

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GYPSOPHILA ERIOCALYX İÇEREN FİTOTERAPÖTİK
NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE OSTEOPOROZ
ÜZERİNE ETKİSİNİN *IN VITRO* VE *IN SILICO* YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ

Sibel ÖZER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Yasemin BUDAMA-KILINÇ

Eş Danışman

Doç. Dr. Serda KECEL-GUNDUZ

Temmuz, 2022

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***GYPSOPHILA ERIOCALYX* İÇEREN FİTOTERAPÖTİK
NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE OSTEOPOROZ ÜZERİNE
ETKİSİNİN *IN VITRO* VE *IN SILICO* YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Sibel ÖZER tarafından hazırlanan tez çalışması 21.07.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Doç. Dr. Serda KECEL GÜNDÜZ
İstanbul Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Musa TÜRKER, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Murat KARTAL, Üye
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ sorumluluğunda tarafımda hazırlanan “*Gypsophila eriocalyx* İçeren Fitoterapötik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Osteoporoz Üzerine Etkisinin *In Vitro* ve *In Silico* Yöntemlerle Değerlendirilmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Sibel ÖZER



Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün FYL-2022-4845 numaralı “*Gypsophila eriocalyx* İçeren Fitoterapötik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Osteoporoz Üzerine Etkisinin *In vitro* ve *In silico* Yöntemlerle Değerlendirilmesi” isimli projesi ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışması sürecimde deneyimleri ve bilgisiyle bana yol gösteren, akademik sürecimdeki en büyük idolüm, kıymetli danışmanım Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez kapsamında desteğini benden esirgemeyen Doç. Dr. Serda KECEL GÜNDÜZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım ve yazım aşamasında bana yardımcı ve destek olan Uygulamalı Nanoteknoloji ve Antikor Üretimi Laboratuvarı baş asistanı doktorant Bahar GÖK'e, baş asistan yardımcısı doktorant Ozan Barış KÜRTÜR'e ve tüm laboratuvar çalışanı arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Kök hücre deneyleri kapsamında desteklerini bizlerden esirgemeyen başta Prof. Dr. Ercüment OVALI 'ya, Muhammer ELEK'e ve tüm Acıbadem Labcell çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında bana destek olan, her zaman yanımda olduklarını bildiğim ve beni her kararında destekleyen babam Seyfi ÖZER ve annem Reyhan ÖZER başta olmak üzere kardeşim Sıla Özer'e ve tüm ÖZER ailesine minnettarım.

Çalışmanın içeriğinin belirlenmesi ve tedarikler noktasında yardımcı olan ve sürecimi şekillendiren Erkan KAYMAK ve Gönül KAYMAK'a teşekkürlerimi sunarım. Sevginin tanımını anlamamı sağlayan, hatırasıyla hep yanımda olduğunu bildiğim kardeşim Abdullah KAYMAK'a minnettarım.

Son olarak sürecimin başından son anına dek yanımda olan, beni cesaretlendiren ve akademik kariyerimin kaygılarını silip atan, sevgisiyle tüm boşluklarımı dolduran ve karanlıklarımı aydınlatan, sabrına ve hayat penceresine hayran olduğum yoldaşım, hayat arkadaşım Sadık Bedirhan KAYMAK'a çalışmamı ve tüm sürecimi ithaf ediyorum.

Sibel ÖZER

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez.....	3
2 GENEL BİLGİLER	5
2.1 Tıbbi Bitkiler	5
2.1.1 <i>Gypsophila eriocalyx</i>	7
2.1.2 Fitoterapötikler	14
2.2 Osteoporoz	15
2.2.1 Osteoblast ve Osteoklast Hücreler (Kemik Hücreleri)	17
2.3 Nanopartiküller	20
2.3.1 Kitosan Nanopartikülleri	22
2.4 <i>In Silico</i> Analizler	27
2.4.1 İlaç Tasarımında Moleküler Yerleştirme	30
3 MATERYAL VE METOT	32
3.1 Deney Kapsamında Kullanılan Malzemeler ve Ekipmanlar	32
3.1.1 Malzemeler	32
3.1.2 Cihazlar ve Ölçüm Yöntemleri.....	33
3.2 Yöntem.....	39
3.2.1 <i>Gypsophila eriocalyx</i> 'in Toplanması	39
3.2.2 <i>Gypsophila eriocalyx</i> 'in Ekstraksiyon İşlemine Hazırlanması	41
3.2.3 <i>Gypsophila eriocalyx</i> Ekstraktı Eldesi	41
3.2.4 <i>Gypsophila eriocalyx</i> Ekstraktının UV-Vis Spektrofotometre Analizi	42

3.2.5 <i>Gypsophila eriocalyx</i> Ekstraktı Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması	43
3.2.6 GEE İçeren Kitosan Nanopartiküllerinin Zeta Sizer ile Analizi	43
3.2.7 ATR-FTIR Analizler	44
3.2.8 GEE İçeren Kitosan Nanopartiküllerinin Yükleme Kapasitesi ve Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması	44
3.2.9 GEE Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin <i>In Vitro</i> Salım Analizi	45
3.2.10 MTT Analizleri	46
3.2.11 <i>In Silico</i> Çalışmalar	47
4 DENEY SONUÇLARI	50
4.1 Nanopartiküllerin Karakterizasyon Sonuçları	50
4.1.1 Kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Boyutu, PdI ve Zeta Potansiyel Analizi.....	50
4.1.2 ATR Analizi Sonuçları	52
4.1.3 GEE Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Yükleme Kapasitesinin ve Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması	52
4.1.4 GEE Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin <i>In Vitro</i> Salım Analizi Sonuçları	54
4.1.5 MTT Analizleri Sonuçları.....	54
4.1.6 <i>In Silico</i> Analiz Sonuçları	56
5 SONUÇ VE ÖNERİLER	67
KAYNAKÇA	80
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	92

SİMGE LİSTESİ

±	Artı-eksi
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
°C	Derece Celsius
g	Gram
C	Karbon
Cl	Klor
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
Nm	Nanometre
cm	Santimetre
Na	Sodyum
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ADME	Emilim, Dağılım, Metabolizma ve Atılım
CatK	Cathepsin K
Covid-19	Küresel Koronavirüs Hastalığı Salgını-2019
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FBS	Fetal Bovin Serum
FDA	Dünya Sağlık Örgütü
ISO	Uluslararası Standartlar Organizasyonu
M-CSF	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum Bromür
NF-kB	Nükleer Faktör kappa B
NIK	Nükleer Faktör kappa B'yi İndükleyen Kinaz
PDB	Protein Veri Bankası
PdI	Polidispersite İndeksi
RANKL	Nükleer Faktör kappa-B Ligandının Reseptör Aktivatörü
RMSD	Atomik Pozisyonların Ortalama Karekök Sapması
RO5	5'in Kuralı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TPP	Tripolifosfat
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge
WHO	Uluslararası Standartlar Organizasyonu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 <i>Gypsophila eriocalyx</i> görüntüleri	8
Şekil 2.2 Saponinlerin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.3 Saponin türleri	11
Şekil 2.4 Rutin bileşiğinin kimyasal yapısı	13
Şekil 2.5 Rosmarinik asit 'in kimyasal yapısı	14
Şekil 2.6 Osteoporoz sürecinde kemik yapısının değişimi	16
Şekil 2.7 Kemiğin yeniden şekillenme sürecinin şematik gösterimi	19
Şekil 2.8 Nanomalzeme çeşitlerinin şematik ve deneysel görüntüleri.	21
Şekil 2.9 Kitinin deasetilasyonu sonrası kitosan oluşumunun şematik gösterimi	23
Şekil 2.10 Kitosanın avantajlı özellikleri	23
Şekil 2.11 <i>In silico</i> yöntemler ve alt başlıkları.....	28
Şekil 3.1 Ohaus hassas terazisi	33
Şekil 3.2 Dlab manyetik karıştırıcısı.....	33
Şekil 3.3 Ohaus marka pH-metre.....	34
Şekil 3.4 Hettich marka santrifüj	34
Şekil 3.5 Witeg marka su banyosu	34
Şekil 3.6 Biobase marka liyofilizatör.....	35
Şekil 3.7 Malvern Zeta Sizer	35
Şekil 3.8 Shimadzu marka spektrofotometre	37
Şekil 3.9 <i>Gypsophila eriocalyx</i> 'in enine kesitinin şematik gösterimi.....	40
Şekil 3.10 <i>Gypsophila eriocalyx</i> dekoksasyon işlemi basamakları.....	42
Şekil 4.1 A) Boş kitosan nanopartikülleri, B) GEE yüklü kitosan nanopartiküllerine ait boyut ve PdI analiz sonuçları	51
Şekil 4.2 A) Boş kitosan nanopartikülleri ve B) GEE yüklü kitosan nanopartiküllerine ait zeta potansiyel analiz sonuçları	51
Şekil 4.3 Numunelerin ATR-FTIR analizleri sonucu	52
Şekil 4.4 <i>Gypsophila eriocalyx</i> ekstraktının kalibrasyon eğrisi	53
Şekil 4.5 GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin <i>in vitro</i> salım grafiği	54

Şekil 4.6 A) GEE'nin ve B) GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin L929 hücre hattı üzerindeki canlılık grafiği.....	55
Şekil 4.7 A) GEE ve B) GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin hBMC hücre hattı üzerindeki <i>in vitro</i> osteojenik proliferasyonu.....	56
Şekil 4.8 A) Gypsogenin, B) Rutin ve C) Rosmarinik asitin CatK reseptörüne bağlanan aktif ligandların yapıları.....	58
Şekil 4.9 A) Gypsogenin, B) Rutin ve C) Rosmarinik asit fitobileşenlerinin CatK reseptörü ve ligandların aktif bağlanma bölgesi etkileşimleri	60
Şekil 4.10 A) Gypsogenin, B) Rutin ve C) Rosmarinik asit fitobileşenleri ve CatK MD sistem yapıları.....	61
Şekil 4.11 A) Gypsogenin, B) Rutin ve C) Rosmarinik asit fitobileşenleri ve CatK MD sistemlerinin RMSD değerleri	62
Şekil 4.12 Gypsogenin molekülünün 50 ns CatK ile etkileşimi.....	63
Şekil 4.13 Rutin molekülünün 50 ns boyunda CatK ile etkileşimi	64
Şekil 4.14 Rosmarinik asit molekülünün 50 ns boyunda CatK ile etkileşimi.....	65

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	<i>Gypsophila</i> türlerinin çeşitli farmakolojik özellikleri	3
Tablo 2.1	<i>Gypsophila</i> türlerinin Türkiye’de dağılımı	6
Tablo 2.2	Saponinler ve özellikleri.....	12
Tablo 2.3	Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanma metotları ve özellikleri	25
Tablo 3.1	Deneyler kapsamında kullanılan malzemeler	32
Tablo 4.1	Zeta Sizer cihazı ölçüm sonuçları.....	50
Tablo 4.2	Zeta Sizer cihazı ölçüm sonuçları.....	51
Tablo 4.3	Osteojenik proliferasyon analiz sonuçları.....	56
Tablo 4.4	CatK ve GEE ait fitobileşenlerinin moleküler yerleştirme analiz sonuçları	57
Tablo 4.5	Fitobileşenlerin teorik ADME özellikleri.....	66

***Gypsophila eriocalyx* İçeren Fitoterapötik Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Osteoporoz Üzerine Etkisinin *In Vitro* ve *In Silico* Yöntemlerle Değerlendirilmesi**

Sibel ÖZER

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Yasemin BUDAMA-KILINÇ

Eş Danışman: Serda KECEL-GÜNDÜZ

Osteoporoz, osteoklastogenez sebebiyle kemik kütlesinde yaşanan azalma ile kemikteki dokunun ve mikro-mimarinin bozulmasıdır. Kemiklerin gücünü kaybetmesi ve direncinin azalması sonucunda yaşanacak basit bir darbe kemik kırıklarına sebep olur. Osteoporoz tedavileri kemik yıkımından sorumlu hücrelerin aktivitelerini azaltmaya yönelik anti-rezorptif ilaçlar ve anabolik ajanların kullanımı ile sınırlıdır. Klinik olarak kullanılan bu ilaçların çoğu sistemik olarak uygulanır ve bu da iskelet dışı dokularda yan etkilere neden olabilir. Bu tür dezavantajları ortadan kaldırmak için araştırmalar, yenilikçi ve alternatif tedaviler oluşturmak amacıyla nanoformülasyonlara yönelmiştir. Osteoporoz tedavi süreçlerini iyileştirmek ve olası yan etkileri önlemek için yenilikçi yaklaşımlardan birisi de tıbbi bitki içerikli kontrollü ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesidir.

Tıbbi bitkiler, ilaç geliştirilmesinde doğrudan kullanılabilir zengin içerik kaynakları olarak kabul edilirler. Bu bağlamda Türkiye’de tanımlanmış 35 cinsi bulunan Caryophyllaceae (Karanfilgiller) familyası türleri de potansiyel tıbbi bitkilerdir. Bu familyanın 3. büyük cinsine ait olan *Gypsophila eriocalyx* Boiss. endemik türü, içerdiği fitokimyasallar sebebiyle, kimyasal kullanımının yanı sıra tıbbi amaçlı kullanıma da elverişlidir. *Gypsophila* türleri saponin içerikleri ile bilinirler ve saponinler antioksidan, anti-tümör, antimikrobiyal, antienflamatuvar gibi çeşitli aktiviteler gösterirler. Bunlara ek olarak saponinlerin anti-osteoporoz etkinlikleri de literatürdeki çeşitli saponin içerikli nanopartikül çalışmalarıyla ortaya konulmuştur. Osteoporozda geleneksel tedavilerin olumsuz etkilerini önlemek amacıyla bitkisel içerikli nanopartiküllerin geliştirilmesi, sistemik toksisiteyi azaltması ve terapötik etkinliği iyileştirmesi sebebiyle alternatif bir tedavi yöntemidir. Bu doğrultuda çalışma kapsamında, *Gypsophila eriocalyx* yüklü kitosan nanopartikülleri sentezlenmiş ve çeşitli spektroskopik (UV-Vis Spektroskopisi, Dinamik Işık Saçılması Spektroskopisi ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) yöntemler ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca *Gypsophila eriocalyx* yüklü kitosan nanopartiküllerinin sitotoksik etkisinin olup olmadığı, L929 hücre hattında MTT testi ile değerlendirilmiştir. Osteojenik proliferasyon analizleri, insan kemik iliği kök hücreleri (hBMC) üzerinde MTT testi ile gerçekleştirilmiştir. Son olarak, *Gypsophila eriocalyx* yüklü kitosan nanopartiküllerinin moleküler seviyede anti-osteoporoz etkinliği, moleküler yerleştirme ve moleküler dinamik simülasyon yöntemleri aracılığıyla incelenerek ortaya konulmuştur. Elde edilen *in vitro* ve *in silico* sonuçlar doğrultusunda *Gypsophila eriocalyx*’in anti-osteoporotik etkisinin olduğu ve tedavi süreçlerinde takviye olarak kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Osteoporoz, *Gypsophila eriocalyx*, saponin, nanopartikül, kitosan

Synthesis of Phytotherapeutic *Gypsophila eriocalyx* Nanoparticles and Evaluation of the Effect on Osteoporosis by *In Vitro* and *In Silico* Methods

Sibel OZER

Department of Bioengineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yasemin BUDAMA-KILINC

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Serda KECEL-GUNDUZ

Osteoporosis is the deterioration of bone tissue and micro-architecture with a decrease in bone mass due to osteoclastogenesis. A simple blow to the bones will cause bone fractures because of low strength and a decrease in their resistance. Osteoporosis treatments are limited to the use of anti-resorptive drugs and anabolic agents to reduce the activities of cells responsible for bone resorption. Most of these clinically used drugs are administered systemically, which may cause side effects in non-skeletal tissues. To eliminate such disadvantages, research has turned to nanoformulations to create innovative and alternative treatments. One of the innovative approaches to improve osteoporosis treatment processes and prevent possible side effects is the development of controlled drug release systems containing medicinal plants. Medicinal plants are considered rich sources of content that can be used directly in drug development.

Within this scope, Caryophyllaceae (Carnations) family species, which have thirty-five genera defined in Turkey, are potential medicinal plants. *Gypsophila eriocalyx* Boiss. is an endemic species, which belongs to the third largest genus of this family, is suitable for medical use as well as chemical use due to the phytochemicals that it contains. *Gypsophila* species are known for their saponin content, and saponins show various activities such as antioxidant, anti-tumor, antimicrobial, and anti-inflammatory. In addition, the anti-osteoporosis content of saponins has been demonstrated by various saponin-containing nanoparticle studies in the literature. Developing medicinal plant extract containing nanoparticles in osteoporosis to prevent the negative aspects of traditional treatments is an alternative treatment method because it reduces systemic toxicity and improves therapeutic efficacy. In this direction, within the scope of the study, chitosan nanoparticles loaded with *Gypsophila eriocalyx* were synthesized and characterization studies were conducted with various spectroscopic (UV-Vis Spectroscopy, Dynamic Light Scattering Spectroscopy, and Fourier-transform Infrared Spectroscopy) methods. In addition, the cytotoxic effect of chitosan nanoparticles loaded with *Gypsophila eriocalyx* was evaluated by the MTT test in the L929 cell line. Osteogenic proliferation assays were performed by MTT assay on human bone marrow stem cells (hBMC). Finally, the anti-osteoporosis activity of *Gypsophila eriocalyx*-loaded chitosan nanoparticles at the molecular level was demonstrated through molecular docking and molecular dynamics simulation methods. In line with the *in vitro* and *in silico* results obtained, it was concluded that *Gypsophila eriocalyx* has an anti-osteoporotic effect and can be used as a supplement in the osteoporosis treatment processes.

Keywords: Osteoporosis, *Gypsophila eriocalyx*, saponins, nanoparticles, chitosan

1.1 Literatür Özeti

Nano-biyoürünlerin çekirdeğini oluşturan ve geniş bir ürün sınıfı olan nanopartiküller, nanoteknoloji alanında geliştirilen en önemli sistemlerden bir tanesidir. Nanopartiküller, hidrofilik veya hidrofobik bir bileşeni, 10-100 nm civarında değişen mikron altı partikül boyutunda iletebilen sistemlerdir. Yapısal olarak nanopartiküller, kapsüllenmiş bileşenleri kimyasal ve enzimatik bozulmadan korurlar. Nanopartiküllerin en büyük avantajlarından bir tanesi de yüzey alanlarının geniş olmasıdır [1]. Sahip olduğu bu özellik sebebiyle nanopartikül içerisindeki bileşenler daha kolay çözünmektedir.

Diğer malzeme sistemleri ile kıyaslandığında nanopartiküller, genişletilmiş yüzey alanları, biyoyararlanımları, kontrollü iletimi sağlamaları ve yüksek stabiliteleri sebebiyle ilaç geliştirilmesi ve ilaçların kontrollü salımı, aşı çalışmaları, otomotiv, kozmetik, tarım gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar [2].

Son yüzyılın odak konularından biri haline gelen nanopartiküllerin üretimi; kimyasal, fiziksel ve biyolojik yöntemler olmak üzere üç başlık altında toplanmıştır. Lazer ablasyon gibi fiziksel yöntemler çok enerji tüketmesi ve radyasyon yayması sebebiyle nanopartikül üretiminde kimyasal ve biyolojik yöntemler fiziksel yöntemlere oranla daha sıklıkla tercih edilirler [3].

İnsan vücudunda destek sağlayan ve şekil oluşturmaya yardımcı olan iskelet yapısı kemiklerden oluşur. Kemik, katı bir çerçeveye entegre edilmiş metabolik olarak aktif hücrelerden oluşan dinamik bir canlı dokudur. Kemiğin ana bileşenleri organik bir matris ve karmaşık bir kristal tuzdur [4]. Sert mineral ile kaplanmış yumuşak kolajenin kombinasyonu, esnek ancak strese dayanıklı bir yapı oluşturur.

Kemikler yetişkinlikten itibaren oluştuğu şekilde kalmazlar. Yetişkin iskeletinde her yıl kemiğin %5-10'u yeniden şekillenir [5]. Sağlıklı bireylerde doğumdan itibaren 20'li yaşlara dek kemik gelişimi devam eder. Bu dönemden sonra kemik yapım ve yıkımı aynı seviyeye gelerek eşitlenir [6].

Halk arasında kemik erimesi olarak da bilinen osteoporoz kemik kütlesinde yaşanan azalma ile kemikteki dokunun yoğunluğunu kaybetmesidir. Osteoporoz sebebiyle kemik gücünde azalma ve kırılma riskinde artış görülebilir.

İnsan hayatının erken evrelerinde belirtisiz ilerleyen osteoporoz, yaş alınması ile kemiklerde oluşan hasarlar sonucunda ortaya çıkmaktadır [7]. İstatistiksel olarak 45 yaş üzerindeki kişilerde ve kadınlarda daha fazla görülmektedir. Osteoporoz insanlarda en sık görülen kemik hastalığıdır ve kişisel endişelerin yanı sıra önemli bir halk sağlığı sorunudur [8]. Sessiz epidemi olarak da adlandırılan osteoporoz dünya çapında geniş kitlelerce araştırılmakta ve alternatif tedavi yöntemleri oluşturulmaya çalışılmaktadır.

Osteoporozun kesin bir tedavisi bulunmamasıyla birlikte hazırdaki tedavi süreçleri sentetik ilaç kullanımları ve takviyeler ile sınırlıdır. Endişe verici yan etkileri sebebiyle hastalıkların tedavilerinde kullanılan sentetik ilaçlar yerini global çapta bitkisel terapötiklere bırakmıştır. Son yıllarda, özellikle COVID-19 pandemi dönemiyle birlikte bitkisel terapötikler üzerine yapılan çalışmalar ivme kazanmıştır [9].

Zengin bitkisel içerikleriyle bilinen Caryophyllaceae familyasına ait endemik bir tür olan *Gypsophila eriocalyx*, yapısında büyük oranda triterpenik saponin ve çeşitli flavonoidler barındırmaktadır [10].

Literatürdeki alışmalarda *Gypsophila* cinsinin farklı türlerindeki içeriklerinin çeşitli farmakolojik etkileri literatürde bildirilmiştir. Literatür zeti Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1 *Gypsophila* türlerinin çeşitli farmakolojik özellikleri

Tür	Farmakolojik Özelliği	Referans
<i>G. paniculata</i>	• Antidiyabetik	[11], [12]
<i>G. pilulifera</i>	• Anti-tümör • Antikanser	[13]
<i>G. trichotoma</i>	• Hepatoprotektif • Antioksidan	[14]
<i>G. arrostii</i>	• Antimikrobiyal • Antikanser	[15]
<i>G. elegans</i>	• Anti-tümör • Transfeksiyon artırıcı	[16], [17]
<i>G. capillaris</i>	• Anti-fungal	[18]

Saponin içerikli bitkilerde anti-osteoporoz etki de literatürde bildirilmiştir. Çemen otunda bulunan steroidal saponinlerin, osteoporoza sebep olan osteoklast hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayan proteinler üzerinde inhibitör davranışları olduğu raporlanmıştır [19]. Başka bir çalışmada *Cimicifuga racemosa*'dan elde edilen triterpenik saponinlerin anti-osteoporoz etkileri *in vivo* deneyler ile raporlanmıştır [20]. Ancak şu ana kadar saponin içeriği bilinen *Gypsophila eriocalyx* ile nanopartikül dozaj formunda yapılan bir çalışma bulunmamaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, tedavi seçeneklerini çoğaltmak ve yenilikçi yaklaşımlar üretmek amacıyla, literatürde çeşitli farmakolojik etkileri bildirilen *Gypsophila* cinsine ait endemik bir tür olan *Gypsophila eriocalyx* ekstraktı içeren kitosan nanopartiküllerinin sentezlenmesi, karakterizasyonunun yapılması, *in vitro* güvenilirlik ve osteoporoza yönelik etkinliklerinin incelenmesidir.

1.3 Hipotez

Tıbbi bitkilerin anti-osteoporoz etkinliklerinin, tedavilere yönelik çalışmaları literatürde mevcuttur. Hastalık çoğunlukla 50 yaş üstü bireylerde görülür ve

herhangi bir kırık oluşmadan belirti göstermediği için erken teşhis edilmesi oldukça zordur. Osteoporoz tedavisine yönelik fitokimyasalların kullanılmasındaki temel mekanizma, hedef molekül, hücre ya da bileşenin inhibisyonuna dayanır. Takviyelerdeki temel tedavi mekanizması ise hedeflerin inhibisyonuyla birlikte ürünün kemik yapısına katılması veya kan akışını hızlandırarak emilimi arttırmasıdır. Sonuç olarak, tedavilerde ek bir ürün olacak şekilde takviyelerin kullanılması hem süreyi azaltacak hem de maliyet açısından büyük bir fayda sağlayacaktır. Bilimsel ve ekonomik temellere dayandırılmış olan tıbbi bitkilerden elde edilen özlerin hastalıkların tedavilerinde kullanılması konusu, son yıllarda ivme kazanmıştır.

Literatürde şu ana kadar osteoporoz problemini önlenmesi/geciktirilmesi için *Gypsophila eriocalyx* yüklü kitosan nanopartikül dozaj sistemine sahip bir takviye ürün geliştirilmemiştir. Çalışma kapsamında sentezlenecek nanopartiküllerin osteoporoz tedavisinde potansiyel bir takviye olacağı öngörülmektedir.

Tez çalışmasının nihai çıktısının, osteoporoz probleminin çözümü için düşük toksisiteye sahip, maksimum verimli bir nano-boyutlu takviye ürünün geliştirilmesinde aday formülasyon olması hedeflenmektedir.

2.1 Tıbbi Bitkiler

Tıbbi bitki kavramı bitkibilimde kullanılan çeşitli türlerin toplam bir ifadesi niteliğindedir. Bitkilerin tıbbi amaç için kullanılması ve incelenmesi de bu tanımlamanın içerisinde yer almaktadır. Tıbbi bitkiler, ilaç geliştirilmesinde farmakopede yer alan veya almayan, sentetik ilaçlarda kullanılabilecek zengin içerik kaynakları olarak kabul edilirler. Bunun bir parçası olarak, bu bitkiler tüm dünyadaki insan kültürlerinin gelişmesinde de kritik bir rol oynamaktadır. Şifalı otlar veya bitkilerin, önemli bir terapötik veya tedavi edici yardımcı madde kaynağı olduğu bilinmektedir [21].

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, bitkisel tıbbın tanımı, şifalı otlar, bitkisel içerikler, bitkisel formülasyonlar ve esas olarak bitkinin parçalarından veya bitkilerinden izole edilen terapötik olarak aktif fito-bileşenlerden oluşan fabrikasyonların bitki özlerini içeren ilaç uygulamasında kullanılmasıdır. Genel olarak, bu bitkisel bileşenler kökler, gövdeler, yapraklar, çiçekler, tohumlar veya yan ürünler dahil olmak üzere bitki kısımlarından izole edilirler [22].

Tıbbi bitkiler, global çapta hastalıkların tedavi süreçlerinde sıklıkla tercih edilmektedirler. Bu kapsam tıbbi bitkilerin yalnızca hastalıkların tedavisi için değil, aynı zamanda sağlık koşulların korunması için potansiyel bir malzeme olarak kullanılmasını da içermektedir. Dünya nüfusunun üçte ikisi, birinci basamak sağlık hizmetleri için bitkisel ilaçlara bağımlıdır. Bunun nedenleri, daha geniş kitlelerce kabul görmesi, insan vücudu ile daha iyi uyumlulukları ve daha az yan etki oluşturmalarıdır [23].

Türkiye hem coğrafi konumu hem de bitki çeşitliliği açısından dikkat çeken ülkelerden bir tanesidir. Günümüze dek tanımlanmış 11.707 tane bitki türü bulunan Türkiye’de, bu bitki türlerinin 3649 tanesi endemiktir.

Bu flora zenginliğinin sebeplerinden bazıları farklı iklimleri barındırması, jeomorfolojik ve jeolojik yapılar, habitat tipleri açısından çeşitlilik şeklinde sıralanabilir [24].

Caryophyllaceae (Karanfilgiller), bir ve çok yıllık otsu, çalı benzeri bitkileri kapsar. Morfolojik olarak yaprakları çoğunlukla karşılıklı, bazen sıralı ve şeritli yapıdadır. Gövdelerinde tohumcuğun geliştiğı nodyumlar bulunur. Çiçek yapılarında çoğunlukla iki eşey gözlenir. Karanfilgiller familyasındaki son moleküler filogeni çalışmaları, 39 aile ve 749 cins içerdiğini bildirmektedir. Kuzey ve Güney yarım kürede, ılıman bölgelerde ve tropikal dağlarda sıklıkla görülürler. Familyanın gen orijini olarak Akdeniz bölgesi düşünölmektedir [25].

Ölkemizde de Caryophyllaceae familyasına ait 35 cins ve 470 civarında tür yetişmektedir. En çok bilinen türleri; kaşık otu, çöven, karanfil otu, sabun otu ve karamuktur. Bu familyanın Türkiye'deki 3 büyük cinsleri, *Silene* (131 tür), *Dianthus* (69 tür) ve *Gypsophila* (50 tür) olarak sıralanabilir. *Gypsophila* cinsi ölkemizde doğal yayılış gösterir ve türlerinin yarısından fazlası endemiktir. *Gypsophila* türlerinin ölkemizdeki dağılımı Tablo 2.1'de verilmiştir [26].

Tablo 2.1 *Gypsophila* türlerinin Türkiye'de dağılımı

<u>Tür</u>	<u>Yetiştiiği Yer</u>
<i>Gypsophila arrostii</i>	Beyşehir, Konya (Orta Anadolu)
<i>Gypsophila bicolor</i>	Van (Doğu Anadolu)
<i>Gypsophila eriocalyx</i>	Çorum, Yozgat (Orta Anadolu)
<i>Gypsophila graminifolia</i>	Başkale, Van (Doğu Anadolu)
<i>Gypsophila perfoliata</i>	Niğde, Konya, Isparta (Orta Anadolu)
<i>Gypsophila venusta</i>	Konya (Orta ve Doğu Anadolu)

2.1.1 *Gypsophila eriocalyx*

“*Gypsophila*” türleri adını jipsli ortamlara uyum sağlaması özelliğinden almaktadır. Özellikle Orta Anadolu’da jipsli olarak bilinen kalsiyum içeriğince zengin topraklarda yetişirler. Türler halk arasında “Çöven”, “Çöğen”, “Helva kökü” gibi farklı isimlerle de anılmaktadır. Farklı türleri gıda, kozmetik, temizlik ürünleri gibi çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır [27].

Çoğunlukla *Gypsophila* taksonları içerdikleri saponin maddesi ile bilinirler. Saponinler köpürme özellikleri sebebiyle deterjan, sabun, yangın söndürücü üretiminde kullanılmaktadır. Türlerin, bunlara ek olarak saponin içeriği dolayısıyla ilaç yapımı ve ağartıcı olarak kullanıldıkları da belirtilmiştir [28].

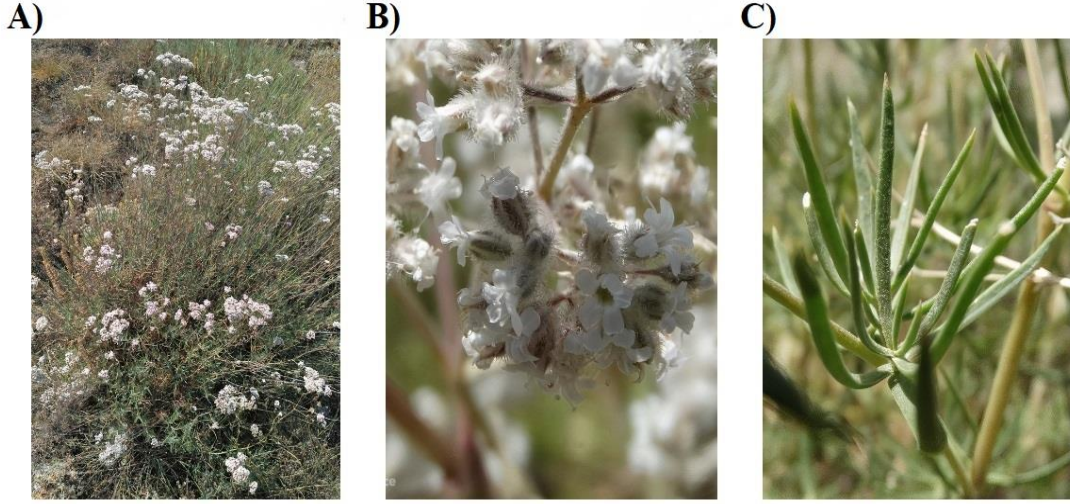
Pek çok bitki içerdiği fitokimyasallar sebebiyle hastalıkların potansiyel tedavisinde kullanılmakta ve hali hazırda araştırılmaktadır. *Gypsophila* cinsine ait olan *Gypsophila eriocalyx* endemik türü de zengin fitokimyasal içeriği sebebiyle farmakolojik açıdan büyük bir potansiyel barındırmaktadır.

Halk arasında “Çorum Çöveni” olarak da adlandırılan *Gypsophila eriocalyx*’in sınıflandırılması şu şekildedir [29],

- ✚ **Alem**, Plantae
- ✚ **Alt alem**, Tracheobionta
- ✚ **Bölüm**, Magnoliophyta
- ✚ **Sınıf**, Magnoliopsida
- ✚ **Altsınıf**, Caryophyllidae
- ✚ **Takım**, Caryophyllales
- ✚ **Familya**, Caryophyllaceae
- ✚ **Cins**, *Gypsophila*
- ✚ **Tür**, *Gypsophila eriocalyx*

Gypsophila eriocalyx çok yıllık olup, kökü 20-30 cm aralığında kazık şeklindedir. Dallanması tabandan dik bir şekildedir. Bitki topraktan çıkarıldığında kökü esnek yapıda olmasına rağmen kurutulduğunda parçalanması oldukça zordur.

Gövde kısmı 1 metreyi bulan bitkinin çiçeklenme dönemi haziran ve temmuz aylarıdır. Bitki çiçekleri oldukça küçüktür ve petalları beyaz renklidir (Şekil 2.1) [30].



Şekil 2.1 *Gypsophila eriocalyx* görüntüleri

A) *Gypsophila eriocalyx*'in erken çiçeklenme dönemi görüntüsü, B) Bitkinin çiçek ve petallarının görüntüsü, C) Bitkinin otsu görüntüsü [31]

2.1.1.1 *Gypsophila eriocalyx* Sekonder Metabolitleri

Bitkiler, yaşamsal faaliyetlerinde bir dizi biyolojik aktivite sergileyen çeşitli organik bileşikler sentezlerler. Bu bileşikler, kullanım amaçlarına göre primer ve sekonder olarak sınıflandırılırlar. Primer metabolitler bitkilerin hayatta kalması için gerekli olan fotosentez, solunum, gelişme ve üreme gibi anabolik ve katabolik olaylara doğrudan katılırlar. Primer metabolitlere örnek olarak organik asitler, vitaminler ve lipitler verilebilir [32].

Sekonder metabolitler ise evrimsel süreçte, bitkilerin çevre koşullarına direnmek veya tozlaşmayı arttırmak amacıyla çeşitli biyotik ve abiyotik streslere maruz kalması sonucunda genetik kazanımlar ile ortaya çıkmış bileşiklerdir. Bu bileşikler bitki dokusunda veya organında bitkiye özgü biyosentetik yollarla sentezlenirler.

Bitki sekonder metabolitlerinin genel fonksiyonları şu şekilde sıralanabilir,

- Bitkiyi patojen saldırılarına karşı korumak,
- Bitkiler arası rekabet güçlerini arttırmak,
- Tozlaşmada görev almak,
- Bitkiyi çevresel faktörlerin değişimi sonucunda ortaya çıkacak stres faktörlerine karşı korumak,
- Allelopatik olarak görev almak,
- Böcekler ile simbiyotik ilişkileri desteklemek,
- Hücresel düzeyde büyüme, gen ekspresyonları ve transformasyon mekanizmalarında görev almak.

Bitki sekonder metabolitleri, biyosentez yollarına göre 3 ana başlık altında toplanabilir. Bunlar,

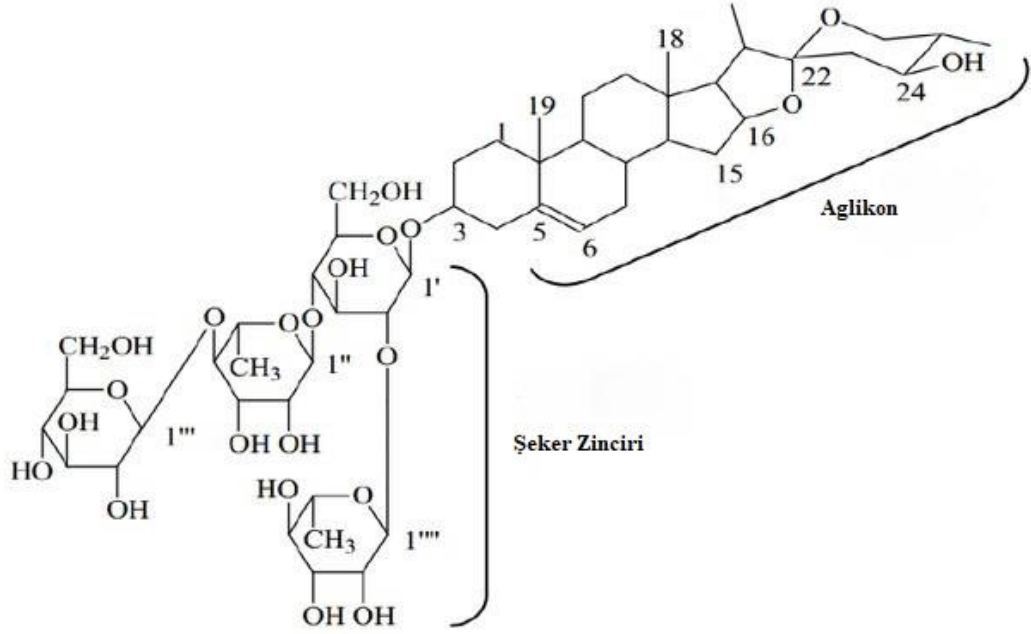
- i. Flavonoidler ve fenolik/polifenolik bileşikler,
- ii. Terpenoidler ve
- iii. Nitrojen içerikli alkaloidler ve sülfür bileşikleridir [33].

Gypsophila türlerinin ana bileşeni olan saponinler, sekonder metabolit gruplarında kimyasal yapısına göre terpenoid olarak değerlendirilirler.

Literatürde *Gypsophila eriocalyx* 'in sulu çözeltilerinde yapılan çalışmalar sonucunda, *Gypsophila* türlerinde ana bileşen olarak bilinen saponin maddesine ek olarak quercetin 3-rutinoside (0.4384 µg/g extract) ve rosmarinik asit (0.4360 µg/g extract) bileşenleri bildirilmiştir [34].

2.1.1.2 Saponinler

Saponinler 27 veya 30 karbonlu, yüksek moleküler ağırlıklı, aglikon çekirdeğine ve sırasıyla en az 6 veya 12 karbon atomu içeren bir veya daha fazla şeker parçasına sahip, doğal olarak oluşan biyoorganik moleküllerdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Saponinlerin kimyasal yapısı [35]

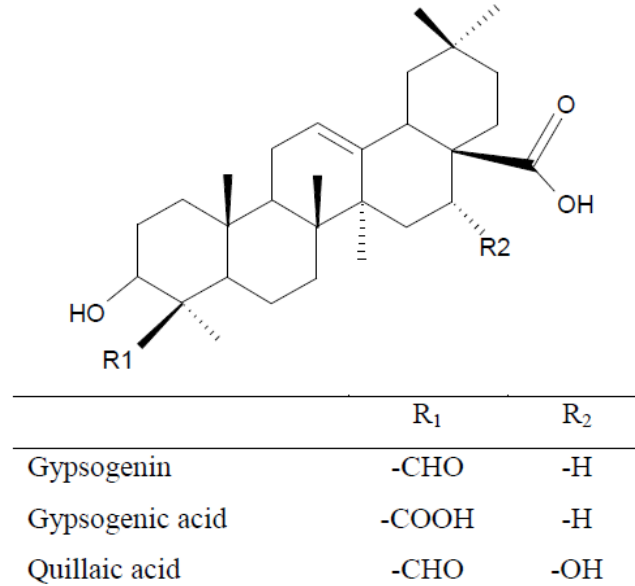
Saponinlerin karbonhidrat içeren kısmı suda çözünürken, sapogenin olarak adlandırılan aglikon ve sakkarit olmayan kısımları yağda çözünür ve bu sebeple yüzey aktif özelliklere sahiptir. Isıl işlemlere karşı oldukça dayanıklı olan saponinlerin biyolojik aktivitelerinde sıcaklığı bağlı azalma görülmez. Bitkiler alemi saponin içeriği açısından oldukça zengindir.

Literatürde 100'den fazla familyada saponin içeren bitkiler bildirilmiştir. Bitkilerdeki saponin miktarları ve çeşitleri bitki fizyolojisinin yanı sıra coğrafi ve çevresel koşullara da bağlı olarak değişir. Saponinler çoğunlukla bitki kökleri ve tohumlarda bulunurlar [36].

Yapısal olarak saponinler, halkalarına bağlı olarak triterpenik (30C) ve steroidal (27C) olmak üzere 2 çeşittir. Triterpenik saponinler pentasiklik yapı sergilerken, steroidal saponinler heksasiklik yapıdadırlar. Steroidal saponinler çoğunlukla tek çeneklilerde (Liliaceae ve Dioscoreaceae gibi), triterpenik saponinler ise iki çeneklilerde (Araliaceae ve Caryophyllaceae gibi) görülür. Saponinler arasındaki çeşitliliğe -OH, -COOH, -CH₃ gibi sapogenin fonksiyonel grupları sebep olmaktadır.

Caryophyllaceae familyasında görülen saponinlerin sapogenin kısmı çoğunlukla gypsogenin, gypsogenic asit veya kuillaik asit içerirler [37].

Literatürde bildirilen veriler dikkate alındığında familyaya ait saponinlerin %46'sı gypsogenin, %33'ü kuillaik asit ve %31'i gypsogenic asit olarak özetlenebilir (Şekil 2.3). Özellikle *Gypsophila* cinsinin türlerinde gypsogenin, %75 oranıyla yapılarında en fazla bulunan bileşendir [38]. Gypsogenin, 3 konumunda bir beta-hidroksil grubu ve 23 konumunda bir okso grubu ile sübstitüe edilmiş olean-12-en-28-oik asit olan bir sapogenindir. Pentasiklik bir triterpenoid, aldehit ve monokarboksilik asittir. Oleanolik asitten elde edilirler.



Şekil 2.3 Saponin türleri [39]

Çeşitli bitkilerden elde edilen farklı türlerdeki saponinler farmakolojik özelliklerine göre medikal ajanlar olarak kullanılırlar. Geçmişte toksik olarak görülen saponinlerin tüketiminin sakıncalı olduğu düşünülse de yapılan çalışmalar neticesinde büyük oranda pozitif etkilerinin olduğu ve sadece bazı türlerinin toksik olabileceği ortaya konulmuştur. Yüksek oranda saponin içeriği besinlere acı bir tat verdiğinden oran sınırlaması ilaç geliştirmede ve gıda sektöründe belirleyici faktörlerden en önemlisidir.

Literatürde antibakteriyel, anti-tümör, antioksidan gibi çeşitli özellikleri yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Literatür özeti Tablo 2.2'de sunulmuştur.

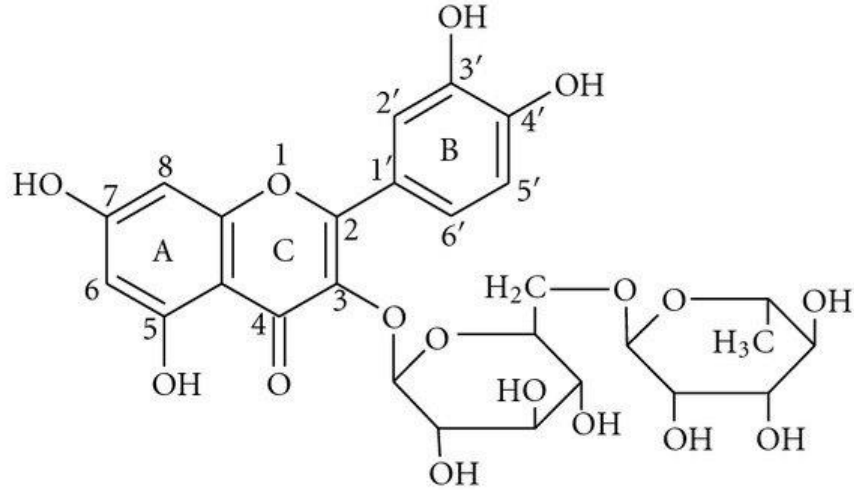
Tablo 2.2 Saponinler ve özellikleri

Tıbbi Bitki	Saponin	Terapötik Kullanımı	Referans
<i>Trillium govanianum</i>	Steroida saponin	Üreme ve adet bozuklukları	[40]
<i>Chlorophytum borivillianum</i>	Triterpenoid ve Steroida saponin	Anti-diyabet ve afrodisyak ajan	[41]
<i>Asparagus racemosus</i>	Steroida saponin	Antioksidan ve antibakteriyel	[42]
<i>Eleutherococcus senticosus</i>	Triterpenik saponin	Romatizma ve ortopedik rahatsızlıklar	[43]
<i>Paris polyphylla</i>	Steroida saponin	Böcek ve yılan zehirleri için panzehir	[44]

2.1.1.3 Rutin (Quercetin)

Quercetin-3-O-rutinoside ve P vitamini olarak da bilinen rutin tıbbi bitkilerde sıklıkla görülen bir flavonoid glikozittir. Bitki özütlerinden elde edilen rutin; elma, narenciye, çay ve karabuğday bitkilerinin başlıca biyoaktif bileşenidir.

Kimyasal olarak 2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3-[α -l-rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -d-glukopiranoziloksi]-4H-kromen-4-one şeklinde adlandırılmaktadır. 610.521 g/mol molar kütleyle sahip rutin ekstrakt edildiğinde sarı renkli toz şeklindedir. Suda nispeten daha az çözünürken piridinde daha kolay çözünmektedir. pKa değeri 6.17 olan rutin yaklaşık 125 °C'de erimektedir [45]. Yapısal olarak flavanol kersetin ve disakkarit rutinoz'un birleşimi şeklindedir (Şekil 2.4). Rutinin biyosentezi fenilalanin ile başlamaktadır.



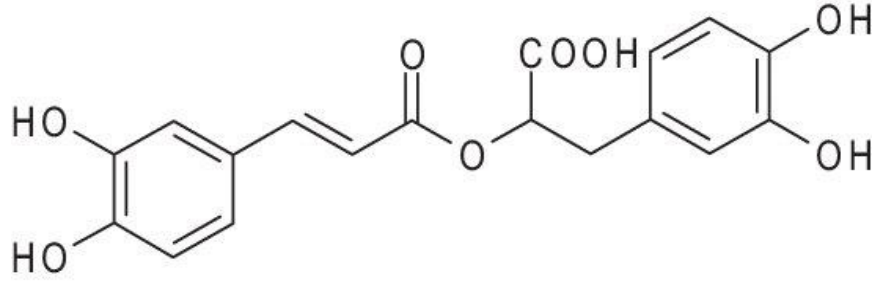
Şekil 2.4 Rutin bileşiğinin kimyasal yapısı [46]

Rutin varis, hemoroit ve iç kanama gibi çeşitli hastalık durumlarını tedavi edebilecek potansiyeli barındırması literatürde bildirilmiştir [47].

Bitki sekonder metabolitlerinin çoğunluğu gibi rutin de güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir [48]. Ek olarak, çok sayıda çalışma rutin antibakteriyel [49], anti-diyabetik [50], anti-kanser [51] gibi çeşitli farmakolojik özelliklerini ortaya koymuştur. Rutinin önemli bir dezavantajı olan suda az çözünürlüğü, yapısındaki şeker molekülüne karboksilat gibi fonksiyonel gruplar eklenmesiyle artırılabilir [52].

2.1.1.4 Rosmarinik asit

Rosmarinik asit (ao-caffeoil-3,4-dihidroksifenil laktik asit) pek çok bitkide bulunan ve suda çözünen bir fenolik bileşik ve kafeik asit esteridir. Yapısal olarak polifenol olan rosmarinik asit; kekik otu, biberiye ve adaçayının ana bileşenidir (Şekil 2.5). Antioksidan aktivitesi çok yüksek olan rosmarinik asit Japonya'da taze deniz ürünlerinde raf ömrünü uzatmak amacıyla gıda koruması ve paketlemede kullanılmaktadır [53].



Şekil 2.5 Rosmarinik asit 'in kimyasal yapısı [54]

Rosmarinik asit, antioksidan [55], anti-inflamasyon [56], nöroproteksiyon [57] ve kardiyoproteksiyon [58] gibi terapötik özellikleri sebebiyle medikal ve gıda uygulamalarında büyük bir potansiyele sahiptir.

2.1.2 Fitoterapötikler

Fitoterapi, bitki kısımlarının doğrudan ya da farklı kısımların bir kombinasyonu olacak şekilde hazırlanmış, hastalıkları iyileştirici, tedavi edici ve önleyici olarak gerçekleştirilen bir tedavi yöntemidir. Kanıta dayalıdır, rasyoneldir, allopatiktir ve süreç esnasında hangi etken madde gruplarının direkt ya da dolaylı olarak sorumlu olduğu bilinmektedir.

Fitoterapötikler bitkilerde farklı işlevleri yerine getiren toksinlerin, feromonların, fitoaleksinlerin ve allelokimyasalların bir bütünüdür. Fitoterapide kullanılan 'fito-ilaçlar' fitoterapötikler adını almaktadır [59]. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre, dünya nüfusunun %80'i tedavilerinde ilk basamak olarak bitki özlerini ve geleneksel tıbbi kullanmaktadır [60].

Son yıllarda geliştirilen bitkisel fitoterapötik yapıları ürünler bitkisel destekler olarak adlandırılmaktadır ve formülasyonlardan üretim süreçlerine kadar olan tüm adımlar FDA tarafından kontrol edilmektedir. Fitoterapötikler kullanım alanlarına bağlı olarak verimlerini arttırmak ve daha etkili hale getirmek için biyomalzemeler ile birleştirilirler.

2.2 Osteoporoz

Kemik çoğunlukla kolajen içerikli, canlı ve büyüyen bir dokudur. Kolajen kemikte yumuşaklığı sağlayan çerçeve proteini görevi görürken, kalsiyum ve fosfat içerikleri bu çerçeveyi güçlendirmekte ve sertlik sağlamaktadır. Kemiklerdeki bu kolajen ve mineral kombinasyonları strese dayanacak kadar güçlü ancak esneyebilen bir yapı oluşturmaktadır. Kemikler bir araya gelerek iskelet yapısını oluştururlar.

Yetişkin iskeleti iki tür kemik içerir: kortikal (kompakt) ve trabeküler (süngerimsi veya süngerimsi) kemik. Kortikal kemik, kemiğin yoğun dış kabuğunu oluşturur ve insan iskeletinin yaklaşık %80'i bu kemikten meydana gelmektedir.

İskeletin geriye kalan %20'si, kemiğin iç tabakasını oluşturan ve petek benzeri bir yapıya sahip olan trabeküler kemiktir. Kortikal kemikten daha büyük bir yüzey alanına sahiptir ve yeniden şekillenmesi daha hızlıdır. Trabeküler kemik ayrıca artan kemik döngüsü ile ilişkili koşullardan kortikal kemiğe göre daha hızlı etkilenir ve bu nedenle kemik kaybına karşı hassastır. Kemiklerdeki yenilenme hayat boyunca devam etmektedir. İnsanlarda kemiklerin yeniden şekillenmesinin %80'i trabeküler kemikte meydana gelmektedir [6].

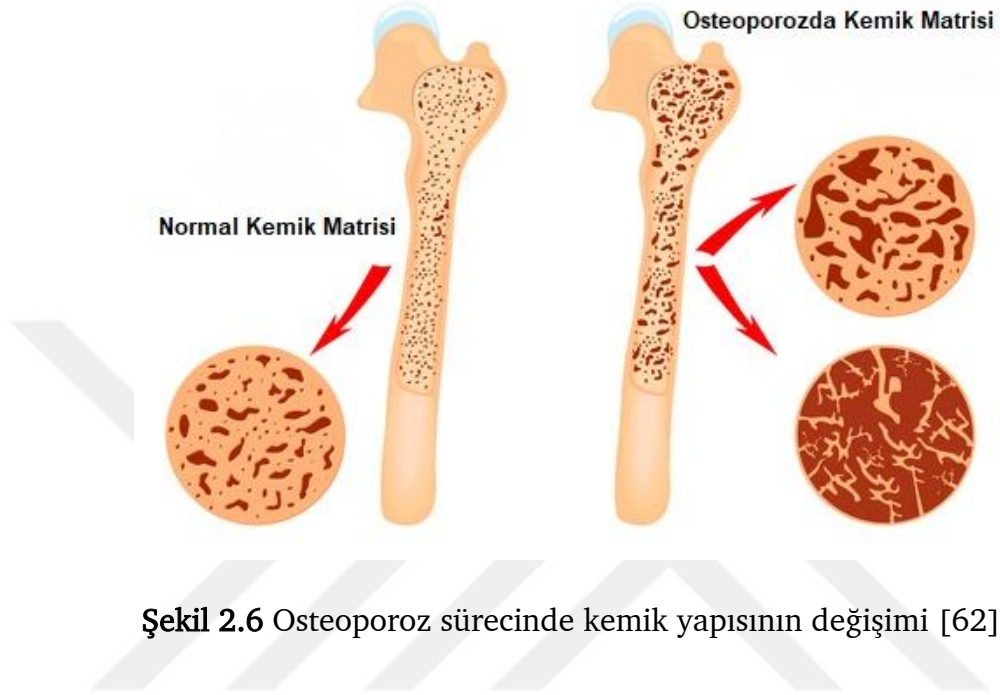
Kemikler yetişkinlikten itibaren olduğu şekilde kalmazlar. Doğumdan itibaren kemikler sürekli olarak yeniden şekillenir. Yeniden şekillenme, iskelet boyunca tek tip olarak değil, farklı bölgelerde görülmektedir. Yeniden şekillenmenin %80'i trabeküler kemikte meydana gelir. Kemik yapım ve yıkımlarında durum farklıdır. Kemik yapımı ilk yetişkinlik döneminin erken safhalarına (27-30 yaş) dek devam eder ve sonrasında yapım ile yıkım eşit seviyede devam eder [61].

Osteoporoz, çeşitli sebeplere bağlı olarak kemiklerde incelme ve kütle azalmasıdır (Şekil 2.6). Osteoporozun sebeplerinden bazıları,

- Aşırı alkol ve tütün ürünleri kullanımı,
- Düşük egzersizli bir yaşam tarzı,
- Hormonsal ve genetik sebepler,
- Aşırı hayvansal gıda tüketimi,

- Duygusal stres şeklinde sıralanabilir.

Kemikler bunların bir sonucu olarak daha kırılgan hale gelir ve trabeküler kemik bölgeleri olarak da adlandırılan özellikle kalça, omurga ve bilek kemiklerinden kolayca kırılır.



Şekil 2.6 Osteoporoz sürecinde kemik yapısının değişimi [62]

Dünya genelinde doğrudan osteoporoza bağlı olarak kalça kırığı yaşayan hasta sayısının 200 milyondan fazla olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye’de de artan yaşlı nüfusu sebebiyle osteoporoz önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir [63].

Yalnızca Birleşik Krallık ’ta üç milyondan fazla insanın osteoporoza sahip olduğu ve düşük kemik kütlesi ile ilişkili kırıkların her yıl yaklaşık 500.000 kişiyi etkilediği tahmin edilmektedir. Osteoporoz sebebiyle elli yaş üstü her 3 kadından 1’i ve her 5 erkekten 1’inde kemik kırıkları görülmektedir [64]. Osteoporozun bireylerde sebep olduğu kırıklar ve kırılganlıklar, artan morbidite ve mortaliteye yol açarak global çapta büyük bir sosyal yüke neden olmaktadır.

Osteoporozun keşfedilmiş bir tedavisi olmaması sebebiyle stratejiler çoğunlukla rezorptif ilaçlar ve anabolik ajanlar ile sınırlıdır. Anti-osteoporotik ilaçlar genel başlığı altında toplanan bu takviyeler ya kemik rezorpsiyonunu hedef alırlar ya da kemik oluşumunu desteklerler. Bu tür ilaçların tedavi yöntemi olarak kullanılması da çeşitli yan etkilere veya kırılmalara neden olabilir.

Örneğin, 50 yıldan fazla bir süredir osteoporoz tedavisinde sıkça kullanılan bifosfonatlar, osteoporozu azaltmada oldukça etkilidir ancak kullanıldığı süre boyunca kandaki kalsiyum seviyesinin düşmesine sebep olur. Bu düşüşü dengelemek amacıyla alınacak kalsiyum takviyeleri tedavi sonunda hiperkalsemi'ye sebep olabilir ve bu da yine kemiklerin zayıflamasıyla sonuçlanacaktır.

Osteoporoz tedavisinde ilaç kullanımının, konsantrasyonların ve dağıtımların optimizasyonu ile kontrol altında tutulması ve süreçlerin iyileştirilmesi, daha verimli bir tedavi süreci ile sonuçlanacaktır. Bu bağlamda, nano malzemeler ideal ve yenilikçi bir tedavi yöntemi olarak görünmektedir [65].

Nanopartiküller yapısal olarak kemiklerin mikro mimarisine benzemesi sebebiyle tedavileri iyileştirme ve strateji belirlemede büyük bir potansiyel olarak kabul edilirler. Nanopartiküllerde inorganik mineraller ve matrisler aynı kemik dokusunda olduğu gibi nano boyutta bir araya getirilebilir.

Tüm bunlara ek olarak nanopartiküller, osteoporozdaki kullanımlarına yönelik en büyük avantajlarından birisi olan komşu proteinlerin ve hücrelerin adsorpsiyonunu ve biyoaktivitesini destekleyecek yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahiptir. Nanopartiküller bünyelerinde barındıracakları biyoaktif ajanları kapsülleme veya yüzeye tutunma yoluyla stabilize edebilir, böylece molekül içselleştirmesini onaylayabilir, hücreler tarafından dağıtımını hedefleyebilir ve planlanan hedefte biyolojik faktörlerin salınımının kontrolüne izin verebilirler.

Bu kapsamda nanopartiküller, osteoporoz sırasında kemik büyümesini uyarabilir ve destekleyici bir potansiyel sunabilir. Nano bazlı malzemelerin bu özellikleri, ilaç dağıtım ve kemik dokusu rejenerasyonu alanında osteoporoz tedavisi için ayrı ayrı veya birlikte kullanılabilirler.

2.2.1 Osteoblast ve Osteoklast Hücreler (Kemik Hücreleri)

Osteoklastlar, kemik rezorpsiyonuna sebep olan büyük hücrelerdir. Kemik iliğinde oluştuktan sonra kanda dolaşan miyeloid/monosit soyundaki öncülerden türetilirler. İki veya daha fazla birbirine kaynaşmış hücrelerden oluşurlar, çok çekirdeklidirler. Kemik mineralinin yüzeyinde, eriyen kemiğin yanında bulunurlar [66].

Osteoblastlar hücreleri yeni kemik hücrelerini oluştururlar. Osteoklastlara benzer şekilde kemik iliğinde üretilirler. Tek çekirdekleri vardır. Osteoblastlar kemik oluşturmak için ekipler halinde çalışırlar [67].

Kemiklerin yeniden şekillenmesi süreci, eski veya hasarlı kemiğin osteoklastlar tarafından uzaklaştırıldığı ve yerine osteoblastlar tarafından oluşturulan yeni kemiğin yerleştirildiği bir süreçtir.

Bu süreçte osteoblastlar ve osteoklastlar hücreden hücreye doğrudan temas yoluyla iletişim kurarlar. Bu etkileşimlere farklı sinyaller, faktörler ve moleküller eşlik eder.

Osteoklast-osteoblast iletişimleri 3 çeşittir. Bunlar,

1. Osteoklastlar ve osteoblastlar, doğrudan temas kurabilirler. Bu temas zara bağlı ligandların ve reseptörlerin etkileşime girmesini kapsar.
2. Boşluk bağlantıları oluşturabilirler. Bu bağlantı hücreler arasındaki küçük suda çözünür moleküllerin geçişine izin verir.
3. Kemik rezorpsiyonu sırasında osteoklastlar, osteoblastlar tarafından kemik matrisinde biriktirilen molekülleri serbest bırakabilir.

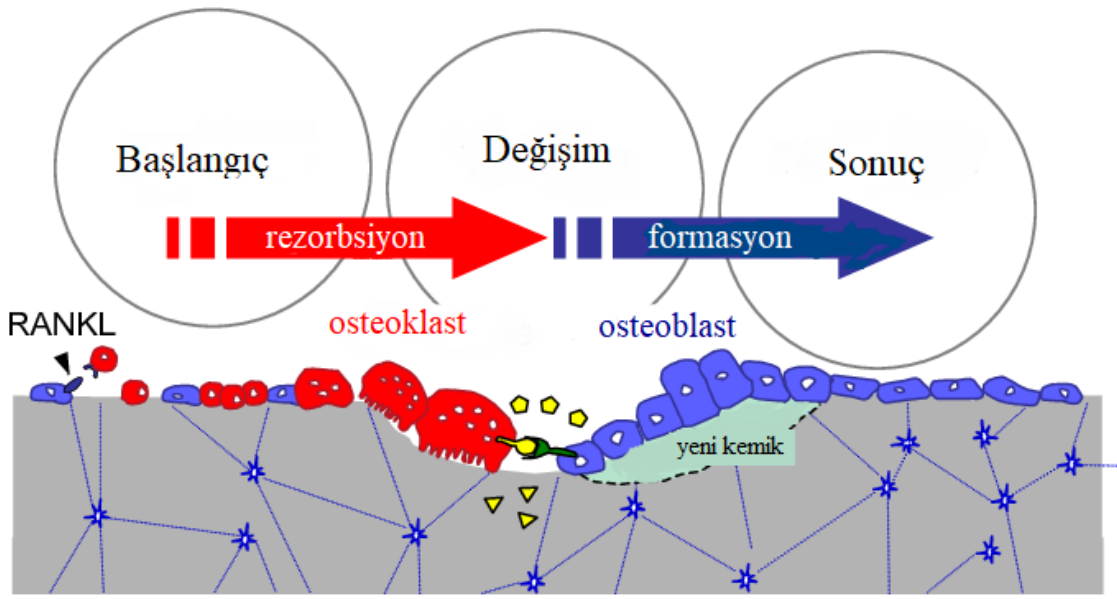
Üç iletişim modu da kemiğin yeniden şekillenmesini düzenlemektedir. Yeniden şekillenme sürecinde osteoklastlar tarafından kemik rezorpsiyonunu osteoblastik kemik oluşumu takip eder, böylece emilen boşluklar osteoblastlar tarafından orijinal seviyesine kadar doldurulur [68]. Bu süreç üç ana aşamadan meydana gelir: yeniden şekillenmenin başlaması, değişimi (geçiş) ve sonlandırılması (Şekil 2.7).

Başlangıç evresi, osteoklast öncüllerinin çağırılmasını, osteoklastların farklılaşması ve aktivasyonunu ve kemik rezorpsiyonunun sürdürülmesini içerir. Osteoklastik kemik rezorpsiyonu insan kemiğinde yaklaşık üç hafta sürer.

Değişim fazı, osteoklastik kemik rezorpsiyonunun engellendiği, osteoklastların apoptoza uğradığı ve osteoblastların toplanıp farklılaştığı bir dönemdir. Emilen yüzey, değişim aşamasında kemik oluşumu için hazırlanır.

Sonlandırma aşaması, yeni kemik (osteoid) oluşumu, mineralizasyon ve durgunluğa girişi içerir.

İnsanlarda yaklaşık üç ay süren osteoblastik kemik oluşumu, osteoklastik kemik rezorpsiyonundan çok daha yavaş bir süreç olduğundan, sonlandırma fazı başlama fazından çok daha uzundur. Sonlandırma fazı sırasında, osteoklastik farklılaşma görünüşte inhibe edilir [69].



Şekil 2.7 Kemik yeniden şekillenme sürecinin şematik gösterimi [69]

Kemik yeniden şekillenmesinde ve bu süreçte kurulan hücreler arası iletişimlerde, osteoporoza yönelik hedef alınabilecek bazı potansiyel faktörler şu şekildedir,

1. Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (M-CSF)

Osteoklastların hayatta kalmasına, çoğalmasına, farklılaşmasına ve hareketliliğine izin veren bir büyüme faktörüdür. Osteoblastlardan ve kemik iliği stromal hücrelerinden salgılanırlar. Üretilmeleriyle birlikte C-FMS adlı yüzey reseptörlerine bağlanırlar. Osteoporoza yönelik tedavi geliştirici sistemlerde M-CSF'nin hedef olarak

belirlenmesi ve sinyal yolunun bloke edilmesi, osteoklastların aktivitesini büyük oranda azaltacaktır [70].

2. NF-kB (Nükleer Faktör-Kappa B) Ligandının (RANKL) Reseptör Aktivatörü

RANKL, osteoklastların ve osteoklast öncülerinin yüzeyindeki NF-kB'nin (RANK) reseptör aktivatörü olan aynı kökenli reseptörüne bağlanır ve osteoklastların farklılaşmasına, füzyonuna ve aktivasyonuna yol açar. RANKL'in aşırı ekspresyonu, artan osteoklast aktivitesi ile şiddetli osteoporoza yol açar [71].

3. Cathepsin K (CatK)

Ana işlevi kemik rezorpsiyonuna aracılık etmek olan CatK, lizozomal sistein proteaz ailesindeki proteazlardan biridir. CatK kemik emilimi sırasında kolajen ve diğer matris proteinlerini parçalamak için çoğunlukla osteoklastlar tarafından salgılanır. Anti-osteoporoz ilaç geliştirme için en çekici hedefler arasındadır ve ilaç firmaları tarafından çalışılmaktadır. Şu ana kadar CatK inhibitörü ve FDA onaylı bir ilaç geliştirilmemiştir [72].

4. NF-kB indükleyen kinaz (NIK),

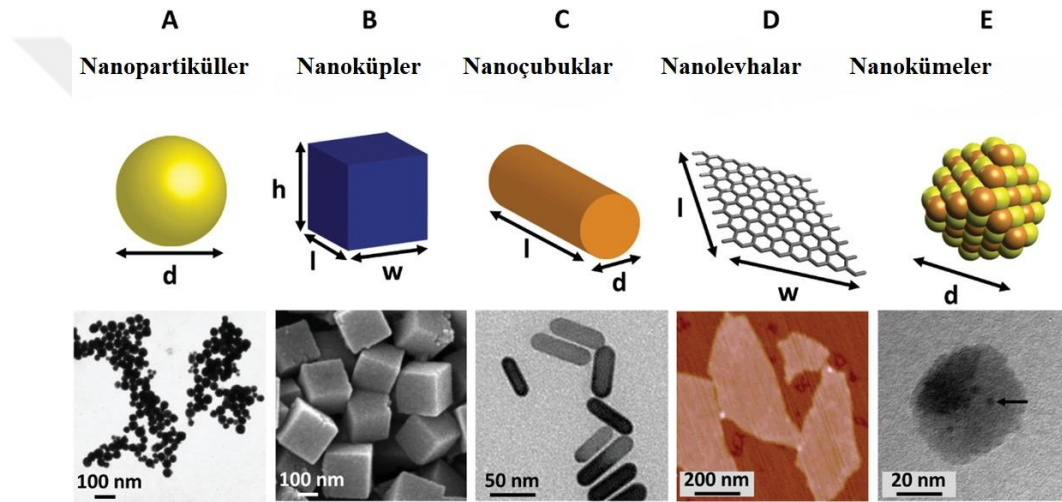
NIK, osteoklast farklılaşmasında kritik bir yol olan NF-kB yolunun aktivasyonunu kontrol eder. NIK'in aktivasyonu osteoklastogeneze ve kemik rezorpsiyonuna sebep olduğundan inhibisyonu osteoklastların farklılaşmasını ve çoğalmasını önleyecektir [73].

2.3 Nanopartiküller

Nanoteknoloji farklı, yeni ve gelişmiş fizikokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip ürünler ortaya koymak amacıyla nano ölçekteki materyalleri kullanan yöntem ve yaklaşımlar bütünüdür. Nanometre ölçeğini kontrol ederek yeni fenomenlerin ve özelliklerin kapsamlı bir şekilde yapılandırılmasını ve kullanımını amaçlar.

Atomik veya moleküler yapılar arasında bir köprü kurması sebebiyle nanoteknolojiden sağlık, biyoteknoloji, nanomedikal gibi pek çok alanda yararlanılmaktadır [74].

Nanoteknoloji kullanılarak malzemeler, hali hazırda özelliklerinin yanı sıra daha güçlü, daha hafif, daha dayanıklı, daha reaktif, daha gözenekli gibi çeşitli özellikler kazanabilirler. Nanoteknolojinin bütününde kullanılan malzemeler genellikle biçimsel olarak nanopartiküller, nanoküpler, nanoçubuklar, nanolevhalar ve nanokümeler olarak sınıflandırılırlar.



Şekil 2.8 Nanomalzeme çeşitlerinin şematik ve deneysel görüntüleri.

(A) Gümüş nanoparçacıkların TEM görüntüsü, B) $\text{ZnSn}(\text{OH})_6$ nanoküplerin SEM görüntüsü, C) Altın/gümüş hibrit nanoçubukların TEM görüntüsü, D) Grafen nano tabakalarının AFM görüntüsü, E) Bakır nanokümelerin TEM görüntüsü [75].

Nanopartiküllerin uygulamaları, insanlarda hastalıkların teşhis ve tedavisinde yeni olanaklar sağlayan ve umut verici bir alandır. Nanopartiküller çoğunlukla 1-100 nm aralığında bir çapa sahiptirler. Nanopartikül boyutları kullandıkları alanlara göre farklılık göstermektedir. Yüzey alanlarının geniş olması ve fonksiyonel grupları barındırması sebebiyle tanısız olarak veya terapötik ajanları birleştirmek için kullanılabilirler.

Genel olarak, nanopartiküller diğer partikül tiplerine kıyasla daha güçlü, daha hafif, daha reaktif ve iletkendir.

Nanopartiküllerin geliştirilmesi, nanotıp alanını desteklemek amacıyla, hastalıkların teşhisi ve tedavisi için terapötiklerin ve ajanların kullanılması gibi sayısız uygulama ve çalışma imkanı sunmaktadır [76]. Son gelişmelerle birlikte nanoteknoloji çalışmaları, bitkisel ilaçlara dayalı yeni ilaç dağıtım sistemlerinin ve formülasyonların geliştirilmesine odaklanmıştır. Bitkisel ilaçlar ile konjuge nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi iki şart etrafında şekillenmektedir.

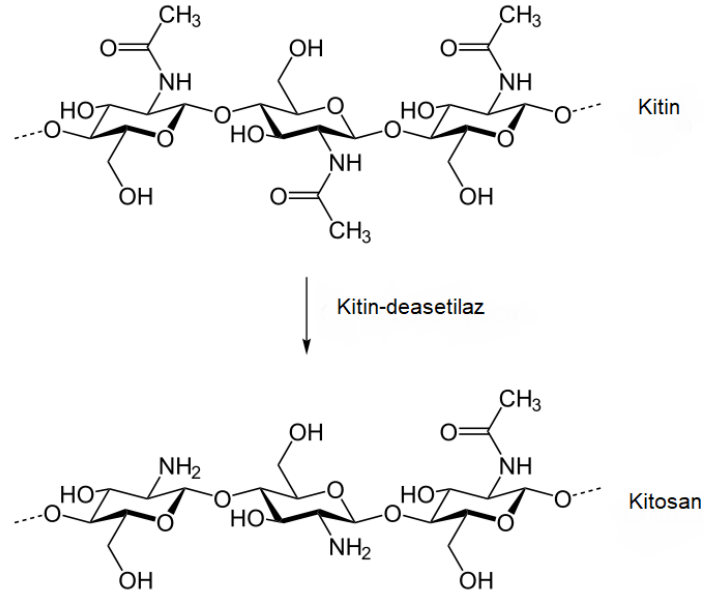
İlk olarak, terapötik olarak aktif kısımları, tedavi boyunca vücuda gerekli oranda ve vücudun ihtiyaç duyduğu orana göre iletmelidirler.

İkinci olarak, aktif kısımları vücudun hedeflenen bölgelerine (hücreler veya dokular) iletilmelidirler. Literatüre göre, çok uzun salınımlı dozajlar bu ideal koşulları sağlamamaktadır [77].

Bitkisel ilaçlar için nano dağıtım sistemleri, dozajın sıklığını azaltma potansiyelinde, çözünürlüğü ve Emilimi arttırılmış ilaç dağıtım sistemlerini içerir. Bitkisel ilaçlarla ilgili olarak nanopartiküllere dayalı ilaç dağıtım sistemleri, tüm dağıtım sistemleri arasında en önemlilerinden biri olarak kabul edilmiştir. Nanopartiküller, bitkisel ilaçları tek tek organlara, hücrelere ve dokulara hedeflemek için özel olarak kullanılabilir ve bu da ilacın hedefleme kabiliyetini, etkinliğini ve güvenliğini ortaya koymaktadır.

2.3.1 Kitosan Nanopartikülleri

Kitosan, rastgele dağılmış β -(1-4) bağlı D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin birimlerinden oluşan lineer bir polisakkarittir ve kabukluların dış iskeletinde bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilir (Şekil 2.9) [78].



Şekil 2.9 Kitinin deasetilasyonu sonrası kitosan oluşumunun şematik gösterimi [78]

Kitin ile kitosan, selülozdan sonra en bol bulunan ikinci polisakkarit olarak kabul edilirler. Kitosan biyolojik özellikleri ve geniş uygulama alanları sebebiyle biyomedikal çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 2.10).

Kitosanın kullanımının avantajlarından bazıları şu şekilde sıralanabilir,



Şekil 2.10 Kitosanın avantajlı özellikleri [79]

Kitosan iyonik çapraz bağlar oluşturabilir ve bu özelliği kontrollü ilaç salımında uzun bir süre boyunca ilacı salan stabil kompleksler oluşturmasını sağlar. Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında literatürde bildirilmiş pek çok farklı yöntem bulunmakta ve kullanılmaktadır.

İyonik jelleşme, mikro emülsiyon, emülsifikasyon gibi çeşitlendirilen yöntemlerde hangisinin tercih edileceği gerekli olan partikül boyutu, aktif maddenin kimyasal ya da termal stabilitesi, salım kinetik profilleri gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [80]. Yöntemler arasında iyonik jelleşme yöntemi basit ve diğer yöntemlere kıyasla pek çok avantajı olduğundan kitosan nanopartiküllerinin sentezlenmesinde sıklıkla tercih edilir.

İyonik jelleşme yöntemi, nanopartikül sentezi için zıt yüklü makromoleküller arasındaki kompleksleştirme mekanizmasına dayanır. Yöntem, reaktiflerin olası toksisitelerinden ve istenmeyen etkilerinde kaçınmak amacıyla kimyasal bağlama yerine elektrostatik etkileşim yoluyla tersinir fiziksel çapraz bağlama uygular.

Yöntem kapsamında kullanılan tripolifosfat (TPP), katyonik kitosan ile elektrostatik kuvvetler yoluyla etkileşime girebilen bir polianyondur. Asidik çözelti içerisinde çözdürülen kitosan, TPP çözeltisine eklendiğinde moleküllerin NH_3 grupları çapraz bağlı kitosan nanopartikülleri oluşturmak için TPP'nin negatif yüklü fosforik iyonları ile reaksiyona girer. Sonuçta istenilen bileşenler ile yüklenebilecek kitosan nanopartikülleri elde edilir. İyonik jelleşme yöntemi çok ekonomik ve basit olması, daha az ekipman ve zaman gerektirmesi sebebiyle diğer üretim yöntemlerine kıyasla sıklıkla tercih edilmektedir.

Osteoporozun tedavisine yönelik çalışmalarda kullanılan terapötik nanopartiküllerin sentezlenmesinde iyonik jelleşme yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir. Örneğin bir çalışmada, osteoporozu tedavi etmek için İbandronat-sodyum yüklü kitosan nanopartikülleri iyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir [81].

Başka bir çalışmada, menopoz sonrası kadınlarda osteoporoz tedavisine yönelik sıklıkla kullanılan Alendronat sodyum kitosan nanopartiküllerine iyonik jelleşme yöntemiyle enkapsüle edilerek sentezlenmiş ve hedefe yönelik etkileri analiz edilmiştir [82].

Başka bir çalışmada, kitosan oligosakkaritleri iyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenmiş ve yenilikçi bir oral kalsiyum dağıtım sistemi elde edilmiştir [83]. Sentezler sonrası elde edilen kalsiyum nanokapsüllerinin kalsiyum emilimini

teşvik ettiğini ve kemik hastalıklarında ilaç dağıtım sistemi olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Bir diğer çalışmada kartogenin-kitosan konjuge nanopartikülleri iyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir [84]. Elde edilen sonuçlar, kullanılan sentez yönteminin hidrofobik kartogeninin suda çözünürlüğünü arttırdığını ve aynı zamanda vücuttaki ilaç farmakokinetiğini ve terapötik etkinliğini de geliştirdiğini göstermiştir.

İyonik jelleşme yönteminin osteoporoz için sunduğu avantajlardan en önemlisi, geliştirildiği yöntem itibariyle karakterizasyonunun da kolay olmasıdır. Organik solventler ve diğer toksik içerikli olabilecek maddeleri ve reaksiyonları kullanmaması sebebiyle ölçüm safsızlıkları ve diğer istenmeyen etkiler elenmektedir. Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanmasında iyonik jelleşme yönteminin alternatif metotlarla karşılaştırılması Tablo 2.3 'de verilmiştir [85].

Tablo 2.3 Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanma metotları ve özellikleri

<i>Metot</i>	<i>Prencip</i>	<i>Avantajlar</i>	<i>Dezavantajlar</i>	<i>Kaynak</i>
<u>İyonik jelleşme</u>	İyonik çapraz bağlama	• Hafif kimyasalların kullanımı • Basit süreç • NP boyutunu ayarlama kolaylığı	-	[85]
<u>Emülsifikasyon ve çapraz bağlama</u>	Kovalent çapraz bağlama	• Basit işlem adımları	• Zararlı kimyasalların kullanımı	[86]

Tablo 2.4 Kitosan nanopartiküllerinin hazırlanma metotları ve özellikleri
(devamı)

<u>Ters miseller</u>	Kovalent çapraz bağlama	• 100 nm'nin altındaki ultra ince NP'ler	• Zaman alıcı süreç • Karmaşık uygulama • Zararlı kimyasalların kullanımı	[87]
<u>Faz inversiyon ve Emülsiyon-damlacık birleşimi</u>	Çökelme	• Belirli bileşikler için yüksek kapsülleme kapasitesi	• Yüksek kesme kuvveti gerektirir • Zararlı kimyasalların kullanımı	[88]

Kitosan nanopartiküllerinin osteoporozla yönelik kontrollü ilaç salımı çalışmaları kapsamında geliştirilmesi ve kullanılması literatürde kendine yer edinmiş bir çalışma alanıdır.

Örneğin anti-osteoporoz nanopartiküllerin geliştirilmesine yönelik bir çalışmada, osteoporozun tedavisine yönelik raloksifen hidroklorür içeren kitosan nanopartikülleri iyonik jelleşme yöntemiyle sentezlenmiştir [89]. Çalışma sonucunda intranazal yolla uygulanacak ilaç yüklü kitosan nanopartiküllerinin yüksek biyoyararlanımda olduğunu ve potansiyel bir tedavi olabileceğini ortaya konulmuştur.

Başka bir çalışmada, osteoporozun yönetimi ve tedavisi için risedronat ile işlevselleştirilmiş kitosan nanopartiküllerini geliştirilmiştir [90]. Geliştirilen risedronat ile fonksiyonelleştirilmiş kitosan nanopartiküllerinin, osteoporotik

sıçanlarda ovariektomi ve risedronata dayalı yaygın ilaç tedavisine kıyasla kemik oluşumunu uyarmada oldukça etkili olduğu bildirilmiştir.

Literatürden örnek verilen çalışmalar, osteoporozu tersine çevirmek veya tedavi etmek için kitosan nanopartiküllerinin kullanılmasının yenilikçi bir yaklaşım olduğunun kavram kanıtı niteliğindedir.

2.4 *In Silico* Analizler

Bilgisayar simülasyonları yardımıyla gerçekleştirilen deneyler *in silico* deneyler olarak adlandırılırlar. Biyolojik sistemlerin karmaşası ve hassasiyeti sebebiyle, kaynaktan ve zamandan tasarruf etmek amacıyla *in silico* yöntemler sıklıkla tercih edilmektedir. Yöntemlerin tek başına veya *in vitro/in vivo* yöntemlerle eş zamanlı kullanılması deneysel aşamaların verimini de arttırmaktadır. *In silico* çalışmalar sözlük tanımıyla; hücreler, moleküller, dokular ve diğer bileşenler arasındaki sistemsel etkileşimlerin bilgi işleme temsillerini, çeşitli ve büyük veri kümelerini, çok ölçekli ağları ve prosedürel bilgiyi matematiksel formalizmler yoluyla entegre ederek hesaplama ve inceleme imkanı sunmaktadır [91]. Hesaplamalı modelleme ve alt dallarında, model oluşturma süreci, bilimsel bir problem veya çoğunlukla geniş kapsamları sebebiyle geleneksel olarak ele alınması güç olan bir soru etrafında ifade oluşturmayı amaçlamaktadır.

Bu süreç disiplinler arası olarak ilerler ve çözme faaliyeti matematik temellerine dayandırılarak gerçekleştirilir. Modelleme yöntemlerinden faydalanan alanlardan bazıları şu şekilde sıralanabilir [92],

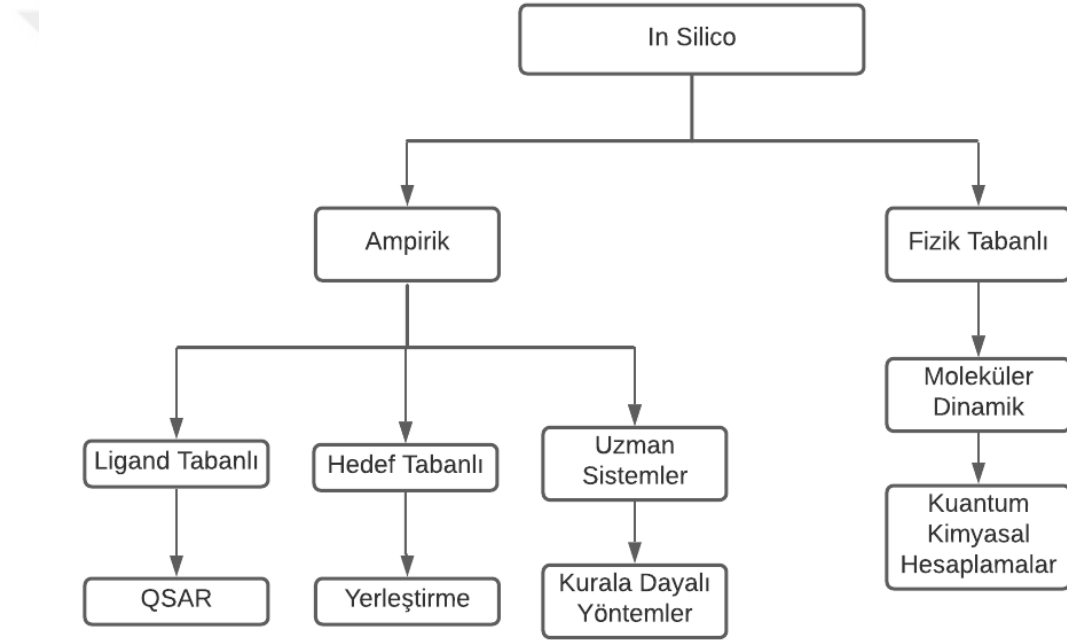
- İmmünolojik çalışmalar,
- Matematiksel analizler,
- Biyoinformatik,
- Yüksek performanslı bilgi işlem,
- Veri analizleri ve veri oluşturma.

In silico metotlar modellere göre fizik tabanlı ve ampirik metotlarla modelleme olmak üzere 2'ye ayrılır (Şekil 2.11).

Fizik temelli yöntemler, örneğin moleküler dinamikleri ve kuantum kimyasal hesaplamaları gibi yöntemlerle bağlanma afinitesinin tahminini içerir.

Sistem fiziği bilgisi olmadan mevcut deneysel verilere dayanan ampirik yöntemler, ligand tabanlı ve hedef tabanlı yaklaşımlara ayrılabilir. Liganda dayalı yöntemlerde, bilinen aktif ve aktif olmayan bileşiklerin yapıları, kantitatif yapı-aktivite ilişkileri ve metabolizma bölgeleri, yani metabolik reaksiyonların meydana geldiği bir substrattaki spesifik atomlar gibi diğer özellikleri türetmek üzere modellenir.

Hedef tabanlı yöntemler, enzimin yapısı model oluşturma için başlangıç noktasıdır. Hem ligandları hem de enzimleri entegre eden modeller, birleşik veya mekanizma tabanlı yöntemler olarak bilinir.



Şekil 2.11 *In silico* yöntemler ve alt başlıkları [93]

In silico yöntemler kapsamında, hedefe dayalı deneylerden biri olan moleküler yerleştirme (molecular docking) deneyleri, moleküllerin makromolekül hedeflerindeki bağlanma bölgelerine uyumlarını ve oryantasyonlarını analiz eden bir yöntemdir.

Arama algoritmaları, puanlama işlevlerine göre sıralanan olası pozlar üretir. Biyoinformatik alanında moleküler yerleştirme deneyleri için AutoDock, AutoDock Vina, DockThor, GOLD gibi yazılım araçları sıklıkla kullanılır [94].

Yerleştirme deneylerinde ilk adım, reseptör olarak da adlandırılan ve genellikle büyük bir biyolojik molekülden oluşan hedef yapıyı belirlemek ve elde etmektir. Bu işlem makromoleküllerin yapıları, deneysel yöntemlerle elde edilen 3 boyutlu atomik koordinatlara erişim sağlayan Protein Veri Bankasından (PDB) verileri elde ederek gerçekleştirilir [95].

Çoğunlukla makromoleküllerdeki bağlanma bölgeleri bilinir. Aksi bir durumda “kör yerleştirme (blind docking)” adı verilen yaklaşım ile öncelikli simülasyonlar gerçekleştirilir. Tarama tüm yapıyı kapsadığından zaman alabilen bu işlem, sonuçta hedef moleküldeki bağlanma bölgelerindeki analizleri gerçekleştirir.

Yerleştirme hesaplamaları sırasında, ortak bir strateji, hedef bağlama bölgesi içindeki etkileşim için önceden hesaplanmış potansiyel enerjileri içeren temsilleri kullanmaktır.

İşlem sırasında her bir hedef bölgede Lennard-Jones ve elektrostatik potansiyellerle ilgili etkileşimler hesaplanır. Hedefe bağlanacak ligandlar, makromoleküllere kıyasla daha küçük ve dinamiklerdir. PubChem adındaki veri tabanından elde edilebilirler [96].

Yerleştirme programları için iki kriter çok önemlidir: arama algoritmaları ve puanlama işlevleri. Arama algoritması, ligandın roto-translasyonel ve dahili serbestlik derecelerini dikkate alarak hedefin bağlanma bölgesinde ligand pozunu analiz eder ve oluşturur [97]. Arama stratejileri genellikle sistematik, stokastik veya deterministik olarak sınıflandırılır. Sistematik arama algoritmaları, her ligandın serbestlik derecesini aşamalı olarak keşfeder.

Stokastik arama algoritmaları, ligandın serbestlik derecelerinde rastgele değişiklikler gerçekleştirir. AutoDock, GOLD, DockThor gibi birçok yazılım, arama yöntemleri olarak stokastik algoritmaları kullanır.

Deterministik aramada, ligandın her yinelemedeki yönelimi ve konformasyonu önceki durum tarafından belirlenir ve yeni durum öncekine eşit veya daha düşük enerji değerine sahiptir. Enerji minimizasyon yöntemleri ve moleküler dinamik (MD) simülasyonlar deterministik arama yöntemine örnek olarak verilebilirler.

2.4.1 İlaç Tasarımında Moleküler Yerleştirme

Moleküler yerleştirme deneyleri, bilgisayar destekli ilaç tasarımı başlığının en önemli alt dallarından birisidir. Moleküler etkileşimlerin tahminlerinde bulunmak, ilacın hedefe yönelik potansiyel davranışlarını belirlemede bir ön basamak niteliğindedir. Yerleştirme deneyleri ilaç geliştirmede hem zamandan hem de kaynaktan büyük tasarruf sağlamaktadır.

İlaç veya takviye gıda adayı olabilecek hedef moleküler yapının belirlenmesinde moleküler yerleştirme deneylerinin yanı sıra farmakolojik olarak anlamlı özelliklere sahip olması da önemli belirteçlerdendir. İlaç veya takviye gıda olabilecek, farmakolojik olarak anlamlı özelliklere sahip potansiyel yapılar moleküler yerleştirme deneyleri sonucunda belirlenmektedir.

Ligand olarak seçilen molekül toksik olmamalı ve yüksek biyoaktivite sergilemelidir. İlaç ve türevi maddelerin farmakolojide ADME (Emilim, Dağıtım, Metabolizma ve Boşaltım) özelliklerini sağlaması gerekmektedir. Bu özellikler ilaç molekülünün hedeflenen proteine ulaşip ulaşmayacağının bir ölçüsüdür. Deneysel olarak tüm özelliklerin değerlendirilmesine alternatif olarak biyoinformatik araçlar kullanılması büyük bir avantaj sağlamaktadır [98].

SwissADME gibi web tabanlı biyoinformatik araçları, küçük moleküllerin ADME özelliklerinin belirlenmesini, fizikokimyasal ve farmakokinetik özelliklerinin gözlemlenmesini sağlamaktadır.

ADME tahmini matematiksel parametrelerinden bazıları şu şekilde sıralanabilir,

- Kan-beyin bariyeri penetrasyonu,
- İnsan bağırsak absorpsiyonu,
- Suda çözünürlük,
- Hepatotoksisite, sitokrom P2D6 inhibisyonu ve

- Plazma protein bağlanması.

İlaç keşfinin ilk aşamalarında Christopher Lipinski ve arkadaşları, "ilaç benzerliği" kavramını oral biyoyararlanım ile ilişkilendirmişler ve 1997'de "Beşin Kuralı" (RO5) olarak öneride bulunmuşlardır [99].

Bu bağlamda Beş Kuralı önermeleri şu şekildedir,

- 1) En fazla 5 hidrojen bağı donörü (toplam nitrojen-hidrojen ve oksijen-hidrojen bağları sayısı),
- 2) En fazla 10 hidrojen bağı alıcısı (tüm nitrojen veya oksijen atomları),
- 3) 500 daltondan küçük bir moleküler kütle,
- 4) 5'i geçmeyen bir oktanol-su bölme katsayısı (log P).

Bir molekül, RO5'e göre dört kuraldan iki veya daha fazlasını ihlal ederse oral olarak inaktif olarak kabul edilir. ADME süreçleri çoğunlukla, klinik deneme başarısızlıklarını azaltmak için ilaç keşfinin erken aşamasında uygulanmaktadır. Son çalışmalar ile milyonlarca fitokimyasal, yapısal ve işlevsel olarak karakterize edilmiştir.

Fitokimyasalların incelenmesi süreçleri, kimyasalların ayrılmasını, ekstraksiyonunu, saflaştırılmasını, tanımlanmasını, yapısal ve fonksiyonel analizlerini içerir. Günümüzde fitokimyasalların çoğu biyolojik etkileri bilinmediği için henüz keşfedilmemiştir.

Sistem biyolojisi yaklaşımları ile kimyasal bilişim ve biyoinformatiğin bir birleşimini kullanarak moleküler hedeflerinin tanımlanması yoluyla araştırılmamış fitokimyasalların eylemlerini keşfetmek için *in silico* yöntemlerden yararlanılabilir. Bu yaklaşımlar, potansiyel kimyasalların taranması, örüntü tanıma ve olası hedefleriyle bağlanma etkileşimlerinin analiz edilmesi için kamuya açık veritabanlarını ve çeşitli yazılım araçlarını eşzamanlı olarak kullanır.

3.1 Deney Kapsamında Kullanılan Malzemeler ve Ekipmanlar

3.1.1 Malzemeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler Tablo 3.1’de sıralanmıştır.

Tablo 3.1 Deneyler kapsamında kullanılan malzemeler

Kimyasal Malzeme	Marka
Kitosan (Düşük moleküler ağırlık)	Sigma-Aldrich
Sodyum tripolifosfat (TPP)	Sigma-Aldrich
Asetik Asit	Merck
Etanol	ISOLAB
DMEM/F12	Gibco
Fotal Bovine Serum (FBS)	Biological Industries
Tripsin-EDTA (%0,25)	Gibco
DMSO	Panreac & Applichem
Penisilin-Streptomisin	SATORIUS
Thiazol Blue Tetrazolium Bromide	Sigma-Aldrich
Fare Fibroblast Hücre Hattı L929	Thermo-Fisher

3.1.2 Cihazlar ve Ölçüm Yöntemleri

Deneyler kapsamında kullanılan cihazlar ve ölçüm yöntemleri sıralanmıştır.

- **Hassas Terazı:** Ohaus markasının PA214C model analitik terazisi kullanılmıştır. Hassasiyeti 210 g ile 0.0001 g arasındadır.



Şekil 3.1 Ohaus hassas terazisi

- **Manyetik Karıştırıcı:** Dlab markasının MS-M-S10 model manyetik karıştırıcısı kullanılmıştır.



Şekil 3.2 Dlab manyetik karıştırıcısı

- **pH-metre:** Ohaus markasının 3100M model pH-metresi kullanılmıştır. pH-metre SI-Analytics pH elektrodu içermektedir.



Şekil 3.3 Ohaus marka pH-metre

- **Santrifüj:** Hettich markasının Universal 320 model santrifüjü kullanılmıştır.



Şekil 3.4 Hettich marka santrifüj

- **Su banyosu:** Witeg markasının WITEG_20004 model çalkalamalı su banyosu kullanılmıştır.



Şekil 3.5 Witeg marka su banyosu

- **Liyofilizatör:** Biobase markasının BK-FD10S model liyofilizatörü kullanılmıştır.



Şekil 3.6 Biobase marka liyofilizatör

- **Zeta Sizer:** Ölçümler kapsamında Malvern Zeta Sizer Nano ZS kullanılmıştır.



Şekil 3.7 Malvern Zeta Sizer

Sıvı içerisinde çözünmeyen parçacıkların asılı kalarak bir süspansiyon oluşturduğu karışımlara kolloid adı verilir. Kolloidler dağınık (parçacıklar) ve sürekli (süspansiyon ortamı) olmak üzere iki faza sahiptirler.

Kolloidler içerisindeki asılı kalan parçacıklar, karışımın homojen bir görüntü sergilemesi sebebiyle gözle görünmez. Parçacıkların varlığının tespit edilebilmesi için karışım içerisinde lazer ışını veya ışın demeti geçirilmelidir.

Nanopartikül çözeltilerini karakterize etmek için Dinamik Işık Saçılımı (DLS) yöntemi kullanılır. Prensip olarak DLS, lazer kaynağından çıkan ışının kapalı sistem içerisinde optik yolu takip ederek kolloidal çözelti içerisinde geçirilen lazer ışınının çözelti içerisinde asılı kalan parçacıklara çarparak saçılan ışığı ölçmektedir [100].

Korelatör tarafından kaydedilen ölçümler sonucunda polidispersite indeksi (PDI) ve difüzyon katsayısı (d_H) hesaplanmaktadır. Difüzyon katsayısı ve partikül boyutu arasındaki ilişki Stokes-Einstein denklemi (Denklem 3.1) aracılığıyla açıklanır.

$$dH = \frac{kT}{3\eta\pi} \quad (3.1)$$

(d_H , hidrodinamik çap (m); kT , ortalama kinetik enerji (J); k , Boltzmann sabiti = $1,381 \times 10^{-23}$ J/K; T , mutlak sıcaklık (K); η , viskozite (Pa·s); D , difüzyon katsayısı (J/Pa·s·m))

Yöntem kapsamında, lazer ışığı gönderilen numuneler içindeki nanopartiküllerden saçılan ışık dedektör tarafından algılanır. Işık dalgalarının farklı yönlerde saçılması sonucu girişim gerçekleşir ve dedektör bu girişim sonucunda oluşan ışık şiddeti dağılımını ölçer. Numune içerisindeki nanopartiküller Brown hareketi prensibine göre hareket ederler. Brown hareketi prensibine göre küçük olan partiküller büyüklere oranla daha hızlı ve rastgele hareket ederler. Daha hızlı hareket eden partiküller daha fazla yer değiştirecekler ve ışık şiddeti dağılımı da buna bağlı olarak daha çabuk değişecektir. Bu değişimden yola çıkılarak Zeta Sizer cihazı ile difüzyon katsayısının hesaplanması amacıyla kümülant analizi uygulanmaktadır [101].

Sonrasında Stokes-Einstein denklemi kullanılarak hidrodinamik çap hesaplanmaktadır. Bu durumda difüzyon katsayısını etkileyen parametreler partikül boyutunu da etkileyecektir.

Çalışma kapsamında kullanılan kitosan katyonik davranıştayken TPP anyonik davranış sergiler. Buradan yola çıkılarak oluşturulan nanopartiküllerin dış yüzeyi pozitif yüklüdür. Zeta potansiyel ölçümlerinde kullanılan teknik Elektroforetik Işık Saçılımı (ELS) adını alır. Zeta potansiyeli hesaplamalarında Henry denkleminde (Denklemler 3.2) faydalanılır [102].

$$U_e = \frac{2 \cdot \epsilon \cdot z \cdot f(ka)}{3\eta} \quad (3.2)$$

(U_e =Elektroforetik hareketlilik, ϵ =Ortam dielektrik sabiti, $f(ka)$ =Henry fonksiyonu, η =Ortam viskozitesi)

- **UV-Vis Spektrofotometre:** Shimadzu markasının UV-VIS UV-1280 model spektrofotometresi kullanılmıştır.



Şekil 3.8 Shimadzu marka spektrofotometre

Ultraviyole ve görünür ışık aralığı (UV-Vis), maddelerin sınıflandırılması ve incelenmesi için araştırma, üretim ve kalite kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır.

UV-Vis spektroskopisi prensibi, bir numune tarafından ışığın emilmesine dayanır. Numune tarafından emilen ışık miktarına ve dalga boyuna bağlı olarak, numunenin saflığı, konsantrasyonu gibi bilgiler elde edilir.

Ölçüm, bir küvet içindeki bir numune çözeltisinden geçen ışığın yoğunluğunu ölçer ve bunu, numuneden geçmeden önce ışığın yoğunluğuyla karşılaştırır. Cihaz, iletilen ışık yoğunluğunun orijinal ışık yoğunluğuna oranı olan “Geçirgenliği (T)” ölçer. Absorbans değeri de geçirgenliğin eksi logaritmasına eşit olarak ifade edilir.

UV-Vis spektrumu, dalga boyunun bir fonksiyonu olarak absorbans, grafiksel bir şekilde temsil edilir. Elde edilen grafikte absorpsiyon zirvelerinin yükseklikleri, bileşenlerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Konsantrasyonların hesaplanması Lambert-Beer Yasası ile gerçekleşir. hesaplamak için Denklem 3.3 kullanılır.

$$\text{Absorbans} = \epsilon \times l \times c \quad (3.3)$$

(ϵ =molar absorbtivite, l =yol ve c =molar konsantrasyon)

UV-Vis spektroskopisinin ilaç geliştirme çalışmalarının analiz basamağında sıklıkla tercih edilmesinin en önemli sebebi aktif farmasötik bileşenleri belirlemesinin yanı sıra numune içerisindeki kirleticiler hakkında da fikir vermesidir. Kirletici analizleri safsızlık hakkında bilgi vererek geliştirilen formülasyon üzerindeki bilgi hakimiyetini artırmaktadır.

Bu bağlamda ekstraksiyon sonrası elde edilen solüsyon içerisindeki etken madde miktarının analiz edilmesi ve takip eden çalışmalar kapsamında gerçekleştirilecek olan nanopartiküllerin *in vitro* salımı ve etken madde

içeriğinin belirlenebilmesi amacıyla UV-Vis Spektrofotometre analizleri gerçekleştirilmiştir.

- **ATR-FTIR Spektrofotometre:**

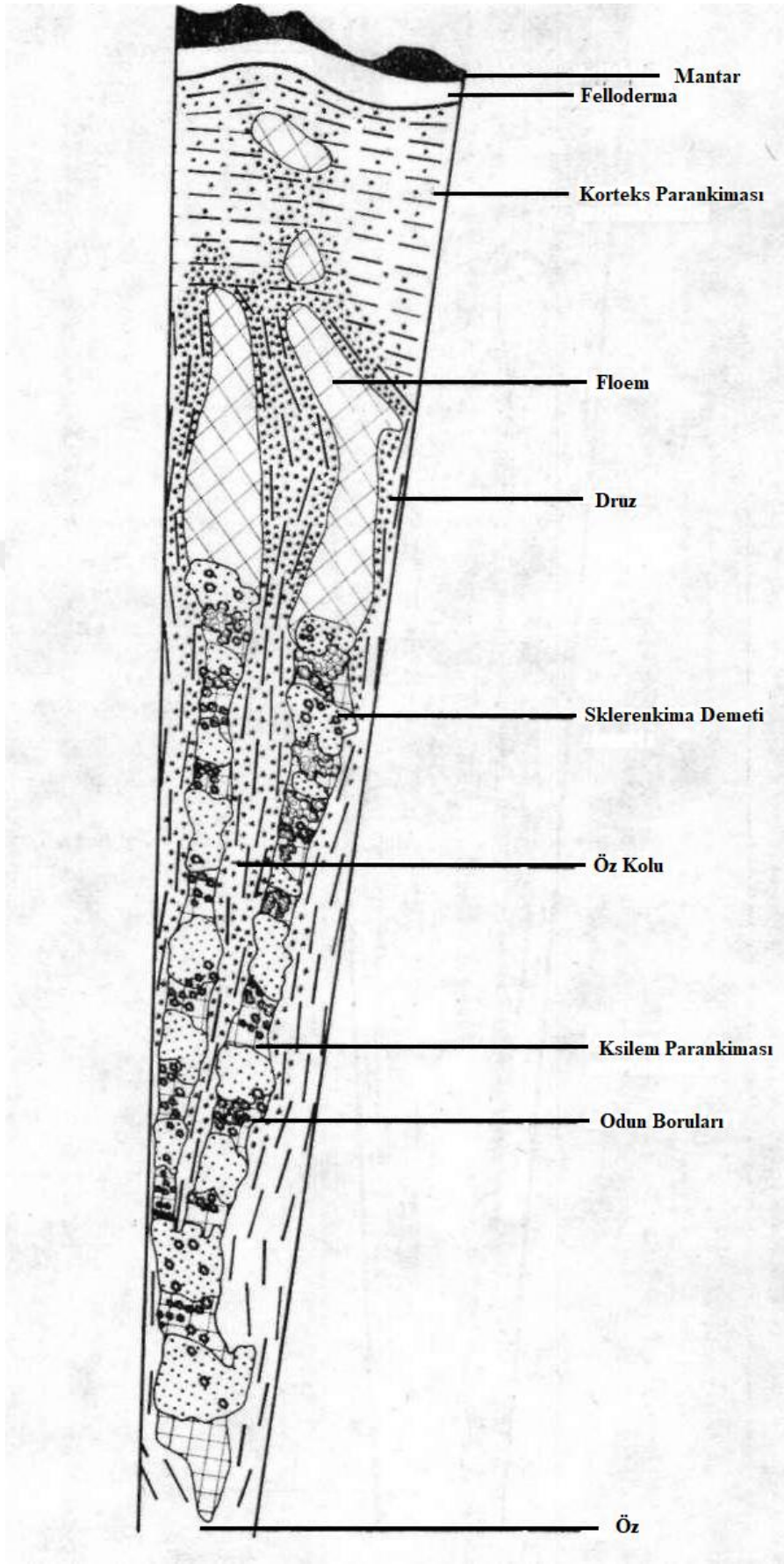
Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, molekül içerisindeki bağların tanımlanması amacıyla kullanılan yöntemdir. Yöntem molekül içerisindeki bağların üzerine kızılötesi ışınların düşürülmesi ve sonrasında bağların yaptıkları titreşim ve dönme hareketlerinin soğurulması temeline dayanmaktadır. Yöntem kapsamındaki analizler için numunelerin dipol momente sahip polar yapıda olması gerekmektedir.

Attenuated Total Reflectance (ATR) adıyla bilinen Zayıflatılmış Toplam Yansıtma Spektroskopisi tekniği temelde toplam iç yansımaya dayanmaktadır. Gelen bir miktar ışın, yansıtma yüzeyi üzerinde yer alan ve bu yüzeye yakın temas halinde bulunan örneğe nüfuz eder. Sonrasında çıkan zayıf ışın ölçülerek spektrofotometre tarafından dalga boyunun bir fonksiyonu olarak ifade edilir. En son örneğin absorban spektrumu elde edilir.

3.2 Yöntem

3.2.1 *Gypsophila eriocalyx*'in Toplanması

Gypsophila eriocalyx bitkisi Çorum-Kastamonu yolu üzerinde İskilip ilçesi yakınlarında yolun sağında ve solunda jipsli gevşek topraklardan (GPS: 40.731518, 34.454072) toplanmıştır. Çalışma kapsamında kök kısmının kullanılacak olması sebebiyle kazma yardımıyla çıkarılan köklerden örnekler homojen bir şekilde toplanmıştır. “Çorum Çöveni” olarak da adlandırılan *Gypsophila eriocalyx*'in enine kesiti Şekil 3.9'da verilmiştir.



Şekil 3.9 *Gypsophila eriocalyx*’ın enine kesitinin şematik gösterimi [30]

3.2.2 *Gypsophila eriocalyx*'in Ekstraksiyon İşlemine Hazırlanması

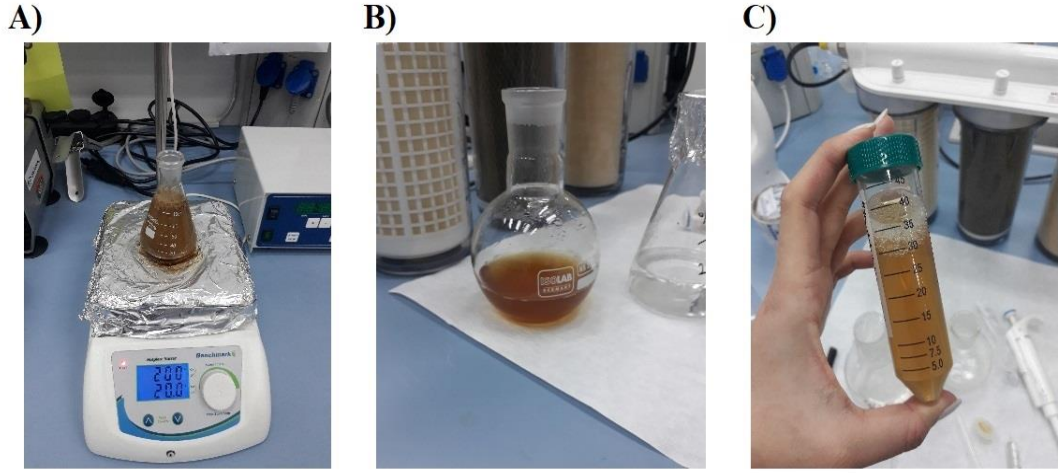
Bitkinin kurutulmuş olan toprak altı kısımları 40-50 gram ürün elde edilecek şekilde parçalara ayrılmıştır ve havanda dövülmüştür. Bitki toprak altı kısımlarının toz haline getirilmesindeki temel sebep artan substrat yüzeyi ile etki yüzeyini de arttırmaktır. Artan yüzey alanı ile solvent bitkiye daha iyi nüfuz etmekte ve elde edilen aktif bileşen miktarı artmaktadır, bu da doğrudan ekstraksiyon verimini etkilemektedir.

3.2.3 *Gypsophila eriocalyx* Ekstraktı Eldesi

Toz haline getirilmiş *Gypsophila eriocalyx* toprak altı kısımlarından ekstraksiyon eldesi dekoksasyon yöntemiyle ile yapılmıştır. Yöntem kabaca, soğuk suya ilave edilen bileşenlerin ısıtılarak maserasyonu ile özünü elde etme işlemidir.

Toz haline getirilmiş materyal 2 g tartılarak 100 mL erlenmeyer'e alınarak üzerine 100 mL saf su konulmuştur. Sonrasında ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde 70°C'de 250 rpm'de karışma sağlanana kadar tutulmuştur. Yoğun kıvamlı olan ekstrakt, renk değişimi sağlandığında ve istenilen homojenliğe ulaşıldığı 30. dakikada karıştırıcıdan alınmıştır. Sonrasında 0.45 µm gözenekli filtre kâğıdı ile süzülerek kaba partiküllerden arındırılmıştır (Şekil 3.10).

Elde edilen solüsyon ekstrakt liyofilizasyon işlemi uygulanmak üzere +4°C'de falcon tüplerde muhafaza edilmiştir. Dondurarak kurutma işlemi olarak da adlandırılan liyofilizasyon işlemi ile ekstrakt solüsyonu kurutulmuştur. Bu işlemin uygulanmasındaki temel amaç donmuş materyaldeki çözücünün vakum altında buharlaştırılması ile uzaklaştırılarak kurutulmasıdır. Liyofilizasyon sonucunda elde edilen ürün toz halindeki ekstraktır. Elde edilen ürün falcon tüp içerisinde -20°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.10 *Gypsophila eriocalyx* dekoksasyon işlemi basamakları

A) Belirli sıcaklıkta ve karıştırma hızında kaynatma aşaması, B) Elde edilen özütün filtre kâğıdı ile süzülmesi, C) Liyofilizasyon işlemi için falkon tüplerde muhafaza edilmesi.

3.2.4 *Gypsophila eriocalyx* Ekstraktının UV-Vis Spektrofotometre Analizi

Elde edilen ekstrakt içerisindeki etken madde miktarının analiz edilmesi ve takip eden çalışmalar kapsamında gerçekleştirilecek olan nanopartiküllerin *in vitro* salımı ve etken madde içeriğinin belirlenebilmesi amacıyla UV-Vis Spektrofotometre analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda ekstrakt ile hazırlanan 1 mg/mL ana solüsyon seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda (6,75, 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 µg/mL) örnekler hazırlanmıştır.

Elde edilen çözeltilerden absorbans değeri aralığı 190 ila 600 nm olacak şekilde spektrum taraması yapılmış ve 260 nm'de absorbans belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda ölçümler yapılarak *Gypsophila eriocalyx*'e ait kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir.

3.2.5 *Gypsophila eriocalyx* Ekstraktı Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Hazırlanması

GEE içeren kitosan nanopartikülleri iyonik jelleşme yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu bağlamda, 20 mg düşük moleküler ağırlıklı kitosan tartılarak %0,3 asetik asit solüsyonu içeren 100 mL suda çözündürülmüştür ve ardından 24 saat manyetik karıştırıcı üzerinde sürekli karıştırılmıştır.

Ertesi gün çözünmüş kitosan 0,45 μm filtreden geçirilmiştir. TPP çözeltisini hazırlamak için 50 mg TPP 100 mL saf suda çözündürülmüştür. Ardından 0,22 μm filtreden geçirilmiştir.

3,3 mL'lik TPP çözeltisinin üzerine GEE'den 2 mg tartılmış ve eklenmiştir. Oda ısısında bir süre karıştırıldıktan sonra örnek manyetik karıştırıcı üzerinde +4°C'ye alınarak soğuyana kadar karıştırma işlemine devam edilmiştir. Sonrasında hazırlanmış kitosan solüsyonunun üzerine TPP solüsyonu ilave edilmiştir.

Elde edilen nanopartikül solüsyonundan 1 mg/mL örnek alınarak 1500 rpm'de 1 saat santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen nanopartikül içeriği -20°C'de bir gece bekletilerek liyofilizasyon işlemine hazırlanmıştır. Sentez deneylerine takiben yapılacak olan karakterizasyon ve *in vitro* çalışmalarda kullanılması amacıyla hem sıvı hem de liyofilize edilmiş toz formları +4 °C'de ve -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.6 GEE İçeren Kitosan Nanopartiküllerinin Zeta Sizer ile Analizi

DLS ve ELS yöntemleriyle Zeta Sizer Nano ZS cihazında yapılan analizler sonucunda Pdl, boyut ve yüzey yükünü belirlemek amacıyla hem dolu hem de boş kitosan nanopartikülleri analiz edilmiştir. Kitosan nanopartikülleri sentez deneyleri sonucunda elde edilen solüsyon halindeki nanopartiküllerden 1 mL örnekler ZEN0040 küvetleri içerisine alınmış ve DLS yöntemiyle analiz edilmiştir.

Sonrasında solüsyon halindeki nanopartikül örneklerinden 750 μL alınmış ve DTS1070 küvetlerine konulmuştur. Zeta potansiyelleri ELS yöntemiyle

belirlenmiştir. Ölçümler her bir örnek için 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.7 ATR-FTIR Analizler

GEE ve kitosan polimeri arasındaki kimyasal etkileşimleri incelemek amacıyla FTIR ve ATR analizleri gerçekleştirilmiştir. GEE, GEE yüklü kitosan nanopartikülleri ve boş kitosan nanopartikülleri için ATR spektrumu 2 cm^{-1} çözünürlük ve $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ aralığında olacak şekilde Jasco 6300 FTIR spektrometre cihazına ATR ölçüm başlığı takılması ve kullanılmasıyla veriler elde edilmiştir.

3.2.8 GEE İçeren Kitosan Nanopartiküllerinin Yükleme Kapasitesi ve Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması

Sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin içine enkapsüle olan GEE miktarının belirlenmesi ve yükleme kapasitesinin tayin edilmesi amacıyla UV-Vis spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır.

Solüsyon içerisindeki maddenin ne kadarının nanopartiküllerin içerisinde olduğunu belirlemek amacıyla enkapsülasyon verimi değeri hesaplanırken; nanopartiküllerin içerisinde enkapsüle halde olan maddenin ağırlıkça oranını belirlemek amacıyla yükleme kapasitesi belirlenmektedir.

GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin enkapsülasyon veriminin ve yükleme kapasitesinin belirlenmesi amacıyla aşağıda verilen Denklem 3.4 ve Denklem 3.5 kullanılmıştır. Enkapsüle olmamış GEE miktarının analizi amacıyla, sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin 260 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır.

Enkapsüle olmuş GEE, nanopartikül sentezi sırasında eklenen toplam GEE miktarından enkapsüle olmamış GEE miktarının çıkarılması sonucunda elde edilmiştir.

$$\text{Enkapsülasyon Verimi (\%)} = \frac{\text{Toplam GEE-Serbest GEE}}{\text{Toplam GEE}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\text{Yükleme Kapasitesi (\%)} = \frac{\text{Enkapsüle Olmuş GEE Miktarı}}{\text{Nanopartikül Ağırlığı}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.2.9 GEE Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin *In Vitro* Salım Analizi

GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin, insan vücudundaki salım profillerini ortaya koymak ve incelemek amacıyla, vücut ortamı taklit edilecek şekilde salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. 37 °C'de PBS solüsyonlarına karşı diyaliz yöntemi aracılığıyla *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Öncesinde liyofilizasyon ile dondurularak kurutulmuş olan GEE yüklü kitosan nanopartikülleri 1 mg tartılmış, 1 mL saf suda çözündürülmüş ve membran aracılığıyla solüsyona diyaliz olacak şekilde 50 mL PBS solüsyonlarına yerleştirilmiştir. Yerleştirme sonrasında başlangıç noktası olarak kabul edilen 0. saatte UV-Vis Spektrofotometre ile ölçüm yapılmıştır.

Sonrasında nanopartiküller çalkalamalı su banyosu içerisinde 120 rpm'de, 37 °C sıcaklıkta, PBS ortamında aralıksız karıştırmaya bırakılmıştır ve ortamdan saat aralıkları ayarlanmış şekilde birinci gün için 0., 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7. ve 8. saat olacak şekilde düzenli ölçüm gerçekleştirilmiştir. Sonrasında gün bazlı olacak şekilde (24 ve 48 saat) ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçüm işlemi esnasında ortamdan alınan numunelerin salım ortamının hacmini etkilememesi amacıyla, ortamdan çekilen miktar kadar PBS solüsyonu eklenmiştir.

Ölçümler sonrasında elde edilen absorbans değerlerinden kalibrasyon eğrisi bulunarak nanopartiküllerin salım profili bulunmuştur. Sonrasında Denklem 3.6'da elde edilen değerler yerlerine konularak salım yüzdesi hesaplanmıştır.

$$\text{Salım Yüzdesi (\%)} = \frac{\text{Ortamdaki GEE Miktarı}}{\text{Total GEE Miktarı}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.2.10 MTT Analizleri

3.2.10.1 Sitotoksosite Analizi

Elde edilen GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin sitotoksosite analizleri MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) deneyi ile gerçekleştirilmiştir. Deney kapsamında GEE'lerin ve GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin sitotoksisiteleri ayrı ayrı incelenmiştir.

Bu bağlamda L929 (fare fibroblast) hücre kültürü hazırlanarak, elde edilen hücre kültürü DMEM-F12 besiyeri (%10 FBS, 5 µg/mL penisilin-streptomisin) içerisinde 37 °C'de etüvde inkübe edilmiştir.

Gün aşırı kontrol altında tutulan ve istenilen miktarda çoğaldığı belirlenen L929 hücreleri, tripsin kimyasalı aracılığıyla flask yüzeyinden kaldırılarak 1000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant kısmı atılarak dibe çöken kısım sayım yapılarak sitotoksosite deneylerinde kullanılmıştır. MTT testi ile GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin toksik etkilerinin incelenmesi amacıyla 96 kuyucuk içeren mikrolaklara, DMEM-F12 içerisinde penisilin-streptomycin ve %10 oranında Fetal bovine serum (FBS) içerikli besiyeri olacak şekilde hazırlanan hücreler 1x10⁵ hücre/kuyu oranında olacak şekilde eklenmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir.

Çalışma kapsamında kullanılacak olan GEE'lerin konsantrasyonları 0, 0.048, 0.09, 0.19 ve 0.38 µg/mL şeklinde belirlenmiştir.

GEE yüklü kitosan nanopartikülleri ise konsantrasyonları 0, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 µg/mL olacak şekilde alınmış ve belirlenen konsantrasyonlar hücreler ile kuyucuklara ilave edilerek 24 saat inkübasyondan sonra MTT testi uygulanmıştır.

Bu bağlamda, tüm kuyucuklara 40 µL MTT eklenmiş ve 4 saat boyunca ışıksız ortamda 37 °C’ de inkübe edilmiştir. Sonrasında inkübe edilen hücrelere 160 µL dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edilmiş ve 30 dakika bekletildikten sonra kuyucuklu kaplar okuyuculu spektrometreye yerleştirilerek absorbans okunmuştur.

3.2.10.2 Osteojenik Proliferasyon Analizi

İnsan kemik iliği kök hücreleri (hBMC), Acıbadem Labcell ‘den elde edilmiştir. Hücreler, %30 FBS ve %1 penisilin-streptomisin ile desteklenmiş DMEM içeren şişelerde kültürlenmiştir. Daha sonra hücreler, 2 gün boyunca nemlendirilmiş %5 CO₂ içinde 37°C’de inkübe edilmiştir. Hücrelerin çoğalmasının %90’a ulaşmasının ardından kültür, 37°C’de 5 dakika boyunca tripsin-EDTA ile muamele edilmiş ve pasajlama gerçekleştirilmiştir. GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin osteojenik proliferasyonu, hBMC’ler ile MTT testi yapılarak belirlenmiştir.

Bu kapsamda, L929 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen MTT testi prosedürüne benzer şekilde, GEE yüklü kitosan nanopartikülleri ve GEE’ler aynı konsantrasyonlarda kuyucuklara hBMC hücreleri ile ilave edilmiş ve sonrasında DMSO ile 4 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Son olarak, absorbans plak okuyuculu spektrofotometre analizi ile analiz değerleri elde edilmiştir.

3.2.11 *In Silico* Çalışmalar

In silico çalışmalar GEE’nin anti-osteoporotik etkilerini belirlemek amacıyla yapay zeka yöntemlerinden faydalanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda seçilen bitki bileşenlerinin ve osteoporoza yönelik hedef proteinin sanal temsilleri analiz edilmiştir. Sonrasında GEE içeriğinden belirlenmiş olan fitobileşenlerin ilaç davranışlarını analiz etmek amacıyla teorik ADME özellikleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, verilere uygun olacak programlar yardımıyla analiz edilmiştir.

3.2.11.1 Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

Anti-osteoporoz ilaçların geliştirilmesindeki en çekici hedeflerden birisi olan CatK, ilaç firmaları tarafından hali hazırda çalışılmaktadır [72].

İnhibitör mekanizmaları araştırılmasına rağmen CatK inhibitörü FDA onaylı bir ilaç bulunmamaktadır. Merck & Co. tarafından geliştirilen Odanacatib (ODN), Faz III klinik çalışmalarda postmenopozal osteoporozlu hastalarda yüksek terapötik etkinlik gösteren tek CatK inhibitörü adayı olmasına rağmen kardiyoserebrovasküler yan etkiler nedeniyle araştırma çalışmaları sona erdirilmiştir[103] .

Bu kapsamda, osteoporoza yönelik GEE'nin anti-osteoporotik etkileri, *in silico* moleküler yerleştirme analizleri metodolojisiyle incelenmiş ve raporlanmıştır.

Gypsophila eriocalyx fitokimyasallarından gypsogenin (PubChem ID: 92825) [104], rutin (PubChem ID: 5280805) [105] ve rosmarinik asit (PubChem ID: 5281792) [106] molekül yapıları PubChem veri tabanından indirilerek moleküler yerleştirme çalışmalarında ligand olarak kullanılmak amacıyla Schrödinger programının Maestro 11.4 Glide modülüne tanıtılmıştır [107]. Program içerisinde yer alan “LigPrep” aracı ile OPLS kuvvet alanı kullanılarak 3 ligand nötral pH'da farklı geometrilerdeki stereoimerleri elde edilerek moleküler yerleştirme analizi için kullanılmışlardır [108].

CatK (PDB: 1ATK) moleküler yapısı protein veri bankasından elde edilmiştir [109]. CatK'nın 2.20 Å çözünürlük ve ~215 tortulu kristal yapısı analizlerde kullanılmak amacıyla seçilmiştir. SWISS MODEL web aracı kullanılarak yapının düzenlenmiş hali elde edilmiştir [110].

Schrödinger Maestro Docking Programının Glide modülü içerisinde yer alan “reseptör hazırlama sihirbazı” kullanılarak yapı içerisindeki tüm su ve iyon gibi moleküler yapılar çıkartılmış ve polar hidrojen atomları reseptöre moleküle eklenmiştir. Sonrasında bağ düzenleri tayin edilmiş, yükler nötral pH'da “propka” metodu ile belirlenmiş, reseptör için 0.3 Å RMSD (atomik pozisyonların ortalama karekök sapması) değeri tercih edilmiş ve “OPLS3” kuvvet alanı seçilerek reseptör optimize edilmiştir [111]. Tüm bu adımlar reseptör molekülü yerleştirme deneyleri için hazırlamıştır.

3.2.11.2 Moleküler Dinamik Analizler

CatK reseptörü ile GEE baskın fitokimyasallarının etkileşimlerini daha uzun süreli dinamik sistemde inceleyebilmek amacıyla Moleküler Dinamik (MD) analizleri 50 nanosaniye (ns)'de gerçekleştirilmiştir.

3.2.11.3 ADME Parametrelerinin Teorik Tahminleri

Potansiyel bir ilaç/ilaç benzeri bileşiğin aday olarak nitelendirilebilmesi için daha iyi bir farmakokinetik profili ortaya koymak ve incelemek amacıyla ADME parametrelerinin değerlendirilmesi adımı gerçekleştirilmiştir. SwissADME [112] çevrimiçi yazılımı kullanılarak, GEE'nin yapısında bulunan üç büyük ana bileşiği olan gypsogenin, rutin ve rosmarinik asit üzerinde ADME özellikleri tahmini gerçekleştirilmiştir. Programın kullanımı kapsamında, istenilen formatta girilen bileşenlerin kimyasal profillerinin temsilleri sonucunda ADME profillerinin parametreleri elde edilmiştir.

4.1 Nanopartiküllerin Karakterizasyon Sonuçları

4.1.1 Kitosan Nanopartiküllerinin Partikül Boyutu, PdI ve Zeta Potansiyel Analizi

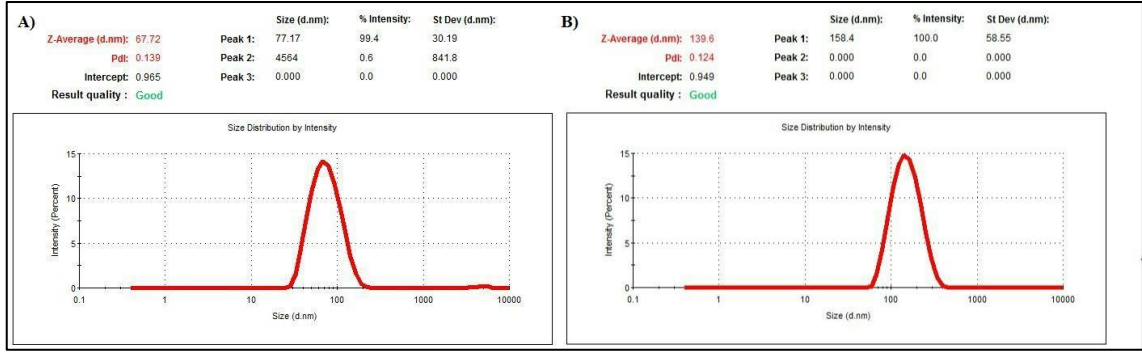
Kitosan nanopartiküllerinin sentezi sonrasında DLS yöntemiyle partikül boyutları ve PdI değerleri belirlenmiştir. Zeta potansiyellerinin belirlemek amacıyla ELS yöntemi kullanılmıştır. Biri boş kitosan nanopartikülü ve diğeri GEE yüklü kitosan nanopartikülü olmak üzere sentezlenen iki örnekten numuneler alınarak analizler gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.1 Kitosan Nanopartiküllerinin DLS ile Boyut ve PdI Analizleri

Nanopartikül boyut ve PdI analizleri üç tekrarlı olacak şekilde Zeta Sizer cihazında yapılmış ve böylece elde edilen sonuçlar elde edilen pikler ile doğrulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 Zeta Sizer cihazı ölçüm sonuçları

Numune	Boyut (nm)	PdI
Boş Kitosan Nanopartikülleri	67.71 ± 7.74	0.139 ± 0.01
GEE ile Yüklü Kitosan Nanopartikülleri	139.6 ± 1.55	0.124 ± 0.01



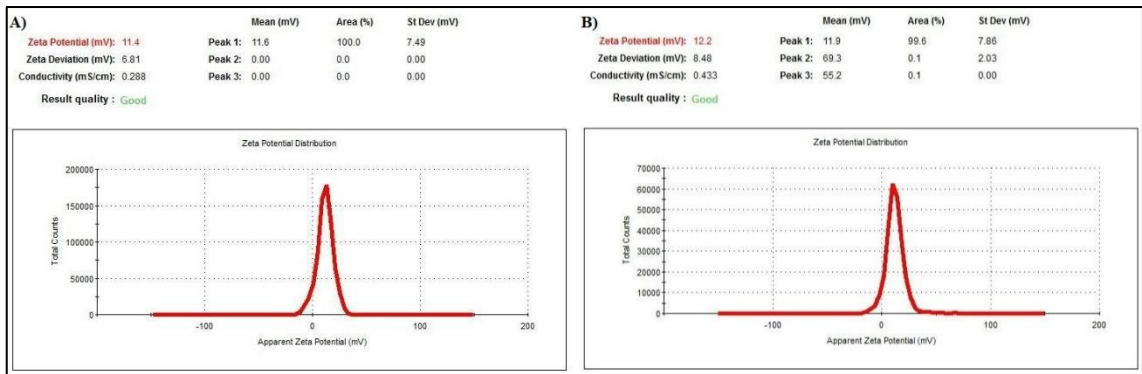
Şekil 4.1 A) Boş kitosan nanopartikülleri, **B)** GEE yüklü kitosan nanopartiküllerine ait boyut ve Pdl analiz sonuçları

4.1.1.2 Kitosan Nanopartiküllerinin Zeta Potansiyeli Analizi

Kitosan nanopartikülleri sentezi sonrası zeta potansiyelleri analizi sonucunda elde edilen zeta potansiyel değerleri Tablo 4.2 ve Şekil 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2 Zeta Sizer cihazı ölçüm sonuçları

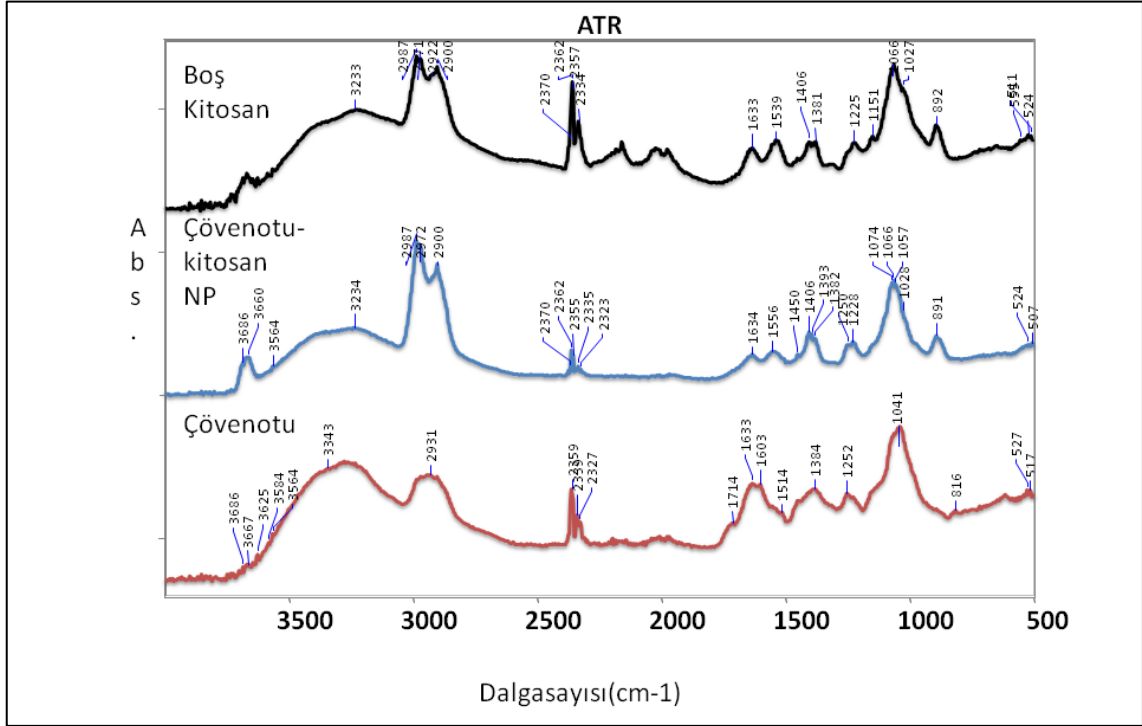
Numune	Zeta Potansiyeli (mV)
Boş Kitosan Nanopartikülleri	11.4 ± 1.29
GEE ile Yüklü Kitosan Nanopartikülleri	12.2 ± 0.91



Şekil 4.2 A) Boş kitosan nanopartikülleri ve **B)** GEE yüklü kitosan nanopartiküllerine ait zeta potansiyel analiz sonuçları

4.1.2 ATR Analizi Sonuçları

Boş kitosan, GEE ile yüklü kitosan ve sadece GEE numunelerinden elde edilen ATR-FTIR analizi sonuçları Şekil 4.3'te verilmiştir. Analiz sonuçları GEE'de C-O germe bantlarının yoğunlukta olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.3 Numunelerin ATR-FTIR analizleri sonucu

4.1.3 GEE Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Yükleme Kapasitesinin ve Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması

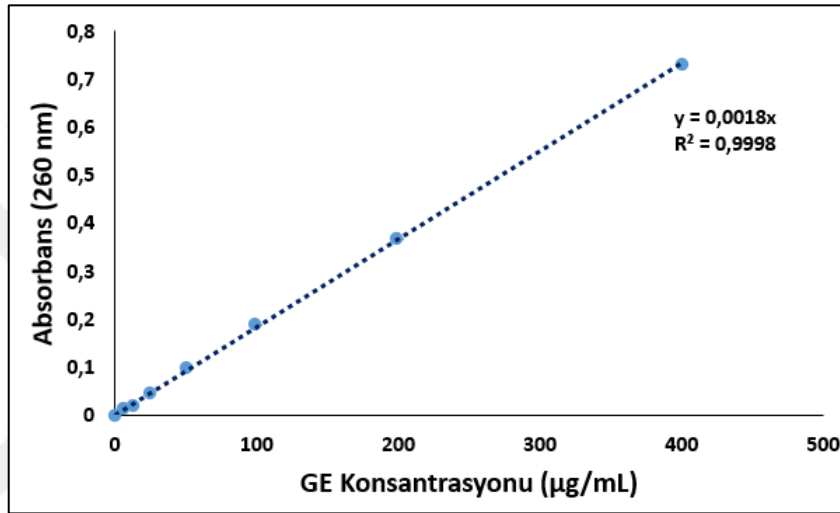
4.1.3.1 *Gypsophila eriocalyx* Ekstraktının Kalibrasyon Eğrisi

Gypsophila eriocalyx ekstraktının kalibrasyon eğrisi; 1 mL total hacimde olacak şekilde 6,75 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL ve 400 µg/mL olacak şekilde hazırlanan yedi farklı konsantrasyondaki *Gypsophila eriocalyx* ekstraktının çözeltisiyle hazırlanmıştır. Numuneler GEE'nin absorbans değeri olan 260 nm'de okunmuştur ve elde edilen değerlerden kalibrasyon eğrisi ve eğrinin denklemi elde edilmiştir. Elde edilen bu eğri, GEE ile enkapsüle edilmiş kitosan nanopartiküllerinin içerisinde enkapsüle haldeki ekstrakt miktarının belirlenmesi, enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesinin

bulunması ve nanopartiküllerin salım profillerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır.

GEE'ye ait kalibrasyon eğrisi ve eğrinin denklemi Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Elde edilen Denklem 4.1'de gösterilmektedir.

$$y = 0.0018x \quad (4.1)$$



Şekil 4.4 *Gypsophila eriocalyx* ekstraktının kalibrasyon eğrisi

4.1.3.2 GEE Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması

▪ Enkapsülasyon Verimi

Enkapsülasyon verimi kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem yardımıyla ilgili konsantrasyonlar belirlenerek ve Denklem 3.4 ve Denklem 4.1 kullanılarak %90.61 olarak hesaplanmıştır.

▪ Yükleme Kapasitesi

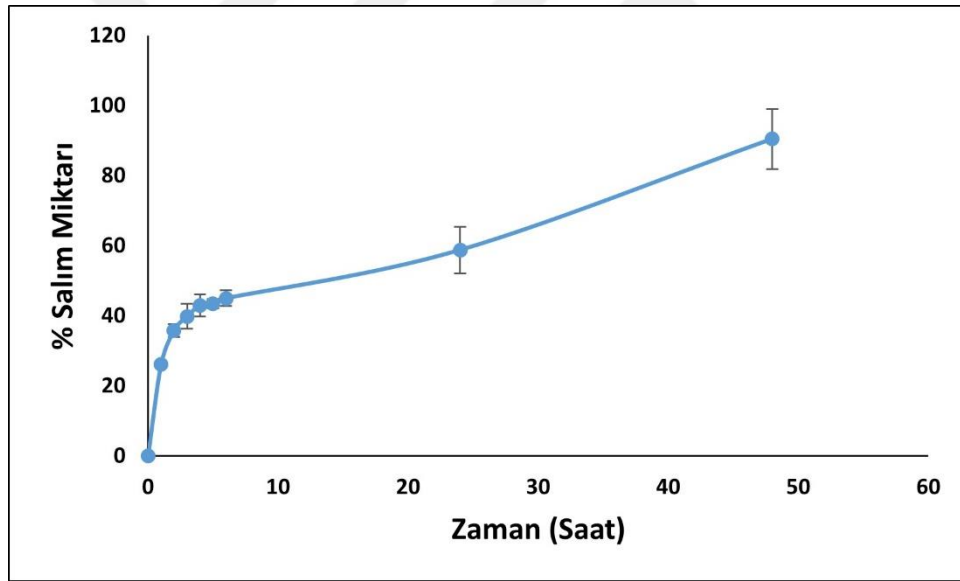
Yükleme kapasitesi kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem yardımıyla ilgili konsantrasyonlar belirlenerek ve sentezlenen kitosan nanopartiküllerinin kuru ağırlığı ölçülerek Denklem 3.5 ve Denklem 4.1 yardımıyla %38.56 olarak hesaplanmıştır.

4.1.4 GEE Yüklü Kitosan Nanopartiküllerinin *In Vitro* Salım Analizi Sonuçları

GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin *in vitro* salım testi amacıyla çalkalamalı su banyosunda sürekli karışan diyaliz kapsülü içerisindeki nanopartikül formülasyonu salım ortamı olarak PBS (pH=7.2) içerisine yerleştirilmiştir ve salım ortamından belirli saat aralıklarında sırasıyla alınan örnekler UV-Vis spektrofotometrede analiz edilmiştir.

Elde edilen absorbans sonuçları ile salım yüzdesi bulunmuş ve zamana bağlı bir grafik oluşturularak salım profilleri incelenmiştir.

Elde edilen değerler ilgili denklemde yerine konulduğunda 48. saat sonunda GEE'nin yaklaşık %90.45'i kadarının salındığı gözlemlenmiştir ve Şekil 4.5'te ilgili grafik verilmiştir.



Şekil 4.5 GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin *in vitro* salım grafiği

4.1.5 MTT Analizleri Sonuçları

4.1.5.1 Sitotoksikite Testi Sonuçları

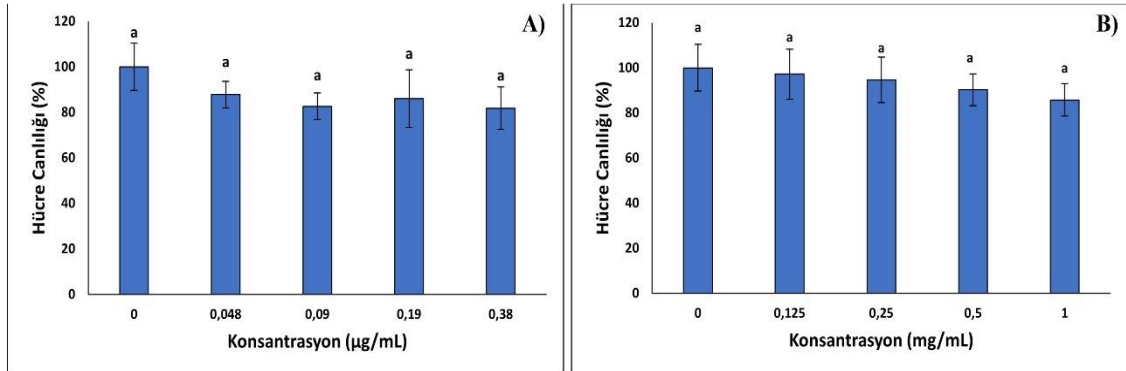
GEE'nin ve GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde sitotoksik etkileri incelenmiştir.

GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin altı farklı konsantrasyonda hazırlanan numunelerinin hücre hattına uygulanması sonrasında inkübasyon süreci ardından MTT testi uygulanmıştır.

Son olarak Elisa absorbands okuyucuya yerleştirilerek 260 nm olarak belirlenen değerde absorbands değerleri okunmuştur. Deneyler kapsamında GEE'nin toksik olmadığı konsantrasyon aralığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Deney sonucunda GEE'nin ve GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin deneyler kapsamında çalışılan konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerinde %80'in altına düşmeyen hücre canlılığı göstermesiyle toksik olmadığı belirlenmiştir.

Şekil 4.6'da L929 hücre hattı üzerindeki % hücre canlılıkları belirtilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda p değerinin kontrolü sonrası değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya konulmuştur.



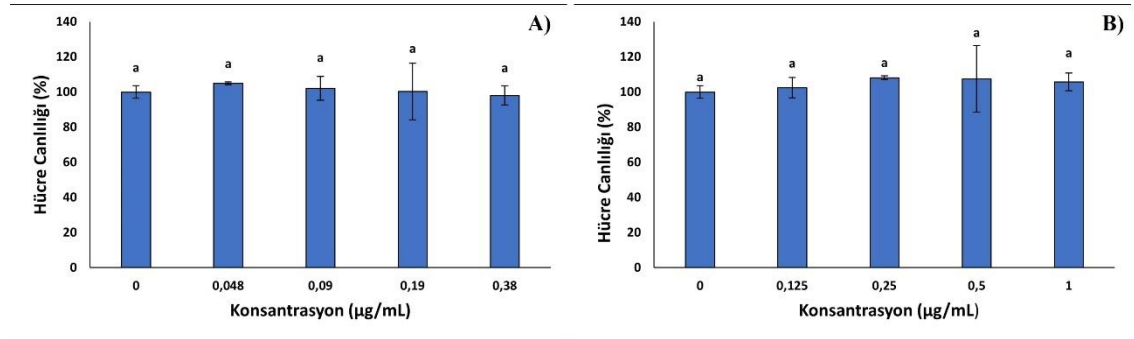
Şekil 4.6 A) GEE'nin ve B) GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin L929 hücre hattı üzerindeki canlılık grafiği

4.1.5.2 Osteojenik Proliferasyon Analizi Sonuçları

Osteojenik proliferasyon analizi, hem GEE (0, 0.048, 0.09, 0.19 ve 0.38 µg/mL) hem de GEE yüklü kitosan nanopartikülleri (0, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 µg/mL) için beş farklı konsantrasyonla MTT analizi kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.3 ve Şekil 4.7).

Tablo 4.3 Osteojenik proliferasyon analiz sonuçları (Değerler ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir)

GEE		GEE Yüklü Kitosan Nanopartikülleri	
Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Hücre Canlılığı (%)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Hücre Canlılığı (%)
0	100 $\pm$ 3.56	0	100 $\pm$ 3.56
0.048	104.9 $\pm$ 0.76	0.125	102.45 $\pm$ 5.76
0.09	102.13 $\pm$ 6.75	0.25	108.10 $\pm$ 1.10
0.19	100.25 $\pm$ 16.1	0.5	107.47 $\pm$ 18.95
0.38	98.05 $\pm$ 5.34	1	105.71 $\pm$ 5.06



Şekil 4.7 A) GEE ve B) GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin hBMC hücre hattı üzerindeki *in vitro* osteojenik proliferasyonu

4.1.6 *In Silico* Analiz Sonuçları

Yapılan *in silico* analizler doğrultusunda moleküler yerleştirme profilleri ve inhibitör mekanizmalara ek olarak ilaç benzeri özellikler de belirlenmiştir. Deneyler kapsamında hedef reseptör belirlenerek ligandlar eşliğinde moleküler yerleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiş, MD analizi ile su içerisindeki davranışlar belirlenmiş, son olarak ADME özelliklerinin belirlenmesi ve ilaç benzeri profillerin ortaya konulması açısından SWISSADME analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.1.6.1 Moleküler Yerleştirme Çalışmaları Sonuçları

Gypsophila cinsine ait endemik bir tür olan *Gypsophila eriocalyx* zengin fitokimyasal içermesi sebebiyle büyük bir farmakolojik potansiyel barındırmaktadır.

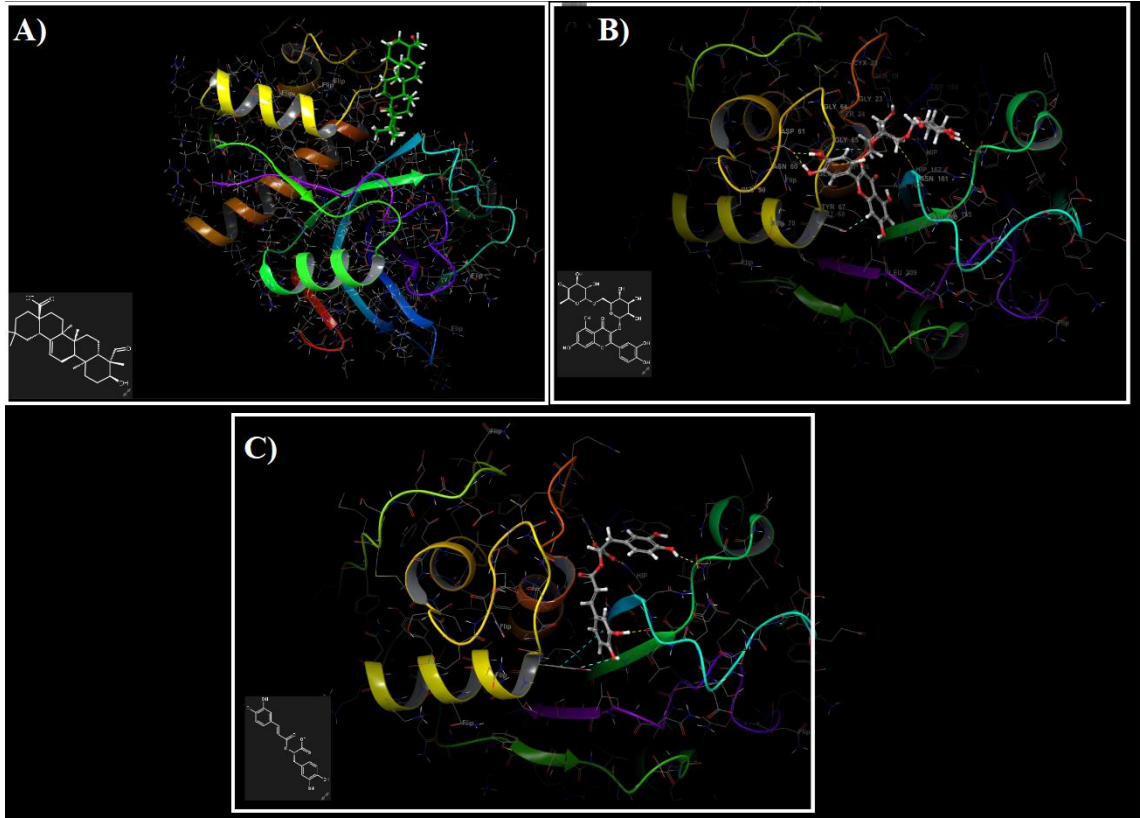
Gypsophila ana fito-bileşeni olan saponinlerin %46'sı gypsogenin maddesinden oluşmaktadır. Bünyesinde gypsogenine ek olarak içerdiği quercetin-3-rutinoside olarak da bilinen rutin, *Gypsophila* türleri arasındaki en yaygın flavonoid glikozittir. Diğer bir fitokimyasal olan rosmarinik asit, *Gypsophila eriocalyx* türünde baskın bir polifenoldür ve antioksidan seviyesi oldukça yüksektir [113].

Moleküler yerleştirme analizi kullanılarak, *Gypsophila eriocalyx* içerisinde bulunan baskın fitokimyasallardan olan gypsogenin, rutin ve rosmarinik asit bileşenlerinin moleküler yapılarının, anti-osteoporoz ilaç geliştirilmesindeki en önemli hedefler arasında bulunan CatK ile kenetlenmesi ve etkileşim mekanizmaları ortaya konulmuştur.

Şekil 4.8'de CatK ile kenetlenen üç fitokimyasal verilmiştir. Bu kenetlenme enerjileri ve etkileşim çeşitleri de Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4.4 CatK ve GEE ait fitobileşenlerinin moleküler yerleştirme analiz sonuçları

	Gypsogenin $C_{30}H_{46}O_4$	Rutin $C_{27}H_{30}O_{16}$	Rosmarinik asit $C_{18}H_{16}O_8$
Bağlanma Afiniteleri (kcal/mol)	-5.75	-8.67	-6.20
H Bağı Etkileşimleri (Å)	ASP61(1.80) GLY66(1.84)	SER138(1.86) ASN161(2.18) GLY66(2.44) ASP61(1.71) ASP61(1.74) HIS162(2.71)	LEU160(1.91) GLN19(1.65) SER138(2.16)
Tuz Köprüsü Etkileşimleri (Å)			HIS162(2.66)
Aromatik H Bağı Etkileşimleri (Å)		TYR67(2.59) TRP26(2.71)	TYR67(2.73) TRP184(2.77)
Pi-pi İstifleme Etkileşimleri (Å)			TYR67(5.16)



Şekil 4.8 A) Gypsogenin, B) Rutin ve C) Rosmarinik asit ‘in CatK reseptörüne bağlanan aktif ligandların yapıları

Ek olarak, CatK reseptörünün aktif bağlanma bölgesine bağlanan gypsogenin, rutin ve rosmarinik asit moleküllerinin, reseptöre bağlanma yerleri ve etkileşim mekanizmaları Şekil 4.9’da da verilmiştir.

Tablo 4.4’ten görüldüğü üzere, elde ettiğimiz sonuçlar; CatK reseptörüne en düşük enerjili ve en kararlı bağlanmayı gerçekleştiren molekül yapının rutin olduğu göstermektedir. Rutin ile CatK reseptörü arasındaki kararlı kenetlenmenin skoru -8.67 kcal/mol olarak bulunmuştur. Rutin molekülünü rosmarinik asit -6.20 kcal/mol kenetlenme skoru ile takip etmiş ve ikinci sırada yer almıştır. Gypsogeninin ise -5.75 kcal/mol skorlu bir bağlanma enerjisi ile üç ligand arasındaki en az bağlanma enerjisine sahip olduğu belirlenmiştir.

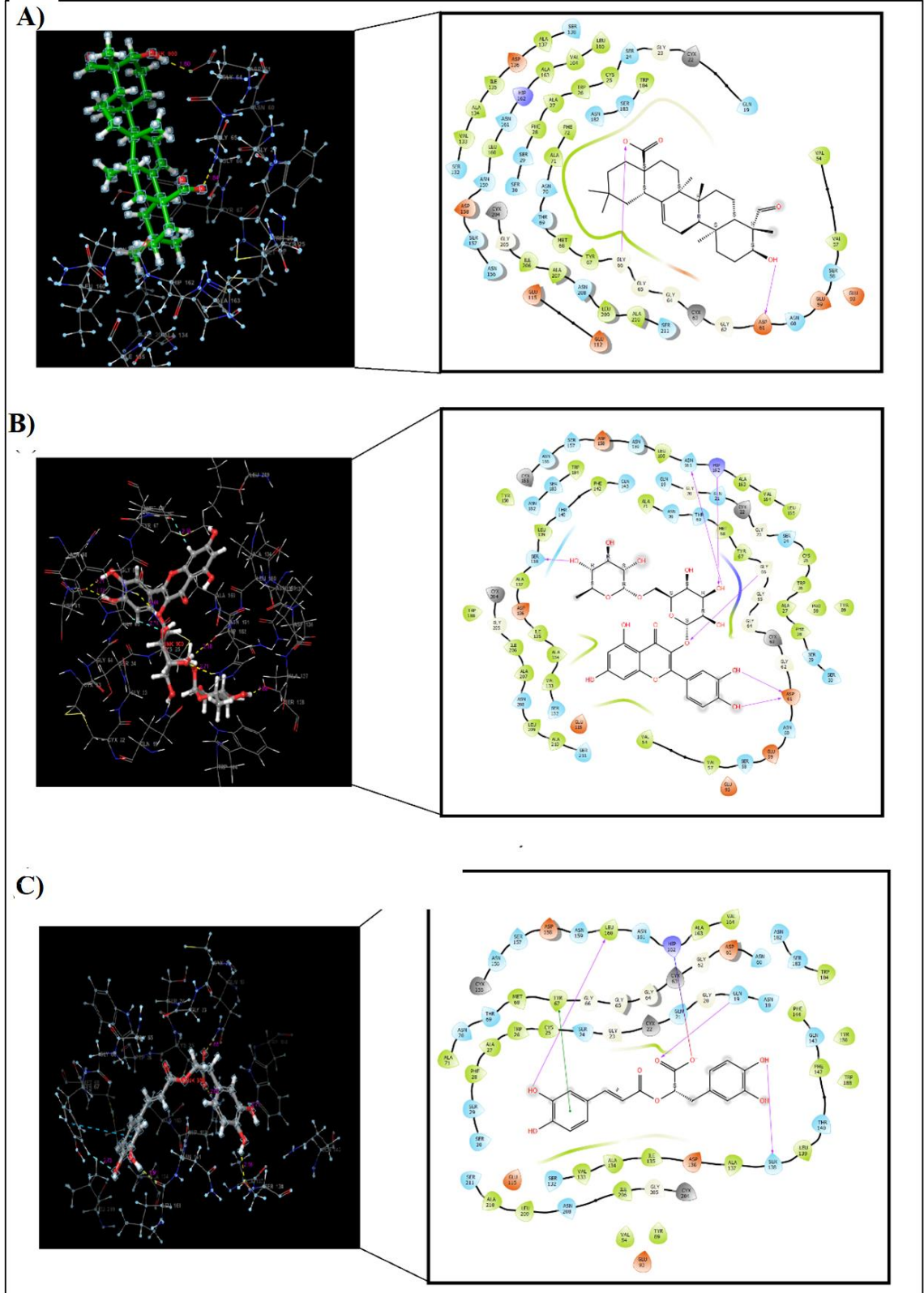
Bu düşük etkileşim, gypsogeninin CatK reseptörünün aktif bağlanma bölgesi ile daha az sayıda hidrojen bağı etkileşimine sahip olmasından kaynaklanmıştır.

Gypsogenin ASP61(1.80) ve GLY66(1.84) rezidüleri arasında iki adet hidrojen bağı ile bağlanmıştır. Elde edilen bu bağlanmalar mor renkli oklar ile Şekil 4.9(A)'da verilmiştir. Rutin molekülü CatK reseptörünün aktif bağlanma bölgesine SER138(1.86), ASN161(2.18), GLY66(2.44), ASP61(1.71), ASP61(1.74) ve HIS162(2.71) rezidülerinden toplamda altı adet hidrojen bağı ile kenetlenmiştir. Bunlara ek olarak; halka yapıdaki TYR67(2.59) ve TRP26(2.71) rezidüleri ile de aromatik hidrojen bağları ile bağlanarak, kararlı kenetlenmeyi gerçekleştirmiştir.

Rutin ve aktif bağlanma bölgesindeki rezidüler arasındaki hidrojen bağı etkileşimleri mor renkli oklar ile, aromatik hidrojen bağı etkileşimleri de mavi renkli oklar ile Şekil 4.9(B)'de gösterilmiştir.

Rosmarinik asit molekülü CatK reseptörünün aktif bağlanma bölgesindeki LEU160(1.91), GLN19(1.65) ve SER138(2.16) rezidüleri ile üç adet hidrojen bağı, TYR67(2.73) ve TRP184(2.77) rezidüleri ile aromatik hidrojen bağı etkileşimleri, HIS162(2.66) ile tuz köprüsü etkileşimi ve TYR67(5.16) ile de pi-pi istifleme etkileşimleri yapmıştır. Bu etkileşimler de Şekil 4.9(C)'de mor oklar hidrojen bağlarını, yeşil renk çizgi pi-pi istifleme etkileşimini temsil edecek şekilde sunulmuştur.

Tüm üç boyutlu etkileşimler ölçülen değerleriyle birlikte ve iki boyuttaki görsel temsilleri ile Şekil 4.9'da verilmiştir.



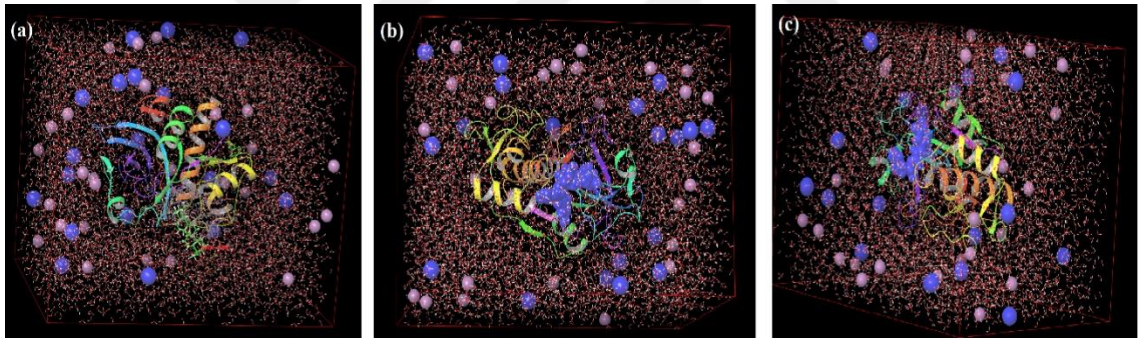
Şekil 4.9 A) Gypsogenin, B)Rutin ve C) Rosmarinik asit fitobileşenlerinin CatK reseptörü ve ligandların aktif bağlanma bölgesi etkileşimleri

4.1.6.2 MD Analiz Sonuçları

MD analizleri kapsamında, gypsogenin molekülü için, CatK ile 7052 adet su molekülü ve sistemi nötral hale getirmek için 27 adet klor (Cl) ve 20 adet sodyum (Na) atomu eklenerek 300 Kelvin (K) sıcaklık ve 1 atm basınçta 50 ns için MD simülasyonu gerçekleştirilmiştir.

Rutin molekülü için, CatK ile 6741 adet su molekülü ve sistemi nötral hale getirmek için 27 adet Cl ve 19 adet Na atomu eklenerek 300 K sıcaklık ve 1 atm basınçta 50 ns için MD simülasyonu gerçekleştirilmiştir.

Rosmarinik asit molekülü için, CatK ile 6768 adet su molekülü ve sistemi nötral hale getirmek için 26 adet Cl ve 19 adet Na atomu eklenerek 300 K sıcaklık ve 1 atm basınçta 50 ns için MD simülasyonu gerçekleştirilmiştir. MD için hazırlanan bu üç sistem sonuçları Şekil 4.10'da verilmiştir.

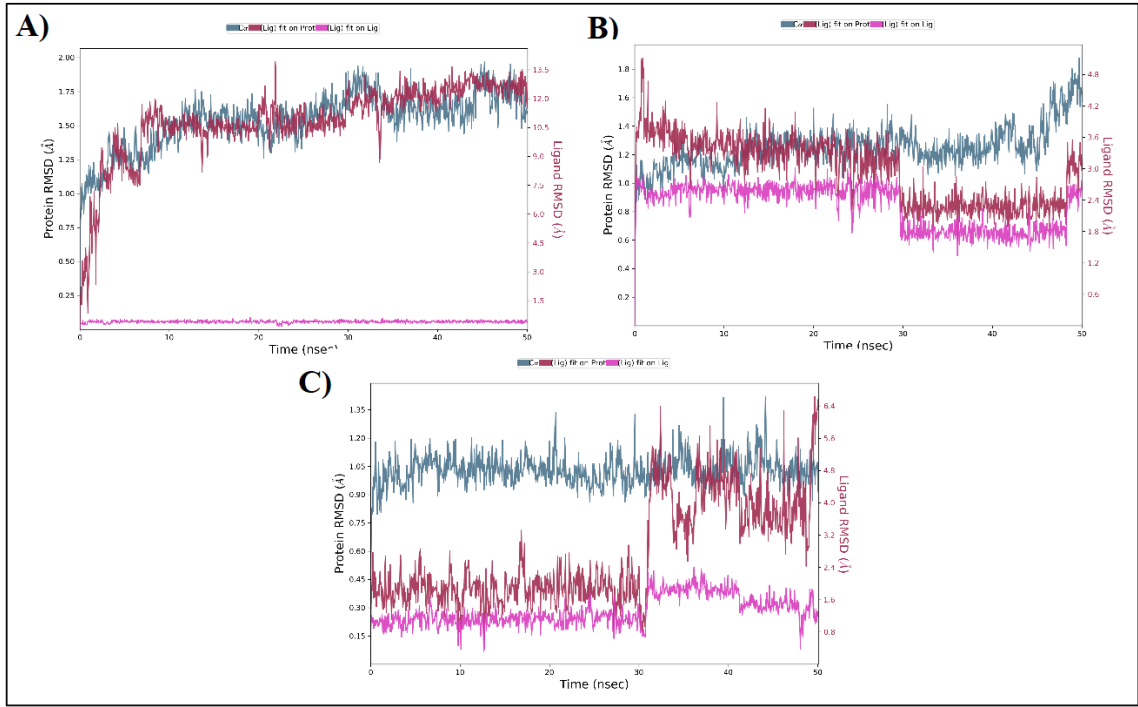


Şekil 4.10 A) Gypsogenin, B) Rutin ve C) Rosmarinik asit fitobileşenleri ve CatK MD sistem yapıları

50 ns MD analizleri sonucunda trajektörlerin elde edilmesi sonrasında teker teker her bir sistemin RMSD değerleri hesaplatılmıştır. Gypsogenin ile oluşturulan sistemin protein ve ligand RMSD değerleri Şekil 4.11 (A)'da verilmektedir. Şekildeki verilere göre, protein RMSD değeri 2 Å altında ve ligand RMSD değeri de (pembe renk ile gösterilmiştir) 0.5 Å altında elde edilmiştir. Yapılan MD hesaplama süresince RMSD değeri küçük dalgalanmalar ile 1.50 Å civarında kararlı bir biçimde kalmıştır.

Rutin için hesaplanan protein ve ligand RMSD değerleri de Şekil 4.11 (B)'de gösterilmiştir. Rutin için de RMSD değerleri de 2 Å altında elde edilmiştir.

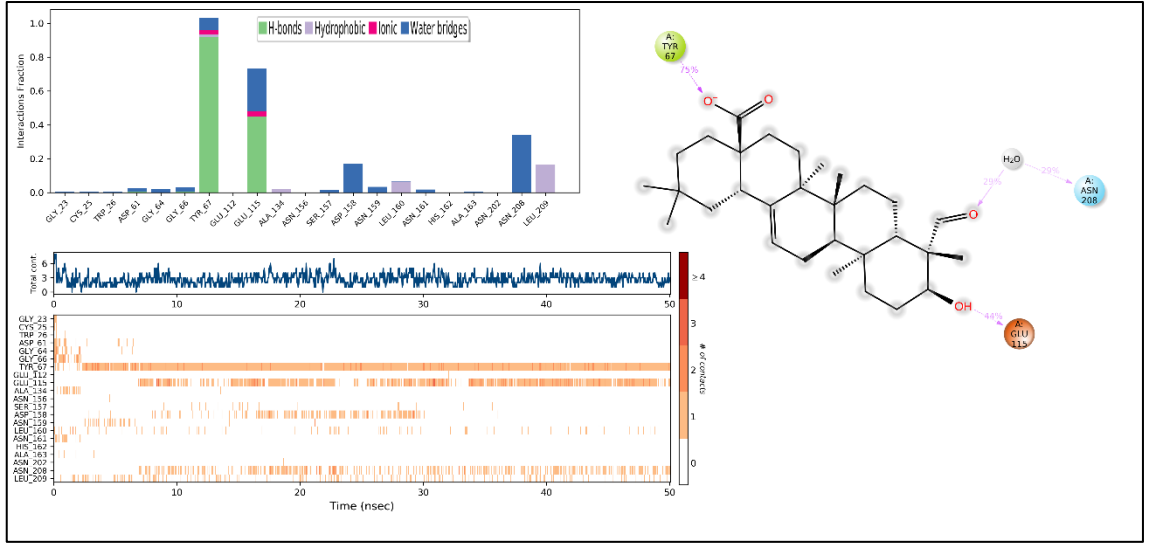
Rosmarinik asit için sistem RMSD değeri de maksimum 1.35 Å olarak hesaplanmıştır ve Şekil 4.11 (C)'de gösterilmiştir. MD simülasyonları gerçekleştirilen üç sistemde de moleküler yerleştirme gerçekleştirilmiş halde analiz edilen üç ligand ve CatK proteini kararlı halde bulunmuşlardır. MD analizleri sırasında atomlarda parçalanma veya bağlarda kopma gözlenmemiştir.



Şekil 4.11 A) Gypsogenin, B) Rutin ve C) Rosmarinik asit fitobileşenleri ve CatK MD sistemlerinin RMSD değerleri

Gypsogenin molekülünün CatK ile etkileşimi incelendiğinde; moleküler yerleştirme analizinde de ortaya konulduğu üzere ASP61 ve GLY66 rezidüleri ile hidrojen bağ etkileşimi yaptığı MD analizinde de gözlenmiştir. Ancak bu etkileşimler, sonrasında su molekülleri ile örtülü kalarak daha kısa süre ile sınırlı kalmıştır. Ek olarak molekül, TYR67, GLU115 rezidüleri ile çok daha uzun süreli etkileşim içerisinde bulunmuştur.

LEU 209 ve ASN 208 ile de hidrofobik etkileşimler gözlenmiştir. Gypsogenin molekülünün 50 ns boyunca CatK ile etkileşimi Şekil 4.12'de verilmiştir.

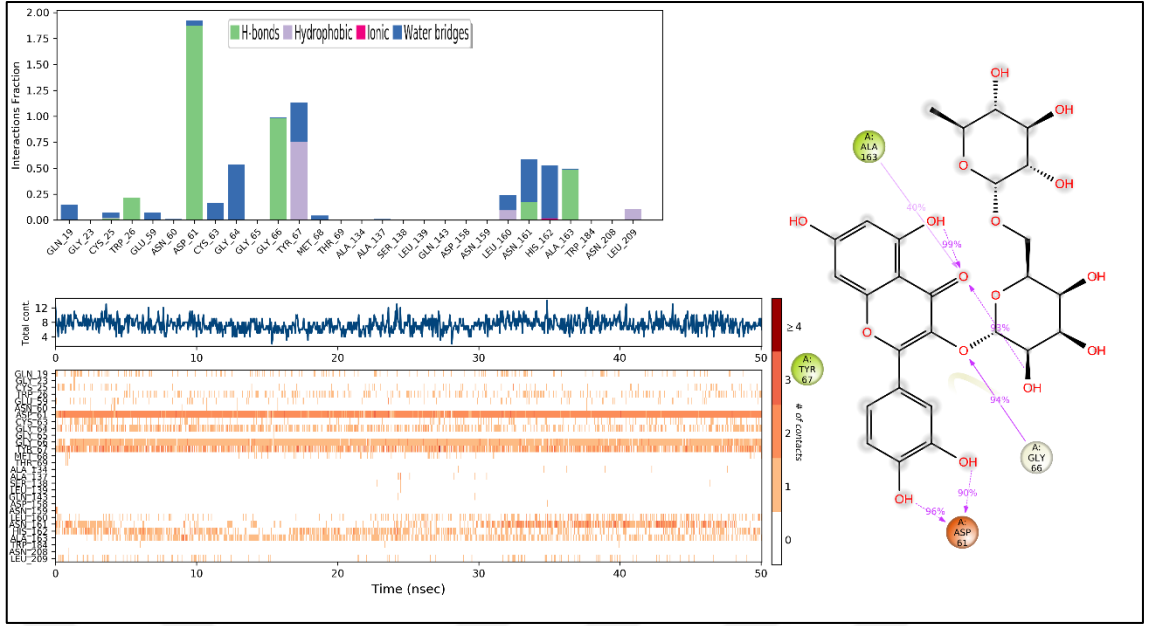


Şekil 4.12 Gypsogenin molekülünün 50 ns CatK ile etkileşimi

Rutin molekülünün CatK ile etkileşimi incelendiğinde; ASP 61, GLY66 rezidüleri ve ALA163 rezidüsü ile hidrojen bağı etkileşimi yaptığı gözlemlenmiştir. ASP61, GLY66 etkileşimleri 50 ns boyunca etkili olmuş etkileşimlerdir ki bu etkileşimler moleküler yerleştirme analizi ile de ortaya konulmuştur.

Benzer bir şekilde yerleştirme analizinde ortaya konulan ASN161 ile hidrojen bağı etkileşimi MD analizinde de gözlemlenmiştir. Moleküler yerleştirme analizinde aromatik hidrojen bağı yapan rezidüler olan TYR67 ile hidrofobik etkileşme ve TRP26 ile de hidrojen bağı etkileşimi belirlenmiştir. HIS162 ile de iyonik etkileşim belirlenmiştir ki bu etkileşim moleküler yerleştirme analizlerindeki tuz köprüsü etkileşimi olarak belirtilen etkileşimdir.

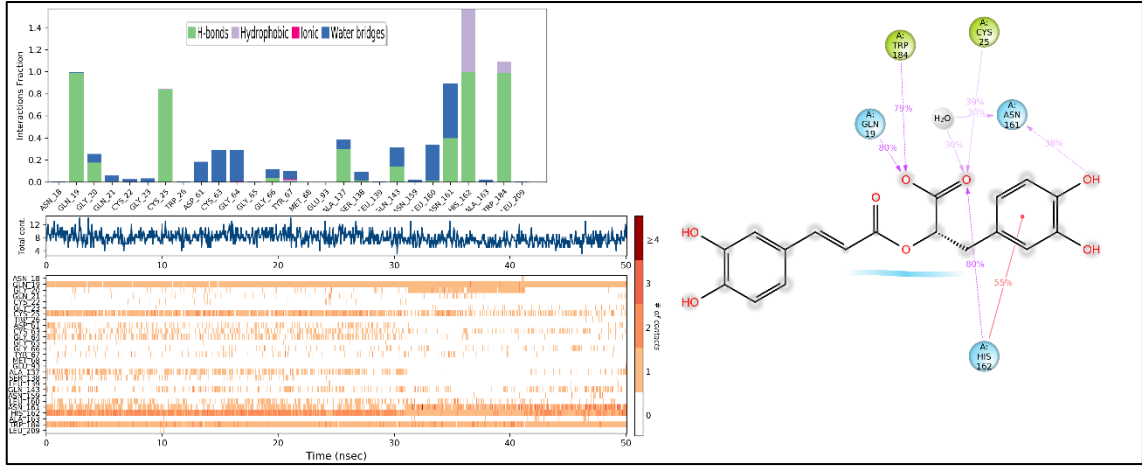
Tüm bu etkileşimlere ek olarak ALA163 ile de hidrojen bağı etkileşime sahip olduğu MD analizi sonunda ortaya konulmuştur. Etkileşim çeşitleri ve süreleri Şekil 4.13 'de verilmiştir.



Şekil 4.13 Rutin molekülünün 50 ns boyunca CatK ile etkileşimi

Rosmarinik asit 'in CatK ile etkileşimi incelendiğinde; GLN19, GLY20, CYS25, LEU160, SER138, ASN161, GLN143, ALA137, HIS162 ve TRP184 ile hidrojen bağı etkileşimleri meydana geldiği gözlemlenmiştir. En uzun süreli etkileşimler GLN19, HIS162, TRP184, ASN161 ve CYS25 rezidüleri ile gerçekleşmiştir.

Moleküler yerleştirme analizleri sonucu ile benzer şekilde GLN19, LEU160, HIS162 ve TRP184 rezidüleri ile hidrojen bağı etkileşimleri gözlemlenmiştir. Moleküler yerleştirme analizinde gözlemlenmiş olan TYR 67 ile aromatik hidrojen bağı ve pi-pi etkileşimi iyonik etkileşimleri, MD analizinde de benzer şekilde aynı rezidü ile gözlemlenmiştir. Hidrofobik etkileşimler de TRP184 ve HIS162 rezidülerinde meydana gelmiştir. Tüm bu etkileşimlerin çeşidi, süresi ve rosmarinik asit 'in hangi atomları ile bu etkileşimin ortaya çıktığı Şekil 4.14' te verilmiştir.



Şekil 4.14 Rosmarinik asit molekülünün 50 ns boyunca CatK ile etkileşimi

4.1.6.3 ADME Parametrelerinin Tahmin Sonuçları

SwissADME çevrimiçi yazılımı üzerinden gerçekleştirilen tahmini ADME değerlerinin hesaplanması ile elde edilen sonuçlar Tablo 4.5'te verilmiştir. Literatürdeki veriler ile paralelliğinin belirlenmesi ve elde edilen teorik verilerin yorumlanması açısından tabloda yer alan ortalama değerler, farmakolojik çalışmalardan elde edilmiş ve analizlerde sıklıkla kullanılan verilerdir [114].

Analizler kapsamında seçilen parametreler, osteoporozla yönelik ilaç geliştirmesi çalışmalarında incelenen literatür parametrelerinden esinlenilerek seçilmiştir. Anti-osteoporoz özelliklerin ortaya konulması açısından moleküler ağırlık ve H-bağı alıcı ve donör sayıları gibi fizikokimyasal özelliklerin yanı sıra suda çözünürlük gibi doğrudan kemiğe yönelik olan özelliklerinin belirlenmesi de önem taşımaktadır. Hedef seçilmiş reseptörün kemik organik matrisinde bulunması sebebiyle farmakolojik parametrelerin bilinmesi, kontrollü ilaç salım sisteminin geliştirilmesi açısından büyük bir fayda sağlayacaktır.

Bu kapsamda tahmin edilen özellikler, farklı kimyasallar arasında tanımlamayı kolaylaştırmak için renk kodludur. Renk kodları şunları içerir: son derece pozitif ve evet değerleri için pembe; zayıf pozitif değerler için sarı, negatif ve hayır değerleri için yeşil.

Tablo 4.5 Fitobileşenlerin teorik ADME özellikleri

ADME Özellikleri	Gypsogenin	Rutin	Rosmarinik asit	
Fizikokimyasal Özellikler				Ortalama Değerler
Molekül Ağırlığı(g/mol)	470.68	610.52	360.31	(50.0/500.0)
Csp3 Oranı	0.87	0.44	0.11	(≥0.25)
Dönebilen bağ sayısı	2	6	7	(1.0/10.0)
H-bağı Alıcılarının Sayısı	4	16	8	(2.0/20.0)
H-bağı Donörü Sayısı	2	10	5	(0.0/6.0)
TPSA Å² (Topolojik Polar Yüzey Alanı)	74.60	269.43	144.52	(≤140.0)
Farmakolojik Özelliklerin Tahmini				
log P Değerlerinin Ortalaması	5.34	-1.29	1.52	(≥1.0, ≤4.0)
log S (Suda Çözünürlük)	-6.83	-3.30	-3.44	(-6.5/0.5)
Çözünürlük Sınıfı	Zayıf Çözünür	Çözünür	Çözünür	Çözünür
Gastrointestinal Absorpsiyon	Yüksek	Düşük	Düşük	-
Kan-Beyin Bariyeri Geçirgenliği	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
P-gp Substratı	Evet	Evet	Hayır	-
Log Kp (Deri geçirgenliği cm/s)	-4.43	-10.26	-6.82	(cm/saat cinsinden Kp)
Lipinski 5 İhlal Kuralı	1	3	0	(Maksimum 4)
Biyoyararlanım Skoru	0.85	0.17	0.56	(≥0.10)

SONUÇ VE ÖNERİLER

Osteoporoz, kemik dokusunda yapısal bozulma, düşük kemik kütlesi ve artmış kırık riski ile ilişkili bir iskelet bozukluğudur. Osteoporozlu hastaların, normal kemik minerali olan bireylere kıyasla sağlıkla ilgili yaşam kaliteleri daha düşüktür. Yapılan çalışmalar, osteoporozun ve buna bağlı kemik zayıflıklarının Avustralya, Japonya, Avrupa'daki beş ülke (Birleşik Krallık, Fransa, Almanya, İtalya, İspanya), ABD ve Kanada'da 50 yaş ve üzeri 24 ila 49 milyon kişiyi etkilediğini bildirmiştir [115]. Başka bir çalışmada, küresel olarak osteoporozdan etkilenen 286 milyondan fazla hastanın olduğu tahmin edilmektedir [116].

Osteoporoz son yıllarda global çapta yaşlanma eğiliminde olan nüfus sebebiyle, özellikle orta yaşlı ve yaşlı bireylerin sağlığı için ciddi bir tehlikeye dönüşmüştür. Her iki cinsiyeti de etkileyen hastalığın kadınlardaki prevalansı erkeklere kıyasla üç kat daha fazladır. Osteoporozun genetikten, beslenmeye, steroidler benzeri ilaçlar kullanımından vitamin eksikliklerine kadar pek çok tetikleyici sebebi olabilmektedir. Günümüzde osteoporoz tedavileri çoğunlukla bifosfonat içerikli ilaçlar ile sınırlıdır.

Alendronat, İbandronat, Risedronat örnekleri verilebilecek bu ilaç türleri yan etkileri ve sadece belirli bir periyotta kullanılmaları sebebiyle tam bir tedavi tanımından çok hastalığı belirli bir seviyede tutmaya yöneliktir [117]. Bir alternatif olarak bitkisel temelli anti-osteoporoz ajanları antik çağlardan günümüze dek sıklıkla tercih edilmiştir. *Alangium salvifolium*, *Diospyros chloroxylon*, *Erythrina fusca*, *Mimosa intsia* gibi farklı ailelere ait bitki türleri kemiklerin kırık tedavisinde kullanılmıştır [118].

Şifalı bitki ailelerinden birisi olan Caryophyllaceae 'ye ait *Gypsophila eriocalyx* endemik türü, zengin saponin içeriği sebebiyle güçlü bir terapötik potansiyel barındırmaktadır. Bitkilerin tedavi edici potansiyellerine ek olarak; ilaç iletimini sağlamak, stabiliteyi ve biyoyararlanımı arttırmak amacıyla nanopartikül dozaj

formunda yenilikçi bir ilaç salım sisteminin geliştirilmesi son yılların vazgeçilmez araştırma konularından birisi haline gelmiştir [119].

Nanopartiküller; geniş yüzey alanları, biyoyumlu olmaları, hedef odaklı iletim sistemleri ve biyobozunur olmaları sebebiyle kontrollü ilaç dağıtım sistemlerinde en çok tercih edilen sistemlerden bir tanesidir. İlaç salım sistemlerinde tercih edilen polimerik nanopartikül malzemelerinden kitosan, FDA ve EMA tarafından onaylanmış en önemli katyonik polimerdir [120]. Kitosan kolay işlevselleştirilebilir ve muko-adeziv özellikleri sebebiyle ilaçların ve farmasötiklerin organlara verilmesi için en çok çalışılan polimerlerden bir tanesidir.

Osteoporoz araştırmalarında kitosan nanopartiküllerinin kullanılması konusu araştırılmaya devam etmektedir. Örneğin, bifosfonat benzeri risedronatların biyoyararlanımlarını yükseltmek amacıyla kitosan nanopartikülleri ile işlevselleştirme çalışması *in vivo* deneylerde başarıyla sonuçlanmıştır [121]. Başka bir çalışmada, insan paratiroid hormonu yüklü kitosan nanopartikülleri osteoporoz tedavisi amacıyla kullanılmıştır. Nanopartiküllerin *in vivo* deneyler kapsamında farelere verilmesi sonucunda hücre içi kalsiyum alımının, kemiğe özgü alkalik fosfataz üretiminin ve osteokalsin üretiminin uyarıldığı bildirilmiştir [122].

Bir diğer çalışmada, osteoporoz tedavilerinde sıklıkla kullanılan pamidronat disodyumun kitosan nanopartiküllerine enkapsülasyonu ile biyobozunur ajanlar geliştirilmesi amaçlanmıştır [123]. Çalışmanın sonucunda ajanların osteoporotik sıçanlar üzerinde kullanım potansiyelleri artan kemik mimarisi ile ortaya konulmuştur.

Detaylı literatür araştırmaları neticesinde şu ana kadar *Gypsophila eriocalyx*'in anti-osteoporoz etkisinin araştırılması ve kitosan nanopartiküllerine enkapsüle edilmesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunamamıştır.

Tez çalışması, anti-osteoporoz etkileri literatürde bildirilmiş olan saponin maddesince zengin *Gypsophila eriocalyx* ekstraktı içeren kitosan nanopartiküllerinin sentezlenmesi, karakterizasyonu, salım profillerinin ve

sitotoksitelerinin belirlenmesi ve anti-osteoporoz etkilerinin *in silico* yöntemlerle değerlendirilmesini amaçlamıştır.

Tez amacı doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmalar şu şekildedir,

1. *Gypsophila eriocalyx*'in kökleri uygun şartlarda toplanmış ve sonrasında dekoksasyonu ile ekstrakt elde edilmiştir.
2. *Gypsophila eriocalyx* ekstraktının kitosan nanopartiküllerine enkapsülasyonu gerçekleştirilmiş ve sentez iyonik jelleşme yöntemiyle yapılmıştır.
3. *Gypsophila eriocalyx* içeren kitosan nanopartiküllerinin UV-Vis ve ATR-FTIR spektroskopisi, zeta potansiyeli analizi, yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon veriminin bulunması ve salım profillerinin incelenmesi ile karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
4. *Gypsophila eriocalyx* içeren kitosan nanopartiküllerinin ve GEE'nin sitotoksik etkilerinin ve osteojenik proliferasyon profillerinin belirlenmesi amacıyla MTT deneyleri gerçekleştirilmiştir.
5. Son olarak *Gypsophila eriocalyx* etken maddelerinin anti-osteoporotik etkilerinin moleküler analizleri, moleküler yerleştirme ve moleküler dinamik simülasyonları çalışmalarıyla belirlenmiştir. İlaç profilleri ADME özelliklerinin teorik tahminleri ile ortaya konmuştur.

İlk olarak, dekoksasyon yöntemiyle kaynatılan toz halindeki *Gypsophila eriocalyx*, kahverengi, kıvamlı ve üst kısmında köpükler oluşan bir sıvı oluşturmuştur. *Gypsophila* türlerinin ana maddesi olan saponin kaynatıldığında kıvam almaktadır ve kıvam arttırıcı olarak helva ve yenilebilir köpük yapımında kullanılmaktadır [124]. Bu bilgilerden yola çıkılarak saponinlerin başarılı bir şekilde ekstrakt solüsyonuna aktarıldığı söylenebilir. Nanopartiküllerde boyut, kullanılan ajan maddesine bağlı olarak toksisiteyi belirlemektedir. Nanopartiküllerin yüzey özellikleri ve boyutları sayesinde içerdikleri terapötik madde miktarları, yarı ömürleri ve hedefteki birikimleri belirlenebilmektedir. Nanopartiküllerin boyutlarının toksisite ile ters orantılı olduğu düşünülmektedir.

Nanopartiküller için belirlenen genel aralık 10-100 nm arasındadır. Kitosan nanopartiküllerinin osteoporoz tedavilerine yönelik kullanımı ile ilgili örnek verilen çalışmalarda dolu kitosan nanopartikülleri için boyutlar 170-260 nm arasında değişmektedir. Kemik gözeneklerinin 20- 1500 nm arasında değişken boyutları ajanların nanopartiküller aracılığıyla iletilmesi noktasında büyük bir avantaj sağlamaktadır [125].

Tez çalışmasından elde edilen ortalama nanopartikül boyutları boş kitosan nanopartikülleri için 67.71 ± 7.75 nm ve GEE yüklü kitosan nanopartikülleri için 139.6 ± 1.55 nm olarak bulunmuştur.

Sentez deneyleri sonucunda boş kitosan nanopartiküllerine kıyasla GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin boyutlarında artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu durumun, çalışma kapsamında kullanılan etken madde olan GEE'nin yapısındaki kimyasal gruplar ile kitosan polimerinin zincirleri arasında meydana gelen itme kuvvetlerinin neden olduğu etkileşimlerden dolayı olduğu düşünülmektedir.

PdI değeri kolloidal numune içerisindeki partiküllerin boyut dağılımı hakkında bilgi sahibi olunmasına yardımcı olan önemli bir parametredir ve çoğunlukla 0 ile 1 aralığında olması beklenir. Farmakolojide PdI değerleri 0.3'ten düşük olan kolloidal partiküllerin monodispers ve 0.5'ten büyük olanların polidispers dağılım gösterdiği kabul edilmektedir [126].

Deney sonucunda elde edilen PdI değerleri sırasıyla boş ve GEE yüklü kitosan nanopartikülleri için 0.139 ± 0.02 ve 0.124 ± 0.01 olarak bulunmuştur.

Değerlerden anlaşılaacağı üzere, kitosan nanopartikülleri solüsyon içerisinde monodispers dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Bu dağılım, solüsyon içerisinde tek tip moleküler ağırlıkta olan nanopartiküllerin homojen bir dağılım içerisinde olduğu anlamına gelmektedir. Kontrollü ilaç dağıtım sistemlerinde, formülasyonların gözeneklerden rahat geçebilmesi hedefi dolayısıyla PdI değerinin 0.3'ten küçük olması beklenmektedir [127].

Çalışma kapsamında elde edilen formülasyonun boyut ve dağılım açısından incelenmesi sonucunda, GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin oral olarak

alınacak bir takviye için gastrointestinal (GI) sistemde çözünürlük şartları olan 300 nm'den küçük olması ve monodispers dağılımda olması şartlarını da sağladığı belirlenmiştir [128].

Çoğunlukla polisakkaritler asidik ortamlarda nötr davrandıklarından kitosanın katyonik olması, terapötik ajanların iletimini sağlamak amacıyla taşıyıcı sistemler oluşturulduğunda elektrostatik kompleksler oluşturmasını kolaylaştırmaktadır. Buna ek olarak, GI sistem dokularındaki mukozal tabakanın anyonik olması sebebiyle katyonik kitosan, muko-adezif bir davranış sergilemektedir. Gypsogenin maddesi, diğer saponinler gibi bazik özelliğiyle bilindiğinden ve yapısında bulunan fonksiyonel grupları dolayısıyla katyonik bir etki gösterdiği düşünülmektedir. Buna bağlı olarak katyonik bir nanopartikül yapısı ve artan GEE konsantrasyonu ile birlikte katyonik davranışların artacağı düşünülmüştür.

Boş kitosan nanopartikülleri ve GEE yüklü kitosan nanopartikülleri için zeta potansiyelleri sırasıyla 11.4 ± 1.29 ve 12.2 ± 0.91 mV bulunmuştur ve katyonik davranışın arttığı görülmüştür.

Katyonik taşıyıcıların veya nano-ajanların ilaç geliştirmede kullanılması, hücresel alımda endositozu kolaylaştırması sebebiyle avantajlı olarak kabul görmektedir. Suda az çözünür veya hidrofobik bileşenlerin katyonik vektörler sayesinde hedef bölgeye emilimi daha kolay hale gelmektedir [129]. Buna ek olarak, katyonik nanopartiküllerin osteogenezi desteklediği bildirilmiştir [130]. Ayrıca pozitif kitosan nanopartikülleri hücre kinetiğine daha kolay uyum sağlaması sebebiyle tüm hücre hatlarında hücre içi alımlarının daha fazla olduğu belirtilmiştir [131]. Literatürde pozitif yüklü nanopartiküllerin kemik yüzeyinin minimal de olsa negatif yüklü olması sebebiyle daha yüksek bağlanma afinitesi gösterdiği bildirilmiştir [132].

ATR-FTIR spektroskopisi, çok yönlü yaklaşımı sebebiyle numuneler içerisindeki aktif bileşenleri ve fizikokimyasal etkileşimleri doğrudan analiz etmektedir. Karakterizasyon çalışmalarında tercih edilmesinin bir diğer nedeni, nanopartikül formülasyonlarında özellikle ilaç formüllerinin C=O, C-H veya N-H gibi çeşitli fonksiyonel grupların öznelik zirvelerinin görünümünün, modifikasyonunun ve ayırt edilebilirliğinin önünü açmasıdır [133].

Çalışma kapsamında elde edilen veriler boş kitosan ile GEE karakteristik piklerinin GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinde birlikte gözlemlenmesi, enkapsülasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirdiğini belirtmektedir.

GEE analizleri sonucunda elde edilen $\sim 3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki piklerin kalsiyum sülfata (jips) ait O-H germe bantları olduğu düşünülmüştür [134]. Elde edilen $\sim 2931\text{ cm}^{-1}$ bantının CH_3 germe bantı olduğu ve kütikular vaks yapısından kaynaklandığı belirlenmiştir [135]. Sonrasında belirlenen $\sim 2300\text{ cm}^{-1}$ piklerinin atmosferik CO_2 kaynaklı $\text{O}=\text{C}=\text{O}$ germe bantları olduğu belirlenmiştir. Karakteristik $\sim 1633\text{ cm}^{-1}$ piki $\text{C}=\text{O}$ germe bantlarının varlığını işaret etmektedir. Bu germeye sebep olan kalsiyum okzalatin, bitkinin yetiştiği jipsli toprak sebebiyle ekstrakt içerisinde yer aldığı düşünülmüştür. Bitkinin jipsli toprakta yoğun olarak bulunun kalsiyumu, kalsiyum okalat olarak depo ettiği ve kurak koşullarda şeker sentezine dahil ettiği düşünülmektedir [136].

Saponinler üzerine yapılan çalışmalar neticesinde spesifik piklerin literatürde belirtilmesi doğrultusunda $\sim 1714\text{ cm}^{-1}$ pikinin esterlere ait $\text{C}=\text{O}$ germe bantı olduğu düşünülerek saponin içeriğine işaret ettiği kanaatine varılmıştır [137]. Ek olarak $\sim 1041\text{ cm}^{-1}$ pikinin yine jipse ait S-O germe bantı ve $\sim 527\text{-}517\text{ cm}^{-1}$ piklerinin ise S-O eğilme bantları olduğu tahmin edilmektedir. Kükürt de kalsiyum gibi jipsli toprakların yoğun olarak içerdiği bir diğer bileşendir.

Çalışma kapsamında elde edilen ATR-FTIR analizi sonuçlarındaki esterlerin $\text{C}=\text{O}$ germe bantlarının varlığı ve yüksek miktarda farklı karakteristik pikler içermesi, bitkinin jipsli koşullara uyum sağladığını ve bu sebeple aşırı sekonder metabolit sentezleyerek çevresel faktörlere tepki verdiği ve abiyotik stres toleransına sebep olan adaptasyonunun bir parçası olduğu şeklinde yorumlanabilir. Yoğunlukta olan $\text{C}=\text{O}$ piklerinin yüksek miktarda saponin içeriği dolayısıyla oluştuğu düşünülmüştür [137].

Kontrollü ilaç salım sistemleri, biyouyumluluk ve biyobozunurluğun yanı sıra terapötik ajanların düzenli olarak salımını gerçekleştirmesi avantajı sebebiyle tedavilerde sıklıkla tercih edilmektedirler.

Kitosan yapısal olarak, çalışmalar kapsamında eklenilen TPP ile iyonik çapraz bağlar oluşturduğundan bu kompleks, hazırlanan nanoformülasyonu kararlı ve hedef bölgede belirli bir süre kalan bir yapıya dönüşmektedir.

GEE kimyasal olarak bazik olduğundan, nanopartiküller ile olan enkapsülasyonu arttırmak adına kitosan pH'ı 2.8 olacak şekilde ayarlanmıştır. Asidik ortamlarda şişmeleri ile bilinen kitosan nanopartikülleri, çalışma kapsamında hazırlanan nanoformülasyonun sürekli olarak salınımını sağlamaktadır.

GEE ile yüklü kitosan nanopartiküllerinin salım profilleri deneyi kapsamında 48 saat sonrasında enkapsüle olmuş GEE miktarının yaklaşık %90.45 kadarının PBS ortamına saldıgı gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda nanoformülasyonun %40'ının ilk 10 saat içerisinde hızlı bir şekilde salındığı bulunmuştur. Bu salıma "bolus" adı verilir ve kontrollü ilaç dağıtım sistemlerinin tedavi uygulamalarında sıklıkla tercih edilir. İlacın yarısı kadarının hızlı bir şekilde hedef bölgeye ulaşmasını sağlamak ve bu da tüm salımın gerçekleşmesini beklemeden hedef bölgede rahatlama sağlamaktadır [138].

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin en büyük avantajlarından birisi, bileşenlerin hedef bölgeye tek seferde verilmesini değil, yavaş bir salımı desteklemesidir. Bu sayede ilaç, hasta tarafında belirli periyotlarda kullanılmaktadır. Osteoporoz tedavilerinde kontrollü ilaç sistemlerinin kullanılması, kişiye yönelik tedavi adımlarının atılması ve dozajın ayarlanması konusunda büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Örneğin, osteoporoz tedavilerinde sıklıkla kullanılan Alendronate, oral tablet olarak tüketildiğinde günlük 10 mg olacak şekilde alınmalıdır. Alendronate gibi ilaçların kontrollü olarak değil de tek seferde salım gerçekleşecek şekilde verilmesi 10 mg bileşenin hedef bölgeyi nüfuz etmesine sebep olacak, bu da bağışıklık sisteminin uyarılması ile sonuçlanacaktır [139].

Alendronate ile ilgili gerçekleştirilen başka bir çalışmada, ilacın %90'ının 8-10 saat içerisinde salındığını, bu sürenin kitosan nanopartikülleri ile kaplanan aynı maddede 30 saate kadar çıktığını bildirmişlerdir [140].

Literatürden de anlaşılacağı üzere, bileşenlerin kitosan nanopartikülleri ile enkapsüle şekilde kullanılması kontrollü salım açısından büyük bir fayda sağlamakta ve verim düşüşünün önüne geçmektedir.

Nanopartikül çalışmalarında, rezervuar ve etken madde arasındaki yükleme ve verim ilişkisini belirlemek amacıyla enkapsülasyon veriminin ve yükleme kapasitesinin hesaplanması en önemli fizikokimyasal karakterizasyon aşamalarındandır. GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi %90.61 olarak bulunmuştur. Bulunan bu değer, enkapsüle edilmek istenen 100 μg GEE'nin 90.61 μg kadarının enkapsüle edilebildiğini göstermektedir. Literatürde kitosan nanopartikülleri için %50 ve üzeri kabul edilebilir bir verim değeri iken %80 ve üzeri çok yüksek enkapsülasyon verimi olarak değerlendirilmektedir [141].

Yükleme kapasitesi ise nanopartiküllerin ne kadarının enkapsüle edilmek istenen bileşenlerden (ekstraktan) oluştuğu hakkında bilgi vermektedir. Çalışma kapsamında bulunan %38.56 yükleme kapasitesi nanopartiküllerin ağırlığının %38.56'sının GEE'den oluştuğu anlamına gelmektedir. Bu değer ise her 1 mg nanopartikül içeriğinin 0.38 mg kadar bileşenleri içerdiğini göstermektedir. Literatürde bildirilen çalışmalar genellikle ilaç geliştirme çalışmalarında %40 ve altında kümelenmiş durumdadır [142].

Kitosan biyopolimerinin, yapılan çalışmalar doğrultusunda L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi olmadığı belirtilmiştir [143]. Literatürde *Gypsophila eriocalyx*'in sitotoksitesine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bunlar ek olarak, ISO10993 (Uluslararası Standartlar Organizasyonu) standartları doğrultusunda maddelerin %80 üzerinde canlılık seviyesinde toksik olmadıkları belirtilmiştir [144].

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen L929 fibroblast hücreleri sitotoksitesite deneylerinde yüksek konsantrasyonlarda düşen hücre canlılığı nedeniyle toksisite artarken, ideal olduğu GEE sitotoksitesite deney sonuçları sonrasında belirlenen GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin çalışılan konsantrasyonlarında hücre canlılığının %80'in altına düşmediği görülmüştür ki bu da GEE'nin bu konsantrasyonlarda toksik olmadığı anlamına gelmektedir.

GEE ile kıyasla, GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinde azalan toksisitenin; kitosan ile enkapsülasyon sonucunda artan yüzey alanı, çözünürlük ve etken maddenin biyoyumluluğunun artması sebebiyle gerçekleştiği düşünülmektedir.

Osteojenik proliferasyon analizleri sonrasında GEE'nin özellikle 0.048 ve 0.09 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında hBMC'ler üzerinde hücre proliferasyonunu artırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. 0.38 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda ise hücreler üzerinde %2'lik bir toksisite gösterdiği belirlenmiştir. GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin deney kapsamında kullanılan bütün konsantrasyonlarında hücresel proliferasyonun arttığı belirlenmiştir. Etken maddenin hBMC proliferasyonunu desteklemesinin yanında kitosan nanopartiküllerinin kemik iliği hücreleri üzerinde destekleyici etkisi literatürde bildirildiğinden sentezlenen nanopartiküllerin artan proliferasyon etkisine kitosan biyopolimerinin de katkısının olduğu düşünülmüştür [145].

Bir çalışmada, kitosan/hidroksiapatit nanopartikülleri de dahil olmak üzere çeşitli nanopartikül formülasyonlarının osteoindüktif potansiyelleri araştırılmıştır. Sonuç olarak nanopartiküller farklı konsantrasyonlarda önemli sitotoksikite göstermemiş ve proliferasyonu sınırlı olarak desteklediği rapor edilmiştir [146].

Başka bir çalışmada, *Tithonia diversifolia* yaprağı ekstresinin fare kemik iliği kök hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini incelemek için MTT testi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda bitki ekstraktının 0.5, 0.25 ve 0.125 mg/mL konsantrasyonlarında hücrelerin %50'sini öldürdüğü ve sadece 0.0625 mg/mL konsantrasyonda hücre canlılığının %72 olduğu belirtilmiştir [147].

Nasturtium officinale yapraklarının ekstraktı ile sentezlenmiş altın nanopartikülleri üzerine gerçekleştirilmiş bir çalışmada tavşan kemik iliği hücreleri üzerinde sitotoksikite çalışması gerçekleştirilmiş ve bitki ekstraktının toksik etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, nanopartiküllerin 12.5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda sitotoksik etki göstermediği ve proliferasyonu etkilemediği ancak yüksek konsantrasyonlarda 26 $\mu\text{g/mL}$ yüksek konsantrasyonunda hücrelerin %50'sini öldürdüğü bildirilmiştir [148].

Ilex paraguariensis ekstraktı ile kemik iliği hücreleri üzerinde gerçekleştirilen MTT testi ile sitotoksosite analizi sonucunda 10, 20 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ gibi denenen düşük konsantrasyonlarda az miktarda sitotoksosite görülürken, artan konsantrasyonlar ile canlılığın %50'nin altına kadar düştüğü belirtilmiştir [149].

GEE'nin osteoporoz üzerindeki etkisinin ortaya konulması ve bu kapsamda potansiyelinin belirlenmesi amacıyla *in silico* deneyler gerçekleştirilmiştir. Osteoporoza sebep olan osteoklastogenezin sinyal yollarının çeşitli moleküller ile birbirine bağlı olduğu bilinmektedir. CatK ekspresyonunun nükleer faktör κB ligandı (RANKL)-RANK sinyalleşmesinin reseptör aktivatörü tarafından düzenlendiği literatürde bildirilmiştir. Anti-osteoporotik hedef olarak CatK'nın seçilmesi, sinyal yollarındaki diğer moleküllerin tetikleyici davranışlarının son aşaması olan bu reseptörün sentezinin önüne geçilmesinden ileri gelmektedir [72].

Elde edilen moleküler yerleştirme deneyleri sonuçlarına göre, GEE için rutin bileşeninin -8.67 kcal/mol bağlanma afinitesi ile -5.75 kcal/mol olan gypsogenin ve -6.20 kcal/mol olan rosmarinik asit'i geride bıraktığı belirlenmiştir.

Daha düşük bir afinite değeri daha güçlü bir bağlanmaya işaretler. Moleküler yerleştirme çalışmalarında çoğunlukla ideal bağlanma afinitesi değerinin -4.0 kcal/mol ve altında olması beklenmektedir. H bağı etkileşimler moleküler yerleştirme deneylerinde ligand ve protein arasındaki bağlanma mekanizmalarının gücünü ifade eder niteliktedir. Rutin bileşeninde 6, gypsogeninde 2 ve rosmarinik asit bileşeninde 3 adet gözlemlenen H bağları, teorik olarak ekstrakt bileşenlerinin hedef proteine oldukça güçlü bir bağlanma gerçekleştireceği anlamına gelmektedir.

Literatürde CatK için aktif bölgeleri ASP158, SER157, ASN161, HIS162, TYR67, CYS25, GLN19 ve GLY66 olarak belirtilmiştir [150]. Bileşenlerden gypsogeninin GLY66'ya H bağı ile bağlandığı, rutin ASN161, HIS162 ve GLY66'ya H bağları ile; TYR67'ye ise aromatik H bağı ile bağlandığı, rosmarinik asit'in GLN19'a H bağı ile; HIS162'ye tuz köprüsü etkileşimi ile; TYR67'ye hem aromatik H bağı hem de pi-pi etkileşimi ile bağlandığı belirlenmiştir.

Bu verilerden yola çıkılarak GEE'nin baskın fitobileşenlerinin osteoporoza yönelik en önemli hedeflerden birisi olan CatK proteininin aktif bölgelerine çeşitli güçlü bağlarla kenetlendiğini söylemek mümkündür.

Moleküler dinamik çalışmalarında ise temel hedef, sulu ortamda bileşenlerin hedefe yönelik davranışlarını analiz etmektir. Bu kapsamda GEE ve CatK'nın birlikte olduğu sistem analiz edilmiştir. Sisteme ait toplam enerjiler olan kinetik ve potansiyel enerjiler elde edilmiş, bileşenlerin sistem içerisindeki ana yapılarından çok fazla sapmadan stabilizelerini korudukları yapılan RMSD çalışmaları ile belirlenmiştir.

RMSD değerleri moleküllerin sistemdeki başlangıç geometrik yapısının simülasyon boyunca ne kadar değiştiğine dair bir fikir ve RMSD'lerin 2 Å değerini geçmemesi beklenir. Simülasyonlar sonrasında yüksek RMSD değerleri elde etmek, ligandların başlangıç konformasyonlarının değiştiğini ifade etmektedir.

In silico deneylerden elde edilen verilerin yorumlanması sırasında parametreleri tek başına değerlendirmek doğru değildir. Bağlanma afiniteleri, RMSD değeri, bağların çeşitleri ve sayısı bir bütün şeklindedir. İdeal olan koşullar sağlandığında dikkat edilmesi gereken en önemli kısım, başlangıç yapısından sapmamış, bağlanma afinitesi olabildiğince yüksek ve hedef reseptöre farklı noktalardan kenetlenmiş bir inhibisyon davranışı elde etmektir.

Çalışma sonucunda 50 ns'lik sistemden elde edilen RMSD değerleri gypsogenin, rutin ve rosmarinik asit için sırasıyla, 1.5; 2 ve 1.35 Å'dur. Değerlerden anlaşılabileceği üzere ligandlar başlangıçta sanallaştırılmış kimyasal profillerinin sisteme tanıtıldığı şekilde kalmışlar ve sapmamışlardır. Ayrıca MD analizleri boyunca bağlarda bir kopma ya da atomik bir değişim görülmemiştir. Bu sonucun büyük bir avantaj olmasının altında yatan temel sebep, nanopartiküllerin amacının ilaç moleküllerini biyo-stabil bir şekilde hedef bölgeye taşınması gerekliliğinden kaynaklanmaktadır. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin geliştirilmesindeki en önemli indikatörlerden bir tanesi yapının bozulmadan hedef bölgeye ulaşmasıdır.

Hastalıkların tedavilerinde kullanılmaya yönelik terapötik ajanların farmakolojik potansiyellerinin boyutlarının ortaya konulması amacıyla ilk adım olarak ADME özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu adımın ilk olarak gerçekleştirilmesi zamandan ve kaynaktan büyük oranda tasarruf sağlayacaktır.

Çalışma kapsamında kullanılan GEE gibi diğer bitkilerin ekstraktlarında da ADME özellikleri doğrultusunda potansiyellerinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla öncelikle en büyük yüzdeliikteki bileşenin yorumlanması, doğruluk oranını arttıracaktır.

Tahmin edilen ADME fizikokimyasal özellikleri, moleküler formül, H- bağlarının alıcılarını ve donörlerini, TPSA gibi özellikleri belirtmektedir. *Gypsophila eriocalyx*'in fito-bileşenlerinin genel özellikleri, molekül ağırlığı 500 Da'dan daha az şartını gypsogenin ve rosmarinik asit için sağlamaktadır ki bu da küçük moleküllerin ilaç benzerliği olarak adlandırılabilir belirtiçlerden bir tanesidir. Devamında elde edilen farmakolojik özelliklerin tahmini kısmındaki logP değerlerinin ortalaması, fito-bileşenlerin lipofilitesinin genel ifadesi niteliğindedir. Lipofilite, bir bileşiğin lipofilik organik faz ile bir polar sulu faz arasında bölünme eğilimini ifade etmektedir.

Yüksek lipofilite genel olarak daha düşük çözünürlük, kan-beyin bariyeri ve diğer doku zarları boyunca gastrointestinal sistemde daha yüksek geçirgenlik, metabolize edici enzimlere daha yüksek bağlanma sağlamaktadır. Sonrasında bileşenlerin, suda çözünürlük değerleri yüksek ve orta seviyede çözünürlük olarak tahmin edilmiştir. GI absorpsiyonu için bulunan değerler *Gypsophila eriocalyx* ana bileşeni ve büyük oranda etken maddesi olan gypsogenin için yüksek, diğer fito-bileşenler için düşük olarak bulunmuştur.

Fitokimyasalların absorpsiyon seviyesinin tahmin edilmesi amacıyla gastrointestinal (GI) absorpsiyon, deri geçirgenliği ve P-glikoprotein (P-gp) substratı parametreleri kullanılmıştır. Yüksek saponin içeriği sebebiyle, bileşenlerin gastrointestinal absorpsiyonunun nispeten uzun zaman alacağı, ancak başarıyla tamamlanacağı tahmin edilmektedir. Log Kp > -2.5 değeri düşük deri geçirgenliği olduğu kabul edilmektedir ve bu bilgiden yola çıkılarak fitokimyasalların düşük deri geçirgenliğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Kan-beyin bariyeri parametresi, ilacın beyin üzerinde yan etkisinin olup olmadığını gösteren önemli bir parametredir. Fitokimyasalların kan-beyin bariyeri geçirgenliğinin olmadığı bulunmuştur.

Lipinski'nin kurallarına göre ilaç benzerlikleri karşılaştırıldığında ihlal sayısı 4'ü geçen bir bileşen bulunmadığından ve biyoyararlanım miktarları da yeterli olduğundan, hedef bölge için istenilen özellikler sağlandığında GEE'lerin ilaç benzeri aktivite gösterebileceği söylenebilir.

Özetle, bu tez çalışması kapsamında kullanılmış, avantajlı yöntemlerden biri olan iyonik jelleşme yöntemi ile ilk kez GEE kitosan polimeri ile enkapsüle edilmiş ve GEE yüklü kitosan nanopartikülleri sentezi gerçekleştirilmiş, karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve anti-osteoporoz etkiler *in vitro* analizler ile ortaya konulmuştur.

Gerçekleştirilmiş olan *in vitro* ve *in silico* deneyler doğrultusunda GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin terapötik olarak kullanılabileceği ve anti-osteoporoz aktivite gösterebileceği belirlenmiştir.

Bunlara ek olarak *Gypsophila eriocalyx* ve GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin osteoporoz üzerindeki etki mekanizmaları aydınlatılabilir ve diğer kemik hastalıklarının tedavilerindeki potansiyelleri ortaya konulabilir. *Gypsophila eriocalyx* fito-bileşenleri izole edilerek moleküler etkileşim profilleri ve potansiyelleri analiz edilebilir. Sonuç olarak bu tez çalışmasında, ülkemiz topraklarında yetişen fitoterapötik özellikli *Gypsophila eriocalyx* ekstraktının nano boyutlu formüle edilmesi ile geliştirilen GEE yüklü kitosan nanopartiküllerinin uygun maliyetle bir anti-osteoporoz önleyici/tedavi edici gıda takviyesi veya ilaç olarak kullanım potansiyelinin olduğu *in vitro* ve *in silico* çalışmalar ile değerlendirilmiştir. Nihai ürün olarak *Gypsophila eriocalyx* ekstraktının kullanıldığı nanopartikül dozaj formundaki formülasyonun ticarileşme aşamasına gelebilmesi için detaylı *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

-
- [1] A. Selmani, D. Kovačević, and K. Bohinc, "Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 303, p. 102640, 2022/05/01/ 2022.
- [2] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 12, no. 7, pp. 908-931, 2019/11/01/ 2019.
- [3] M. Jeyaraj, S. Gurunathan, M. Qasim, M.-H. Kang, and J.-H. Kim, "A Comprehensive Review on the Synthesis, Characterization, and Biomedical Application of Platinum Nanoparticles," vol. 9, no. 12, p. 1719, 2019.
- [4] X. Feng, "Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease," (in eng), *Curr Chem Biol*, vol. 3, no. 2, pp. 189-196, May 1 2009.
- [5] E. Jimi, S. Hirata, K. Osawa, M. Terashita, C. Kitamura, and H. Fukushima, "The Current and Future Therapies of Bone Regeneration to Repair Bone Defects," *International Journal of Dentistry*, vol. 2012, p. 148261, 2012/03/13 2012.
- [6] S. H. Ralston, "Bone structure and metabolism," *Medicine*, vol. 49, no. 9, pp. 567-571, 2021/09/01/ 2021.
- [7] N. M. Appelman-Dijkstra, H. L. D. W. Oei, A. G. Vlug, and E. M. Winter, "The effect of osteoporosis treatment on bone mass," *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 36, no. 2, p. 101623, 2022/03/01/ 2022.
- [8] S. Zhang *et al.*, "Effect of exercise on bone mineral density among patients with osteoporosis and osteopenia: A systematic review and network meta-analysis," *J Clin Nurs*, Nov 1 2021.
- [9] C. S. Lam, H. K. Koon, V. C.-H. Chung, and Y. T. Cheung, "A public survey of traditional, complementary and integrative medicine use during the COVID-19 outbreak in Hong Kong," *PLOS ONE*, vol. 16, no. 7, p. e0253890, 2021.
- [10] R. Gevrenova, T. Stancheva, Y. Voynikov, D. Laurain-Mattar, and M. Henry, "Root in vitro cultures of six Gypsophila species and their saponin contents," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 47, no. 3, pp. 97-104, 2010/08/05/ 2010.
- [11] S. Yao, J.-G. Luo, L. Ma, and L.-Y. Kong, "Two New Triterpenoid Saponins from the Roots of Gypsophila paniculata with Potent α -Glucosidase Inhibition Activity," *Chinese Journal of Natural Medicines*, vol. 9, no. 6, pp. 401-405, 2011/11/01/ 2011.
- [12] A. Weng *et al.*, "The toxin component of targeted anti-tumor toxins determines their efficacy increase by saponins," *Molecular Oncology*, vol. 6, no. 3, pp. 323-332, 2012/06/01/ 2012.
- [13] I. Arslan, A. Celik, and J. H. Chol, "A cytotoxic triterpenoid saponin from under-ground parts of Gypsophila pilulifera Boiss.& Heldr," *Fitoterapia*, vol. 83, no. 4, pp. 699-703, 2012/06/01/ 2012.

- [14] R. Simeonova, M. Kondeva-Burdina, V. Vitcheva, I. Krasteva, V. Manov, and M. Mitcheva, "Protective effects of the apigenin-O/C-diglucoside saponarin from *Gypsophila trichotoma* on carbene tetrachloride-induced hepatotoxicity in vitro/in vivo in rats," *Phytomedicine*, vol. 21, no. 2, pp. 148-154, 2014/01/15/ 2014.
- [15] S. Emirdağ-Öztürk, T. Karayıldırım, A. Çapcı-Karagöz, Ö. Alankuş-Çalışkan, A. Özmen, and E. Poyrazoğlu-Çoban, "Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities, and structure–activity relationships of gypsogenin derivatives against human cancer cells," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 82, pp. 565-573, 2014/07/23/ 2014.
- [16] X. Lin *et al.*, "Isoorientin from *Gypsophila elegans* induces apoptosis in liver cancer cells via mitochondrial-mediated pathway," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 187, pp. 187-194, 2016/07/01/ 2016.
- [17] S. Sama, G. Jerz, P. Schmieder, J. F. Joseph, M. F. Melzig, and A. Weng, "Plant derived triterpenes from *Gypsophila elegans* M.Bieb. enable non-toxic delivery of gene loaded nanoplexes," *Journal of Biotechnology*, vol. 284, pp. 131-139, 2018/10/20/ 2018.
- [18] M. S. M. Mohamed, A. M. Saleh, I. B. Abdel-Farid, and S. A. El-Naggar, "Growth, hydrolases and ultrastructure of *Fusarium oxysporum* as affected by phenolic rich extracts from several xerophytic plants," *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 141, pp. 57-64, 2017/09/01/ 2017.
- [19] M. A. Zinnia and A. B. M. M. Khademul Islam, "Fenugreek steroidal saponins hinder osteoclastogenic bone resorption by targeting CSF-1R which diminishes the RANKL/OPG ratio," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 186, pp. 351-364, 2021/09/01/ 2021.
- [20] D. Seidlova-Wuttke *et al.*, "Osteoprotective effects of *Cimicifuga racemosa* and its triterpene-saponins are responsible for reduction of bone marrow fat," *Phytomedicine*, vol. 19, no. 10, pp. 855-860, 2012/07/15/ 2012.
- [21] P. Drašar and J. Moravcova, "Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines," *Journal of Chromatography B*, vol. 812, no. 1, pp. 3-21, 2004/12/05/ 2004.
- [22] O. World Health, W. H. O. C. o. S. M. Plants, W. H. O. C. o. S. M. Plants, W. H. O. C. o. S. M. Plants, and W. H. O. C. o. S. M. Plants, "WHO monographs on selected medicinal plants," ed. Geneva: World Health Organization, 2006.
- [23] M. Ekor, "The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety," (in eng), *Frontiers in pharmacology*, vol. 4, pp. 177-177, 2014.
- [24] M. Armağan, F. Ozgokce, and A. Celik, "Notes on the genus *Gypsophila* (Caryophyllaceae) in Turkey, with a description of *G. guvengorkii* sp. nov.," *Phytotaxa*, vol. 295, p. 271, 02/10 2017.
- [25] S. Chandra and D. S. Rawat, "Medicinal plants of the family Caryophyllaceae: a review of ethno-medicinal uses and pharmacological properties," *Integrative Medicine Research*, vol. 4, no. 3, pp. 123-131, 2015/09/01/ 2015.

- [26] E. Hamzaoglu, M. Koç, and M. N. Topal, "A new species, *Gypsophila malyerii* (Caryophyllaceae) from Turkey," *Kew Bulletin*, vol. 76, no. 3, pp. 531-538, 2021/09/01 2021.
- [27] V. İlhan, M. Korkmaz, and H. Özcelik, "Habitat Properties of Some *Gypsophila* L. (Caryophyllaceae) Taxa of Turkey-Türkiye'nin Bazı *Gypsophila* L. (Caryophyllaceae) Taksonlarının Habitat Özellikleri," *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 08/17 2012.
- [28] N. Guo *et al.*, "Comparison of the Saponins in Three Processed American Ginseng Products by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Orbitrap Tandem Mass Spectrometry and Multivariate Statistical Analysis," *Int J Anal Chem*, vol. 2022, p. 6721937, 2022.
- [29] Y. Bakış, M. T. Babaç, and E. Uslu, *Updates and improvements of Turkish Plants Data Service (TÜBİVES)*. 2011, pp. 136-140.
- [30] S. Ekrem, "Türk Çöveni'nin Menşei ve Kalitesi," *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 1982.
- [31] G. Adam. *Gypsophila eriocalyx* / Bozkır Çöveni [Online]. Available: <https://gezenadam.com/biota/species.php?ID=499>
- [32] G. Lohaus, "Review primary and secondary metabolites in phloem sap collected with aphid stylectomy," *J Plant Physiol*, vol. 271, p. 153645, Apr 2022.
- [33] M. Erb and D. J. Kliebenstein, "Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy," *Plant Physiology*, vol. 184, no. 1, pp. 39-52, 2020.
- [34] A. Altay, H. Tohma, L. Durmaz, M. Korkmaz, I. Gülçin, and E. Koksall, "Preliminary phytochemical analysis and evaluation of in vitro antioxidant, antiproliferative, antidiabetic, and anticholinergics effects of endemic *Gypsophila* taxa from Turkey," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 43, 07/01 2019.
- [35] E. Moghimipour and S. Handali, "Saponin: Properties, Methods of Evaluation and Applications," *Annual Research & Review in Biology*, vol. 5, pp. 207-220, 01/10 2015.
- [36] J. Shi, K. Arunasalam, D. Yeung, Y. Kakuda, G. Mittal, and Y. Jiang, "Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits," (in eng), *J Med Food*, vol. 7, no. 1, pp. 67-78, Spring 2004.
- [37] G. P. Savage, "SAPONINS," in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)*, B. Caballero, Ed. Oxford: Academic Press, 2003, pp. 5095-5098.
- [38] L. Voutquenne-Nazabadioko *et al.*, "Triterpenoid saponins from the roots of *Gypsophila trichotoma* Wender," *Phytochemistry*, vol. 90, pp. 114-127, 2013/06/01/ 2013.
- [39] A. Idris, "TÜRKİYE'DE DOĞAL YAYILIŞ GÖSTEREN *Gypsophila arrostii* Guss.var.nebulosa (Boiss. & Heldr.) Barkoudah. VE *Gypsophila pilulifera* Boiss. & Heldr. BİTKİ TÜRLERİNİN FİTOKİMYASAL AÇIDAN İNCELENMESİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI," Doctoral, Biology, Pamukkale University, 2012.
- [40] P. Singh *et al.*, "Spatial transcriptome analysis provides insights of key gene(s) involved in steroidal saponin biosynthesis in medicinally

- important herb *Trillium govanianum*," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 45295, 2017/03/28 2017.
- [41] S. Kumar, S. Kalra, B. Singh, A. Kumar, J. Kaur, and K. Singh, "RNA-Seq mediated root transcriptome analysis of *Chlorophytum borivillianum* for identification of genes involved in saponin biosynthesis," *Functional & Integrative Genomics*, vol. 16, no. 1, pp. 37-55, 2016/01/01 2016.
- [42] S. Upadhyay, U. J. Phukan, S. Mishra, and R. K. Shukla, "De novo leaf and root transcriptome analysis identified novel genes involved in Steroidal sapogenin biosynthesis in *Asparagus racemosus*," *BMC Genomics*, vol. 15, no. 1, p. 746, 2014/08/30 2014.
- [43] H.-S. Hwang, H. Lee, and Y. E. Choi, "Transcriptomic analysis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) to discover genes involved in saponin biosynthesis," *BMC Genomics*, vol. 16, no. 1, p. 180, 2015/03/14 2015.
- [44] T. Liu, X. Li, S. Xie, L. Wang, and S. Yang, "RNA-seq analysis of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* roots identified candidate genes for saponin synthesis," *Plant Diversity*, vol. 38, no. 3, pp. 163-170, 2016/06/01/ 2016.
- [45] R. Semwal, S. K. Joshi, R. B. Semwal, and D. K. Semwal, "Health benefits and limitations of rutin - A natural flavonoid with high nutraceutical value," *Phytochemistry Letters*, vol. 46, pp. 119-128, 2021/12/01/ 2021.
- [46] P. Kučerová, V. Halouzka, J. Hrbac, P. Bartak, and J. Skopalova, "Electrochemical Behavior and Determination of Rutin on Modified Carbon Paste Electrodes," *TheScientificWorldJournal*, vol. 2012, p. 394756, 04/30 2012.
- [47] O. C. D. Yong *et al.*, "Molecular and Immunological Mechanisms Underlying the Various Pharmacological Properties of the Potent Bioflavonoid, Rutin," *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, vol. 20, no. 10, pp. 1590-1596, 2020.
- [48] T. L. B. G. Lins *et al.*, "Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model," *Reproductive Toxicology*, vol. 98, pp. 209-217, 2020/12/01/ 2020.
- [49] A. Baldisserotto *et al.*, "Design, synthesis and biological activity of a novel Rutin analogue with improved lipid soluble properties," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 23, no. 1, pp. 264-271, 2015/01/01/ 2015.
- [50] A. Ghorbani, "Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 96, pp. 305-312, 2017/12/01/ 2017.
- [51] S. Nafees, S. H. Mehdi, M. Zafaryab, B. Zeya, T. Sarwar, and M. A. Rizvi, "Synergistic Interaction of Rutin and Silibinin on Human Colon Cancer Cell Line," *Archives of Medical Research*, vol. 49, no. 4, pp. 226-234, 2018/05/01/ 2018.
- [52] C. Pedriali, A. Uchoa, L. Bernusso, and B. Polakiewicz, "The synthesis of a water-soluble derivative of rutin as an antiradical agent," *Quimica Nova - QUIM NOVA*, vol. 31, 01/01 2008.

- [53] L. Ge *et al.*, "Development of active rosmarinic acid-gelatin biodegradable films with antioxidant and long-term antibacterial activities," *Food Hydrocolloids*, vol. 83, 05/01 2018.
- [54] R. Iwona and K. Supruniuk, "Glycosylation of proteins of human skin fibroblasts is changed by rosmarinic acid," *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, vol. 393, pp. 1-9, 03/01 2020.
- [55] A. G. Adomako-Bonsu, S. L. Chan, M. Pratten, and J. R. Fry, "Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics," (in eng), *Toxicol In Vitro*, vol. 40, pp. 248-255, Apr 2017.
- [56] C. Luo *et al.*, "A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases," (in eng), *Frontiers in pharmacology*, vol. 11, pp. 153-153, 2020.
- [57] F. Taram, E. Ignowski, N. Duval, and D. A. Linseman, "Neuroprotection Comparison of Rosmarinic Acid and Carnosic Acid in Primary Cultures of Cerebellar Granule Neurons," *Molecules*, vol. 23, no. 11, 2018.
- [58] S. Javidanpour, M. Dianat, M. Badavi, and S. A. Mard, "The cardioprotective effect of rosmarinic acid on acute myocardial infarction and genes involved in Ca(2+) homeostasis," (in eng), *Free Radic Res*, vol. 51, no. 11-12, pp. 911-923, Dec 2017.
- [59] L. Azmi and I. Shukla, "Chapter 8 - Perspectives of phytotherapeutics: Diagnosis and cure," in *Phytomedicine*, R. A. Bhat, K. R. Hakeem, and M. A. Dervash, Eds.: Academic Press, 2021, pp. 225-250.
- [60] Z. Qi and E. Kelley, "The WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023: A perspective," *Science*, vol. 346, pp. S5-S6, 12/19 2014.
- [61] E. Gibon, L. Y. Lu, K. Nathan, and S. B. Goodman, "Inflammation, ageing, and bone regeneration," (in eng), *J Orthop Translat*, vol. 10, pp. 28-35, Jul 2017.
- [62] S. Rani, S. Bandyopadhyay-Ghosh, S. Ghosh, and G. Liu, "Advances in Sensing Technologies for Monitoring of Bone Health," *Biosensors*, vol. 10, p. 42, 04/21 2020.
- [63] G. Bahat *et al.*, "The current situation in the approach to osteoporosis in older adults in Turkey: areas in need of improvement with a model for other populations," *Journal of Clinical Densitometry*, vol. 25, no. 2, p. 275, 2022/04/01/ 2022.
- [64] R. James, J. G. L. Griffin, C. Senior, and R. Love, "The role of the Radiographer in osteoporosis and fracture prevention services – a narrative review," *Radiography*, vol. 27, pp. S34-S38, 2021/10/01/ 2021.
- [65] M. Barry, H. Pearce, L. Cross, M. Tatullo, and A. K. Gaharwar, "Advances in Nanotechnology for the Treatment of Osteoporosis," (in eng), *Curr Osteoporos Rep*, vol. 14, no. 3, pp. 87-94, Jun 2016.
- [66] B. F. Boyce, Z. Yao, and L. Xing, "Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption," (in eng), *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, vol. 19, no. 3, pp. 171-80, 2009.
- [67] N. Dirckx, M. C. Moorer, T. L. Clemens, and R. C. Riddle, "The role of osteoblasts in energy homeostasis," *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 15, no. 11, pp. 651-665, 2019/11/01 2019.

- [68] J.-M. Kim, C. Lin, Z. Stavre, M. B. Greenblatt, and J.-H. Shim, "Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis," (in eng), *Cells*, vol. 9, no. 9, p. 2073, 2020.
- [69] K. Matsuo and N. Irie, "Osteoclast-osteoblast communication," (in eng), *Arch Biochem Biophys*, vol. 473, no. 2, pp. 201-9, May 15 2008.
- [70] A. Kumari, O. Silakari, and R. K. Singh, "Recent advances in colony stimulating factor-1 receptor/c-FMS as an emerging target for various therapeutic implications," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 103, pp. 662-679, 2018/07/01/ 2018.
- [71] B. F. Boyce and L. Xing, "Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling," (in eng), *Archives of biochemistry and biophysics*, vol. 473, no. 2, pp. 139-146, 2008.
- [72] R. Dai *et al.*, "Cathepsin K: The Action in and Beyond Bone," (in English), Review vol. 8, 2020-June-04 2020.
- [73] C. Yang *et al.*, "NIK Stabilization in Osteoclasts Results in Osteoporosis and Enhanced Inflammatory Osteolysis," *PLOS ONE*, vol. 5, no. 11, p. e15383, 2010.
- [74] R. Saini, S. Saini, and S. Sharma, "Nanotechnology: the future medicine," (in eng), *Journal of cutaneous and aesthetic surgery*, vol. 3, no. 1, pp. 32-33, 2010.
- [75] S. Cheeseman *et al.*, "Antimicrobial Metal Nanomaterials: From Passive to Stimuli-Activated Applications," *Adv Sci (Weinh)*, vol. 7, no. 10, p. 1902913, May 2020.
- [76] S. K. Murthy, "Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges," (in eng), *International journal of nanomedicine*, vol. 2, no. 2, pp. 129-141, 2007.
- [77] D. Chenthamara *et al.*, "Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration," *Biomaterials Research*, vol. 23, no. 1, p. 20, 2019/11/21 2019.
- [78] M. Nurunnabi, V. Revuri, K. M. Huh, and Y.-k. Lee, "Chapter 14 - Polysaccharide based nano/microformulation: an effective and versatile oral drug delivery system," in *Nanostructures for Oral Medicine*, E. Andronescu and A. M. Grumezescu, Eds.: Elsevier, 2017, pp. 409-433.
- [79] D. D. Ojeda-Hernández, A. A. Canales-Aguirre, J. Matias-Guiu, U. Gomez-Pinedo, and J. C. Mateos-Díaz, "Potential of Chitosan and Its Derivatives for Biomedical Applications in the Central Nervous System," (in English), Review vol. 8, 2020-May-05 2020.
- [80] M. Yanat and K. Schroën, "Preparation methods and applications of chitosan nanoparticles; with an outlook toward reinforcement of biodegradable packaging," *Reactive and Functional Polymers*, vol. 161, p. 104849, 2021/04/01/ 2021.
- [81] S. Pathak, S. P. Vyas, and A. Pandey, "DEVELOPMENT, CHARACTERIZATION AND IN VITRO RELEASE KINETIC STUDIES OF IBANDRONATE LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES FOR EFFECTIVE MANAGEMENT OF OSTEOPOROSIS," *International Journal of Applied Pharmaceutics*, vol. 13, no. 6, pp. 120-125, 11/07 2021.

- [82] K. Miladi, S. Sfar, H. Fessi, and A. Elaissari, "Enhancement of alendronate encapsulation in chitosan nanoparticles," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 30, pp. 391-396, 2015/12/01/ 2015.
- [83] M. Zhao *et al.*, "Chitosan oligosaccharides-tripolyphosphate microcapsules as efficient vehicles for desalted duck egg white peptides-calcium: Fabrication, entrapment mechanism and in vivo calcium absorption studies," *LWT*, vol. 154, p. 112869, 2022/01/15/ 2022.
- [84] D. Dehghan-Baniani, Y. Chen, D. Wang, R. Bagheri, A. Solouk, and H. Wu, "Injectable in situ forming kartogenin-loaded chitosan hydrogel with tunable rheological properties for cartilage tissue engineering," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 192, p. 111059, 2020/08/01/ 2020.
- [85] S. Debnath, R. Kumar, and M. Babu, "Ionotropic gelation - A novel method to prepare chitosan nanoparticles," *Research Journal of Pharmacy and Technology*, vol. 4, pp. 492-495, 01/01 2011.
- [86] E. F. Ribeiro *et al.*, "Chitosan and crosslinked chitosan nanoparticles: Synthesis, characterization and their role as Pickering emulsifiers," *Carbohydrate Polymers*, vol. 250, p. 116878, 2020/12/15/ 2020.
- [87] M. Kafshgari, M. Khorram, M. Mansouri, A. Samimi, and S. Osfouri, "Preparation of alginate and chitosan nanoparticles using a new reverse micellar system," *Iranian Polymer Journal*, vol. 21, 02/01 2012.
- [88] S. Bajpai, N. Chand, S. Ahuja, and M. Roy, "Vapor induced phase inversion technique to prepare chitosan/microcrystalline cellulose composite films: synthesis, characterization and moisture absorption study," *Cellulose*, vol. 22, 12/01 2015.
- [89] D. Saini, M. Fazil, M. M. Ali, S. Baboota, and J. Ali, "Formulation, development and optimization of raloxifene-loaded chitosan nanoparticles for treatment of osteoporosis," (in eng), *Drug Deliv*, vol. 22, no. 6, pp. 823-36, 2015.
- [90] S. Santhosh, D. Mukherjee, J. Anbu, M. Murahari, and B. V. Teja, "Improved treatment efficacy of risedronate functionalized chitosan nanoparticles in osteoporosis: formulation development, in vivo, and molecular modelling studies," *Journal of Microencapsulation*, vol. 36, no. 4, pp. 338-355, 2019/05/19 2019.
- [91] Trisilowati and D. G. Mallet, "In silico experimental modeling of cancer treatment," (in eng), *ISRN oncology*, vol. 2012, pp. 828701-828701, 2012.
- [92] R. B. Colquitt, D. A. Colquhoun, and R. H. Thiele, "In silico modelling of physiologic systems," (in eng), *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, vol. 25, no. 4, pp. 499-510, Dec 2011.
- [93] H. Raunio, M. Kuusisto, R. Juvonen, and O. Pentikäinen, "Modeling of interactions between xenobiotics and cytochrome P450 (CYP) enzymes," *Frontiers in Pharmacology*, vol. 6, 06/12 2015.
- [94] K. Crampon, A. Giorkallos, M. Deldossi, S. Baud, and L. A. Steffemel, "Machine-learning methods for ligand-protein molecular docking," *Drug Discovery Today*, vol. 27, no. 1, pp. 151-164, 2022/01/01/ 2022.
- [95] H. M. Berman *et al.*, "The Protein Data Bank," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 1, pp. 235-242, 2000.

- [96] S. Kim *et al.*, "PubChem Substance and Compound databases," (in eng), *Nucleic acids research*, vol. 44, no. D1, pp. D1202-D1213, 2016.
- [97] M. Novič, T. Tibaut, M. Anderluh, J. Borišek, and T. Tomašić, "The Comparison of Docking Search Algorithms and Scoring Functions: An Overview and Case Studies," 2016, p. 29.
- [98] W. Z. Shou, "Current status and future directions of high-throughput ADME screening in drug discovery," *Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 10, no. 3, pp. 201-208, 2020/06/01/ 2020.
- [99] Bradley C. Doak, B. Over, F. Giordanetto, and J. Kihlberg, "Oral Druggable Space beyond the Rule of 5: Insights from Drugs and Clinical Candidates," *Chemistry & Biology*, vol. 21, no. 9, pp. 1115-1142, 2014/09/18/ 2014.
- [100] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential – What they are and what they are not?," *Journal of Controlled Release*, vol. 235, pp. 337-351, 2016/08/10/ 2016.
- [101] M. Manciu, F. S. Manciu, and E. Ruckenstein, "On the surface tension and Zeta potential of electrolyte solutions," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 244, pp. 90-99, 2017/06/01/ 2017.
- [102] F. McNeil-Watson, "Electrophoretic Light Scattering," in *Encyclopedia of Biophysics*, G. C. K. Roberts, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 648-654.
- [103] M. R. McClung *et al.*, "Odanacatib for the treatment of postmenopausal osteoporosis: results of the LOFT multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial and LOFT Extension study," (in eng), *Lancet Diabetes Endocrinol*, vol. 7, no. 12, pp. 899-911, Dec 2019.
- [104] N. C. f. B. Information. PubChem Compound Summary for CID 92825, Gypsogenin [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gypsogenin>
- [105] N. C. f. B. Information. PubChem Compound Summary for CID 5280805, Rutin [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rutin>
- [106] N. C. f. B. Information. PubChem Compound Summary for CID 5281792, Rosmarinic acid [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Rosmarinic-acid>
- [107] R. A. Friesner *et al.*, "Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 47, no. 7, pp. 1739-1749, 2004/03/01 2004.
- [108] G. M. Sastry, M. Adzhigirey, T. Day, R. Annabhimoju, and W. Sherman, "Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments," (in eng), *J Comput Aided Mol Des*, vol. 27, no. 3, pp. 221-34, Mar 2013.
- [109] B. Zhao *et al.*, "Crystal structure of human osteoclast cathepsin K complex with E-64," *Nature Structural Biology*, vol. 4, no. 2, pp. 109-111, 1997/02/01 1997.
- [110] S. Bienert *et al.*, "The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality," (in eng), *Nucleic Acids Res*, vol. 45, no. D1, pp. D313-d319, Jan 4 2017.

- [111] E. Harder *et al.*, "OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 12, no. 1, pp. 281-296, 2016/01/12 2016.
- [112] A. Daina, O. Michielin, and V. Zoete, "SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules," *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 42717, 2017/03/03 2017.
- [113] M. Zych, W. Wojnar, S. Borymski, K. Szałabska, P. Bramora, and I. Kaczmarczyk-Sedlak, "Effect of Rosmarinic Acid and Sinapic Acid on Oxidative Stress Parameters in the Cardiac Tissue and Serum of Type 2 Diabetic Female Rats," vol. 8, no. 12, p. 579, 2019.
- [114] G. Klebe, "From In Vitro to In Vivo: Optimization of ADME and Toxicology Properties," in *Drug Design: Methodology, Concepts, and Mode-of-Action*, G. Klebe, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 397-428.
- [115] S. W. Wade, C. Strader, L. A. Fitzpatrick, M. S. Anthony, and C. D. O'Malley, "Estimating prevalence of osteoporosis: examples from industrialized countries," *Archives of Osteoporosis*, vol. 9, no. 1, p. 182, 2014/05/16 2014.
- [116] L. Si, T. M. Winzenberg, Q. Jiang, M. Chen, and A. J. Palmer, "Projection of osteoporosis-related fractures and costs in China: 2010–2050," *Osteoporosis International*, vol. 26, no. 7, pp. 1929-1937, 2015/07/01 2015.
- [117] M. K. Skjødt, M. Frost, and B. Abrahamsen, "Side effects of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease," (in eng), *Br J Clin Pharmacol*, vol. 85, no. 6, pp. 1063-1071, Jun 2019.
- [118] M. A. Abd Jalil, A. N. Shuid, and N. Muhammad, "Role of medicinal plants and natural products on osteoporotic fracture healing," (in eng), *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, vol. 2012, pp. 714512-714512, 2012.
- [119] S. Jain, N. Saxena, M. K. Sharma, and S. Chatterjee, "Metal nanoparticles and medicinal plants: Present status and future prospects in cancer therapy," *Materials Today: Proceedings*, vol. 31, pp. 662-673, 2020/01/01/ 2020.
- [120] M. A. Mohammed, J. T. M. Syeda, K. M. Wasan, and E. K. Wasan, "An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery," *Pharmaceutics*, vol. 9, no. 4, 2017.
- [121] S. Santhosh, D. Mukherjee, J. Anbu, M. Murahari, and B. V. Teja, "Improved treatment efficacy of risedronate functionalized chitosan nanoparticles in osteoporosis: formulation development, in vivo, and molecular modelling studies," (in eng), *J Microencapsul*, vol. 36, no. 4, pp. 338-355, Jun 2019.
- [122] D. Narayanan, A. Anitha, R. Jayakumar, and K. P. Chennazhi, "In Vitro and in Vivo Evaluation of Osteoporosis Therapeutic Peptide PTH 1–34 Loaded PEGylated Chitosan Nanoparticles," *Molecular Pharmaceutics*, vol. 10, no. 11, pp. 4159-4167, 2013/11/04 2013.
- [123] D. Mukherjee *et al.*, "Pamidronate functionalized mucoadhesive compact for treatment of osteoporosis-in vitro and in vivo characterization,"

- Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 52, pp. 915-926, 2019/08/01/ 2019.
- [124] M. Korkmaz and H. Ozcelik, "Economic importance of *Gypsophila* L., *Ankyropetalum* Fenzl and *Saponaria* L. (Caryophyllaceae) taxa of Turkey," *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, pp. 9533-9541, 08/24 2011.
 - [125] C. M. Murphy and F. J. O'Brien, "Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds," (in eng), *Cell adhesion & migration*, vol. 4, no. 3, pp. 377-381, Jul-Sep 2010.
 - [126] M. Danaei *et al.*, "Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems," vol. 10, no. 2, p. 57, 2018.
 - [127] G. Amasya, C. T. Şengel Türk, U. Badilli, and N. Tarimci, "Development and Statistical Optimization of Solid Lipid Nanoparticle Formulations of Fluticasone Propionate," (in eng), *Turk J Pharm Sci*, vol. 17, no. 4, pp. 359-366, Aug 2020.
 - [128] I. L. Bergin and F. A. Witzmann, "Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps," (in eng), *International journal of biomedical nanoscience and nanotechnology*, vol. 3, no. 1-2, p. 10.1504/IJBNN.2013.054515, 2013.
 - [129] J. Ramos, J. Forcada, and R. Hidalgo-Alvarez, "Cationic Polymer Nanoparticles and Nanogels: From Synthesis to Biotechnological Applications," *Chemical reviews*, vol. 114, 09/05 2013.
 - [130] C.-Z. Wang *et al.*, "Synthesis and characterization of cationic polymeric nanoparticles as simvastatin carriers for enhancing the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 432, pp. 190-199, 2014/10/15/ 2014.
 - [131] N. Aibani, R. Rai, P. Patel, G. Cuddihy, and E. K. Wasan, "Chitosan Nanoparticles at the Biological Interface: Implications for Drug Delivery," (in eng), *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 10, Oct 14 2021.
 - [132] H. Cheng *et al.*, "Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery," (in eng), *Drug Discov Today*, vol. 22, no. 9, pp. 1336-1350, Sep 2017.
 - [133] K. Pramod, C. Suneesh, S. Shanavas, S. Hussain, and J. Ali, "Unveiling the compatibility of eugenol with formulation excipients by systematic drug-excipient compatibility studies," *Journal of Analytical Science and Technology*, vol. 6, 12/01 2015.
 - [134] L.-M. Shillito, M. Almond, J. Nicholson, M. Pantos, and W. Matthews, "Rapid characterisation of archaeological midden components using FT-IR spectroscopy, SEM-EDX and micro-XRD," *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*, vol. 73, pp. 133-9, 08/01 2009.
 - [135] N. Liu *et al.*, "Mid-infrared spectroscopy is a fast screening method for selecting *Arabidopsis* genotypes with altered leaf cuticular wax," (in eng), *Plant Cell Environ*, vol. 43, no. 3, pp. 662-674, Mar 2020.
 - [136] B. López-Macías *et al.*, "Variability and composition of calcium oxalate crystals in embryos-seedlings-adult plants of the globose cacti *Mammillaria uncinata*," *Micron*, vol. 125, p. 102731, 08/01 2019.

- [137] M. S. Almutairi and M. Ali, "Direct detection of saponins in crude extracts of soapnuts by FTIR," (in eng), *Nat Prod Res*, vol. 29, no. 13, pp. 1271-5, 2015.
- [138] A. A. Manzoor *et al.*, "Overcoming limitations in nanoparticle drug delivery: triggered, intravascular release to improve drug penetration into tumors," (in eng), *Cancer Res*, vol. 72, no. 21, pp. 5566-75, Nov 1 2012.
- [139] T. A. Asafo-Adjei, A. J. Chen, A. Najarzadeh, and D. A. Puleo, "Advances in Controlled Drug Delivery for Treatment of Osteoporosis," (in eng), *Current osteoporosis reports*, vol. 14, no. 5, pp. 226-238, 2016.
- [140] S. Pathak*, S. K. Tripathi, C. Pachouri, and A. Pandey, "Encapsulation of Alendronate in Chitosan based Polymeric Nanoparticles for Effective Management of Osteoporosis – Development to Release Kinetic Study," *International Journal of Medical Nano Research*, vol. 9, no. 1, 2022.
- [141] M. A. Mohammed, J. T. M. Syeda, K. M. Wasan, and E. K. Wasan, "An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery," (in eng), *Pharmaceutics*, vol. 9, no. 4, p. 53, 2017.
- [142] S. Shen, Y. Wu, Y. Liu, and D. Wu, "High drug-loading nanomedicines: progress, current status, and prospects," (in eng), *International journal of nanomedicine*, vol. 12, pp. 4085-4109, 2017.
- [143] K. Kanimozhi, S. Khaleel Basha, V. Sugantha Kumari, K. Kaviyarasu, and M. Maaza, "In vitro cytocompatibility of chitosan/PVA/methylcellulose – Nanocellulose nanocomposites scaffolds using L929 fibroblast cells," *Applied Surface Science*, vol. 449, pp. 574-583, 2018/08/15/ 2018.
- [144] J. López-García, M. Lehocý, P. Humpolíček, and P. Sába, "HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation," (in eng), *J Funct Biomater*, vol. 5, no. 2, pp. 43-57, May 8 2014.
- [145] J. Filipowska, J. Lewandowska-Łańcucka, A. Gilarska, Ł. Niedźwiedzki, and M. Nowakowska, "In vitro osteogenic potential of collagen/chitosan-based hydrogels-silica particles hybrids in human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell cultures," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 113, pp. 692-700, 2018/07/01/ 2018.
- [146] N. S. Mahmoud *et al.*, "Role of nanoparticles in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells," (in eng), *Cytotechnology*, vol. 72, no. 1, pp. 1-22, Feb 2020.
- [147] H. Plumeriastuti, A. Kalista, and M. Effendi, "Cytotoxicity Test of Tithonia diversifolia Leaf Extract on Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (BMSC) of Rats Using MTT Assay Method," *Systematic Reviews in Pharmacy*, vol. 11, pp. 1008-1013, 10/01 2020.
- [148] F. Mobaraki, M. Momeni, M. Barghbani, B. F. Far, S. Hosseini, and S. M. Hosseini, "Extract-mediated biosynthesis and characterization of gold nanoparticles: Exploring their protective effect against cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat testis," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 71, p. 103306, 2022/05/01/ 2022.
- [149] V. G. Balera Brito, A. H. Chaves-Neto, T. Landim de Barros, and S. H. Penha Oliveira, "Soluble yerba mate (*Ilex Paraguariensis*) extract enhances in vitro osteoblastic differentiation of bone marrow-derived

- mesenchymal stromal cells," (in eng), *J Ethnopharmacol*, vol. 244, p. 112131, Nov 15 2019.
- [150] J. Lu, M. Wang, Z. Wang, Z. Fu, A. Lu, and G. Zhang, "Advances in the discovery of cathepsin K inhibitors on bone resorption," *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 33, pp. 890-904, 05/03 2018.



Konferans Bildirileri

1. Ozer S., Kurtur B. O., Budama-Kilinc Y., and Kecel-Gunduz S., "Synthesis of phytotherapeutic *Gypsophila eriocalyx* nanoparticles and evaluation of the effect on Osteoporosis by *in vitro* and *in silico* methods," presented at the International Joint Conference on Engineering, Science and Artificial Intelligence, Bursa-Turkey, 2022

