




**T.C.**

**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# KEMİK DOKU REJENERASYONU İÇİN BİYOMİMETİK *P-TERT*-BÜTİLKALİKS[4]AREN NANOFİBRİLLERİN GELİŞTİRİLMESİ

**ESİN ŞİRİN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı**

**Ağustus-2019**

**KONYA**

**Her Hakkı Saklıdır**

# ÖZET

## YÜKSEK LİSANS TEZİ

## KEMİK DOKU REJENERASYONU İÇİN BİYOMİMETİK *P-TERT*-BÜTİLKALİKS[4]AREN NANOFİBRİLLERİN GELİŞTİRİLMESİ

**Esin ŞİRİN**

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**
**Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI**
**Yardımcı Danışman: Prof. Dr. Şeref ERTUL**

**2019, 53 sayfa**

**Jüri**
**Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI**
**Dr. Öğr. Üyesi Saliha DİNÇ**
**Dr. Öğr. Üyesi Nizamettin ÖZDOĞAN**

Kemik doku mühendisliği, son yıllarda hızla büyüyen alanlardan biri olup kemik rejenerasyonu için yeni ve mükemmel teknikler sunmaktadır. Supramoleküllerden Kaliksaren (*p-ter*-bütilkaliks[4]aren), bu alan için umut vaad eden bir adaydır. Bu çalışmanın amacı, elektrodöndürme yöntemi ile oluşturulan *p-ter*-bütilkaliks[4]aren nanoliflerinin üzerindeki osteoblast benzeri insan kemik sarkomu olan Saos-2 hücrelerinin hücre büyüme davranışını incelemektir.

Farklı pozisyondaki piridinyum grupları ile türevlendirilen *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin (2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP) yapısı, $^{1}$H-NMR ve FT-IR analizleri yapılarak karakterize edildi. Elektrodöndürme yöntemi kullanılarak bu yapıların nanolifleri üretildi. Hücre Kültürü çalışmalarında in vitro ortamda insan kemik sarkom (Saos-2) hücreleri ve doku mühendisliği iskelesi olarak da 2-AMP, 3-AMP and 4-AMP nanolif yüzeyler kullanıldı. Hücrelerin, yüzeylerin üzerinde oluşturdukları canlılık ve büyüme davranışını gözlemlemek için XTT metodu kullanıldı. Hücrelerin 3-boyutlu nanolif yüzeyler üzerindeki morfolojik analizleri, DAPI ve Phalloidin boyası ile lazer konfokal mikroskopta yapıldı. Nanoliflerin hücre dışı matriks görevi yapıp yapamadığına taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile bakıldı. Araştırmamız, kaliksarenin, Saos-2 kemik tümörü hücrelerine karşı 2. ve 3.pozisyonda piridinyum grubunun modifikasyonu ile sitotoksisite verdiğini göstermektedir. 3B nanolif kaliksarenlerde 4. Pozisyon ile sentezlenen grup hücre büyüme koşullarına elverişli bulunmuştur.

Bu çalışmada bildirilen sonuçlar, *p-ter*-butilkaliks[4]aren türevlerinden sentezlenen 4-AMP nanoliflerin in vitro koşullarda biyouyumlu doku iskelesi olarak kullanılabileceğini aynı zamanda 2-AMP nanoliflerin antikanser çalışmalarında bir bariyer olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Elektrodöndürme, Kaliks[4]aren, Kemik Doku Mühendisliği, Nanolif, Saos-2

# ABSTRACT

## MASTER OF SCIENCE THESIS

## DEVELOPMENT OF BİOMİMETİC *P-TERT*-BUTYLCALİX[4]ARENE NANOFİBERS FOR BONE TİSSUE REGENERATİON

**Esin ŞİRİN**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY**
**THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN NANOTECHNOLOGY AND ADVANCED MATERIALS**

**Advisor: Asst.Prof.Dr. Pembegül UYAR ARPACI**
**Co-Advisor: Prof.Dr. Şeref ERTUL**

**2019, 53 Pages**

**Jury**
**Asst.Prof.Dr. Pembegül UYAR ARPACI**
**Asst.Prof.Dr. Saliha DİNÇ**
**Asst.Prof.Dr. Nizamettin ÖZDOĞAN**

One of the fast growing areas in recent years is bone tissue engineering field that offers novel and brilliant techniques for bone regeneration. Calixaren (*p-tert*-butylcalix[4]arene), a supramolecule, is a very promising candidate for this area. The purpose of the current work is to test the cell growth behavior of *p-tert*-butylcalix[4]arene electrospun nanofibers on human osteoblast-like osteosarcoma Saos-2 cell line.

The structure of *p-tert*-butylcalix[4]arene (2-AMP, 3-AMP and 4-AMP) derivatized with pyridinium groups was characterized by $^{1}$H-NMR and FT-IR analysis. Nanofibers were fabricated using electrospinning technique. In vitro cell culture studies were conducted by using human osteocarsinoma cell line (Saos-2) and 2-AMP, 3-AMP and 4-AMP nanofibers as tissue engineering scaffolds. Cell viability and proliferation assays were performed in order to understand the cell behaviour against nanofibers by XTT assay. Morphological analysis of the cells on 3D nanofibers by laser confocal microscopy with DAPI and Phalloidin staining. The ability of the nanofibers to function as extracellular matrix was examined by scanning electron microscopy (SEM).

Our study shows that calixarene gives cytotoxicity to Saos-2 bone tumor cells by modification of pyridinium group in position 2 and 3. The group synthesized by Position 4 in 3D nanofibers calixarenes was found to be suitable for cell growth conditions.

The results reported in this study showed that 4-AMP nanofibers synthesized from *p-tert*-butylcalix[4]arene derivatives can be used as biocompatible tissue scaffold in vitro conditions, and 2-AMP nanofibers can be used as a barrier in anticancer studies.

**Keywords:** Electrospinning, Calyx [4] arene, Bone Tissue Engineering, Nanofiber, SaOs-2

# ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca tecrübelerinden ve bilgilerinden faydalandığım, sahip olduğu değerleriyle ve ilmiyle örnek aldığım; öğrencilerine olan sevgisine, hoşgörüsüne ve sabrına sonsuz saygı duyduğum, tez çalışmamda yardımları ve paylaşımlarıyla beni destekleyen çok kıymetli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Pembegül Uyar ARPACI hocama,

Tez çalışmama katkılarından dolayı yardımcı danışman hocam Prof. Dr. Şeref ERTUL'a,

Tez deneylerimde kullandığım maddeleri hazırlayan Öğr. Gör. Dr. Fatih ÖZCAN'a,

Laboratuvar çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Öğr. Gör. Dr. Emine YAVUZ ve Öğr. Gör.Dr.Zeynep Betül SARI'ya

Laboratuvarlarını kullandığımız İLTEK'e ve tüm İLTEK personeline,

Laboratuvarlarda deneysel çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan değerli arkadaşlarım Müslüm AĞAÇ, Emine GÖK, Kübra ÇİNİ, Noora OMAR, Zuhair MOHAMMED ve kıymetli hocam H.Esra AKGÜL'e teşekkür ederim.

Her zaman en büyük destekçim, hayattaki en güzel şansım olan sevgili ailem; bu tezin baş kahramanı canım annem Saliha ŞİRİN, aylarca hasret kaldığım babam Cengiz ŞİRİN, şuan vatani görevini yapmakta olan kardeşim Ertan ŞİRİN, bizi zor anlarda bile güldürebilen kardeşim Oktay ŞİRİN, hep küçüğümüz olarak kalacak olan kardeşim Şeyma ŞİRİN ve ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan dayım İsmail KARİPÇİN güveniniz, ilginiz, karşılığını asla ödeyemeyeceğim emeğiniz ve sevginiz için çok teşekkür ederim.

Bu tezi her daim, her koşulda elimden tutan; sevgisini, maddi-manevi desteğini hep üzerimde hissettiğim çok kıymetli dedem Mehmet KARİPÇİN'e ithaf ediyorum.

Esin ŞİRİN

KONYA-2019

# İÇİNDEKİLER

**ÖZET** ..... **iii**

**ABSTRACT** ..... **iv**

**ÖNSÖZ** ..... **v**

**İÇİNDEKİLER** ..... **vi**

**SİMGELER VE KISALTMALAR** ..... **viii**

**1. GİRİŞ** ..... **1**

**2. KAYNAK ARAŞTIRMASI** ..... 4

2.1. Kaliksarenler ..... 4
2.1.1. Kaliksarenlere giriş ..... 4
2.1.2. Kaliksarenlerin spektral özellikleri ..... 5
2.1.2.1. *Para tersiyer* bütilkaliks[4]arenin sentezi ..... 6
2.1.3. Kaliksarenlerin uygulama alanları ..... 8
2.1.3.1. Kaliksarenlerin biyolojik aktivitesi ..... 8
2.2. Nanolif ve Elektrospin Tekniği ..... 10
2.1.1. Nanoliflerin biyomedikal uygulamaları ..... 11
2.3. Doku Mühendisliği ve Nanotıp ..... 12
2.3.1. Doku iskelesi ..... 13
2.4. Kemik Doku ..... 14
2.4.1. Kortikal kemik doku ..... 15
2.4.2. Süngerimsi kemik doku ..... 15
2.4.3. Kemik iliği ..... 16
2.4.5. Kemiğin matriks bileşenleri ..... 16
2.4.6. Kemiğin hücresel bileşenleri ..... 17
2.4.6.1. Osteoprogenitör hücreler ..... 17
2.4.6.2. Osteoblastlar ..... 17
2.4.6.3. Osteositler ..... 18
2.4.6.4. Osteoklastlar ..... 18
2.4.7. Kemik doku mühendisliği ..... 19
2.4.8. Osteosarkoma (kemik tümörü) ..... 19
2.5. Saos-2 (Osteosarkoma) Hücre Hattı ..... 20

**3. MATERYAL VE YÖNTEM** ..... **22**

3.1. Kimyasal Numune Analizleri ..... 22
3.1.1. Sıvı çözeltide 2-Aminometilpridin, 3-Aminometilpridin, 4-Aminometilpridin p-tert-bütilkaliks[4]arenin Diamit türevleri sentezi ve analizi ..... 22
3.1.2. Elektrospin tekniği ile nanolif üretimi ..... 23
3.1.3. Nanolif sterilizasyonu ..... 24
3.2. Biyolojik Numune Analizleri ..... 25

3.2.1. Saos-2 (osteosarkoma) hücre hattı ..... 25
3.2.2. Hücre çözme (thawing) işlemi ..... 25
3.2.3. Hücre kültürü ve pasajı (alt kültürleme) ..... 26
3.2.4. Hücre sayımı ve ekimi ..... 27
3.2.5. Hücre dondurma (freezing) tekniği ..... 29
3.2.6. XTT (hücre canlılık) testi ..... 29
3.2.7. Lazer taramalı konfokal mikroskop uygulaması ..... 30
3.2.8. SEM (taramalı elektron mikroskobu) uygulamsı ..... 31

**4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA ..... 32**

4.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin Yapı, Karekterizasyon ve Sentez Sonuçları ..... 32
4.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin İnvert Mikroskopta Saos-2 ile Etkileşimlerinin İncelenmesi ..... 32
4.2.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin Saos-2 ile XTT (hücre canlılığı) analizlerinin değerlendirilmesi ..... 35
4.3. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP Sarımlı Nanoloiflerin Saos-2 Hücre Hattı ile Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Analizlerinin Değerlendirilmesi ..... 37
4.4. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP Sarımlı Nanoloiflerin Saos-2 Hücre Hattı ile SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) Analizlerinin Değerlendirilmesi ..... 40

**5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER ..... 43**

5.1 Sonuçlar ..... 43
5.2 Öneriler ..... 44

**KAYNAKLAR ..... 45**

**EKLER ..... 45**

**ÖZGEÇMİŞ ..... 52**

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

**α :** Alfa
**μ :** Mikro
**β :** Beta
**δ :** Delta
***J*** : Joule
**h** : saat

### Kısaltmalar

| | |
|---|---|
| Saos-2 | : Osteosarkom Hücre Hattı |
| 2-AMP | : 2-Aminometilpridin p-tert-bütilkaliks[4]aren |
| 3-AMP | : 3-Aminometilpridin p-tert-bütilkaliks[4]aren |
| 4-AMP | : 4-Aminometilpridin p-tert-bütilkaliks[4]aren |
| 2B | : İki Boyutlu |
| 3B | : Üç Boyutlu |
| ECM | : Ekstraselüler matriks |
| DMEM | : Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| Hanks's Salt Solution | : Tuz tampon çözeltisi |
| $CO_2$ | : Karbondioksit |
| $CHCl_3$ | : Kloroform |
| PVA | : Polivinil alkol |
| DAPI | : 4'6-Diamino-2-Fenilindol, Dihidroklorür |
| FBS | : Fetal Sığır serumu |
| DMSO | : Dimetil Sülfoksit |
| PBS | : Fosfat Buffer Salin |
| XTT | : 3 - [4, 5- Dimethyl thiazol-2-yl] 1-2, 5-diphenyl tetrazolium bromid |
| FT-IR | : Fourier transform infrared spektroskopi |
| NMR | : Nükleer manyetik rözenans |
| SEM | : Taramalı elektron mikroskobu |
| $IC_{50}$ | : Yarı-maksimum İnhibe edici Konsantrasyon |
| nM | : Nanometre |
| μM | : Mikromolar |
| mL | : Mililitre |
| μL | : Mikrolitre |

# 1. GİRİŞ

Yeni tahminlere göre Dünya'da yeni tanı alan kanserli hasta sayısı ve kanserden kaynaklanan ölümler bir önceki tahminlere göre artmıştır. Bu şekilde kanser artış hızının devam etmesi durumunda, Dünya nüfusunun artışına ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak 2025 yılında toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası olacağı belirtilmiştir. Kanser, anormal bir doku kütlesi veya hücrelerin kontrolsüz bölünmesinden kaynaklanan kötü huylu bir büyüme anlamına gelir. Anormal hücre çoğalması, hücre bölünmesi işlemini etkileyen genlerdeki mutasyonlar nedeniyle meydana gelebilir. Bu hücreler büyüyüp bölündükçe normal sağlıklı hücrelerin yerini işgal etmeye başlarlar. Hatta metastaz yaparak vücudun başka bölümlerine, organlarına da sıçrayabilirler.

"Sarkom" terimi kemikler, kaslar, kıkırdak ve bağ dokulardan köken alabilen kötü huylu (malign) tümör anlamına gelir. Kemik kanseri ya kemik dokusunun kendisinden köken almaktadır veya vücudun başka bir yerinden kemiklere yayılmış olabilir. Osteosarkomlar çocuklar ve gençlik çağında en sık görülen kötü huylu kemik tümörleridir. Tedavisi en zor olan kanser türleri arasında yer alır.

Kemik dokusu zedelendiği veya kayba uğradığında, hasarlı bölgenin tamir edilmesinde ya da tamamen yenilenmesinde kullanılmak amacıyla laboratuvarda yapay kemik dokusu üretebilmek günümüzün önemli tıbbi ve sosyal ihtiyaçlarından birisidir. Bu yöntemde temel yaklaşım, amaca uygun bir kaynaktan izole edilen hücreler ile biyobozunur polimerik doku desteklerinin birlikte kullanılmasıyla laboratuvar ortamında üç boyutlu (3B) canlı kemik dokusunun oluşturulmasıdır. Vücut içerisinde hücre aktivitelerinin düzenleyicisi olan büyüme faktörlerinin polimerik yapıya katılması ise, hem kırılgan moleküller olan büyüme faktörlerini bozunmadan koruyacak hem de defekt bölgesinde lokalize edecek ve zamana bağlı bir şekilde ortama uyum sağlamalarını gerçekleştirecektir. Dolayısıyla, kemik doku mühendisliği uygulamalarında doku desteği yapı içerisine biyolojik olarak etkin biyoaktif moleküllerin eklenmesi büyük önem kazanmış ve çalışmalar bu yönde ilerlemeye başlamıştır.

Nanolif doku iskeleleri; hücrelerin büyümesi, gelişmesi, üremesi ve göç etmesi için 3B doğal bir ortam sağlarlar. Nanolif doku iskeleleri, doğal yada sentetik polimerlerden elde edilir. Polimer tercihi yapılırken en temel kriter, polimerin biyouyumlu olmasıdır. Biyouyumlu polimerler, nanolifler üzerinde hücrelerin büyümesi ve gelişmesine olanak verir ve hücreler için toksik etki oluşturmaz. Polimerlerin

biyouyumlu olmasının yanı sıra çalışılması hedeflenen doku tipine göre, polimerin biyobozunur olması da hedeflenebilir. Nanolif eldesinde kullanılan polimerlerin biyobozunur olması, hücrelerin bu yapılar üzerinde büyüyüp gelişebilmesi için oldukça önemlidir. Hücre büyümesine paralel olarak bozunan nanolif doku iskeleleri, yeni hücreler için yaşam alanı sağlamakta ve hücrelerin 3B doku oluşturmasına olanak vermektedir. Biyobozunurluk özelliği, 3B doku gelişiminde oldukça önemli olmakla birlikte, bozunma basamaklarının iyi bilinmesi gerekmektedir. Polimerin hücrelerin canlılığına zarar vermemesi için, hem polimerin hem de bozunma ürünlerinin hücreler için toksik olmaması gerekmektedir. Buna ek olarak, nanoliflerin bozunmasının hücre gelişimi ile paralel olması, dokunun bütünlüğü açısından önem taşımaktadır.

Kemik doku mühendisliğinin ilk adımı gözenekli, 3B doku iskelesinin tasarımı ve üretimi ile başlamaktadır. Doğal hücredışı matriks (HDM) ortamındaki 3B yapı ve nano ölçekli morfolojinin hücre davranışını etkilediği bilinmektedir (Vacanti, 2006). Bu doğal yapıyı hem yapısal hem de fonksiyonel olarak taklit edebilen malzemeler kullanmak doku mühendisliğinde kilit noktadır. İki tür biyobozunur malzeme vardır; nişasta, aljinat, kitin/kitosan, jelatin gibi doğal kökenli malzemeler ve poli(laktik asit), poli(kaprolakton), poli(glikolik asit) gibi sentetik malzemeler. Bu malzemelerden çeşitli yöntemlerle 3B yapılar oluşturularak doku oluşumunu destekleyici iskeleler üretilmektedir. Hücre dışı matriks fiber yapıda bir polimer ağından meydana gelmektedir. Bu ağsı fiber mimari hücrelerin tutunması ve çoğalabilmesi için gerekli uzamsal altyapıyı oluşturur. Doku mühendisliği uygulamalarında da ağsı fiber mimariyi oluşturmak için elektrospin en çok kullanılan yöntemdir (Shor ve ark., 2007).

HDM'i yapısal olarak taklit edebilen lif tabanlı gözenekli iskeleler, liyofilize elastinkollajen, poli(eter-eter-keton)/hidroksiapatit biyokompozitleri ve kitosan tabanlı malzemeler gibi doğal veya sentetik çeşitli biyopolimerlerden oluşturulabilmektedir. Adı geçen bu iskele malzemelerinin biyouyumlulukları ve in vitro ortamda hücre gelişimini arttırdıkları görülmüştür (Buttafoco ve ark., 2006).

Son yıllarda, taç eterler ve doğal bir glikoz oligomeri olan siklodekstrinlerden sonra halkalı yapıda bir fenol-formaldehit oligomeri olan "Kaliksarenler" ortaya çıkmıştır. Kaliksarenler kloroform, piridin, karbondisülfür, dimetil formamit ve dimetil sülfoksit gibi çözücülerde çözünürler. Çok sayıda özelliklere sahip kaliksarenler uygun şekilde fonksiyonlandırılarak eşsiz kullanım alanlarına sahiptirler.

Kemiğin temel doğal bileşenleri olan kolajen fibril ve hidroksiapatit minerali nano boyutta bir yapılanma gösterdiğinden taklit edilmesi mümkündür. Farklı yüzey modifikasyonlu kalikseren nanolifler, kemik hücrelerin adezyonunu ve proliferasyonunu destekleyen daha iyi platformlar sağlayabilmektedirler. Çalışmamızda elektrospin tekniği ile kaliks[4]aren nanolif yapılı iskelelerde osteoblastik farklılaşma araştırılacaktır.

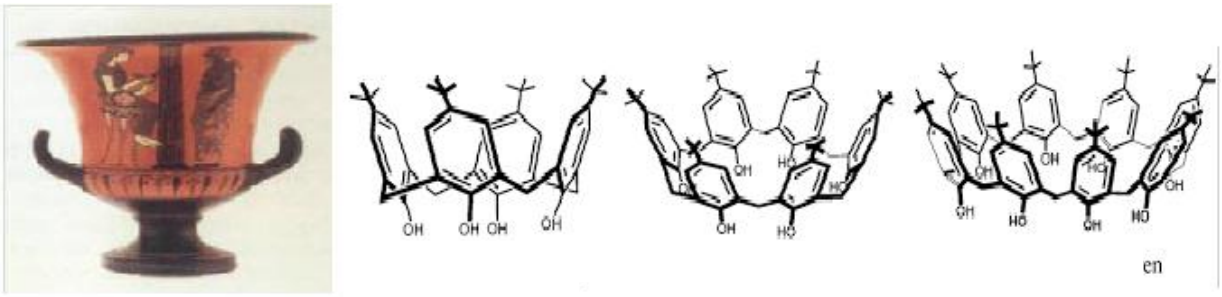
# 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

## 2.1. Kaliksarenler

### 2.1.1. Kaliksarenlere giriş

Kaliks[n]arenler, aromatik birimlerin metilen köprüleriyle birbirine bağlanması sonucu oluşan halkalı yapıdaki oligomer bileşiklerdir. Halkalı yapıda olmasından dolayı, organik moleküller ve metal katyonları ile kompleks yapma özelliğine sahiptir (C. Gutsche, 1989; Knop and Pilato, 1985).

Kaliks[n]arenler, kelime olarak "Calix" "arenes" kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur. Calix ismi Yunanca kökenli bir kelime olup, Antik Yunan dönemindeki "Calix Creater" isimli tabanı dar ağzı geniş, silindirik şeklinde sayılabilecek bir kaseye ithafen verilmiştir. Şekil olarak bu calix kaseleri, kaliksaren moleküllerine benzerliği çok fazladır. "Arenes" kelimesi ise aromatik halkaları ifade etmektedir ve başında köşeli parantez içinde bulunan "n" harfi ise, kaliksaren molekülünü oluşturan aromatik sayıdaki fenolik halkaların sayısını belirtmektedir. Aşağıdaki görselde "Calix Creater" isimli kaseye ve kaliks[4]aren molekülüne ilişkin görseller verilmiştir (Gutsche, 1989) (Şekil 2.1).



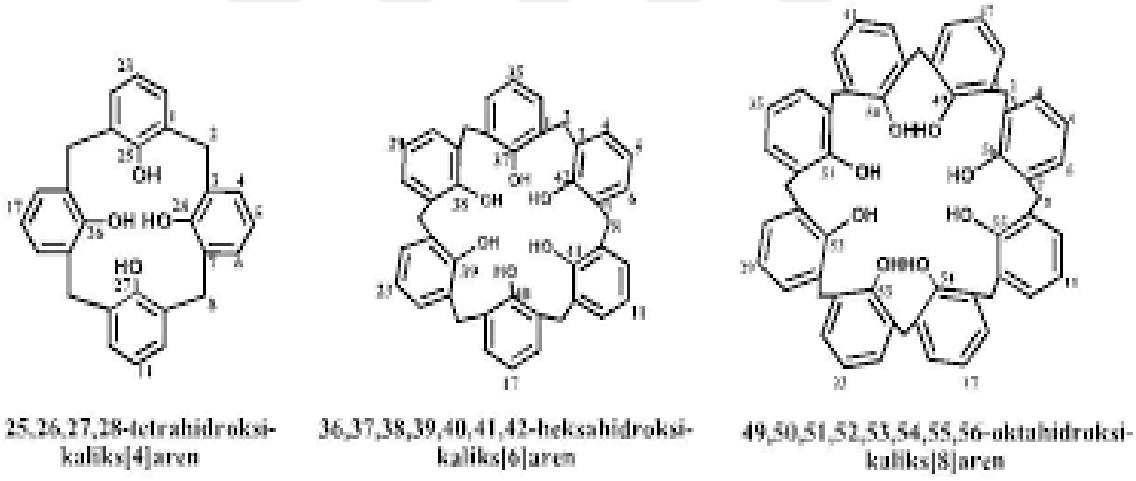
a b

**Şekil 2.1**. (a) "Calix Creater" isimli kase (b) kaliks[4]aren molekülünün genel yapısı

Formadehid ve fenol bileşiklerinin bazik ortamdaki yoğunlaşma reaksiyonu sonucu elde edilir. Kaliksarenler, bilinerek veya bilinmeyerek 1870'li yıllardan beri sentezlenmektedir. Üzerinde detaylı çalışmaların yapılması ise 1940'lı yıllarda gerçekleşmiştir. Yapısının kesin olarak tayin edilip, tekrarlanabilir sentezi ise ancak 1980'li yıllarda gerçekleştirilebilmiştir (C. D. Gutsche and Lin, 1986)

### 2.1.2. Kaliksarenlerin spektral özellikleri

Kaliksarenler oda sıcaklığında kristal yapıda ve katı halde bulunurlar. Erime noktaları 300 $^{o}$C'nin üzerindedir. Örneğin *p-tert*-bütilkaliks[4]arenin erime noktası 343 $^{o}$C civarındayken, *p-tert*-bütilkaliks[6]aren icin 380 $^{o}$C civarında ve *p-tert*-bütilkaliks[8]aren icin 411 $^{o}$C civarıdır. Kaliksarenler, organik çözücülerde az çözünürken suda ve bazik ortamda çözünmemektedir. Bu nedenle ayrılmaları, saflaştırılmaları ve karakterizasyonu zordur. Ancak, kaliksarenlerin, bazı organik çözücülerde yeterli miktarda çözünmeleriyle, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin araştırılması için Ultraviyole (UV), Infrared spektroskopisi (IR), Nükleer manyetik rezonans (NMR), Kütle spektroskopisi (MS) gibi spektroskopik yöntemlere başvurulmuştur. Kaliksarenlerin yapısındaki fenolik gruplardan dolayı yaklaşık olarak 280 nm'de absorbansının bulunduğu saptanmıştır (Gutsche 1989).




**Şekil 2.2**. Kaliks[n]arenlerin yapısı

Kaliksarenlerin belirtilmesinde ve konformasyonlarının gösteriminde en çok kullanılan spektroskopik yöntem $^{1}$H-NMR'dır. $^{1}$H-NMR spektrumlarına bakıldığında kaliksarendeki fenolik hidroksil piklerinin 10 ppm yakınlarında olması düşünülürken, molekül içi H bağlarının etkisiyle pikler yukarı alana kaydığı görülmüştür (Özcan 2009).

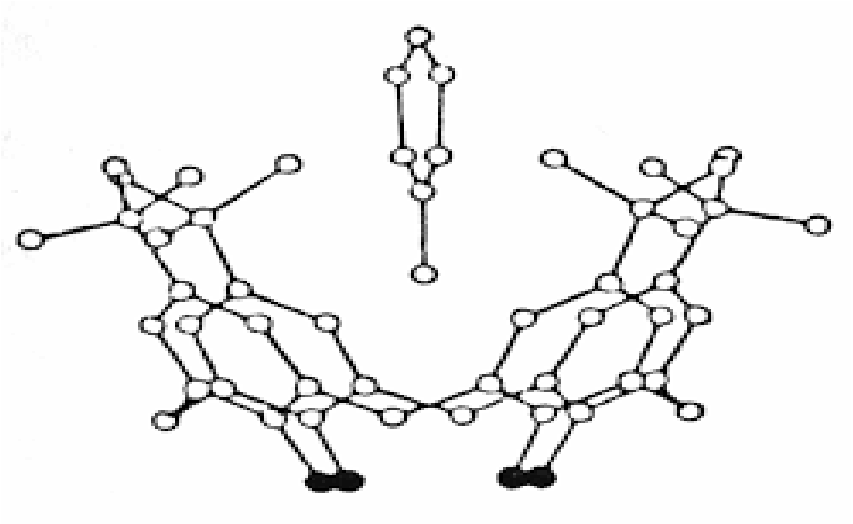
Kaliksaren bileşiklerinin çözünürlükleri kısıtlıdır. Bunun haricinde kaliksarenlerin birçoğu kloroform, piridin ve karbondisülfürde çözünür. Para kısmındaki alkil grupları, kaliksarenin organik yapıdaki çözünürlük özelliğini arttırır.

Yapılarında eter, ester gibi uygun fonksiyonel grupların var olması kaliksarenlerin organik çözücülerde çözünürlüklerini arttırır. Bu yüzden araştırmacılar, karışım halindeki kaliksarenleri ayırmada, türevleme veya sürekli ekstraksiyon yöntemini kullanmaktadırlar. (Gutsche 1989). Kaliksarenler normal şartlarda suda çözünmezler, çözeltilerin sulu formlarında oluşan substrat-bağlanma çalışmaları için uygun değillerdir. Bu nedenle suda çözünen kaliksaren türevlerinin sentezi, kullanım alanını genişletecektir. 1984'te Ungaro ve arkadaşları tarafından sentezlenen *para tersiyer* bütilkaliks[4]arenin tetrakarboksilik asit türevi, suda çözünen ilk kaliksaren özelliğini göstermektedir (Arduini 1984).

### 2.1.2.1. *Para tersiyer* bütilkaliks[4]arenin sentezi

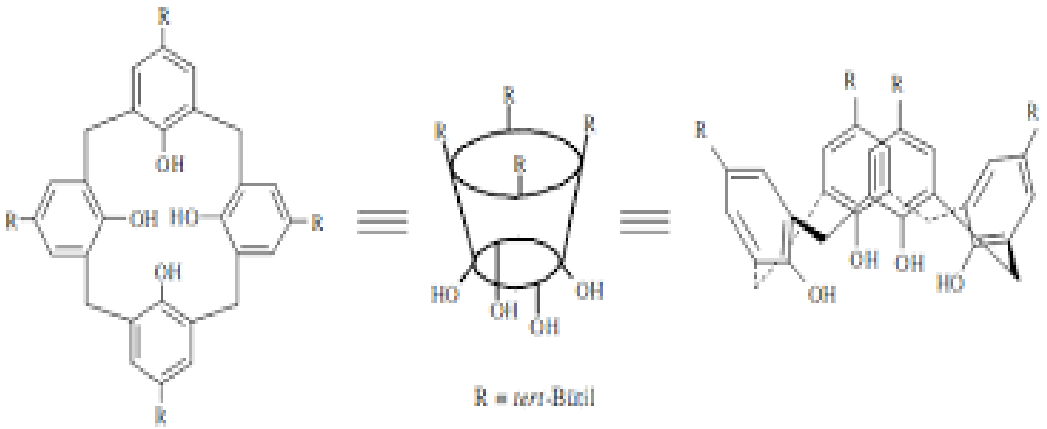
Kaliks[n]arenlerden literatürde çok çalışma yapılan ve kaliks[n]arenlerin temeli olarak görülen *p-tert*-bütilkaliks[4]arenin sentez işleminin nasıl gerçekleştiği uzun yıllar açıklanamamıştır. Ancak değişik ısılarda, çalışmalardaki baz katalizörünün farklı gramlarının tesiri hakkında çalışmalar yapılmış ve kaliksarenlerin basitçe sentezinin yapılması için önemli bir ipucu elde edilmiştir (Gutsche 1990a).

*P-tert*-bütilkaliks[4]aren sentezi hakkında ilk defa Zinke adındaki bilim adamı tarafından bir teori ortaya konuldu. Sonrasında Cornforth ve Gutsche bu teoriyi ileriye taşıyarak genişlettiler. (Zinke 1944, 1948, Gutsche 1986, 1990) Gutsche'nin yöntemine göre *p-tert*-bütilfenol, % 37 saflıktaki formaldehit ve fenolle 0,045 eş değer orandaki sodyum hidroksit ortamında 110-120 ºC'de iki saat ısıtılması sonucu koyu, yapışkan yapıda katı bir ön (precursor) madde elde edilmiştir. Sonrasında bu madde, bir geri soğutucu altında ve su toplama başlığı kullanılarak difenil eterle iki saat kaynatılır (halka yapısı oluşturma). Soğuttuktan sonra reaksiyondaki karışımın içinden saf ürün süzme yöntemiyle ayrıştırılır ve toluenden kristallendirilerek % 50 verim ile parlak beyaz kristal yapı meydana gelir. *P-tert*-bütilfenol ve su fazlı formaldehitin bileşimi, bir baz ile muameleden sonra oluşan ilk ön ürün yüksek sıcaklıkta ısıtıldığında kaliksarenlere dönüşür. İlk ürün olan para-tert-bütilkaliks[8]aren ya da para-tert-bütilkaliks[6]aren'in % 70 - % 75 aralığında yüksek verimlerle *p-tert*-bütilkaliks[4]aren gözlenmiştir (Gutsche 1986).



**Şekil 2.3**. *p-tert*-bütilkaliks[4]aren ile koluen molekülünün kompleks yapısı

*P-tert*-bütilkaliks[4]aren kloroform, toluen, benzen, ksilen ile; *p-tert*-bütilkaliks[6]aren kloroform, metanol ile; *p-tert*-bütilkaliks[8]aren kloroform ile moleküler kompleks vermektedir (Gutsche, 1990b).




**Şekil 2.4.** *p-tert* -bütilkaliks[4]arenin farklı gösterimleri

### 2.1.3. Kaliksarenlerin uygulama alanları

- Enzim taklitçi kaliksarenler
- Molekül / iyon taşıyıcı kalikasarenler
- Sıvı / kristal sistemleri olarak kaliksarenler
- Katalizör özelliğine sahip suda çözünen kaliksarenler
- Sensör ve elektrolit yapımında kullanılan kaliksarenler
- Kromotografik faz olarak kullanılan kaliksarenler
- Kaliksarenlerin polimerleşmesi
- Biyolojik aktiviteli kaliksarenler

#### 2.1.3.1. Kaliksarenlerin biyolojik aktivitesi

İşlevselleştirilmiş fonksiyonel kaliksaren türevleri, organik ve biyoorganik moleküllere karşı olağanüstü özellikler sergilemektedir. Aynı zamanda, kaliksarenlerin biyomoleküller ile stabil kompleksler oluşturma yeteneği; biyosensörlerin geliştirilmesi, biyoteknoloji, biyoloji ve ilaç keşifleri alanındaki uygulamalara izin verir. Üstün geometrik şekillerinden dolayı kaliksarenler, kompleksler oluşturarak ilaç moleküllerini barındırır. Kontrollü ilaç salınımı, hedefe yönelik kemoterapi gibi uygulamalarda idealdir.

Bazı biyomedikal uygulamalara sahip olduğu keşfedilen, ilaçlar gibi davrandığı ve ilaç dağıtım sistemlerinde büyük potansiyel olduğunu gösterdiği makromoleküller ve sentetik makromoleküller arasında taç eter, siklodekstrin, kaliksarenler ve bunların türevleri büyük öneme sahiptir. Makromoleküller arasında, kaliksarenin üçüncü nesil konakçı konuk supramoleküler kimyasını temsil ettiği düşünülmektedir. Kaliksaren, fenolün formaldehit ile tepkimesiyle sentezlenebilen ve güçlü bir baz veya asitin katalitik bir miktarının varlığında sentezlenebilen siklik bir oligomerdir (Livshits ve ark., 2014).

Kaliksaren bazlı bileşiklerin antikanser aktivitesi, birkaç araştırma grubu tarafından araştırılmıştır. Baggetto ve ark.(2010), kaliks[4]aren türevlerinin çeşitli tümör hücreleri (MU2, MU2F, HT1080, SP6.5, 1PC227, Jurkat, MEWO, Hl-60, Huh7, Hep-G2, MEWO, DLM) üzerindeki etkisini incelemişlerdir ve bu bileşiklerin aktivitesini standart anti-kanser ilaçlarıyla karşılaştırmışlardır. Bu işlevsel hale getirilmiş kaliks[4]aren türevlerinin, özellikle lenfoblastik lösemi ve melanoma hücre çizgilerinde güçlü anti kanser ajanları olduğunu keşfetmişlerdir.

Aynı şekilde, Nasuhi Pur ve Dilmaghani sentezlenmiş kaliks[4]areni dört platin(II) merkezi ile işlevselleştirip ve potansiyel bir antikanser ajanı olduğunu bildirdiler. Kemoterapötik bir ajan olan karboplatin ile karşılaştırıldığında, yeni sentezlenen bileşiğin akciğer kanseri, hepatoselüler kanser ve meme kanserine karşı daha iyi aktivite gösterdiği gözlemlendi. Kolorimetrik sitotoksisite testleri kullanılarak bir akciğer kanseri hücre hattındaki ortanca inhibitör konsantrasyonu (IC50) 2,6 μM olarak bulundu. Başka bir çalışmada, bir fare melanom modelinde kaliks[4]arenin glikokonjugatlarının in vivo etkisinin, 2 hafta içinde tümör büyümesinde önemli bir azalma içerdiği rapor edildi.s

Imatinib, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanan antikanser ilaçlardan biridir ve güçlü bir tirozin kinaz III inhibitörü olduğu bilinmektedir. Galindo-Murillo ve ark.(2014), kaliksaren türevleri ve imatinib arasındaki etkileşimi araştırmıştır. Bu komplekslerin siliko çalışmasında, antikanser ilacın tümör hücrelerine kontrollü bir şekilde verilmesini açıklayan yoğunluk fonksiyonel teorisi (DFT) ve moleküler dinamik (MD) simülasyonu yapılmıştır. Etkileşim enerjilerinin hesaplanmasına dayanarak, kaliksaren boşluğu boyutunun ve ekli fonksiyonel grupların doğasının, imatinib kaliksaren konak - misafir kimyasının stabilitesinde hayati bir rol oynadığını buldular. Hidrojen bağ donörü fonksiyonel gruplarının diğerlerinden daha etkili olduğu bulundu. Seçilen 18 kaliksaren türevi arasında, üst kenarda S03H ve $(CH2)_2$ OH grupları ile işlevselleştirilmiş kaliks[6]arenin, imatinib ile daha stabil kompleksler oluşturduğunu buldular.

Galindo-Murillo ve ark.(2014), ayrıca bir antikanser ilacı, 3-fenil-1 H- [1] benzofuro [3,2-c] pirazol (bir tirozin kinaz inhibitörü) ve kaliks[n]arenlerin (n = 4, 5, 6, 8) sülfonik asit ve etoksil grupları ile işlevselleştirildi. Kaliks[8]arenlerinin ve kaliks[6]arenlerinin, üst kenarda S03H grubu taşıyan, 3-fenil-l H - [1] benzofuro [3,2-c] pirazol ile nispeten daha stabil kompleksler oluşturduğunu bildirdiler. Kaliksarenlerin oyuk büyüklüğü ve S03H'nin hidrojen bağ donör kabiliyeti, bu stabilitenin olası nedenleri olarak kabul edildi.

Enzim inhibisyonu bazı kemoterapötik ilaçlar için ortak bir etki şeklidir. Birkaç kaliksaren türevi çalışılmış ve güçlü enzim inhibitörleri olarak davrandığı rapor edilmiştir. Örneğin, Cherenok ve ark.(2012) fosfonik, aminofosfonik ve metilen benzofosfonik asit tortuları ile birleştirilmiş kaliks[4]arenleri incelemiş ve bunları alkalin fosfataz ve tirozin fosfataz gibi bazı fosfatazların aktif inhibitörleri olarak bulmuşlardır. Ayrıca hidroksimetilfosfonik asit kaliksarenlerinin hücrelerde

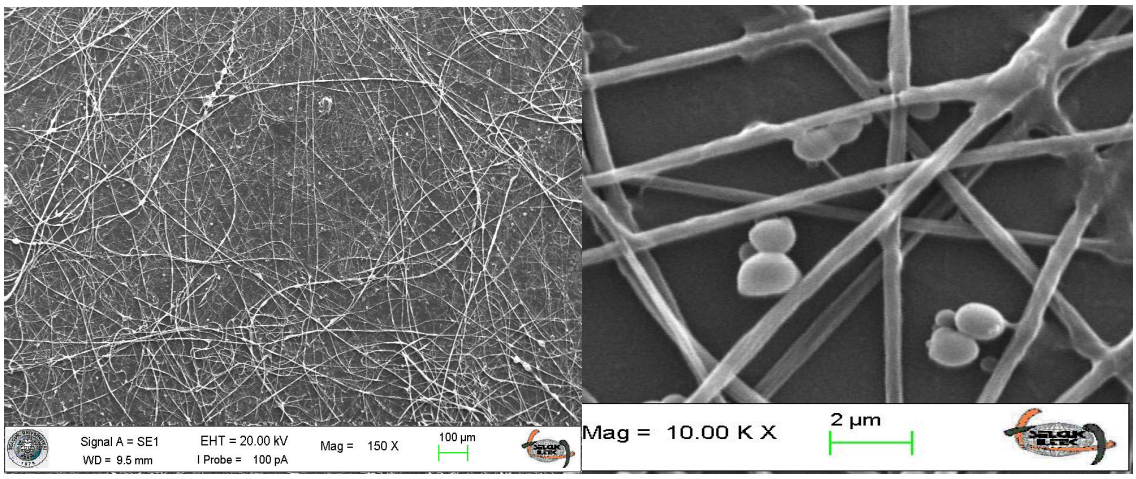
ksenobiyotik detoksifikasyon işleminde kilit bir enzim olan Glutatyon-S-transferazı inhibe ettiğini, böylece birçok tümör tipinde gözlenen çoklu ilaç direncine katkıda bulunduğunu bildirmiştir. Consoli ve ark.(2006) bir *penicillium digitatum* fragmanının DNA replikasyonunun, polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla timin / adenin 2′-deoksinükleotit kısımları ile modifiye edilmiş kaliks[4]aren çalışmalarında inhibe edildiğini bildirmiştir.

## 2.2. Nanolif ve Elektrospin Tekniği

Çapı bir mikron ve altındaki fiberler nanolif olarak tanımlanır. Günümüzde çeşitli üretim yöntemleri kullanılarak birçok seramik ve polimer malzemelerden nanolif üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Çeşitli yöntemler kullanılarak polimer solüsyonundan ve polimer eriyiğinden mikro metre altındaki boyutlarda üretilen fiberlere nanolif denilmektedir (Ramakrishna ve ark., 2005).

Nanoliflerin çapları, kullanım alanına göre düzenlenebilir. Nanolif yoğunluğuna bağlı olarak, gözeneklerin boyutu da düzenlenebilir. Elektrospin düzeneğinde, nanoliflerin elde edilişi, şırınganın ucunda, Taylor konisi meydana geldiği anda başlar. Taylor konisi, polimer çözeltisine uygulanan elektrik akımı sayesinde oluşur. Koni oluşturan polimer, elektrik alan sayesinde jetler halinde toplayıcı üzerinde nanolif olarak birikir. Elektrospin düzeneğinde, sabit ya da dönen toplayıcılar kullanılabilir. Dönen toplayıcılar oluşan nanoliflerin daha düzenli ve yönlendirilmiş bir biçimde elde edilmesini sağlarlar.

Elektrospin tekniği, çeşitli polimerlerin, polimer karışımlarının, inorganik maddelerin ve canlı hücrelerin karıştırılarak aktif nano yapıların oluşumuna olanak sağlamaktadır. Bu yöntem sayesinde çok çeşitli polimerlerden nanolifler üretilebilmekte ve bu liflerin inceliği sayesinde doğal doku başarılı bir şekilde taklit edilebilmektedir. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak yüzeyler vücut içine yerleştirileceklerinden, bu yüzeylerin üretiminde kullanılan polimerlerin vücuda uyumluluk ve kullanılacakları uygulamanın gerekliliklerine uygun bir biyolojik parçalanma seviyesine sahip olmaları gerekmektedir. Nanolifler ile üretilmiş yüzeyler, yapılarında vücuda uyumlu polimerler kullanıldığında deri, kemik, sinir, kas gibi dokuların iyileştirilmesinde ve tekrardan yapılandırılmasında kullanılabilmektedir (Kim ve ark., 2005).




**Şekil 2.5.** Elektrospin tekniği ile üretilen nanolif

Elektrospin tekniğiyle üretilen nanoliflerin özelliklerini; konsantrasyon, kılcal uç ve metal kollektör arasındaki mesafe, en uç noktadaki potansiyel, akış hızı gibi parametreler etkilemektedir. Bu yöntem ile üretilen polimerik, karbon ve seramik nanolifleri; karbon ve diğer nano tüplerle karşılaştırıldıklarında, maliyet ve tek adımda üretimin gerçekleşmesi gibi konularda çeşitli avantajlara sahiptirler. Ayrıca boyutları itibarıyla tıbbi amaçlı kullanıma da uygundurlar. Bu yöntemle çok çeşitli doğal ve sentetik polimer maddeden nano ve mikro boyutta lifler elde edilebilmektedir (He ve ark., 2004).

### 2.2.1. Nanoliflerin biyomedikal uygulamaları

Nanolifler, doğal dokular oluşmadan önce bu dokuların yerine geçebilecek geçici doku destekleri olarak kullanılabilmektedirler. Örneğin, University of Delaware'deki araştırmacılar, kollajen örümcek ipeği ve denature (doğal özellikleri değiştirilmiş) kollajen gibi doğal polimerlerden üretilen nanoliflerle ağlar üretmişlerdir. Elektrospin yöntemine göre elde edilen nanolifler sayesinde geniş yüzey alanı, kontrollü gözeneklilik, yapı ve mekaniksel özellikler gibi istenen parametreler sağlanabilmektedir. Doğal yapıların taklit edilmesinin yanı sıra, nano seviyede biyolojik olarak parçalanabilen liflerin kullanılması ile istenen parçalanma seviyesi de kolaylıkla sağlanabilmektedir.

Virginia Commonwealth Üniversitesinin geliştirdiği teknoloji ile, kollajenden yapılmış 3B yapı içerisine hücre ekilmektedir. Bu sayede by-pass ameliyatlarındaki klasik uygulama kaldırılmaktadır. Çünkü hastanın kol veya bacaklarından damar

alınmamakta ve yeni teknikle klasik yama yönteminden 6 kat daha küçük kan damarları oluşturulup kullanılabilmektedir. Hücre 3 - 6 haftada gelişmekte ve geliştirilmiş damar dokusu aşılanmaya hazır hale gelmektedir. Kollajen vücudun doğal bir komponentidir. Yüzeyinde hücre gelişimine izin vermektedir. Elektrospin teknolojisi ile nanolifler kıkırdak, kemik, deri, atardamar, kalp ve sinir dokuları için yapay doku destek yapısı olarak kullanılabilmektedirler. Nanolif doku iskeleleri tasarlanırken, polimer yapısına, biyoaktif inorganik malzemeler de eklenebilir. Kemik dokusu olarak kullanılacak materyalin vücut hücreleri ile biyolojik uyumu çok önemlidir. Örneğin kemik dokusu hücrelerinin büyütüleceği doku iskelesi yapısı için; sentetik polimerlerin içerisine, hidroksiapatit kristalleri, kalsiyum fosfat gibi inorganik malzemeler eklenebilir. Hidroksiapatit kristalleri ve kalsiyum fosfat kemik yapısında bulunan inorganik maddelerdir. Bu maddelerin nanolif doku iskelesi yapısına eklenmesinin, kemik hücrelerinin çoğalması, büyümesi ve farklılaşması üzerinde olumlu etkileri olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Ayrıca, inorganik malzemeler, nanolif yapısının dayanımını da artırarak, kemik dokusu hücreleri için daha dayanıklı bir büyüme ortamı sağlamaktadır (Dersch ve ark., 2005).

### 2.3. Doku Mühendisliği ve Nanotıp

Tıp biliminde nanoteknolojinin kullanım alanı "Nanotıp" olarak isimlendirilmektedir. Konu olarak nanotıp; tanı, tedavi, hastalık ve travmatik yaralanmaların önlenmesi, ağrının giderilmesi ve insan sağlığının korunup geliştirilmesi amaçlı vücudun moleküler bilgileri ile moleküler araçların kullanılmasını içermektedir. Moleküler biyologların, fizikçilerin, matematikçilerin, tıp mensuplarının ve bilgisayar mühendisleri ile diğer mühendisler gibi multidisipliner birçok bilim adamının ortak çalışması gereken bir alan olup, ilk nanobiyoteknoloji laboratuvarı 2000 yılında Cornell Üniversitesi'nde kurulmuştur (Mastrangelo C., 1999). Burada hedeflenen, günümüz tıbbının metotlarıyla çözüme gidilemeyen sorunları nanoteknoloji sayesinde kökten çözmektir. Nanoteknoloji ile ilaçların yan etkilerinin ortadan kaldırılması, hasarlı dokuların onarılması, kanserli hücrelerin tamamen yok edilmesi ve hastalıkların tedavisi gibi alanlarda başarılı uygulamalar yapılabileceği öngörülmektedir.

Doku mühendisliği terimi ilk olarak 1987'de California Üniversitesi'nden Dr. Y.C. Fung tarafından NSF'nin (National Science Foundation) bir toplantısında dile getirilmiştir. Doku mühendisliği, interdisipliner bir alan olup, mühendislik ve sağlık

bilimlerinin ortak çalışması sonucu ortaya çıkmıştır. Bilimsel çevrelerin "doku mühendisliği" konusunda odaklanmasında ise iki makale çok etkili olmuştur. Bunlardan biri Nerem tarafından 1991'de "hücre mühendisliği konusunda, diğeri ise Langer ve Vacanti tarafından 1993'te Science dergisinde "doku mühendisliği" başlığı altında yayınlanmıştır.

Doku mühendisliği günümüz biyotıbbının en popüler alanını oluşturmaktadır. Biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerini tek başlarına veya birlikte kullanarak canlı dokuların tamiri veya yeniden yapılanması için biyoloji, kimya ve mühendislik ilkelerinin uygulanmasıdır. Doku mühendisleri doku onarımı ya da üretimi için insan vücudunun son derece karmaşık yapısını incelemekte ve çok ileri teknolojiler kullanarak taklit etmeye çalışmaktadırlar. Doku mühendisliğinde istenilen dokuyu oluşturabilecek işlevselliğe sahip hücreler uygun bir malzemeden hazırlanan doku iskeleleri ile birleştirilerek hibrid sistemler oluşturulmaktadır. Doku iskelesi, hücrelerin organize olarak işlevsel bir dokuya dönüşebilmelerinde gerekli desteği sağlamaktadır (Smith L. A., 2004).

Yakın gelecekte laboratuvar ortamında nanoliflerden elde edilen doku iskelelerle oluşturulan doku ve organlar ile organ naklinin tarihe karışabileceği düşünülmektedir. Yeni ve özel doku iskeleleri tasarımı için duyulan ihtiyaç doku mühendisliğini yönlendirmede aktif bir role sahiptir. Hücreleri yalnızca istenilen bölgede tutmaktan ziyade farklı özellikteki hibrit malzemelerin kombinasyonlarıyla fonksiyonel yapıların üretilmesi söz konusudur (Barron ve ark., 2003a; Gautam ve ark., 2010).

### 2.3.1. Doku iskelesi

İnsan vücudu hiyerarşik biçimde düzenlenmiş komoleks bir yapıdır. İnsan vücüdu sistemlerden, sistemler organlardan, organlar dokulardan, dokular ise hücreler ve hücreler arası matriksten (ECM) oluşmaktadır. ECM hücreler için 3B bir mikroçevre oluşturup, hücrelere fiziksel bir destek sağlamaktadır. Aynı zamanda hücre / hücre etkileşimini organize ederek, hücrelerin yapışmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını, göçünü ve matriks birikimini sağlamak için çeşitli biyofiziksel ve biyokimyasal uyarıları yapmaktatdır (Peter, X. MA., 2004).

Doku iskeleleri ECM'i taklit edecek biçimde tasarlanan yapılardır. Kısaca, yapay bir "hücre dışı matriks" olarak düşünülebilir. Doku mühendisliğinin üç temel bileşeninden biri olan doku iskeleleri, hücreler için uygun yapışma yüzeyi

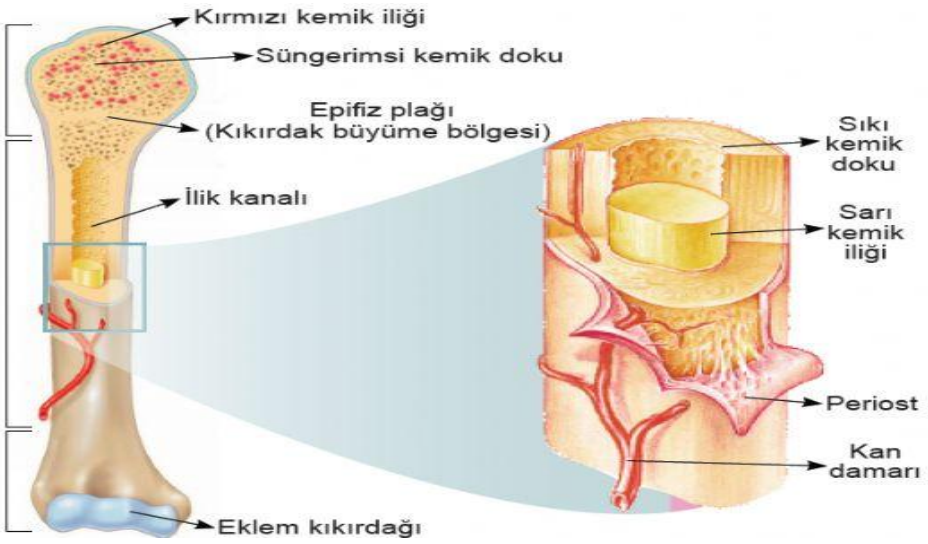
oluşturmalarının yanı sıra, mekanik dayanım sağlamakta, fizyolojik ve biyolojik değişikliklere cevap vermek için çevre doku ile etkileşimin kurulmasına yardımcı olmakta; ayrıca gerçek hücre dışı matriksin yeniden oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Doku iskelesi üretiminde kullanılacak malzemelerin seçimi çok önemlidir. Doku iskelesi üretiminde kullanılacak malzemede olması gereken başlıca özellikler şunlardır:

- Malzeme biyouyumlu olmalıdır, yani vücut içine yerleştirildiğinde istenmeyen doku tepkilerine yol açmamalıdır.
- Hücre yapışmasını ve işlevini artırıcı yüzey kimyasına sahip olmalıdır.
- Hücreler yeni ECM oluşturacak kapasiteye ulaştıklarında iskeleye ihtiyaç kalmayacağından, doku iskelesinin vücut ortamında parçalanabilen bir malzemeden (biyobozunur madde) üretilmesi gerekmektedir.
- Malzeme parçalanırken biyouyumluluğunu kaybetmemeli ve zehirli ürünler oluşturmamalıdır.
- Hücrelerin ve besinlerin geçişini sağlayacak şekilde yüksek gözeneklilik oranına ve uygun gözenek büyüklüğüne sahip olmalıdır.

Bu özelliklere sahip malzemeler arasında doğal polimerler (kolajen, kitin, kitosan, alginat, hyoluronik asit), biyoseramikler (trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit) ve bu malzemelerin bileşimi ile oluşan kompozit malzemeler sayılabilmektedir (Horrocks ve Anand, 2009). Bu malzemelerin işlenmesi sonucu üretilen doku iskeleleri, gerek kimyasal bileşim, gerekse fiziksel yapı bakımından doğal ECM'in yapısını ve biyolojik işlevini mümkün olduğunca iyi bir şekilde taklit etmelidir (Peter, X. MA., 2004).

## 2.4. Kemik doku

Kemik göründüğü gibi tek bir sert yapıdan oluşmamaktadır aksine büyük çoğunluğu viskoelastik matriks olan bir yapıdır (Şekil 2.5). Kemiğin ana dokusu görece sert ve hafiftir. Kemiksi dokunun matriksi kemiklere sertliği veren inorganik mineral olan kalsiyum fosfat (CaP) içeren hidroksiapatit formunda ve kırılmaya direnci sağlayan elastik bir protein olan organik kollajenden oluşan kompozit bir malzemedir (Schmidt-Nielsen, 1984).




**Şekil 2.6.** Kemik dokusunun genel yapısı

Kemik, çeşitli yapısal bileşenler içeren heterojen bir yapıdır. Aynı zamanda hücreler, fibroblastlar ve lifler tarafından sentezlenen bir temel maddeden oluşup, hücre dışı matriks bileşimi ile kalsifiye olmuş bir destek dokudur. Kandaki kalsiyum seviyesi normal miktarın altına düştüğünde kemiklerden kalsiyum salınarak metabolik ihtiyaç karşılanır, kandaki kalsiyum seviyesi yükseldiğinde ise kalsiyumun fazlası kemik matriksinde depolanır. Böylece organları koruma ve yük taşımanın dışında hematopoez için uygun ortamı sağlar.

### 2.4.1. Kortikal kemik doku

Kemik dokusunun dış tabakasını oluşturan yapı kortikal kemik ya da sert kemik dokusu olarak adlandırılmaktadır. Kortikal kemik osteon adı verilen mikroskobik sütunlardan oluşur. Her bir sütun metabolik olarak aktiftir ve osteon içerisindeki hücrelerin konumu ve doğası tekrar tekrar oluşturulur. Kortikal kemik dokusu dıştan periosteum içten ise endosteum adı verilen bir tabaka ile kaplıdır. Endosteum kortikal kemik dokusu ve süngerimsi kemik dokusu ile bir bağ oluşturur (Deakin, 2006).

### 2.4.2. Süngerimsi kemik doku

Kemik dokusunun iç kısmını dolduran bölüm süngerimsi (trabeküler, boşluklu) kemik dokusu olarak bilinmektedir. Bu doku açık gözenek ağına sahiptir. İnce

osteoblast tabakası (olgunlaşmamış kemik hücreleri) endosteumu çevreleyerek düzensiz ağsı boşluk yapısı oluştururlar. Bu boşluklar içerisinde plateletleri, kırmızı kan hücreleri ve beyaz kan hücrelerini oluşturan kemik iliği ve hematopoietik kök hücreleri bulunur. Süngerimsi kemik dokusu toplam kemik kütlesinin %20'sini oluşturur ancak kortikal kemik dokusuna göre on kat daha fazla yüzey alanına sahiptir (Deakin, 2006).

### 2.4.3. Kemik iliği

Kemik iliği kemiklerin iç kısmında yer alan esnek bir dokudur. İnsanlarda kırmızı kan hücreleri hematopoiesis adı verilen bir süreç ile uzun kemiklerin baş kısımlarındaki süngerimsi yapılarda kemik iliği tarafından üretilir. Kemik iliği insanlarda ortalama insan ağırlığının % 4'ünü oluşturmaktadır. Kemik iliğinin hematopoietik bileşeni günde yaklaşık 500 milyar kan hücresi üretir. Kemik iliği aynı zamanda ilik stromal hücreleri olarak bilinen mezenkimal kök hücreleri (MKH) de içerir. Bu hücreler multipotent özellikte olup birçok farklı türdeki hücrelere farklılaşabilme kapasitesine sahiptir (Vunjak ve ark., 2010).

### 2.4.5. Kemiğin matriks bileşenleri

Kemik, organik ve inorganik fazlar içeren kompozit bir malzemedir. Ağırlığının yaklaşık % 60'ı inorganik maddelerden, % 8 - 10'u sudan ve geri kalanı da organik maddelerden oluşur. Organik faz yapıya derinlemesine işleyerek dokuya mekanik ve biyomekanik özelliklerini kazandırır. İçerdiği büyüme faktörleri ve sitokinler, osteonektin, osteopontin, kemik siyalo protein, osteokalsin, proteoglikan ve diğer fosfoproteinler ile fosfolipitler toplam hacme göre küçük bir alanı kaplasalar da kemiğin biyolojik fonksiyonlarına sağladığı katkıları oldukça önemlidir. Hemen her yerde bulunan ve oldukça düşük çözünürlükte olan tip I kollajen proteini kemik matriksini oluşturan ana bileşendir. Organik kısmın ağırlıkça % 98'i tip I kollajen ve çeşitli kollajen yapıda olmayan proteinlerden meydana gelirken, sadece % 2'lik kısmını hücreler oluşturur (Einhorn 1994). İnorganik faz ise kalsiyum fosfattan doğal yollarla oluşan hidroksi apatit [(Ca10(PO4)6(OH)2] formlarının karışımından oluşur. Özellikle fosfat gruplarınının yerine başta karbonat olmak üzere safsızlık içeririler, daha çok türevleri şeklinde bulunurlar. Kalsiyum iyonları yerine potasyum, magnezyum, stronsyum ve sodyum; hidroksil grupları yerine de klor ve flor safsızlık olarak

bulunabilir. Bu safsızlıklar apatitin kristalinitesini azaltır ve dolayısıyla çözülme gibi kemik yıkımında oldukça önemli olan özelliklerini de değiştirir (Ou-Yang, 2001).

### 2.4.6. Kemiğin hücresel bileşenleri

Kemik metabolizması mekanik, kimyasal, magnetik, elektriksel olmak üzere çevresel sinyallerle düzenlenir. Kemik hücreleri, yeni kemik oluşumunu ve lokal kemik yıkımını düzenleyen bu çevresel sinyallerden sorumludur. Kemik dokudaki hücreler mezenkimal ve hematopoitik kaynaklı olarak 2 grupta toplanır.

- mezenkimal kaynaklı; osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler,
- hematopoitik kaynaklı; osteoklastlar.

#### 2.4.6.1. Osteoprogenitör hücreler

Mezenkimadan köken alan osteoprogenitör hücreleri, osteoblast ve osteosit hücrelerinin öncülleridir. Progenitör hücreler, asidofilik sitoplazmalı, soluk boyanan nukleuslu hücreler olup periosteumun iç katında, endosteumda ve Havers kanallarında bulunur. Kemikte herhangi bir aktivite ya da problem meydana geldiğinde kemik büyümesi veya kırık onarımında aktif hale gelerek bölünürler. İhtiyaca göre diğer kemik hücrelerine dönüşürler.

#### 2.4.6.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar pluripotent mezenkimal kök hücre kaynaklıdırlar ve kemik iliğinde, periosteumda ve yumuşak dokularda bulunurlar. Kemik oluşum sürecinde sonradan mineralize olacak osteokalsin, kemik sialoprotein, osteopontin, osteonektin, belirli hormon reseptörleri, büyüme faktörleri ve sitokinler gibi matriks proteinlerinin ve tip I kollajen sentezinden sorumludurlar (Yang, 2005). Osteoblastlar, kemik matriksinin organik kısımlarının sentezinden de sorumludurlar ve kemiğin inorganik kısımlarının sentezi osteoblastların bulunmasına bağlıdır. Osteoblastlar, kemiksi yapılarda birikip ortamı mineralize ederek yeni kemiği oluştururlar. Kemik yüzeylerinde yan yana dizilirler. İri nukleusları olup sitoplazmaları koyu ve bazofiliktir. Bu hücreler birbirleriyle kısa çıkıntılarla / sitoplazmik uzantılarla ilişki kurarlar. Bu uzantılar, hücre kendi etrafını matriks ile sarmaya başladığı zaman daha belirgin hale gelir.

Matriks sentezi yapmaya başladıklarında şekilleri kübikten prizmatiğe kadar değişebilir. Alkalin fosfataz aktivitesi artar. Sentez aktiviteleri azaldıkça yassılaşırlar, alkalin fosfataz aktiviteleri yavaşladıkça sitoplazmalarındaki bazofilik özellikleri de azalır. Yeni kemiği oluşurken osteoblastların bazıları matriks içerisine enkapsüle olarak osteosit adı verilen hücrelere farklılaşırlar. Kalan osteoblastlar yeni oluşmuş kemik yüzeyini kaplayıp, dinlenme evresindeki hücre dizilerine dönüşene kadar kemik sentezlemeye devam ederler (Lian ve Stein, 2001).

#### 2.4.6.3. Osteositler

Osteoblastların farklılaşmasıyla oluşan olgun kemik hücresidir. Tüm kemik hücrelerinin toplam % 95'ini oluştururlar. Yaşlandıklarında matriks molekülü üretimleri düşer ve kemik matriksi içine gömülerek apoptozisle varlıklarını sonlandırırlar. Kemikte baskın olarak mekanik sensör fonksiyonu ile ilişkilidirler. Gelişimlerini tamamlamış olduklarından sentez yapamazlar. Bu nedenle granüllü ER ve golgilerinde azalma görülür. Sitoplazma bazofilisi de daha azdır. Kemikte *"laküna"* denilen boşluklar içinde gömülü şekilde yerleşmişlerdir. En tipik özelliklerinden biri de lakünalar içinde dallanan *"kanalikülü"* uzantılarıdır. Lakün - skanalikül sistemleri sayesinde komşu hücrelerle ve osteoblastlarla iletişim halindedirler (Lian ve Stein, 2001).

#### 2.4.6.4. Osteoklastlar

Osteoklastlar, hematopoitik kökenli olup hücre dışı matriks ve kemik yıkımından sorumlu hücrelerdir. 20 - 100 μm çaplara sahip büyük hücrelerdir, çok sayıda mitokondrileri, lizozomları ve iyi gelişmiş golgi kompleksleri vardır. Fonksiyonlarından dolayı makrofaj türü hücre olarak da kabul edilirler ancak aktif fagositoz yapmazlar. İçerdikleri kollajenaz ve diğer proteolitik enzimlerle kemiği rezorbe ederler (Yang, 2005). Osteoklastlar hormonlara karşı duyarlıdır. Paratiroid hormonu hücrede RNA sentezini arttırmada etkili iken , kalsitonun hormonu tersi etki yaparak kemik yıkımında, kemiğin modellenmesinde önemli rol oynar. Osteoklastların kemiği rezorbe etmesiyle ortama salınan dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- Beta, Transforming Growth Factor), kemik morfogenetik proteinleri (BMP, Bone Morphogenetic Proteins),

fibroblast büyüme faktörü (FGF, Fibroblast Growth Factor) ve insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF, Insulin-like Growth Factor) mezenkimal kök hücreleri ve pre-osteoblastları uyarır kemik yapımı başlar. Diğer yandan pre-osteoblastlar monosit hücrelerini indükleyen M-CSF ve RANKL ligandlarını eksprese etmeye başlar ve osteoklast farklılaşmasını sağlarlar. Kemik homeostası bu şekilde dengede kalmış olur (Quinn ve Gillespie, 2005).

### 2.4.7. Kemik doku mühendisliği

Cam kemik hastalığı, osteomiyelit, osteoartirit ve osteoporoz gibi kemik hastalıkları, travma, enfeksiyon ve kanser gibi sebeplere bağlı oluşan kemik hasarlarının tamiri için farklı tedavi yöntemleri vardır. Temel olarak kemik defektlerinde, özellikle kritik boyuttaki defekt üzerinde iyileşmeyi sağlamak için oluşan boşlukların implant ile doldurulması gerekir.

Bu amaçla kemik rekonstrüktif ameliyat teknikleri çoğunlukla geleneksel, hücresiz-kalıcı malzemelerle yapılan tedavilerdir. Kemik defekti tedavisinde otograft implant altın standart olarak nitelendirilse de alınacak otograft implantın miktarı sınırlıdır ve donörde kronik ağrılar, fiziksel bozukluklar gibi çeşitli rahatsızlıklara sebep olmaktadır. Mevcut tedavi yöntemlerine alternatif olarak kemik dokunun tamirini ve sürekliliğini sağlamak, fonksiyonunu geliştirmek üzere biyolojik substütientleri mühendislik ve canlı bilimi esasları ile birleştiren interdisipliner bir alan, kemik doku mühendisliği yaklaşımı ortaya çıkar (Boccaccio, 2011). Kemik doku mühendisliğinde kullanılmak amacıyla geliştirilen biyomimetik iskelelerin, hücre tutunması, farklılaşması ve çoğalması gibi biyolojik süreçleri yeni doku oluşumu gerçekleşine kadar uygun mikroçevreyi sağlamaları ve desteklemeleri gerekir. Üretilen malzemelerin biyouyumluluk ve biyoyıkım süreçlerinin, mekanik dayanım özelliklerinin ve molekül taşıma kapasitesinin de kullanım amaçlarına uygun olarak değerlendirilmesi gerekir.

### 2.4.8. Osteosarkoma (kemik tümörü)

Osteosarkom en sık görülen primer malign kemik tümörüdür. Daha çok çocuklarda ve genç erişkinlerde görülür. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl bildirilen yaklaşık 900 yeni osteosarkom vakası vardır (Zhang ve ark., 2014).

Osteoblast, osteoklast ve mezenkimal prekürsör aktiviteleri arasındaki dengenin değişmesiyle meydana gelerek, sıklıkla uzun kemiklerde (distal femur, proksimal tibia ve humerus) gelişir. Yüksek malign derecesi, metastazı ve ölüm oranı nedeniyle klinik araştırmalarda sıcak nokta olarak kabul edilir. Son yıllardaki radyoterapi, kemoterapi, cerrahi müdahalelerle yapılan tedaviler osteosarkom hastalarının klinik sonuçlarını iyileştirmiştir. Bununla birlikte iki ana problemi; nüksü ve metastazı çözmek hala çok zordur. Osteosarkomlu hastalarda ölüm nedenlerinin yaklaşık % 80 - 90'ı metastaz, özellikle pulmoner metastazıdır. Metastaz tümör, tanı ve tedavide önemli bir sorundur. Beş yıllık genel sağkalım yaklaşık % 65'tir ve uzun süreli sağkalımın en iyi tahmincisi, tanıda metastatik hastalığın olmamasıdır, metastaz sonrası sağkalım ise bir yıldan azdır. Bu hastalar için yeni farmakolojik yaklaşımların araştırılması zorunludur (Abarrategi ve ark. 2016).

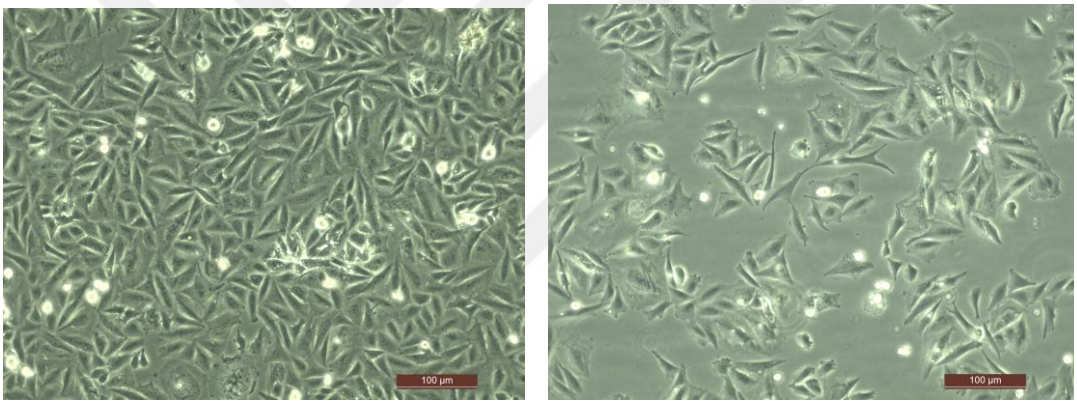
Osteosarkoma tedavilerinin ilerlemesinde ve direncinin altında yatan mekanizmaları araştırmak için iki boyutlu (2B) hücre kültür modelleri oluşturuldu ve kullanıldı. Hücre - hücre ve hücre - matris etkileşimlerinin, tümör morfogenezinde ve kanser ilerlemesinde kilit bir role sahip olduğu bulundu. Bununla birlikte, kanser hücrelerini ve tümör sürecini incelemek için 2B yaklaşımlarının kullanılması, tümör hücresi biyolojisini açıklayamadı, çünkü bunlar; gerçek tümör makro yapısını taklit edemediler ve tümörün karmaşıklığını (tümör - stroma etkileşimleri) ve heterojenliğini (tümör varyantları) yansıtamadılar. Stromal, immün ve endotel hücreleri olan hücreler ve hücre - hücre dışı matriks (ECM) etkileşimlerinin yanı sıra hücre yüzeyi reseptörleri ekspresyonu, büyüme faktörü sentezi, fiziksel ve kimyasal koşullar, in vitro 3B kültür sistemlerinde incelenebilecektir. 3B doku iskelelerinin tümör dokularının karakteristik yapısına uygunluğu yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır (Dong ve ark., 2016).

### 2.5. Saos-2 (Osteosarkoma) Hücre Hattı

Saos-2, birkaç osteoblastik özellik sergileyen bir insan osteosarkom hücre hattıdır. 1973 yılında *Fogh ve ark.* tarafından 11 yaşındaki bir Kafkas kızının primer osteosarkomasından türetilmiştir. Bu hücreler, 1,25-dihidroksivitamin D reseptörleri eksprese ve yüksek bazal alkalen fosfataz aktivitesine sahiptir. Paratiroid hormonu (PTH) reseptörünü eksprese ederler ve PTH ile tedaviye yanıt olarak siklik AMP üretirler. Bu hücreler, immün sistemi baskılanmış farelere deri altından enjekte

edildiğinde tümör oluşturmaz. Bununla birlikte, immün sistemi baskılanmış farelere intra-peritoneal olarak implante edilen difüzyon odalarına enjekte edildiğinde, Saos-2 hücreleri, osteoblastik hücrelerin tanımlayıcı bir özelliği olan mineralize bir matris üretir. Bu hücreler kemik belirteçlerini yüksek seviyelerde göstermeleri nedeniyle insan osteoblastlarına çok benzemektedir. Bu hücreler osteoblastik fenotip gösterir, uzun süre yaşatılabilir ve in vitro olarak kemik oluşturabilirler.Tüm bu özelliklerinden dolayı Saos-2 hücre hattı, yeni tedavileri test etmek için bir model olarak kemik kanseri araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Mulkins MA, ve ark., 1983).

Saos-2 hücreleri % 10 (v/v) fetal sığır serumu (fetal bovine serum, FBS) ile desteklenmiş DMEM (Dulbecco's Modification of Eagles Medium) kültür ortamına % 1 penisilin / streptomisin eklenrek, % 5 $CO_2$ atmosfere sahip ve 37 °C'deki intübatörlerde büyütülmektedir.

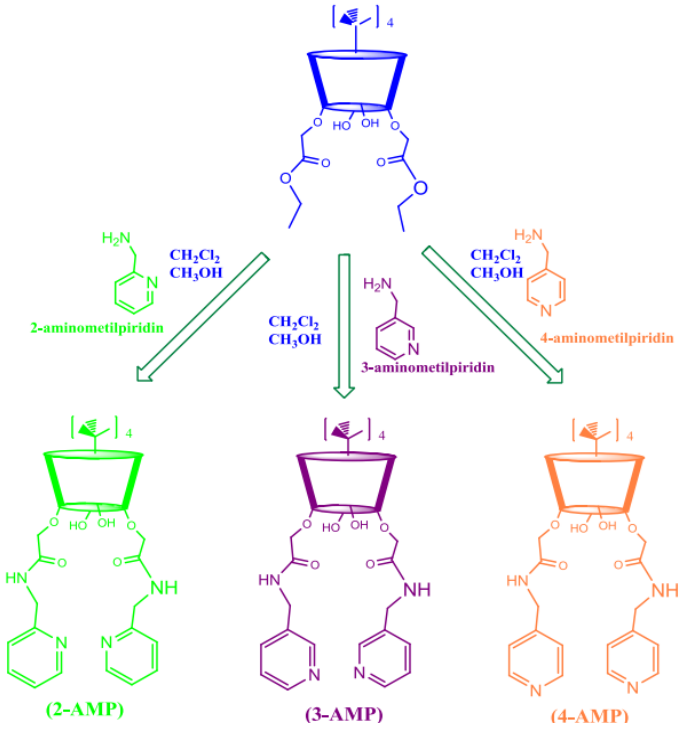



**Şekil 2.7.** İnverted mikroskopta 10X objektifte görüntülenen Saos-2 hücre hattı

# 3. MATERYAL VE YÖNTEM

## 3.1. Kimyasal Numune Analizleri

### 3.1.1. Sıvı çözeltide 2-Aminometilpridin, 3-Aminometilpridin, 4-Aminometilpridin p-tert-bütilkaliks[4]arenin Diamit türevleri sentezi ve analizi



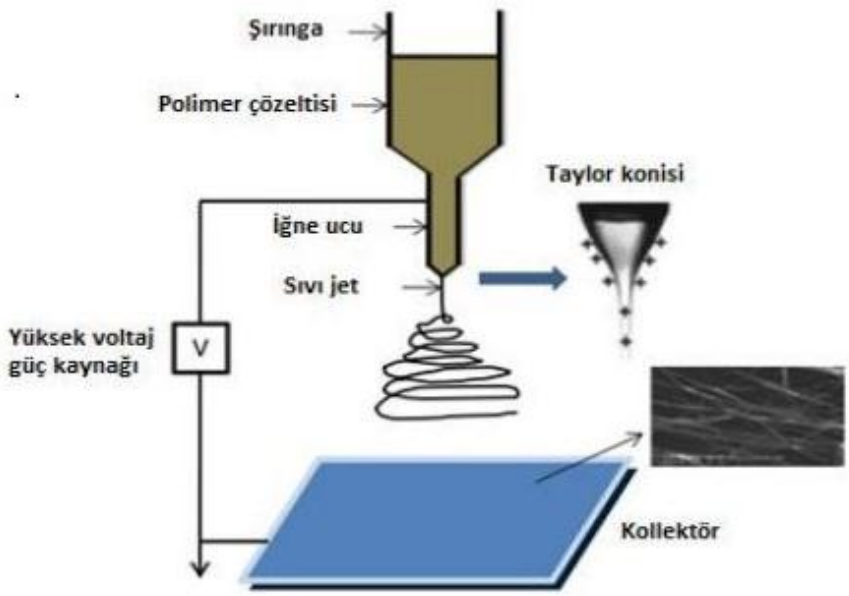

**Şekil. 3.1.** 2-Aminometilpridin, 3-Aminometilpridin, 4-Aminometilpridin p-tert-bütilkaliks[4]arenin Diamit Türevleri

Şekil.3.1'de mekanizması verilen maddeler Ek-1'de gösterildiği gibi senteztezlenip, deneysel çalışmalar için hazırlandı.

Sentezlenen supramolekül bileşiklerinin yapısal analizi spektroskopik teknikler (FTIR, $^{1}$H-NMR, 13C-NMR, MS) ve element analizi, TGA, DSC, SEM ve TEM gibi karakterizasyon teknikleri kullanılarak yapıldı.

### 3.1.2. Elektrospin Tekniği İle Nanolif Üretimi

Elektrospin teknolojisi sol-jel yöntemi ile birleştirildiğinde, polimer veya seramik çözeltiden belirli bir elektrik alan altında nanolif üretimi sağlamaktadır (Li, 2006). Elektrospin, katı ve boşluklu iç yapılı, homojen çapta, uzun boylarda ve çeşitli komposizyonlarda nanolif üretimi sağlayan bir yöntemdir. Bu proses üç temel bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler yüksek voltaj güç sağlayıcısı, metalik iğne (spinneret) ve toplayıcıdır. Metalik iğne, içerisinde polimer solüsyonu veya eriği bulunan bir şırınga ile birleşiktir. Şırınga pompasının kullanımı ile solüsyon iğneye doğru sabit ve kontrol edilebilir bir hızda iletilir. Yüksek voltaj uygulandığı zaman (5 ile 50 kV arası) iğne ağzında asılı duran polimer damlacığı elektriklenir ve indüklenmiş olan yük yüzeye eşit olarak dağıtılır. Elektrostatik etkileşimlerin altında, sıvı damla Taylor koniği olarak bilinen bir konik nesne içine doğru şekil değişimine uğrar. Bu elektriklenmiş jetin uzaması ipliksi yapı oluşturur. Sıvı jetin devamlı uzamasıyla ve çözücünün buharlaşmasıyla beraber çapı 10 - 200 nm aralığında nanolifler üretilip, 3B iskeleler için ito adı verilen indiyum kalay oksit bu liflerle kaplanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.




**Şekil. 3.2.** Elektrospin Cihazı Şematik Görüntüsü

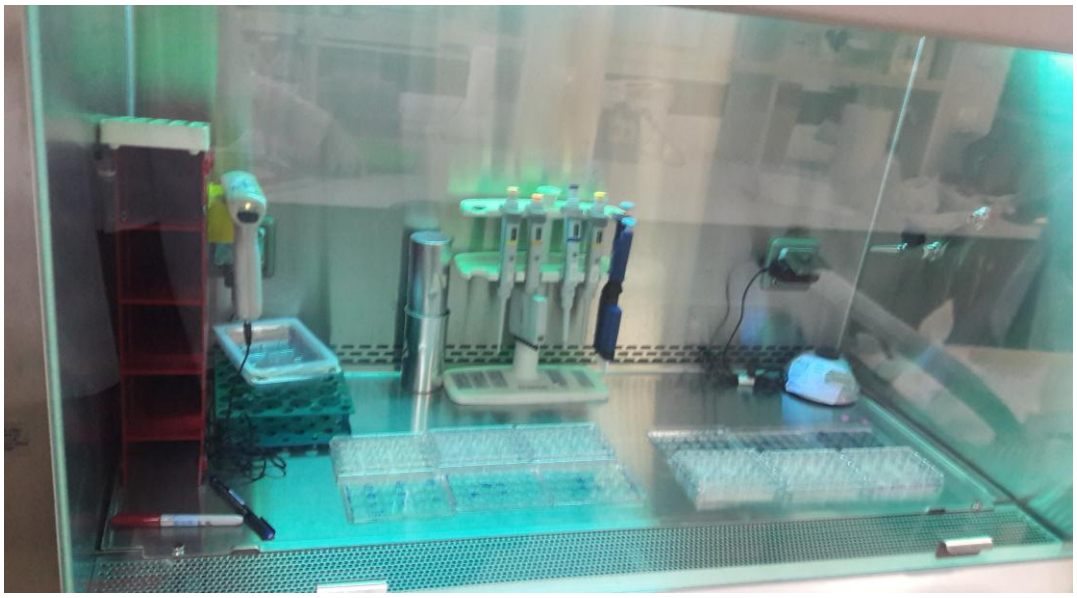
Nanolifler, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde, Prof. Dr. Şeref Ertul'un laboratuvarında Öğr. Gör. Dr. Fatih Özcan tarafından hazırlanmıştır.



**Şekil 3.3.** İto üzerine kaplanan nanolifler

### 3.1.3. Nanolif sterilizasyonu

Deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere kaliksaren nanolifler 24 kuyu kültür plakalarına yerleştirilerek, 2 saat UV ışınlarına maruz bırakıldı. Sterilizasyonu tamamlanan nanolifler Hanks tuz solüsyonu ile yıkanarak hücre ekimi için hazır hale getirildi.



**Şekil. 3.4.** Plakalara yerleştirilen nanoliflerin UV ile sterilizasyonu

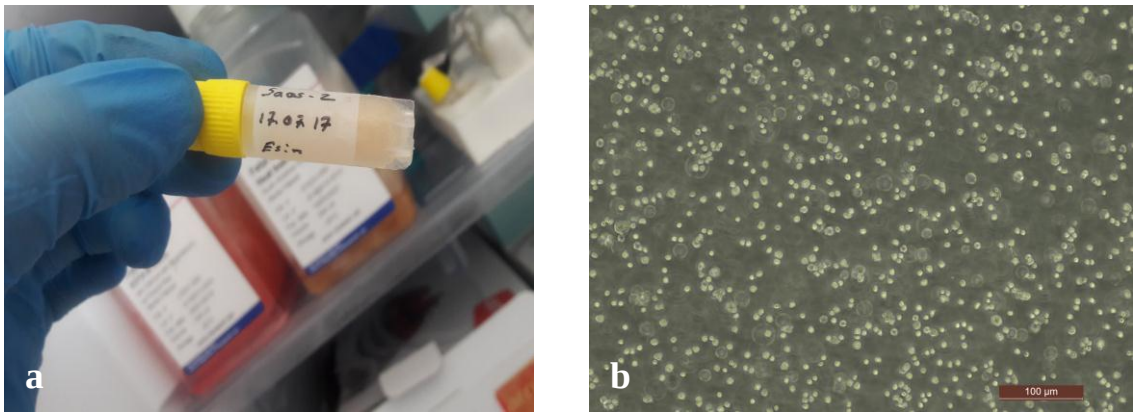
## 3.2. Biyolojik Numune Analizleri

### 3.2.1. Saos-2 (osteosarkoma) hücre hattı

Saos-2 (ATCC® HTB-85™) osteoblastik özellik sergileyen bir insan osteosarkom hücre hattıdır. 1973 yılında *Fogh ve ark.* tarafından 11 yaşındaki bir Kafkas kızın primer osteosarkomasından türetilmiştir. Bu hücreler, 1,25-dihidroksivitamin D reseptörleri eksprese ve yüksek bazal alkalen fosfataz aktivitesine sahiptir. Yüzeye tutunarak, tabakalaşmadan tek katman halinde büyüyen bir hücre hattıdır.

### 3.2.2. Hücre çözme (thawing) işlemi

< -180 $^{o}$C sıvı azot tanklarında muhafaza edilen Saos-2 hücre hattı, oda ısısında çözdürülerek, içerisinde % 15 (v/v) fetal bovine serumu (fetal dana serumu, FBS, Bichorom-Merck, Almanya; S-0115) ve antibakteriyal penicilin (5 mg/ml) bulunan Dulbecco-MEM **(**Sigma D6429, composed of 4,500 mg/l glucose, sodium pyruvate, and sodium bicarbonate**)** besiyeri ile seyreltilip, T-25 hücre kültür kaplarında inkübasyona bırakıldı. İnvert mikroskopta, yeterli büyümeyi sağladığı gözlemlenen Saos-2 hücresi yüzey alanını genişletmek için T-75 kültür kabına aktarıldı. Hücre pasajlama protokolü ile yapılan bu çoğaltma işlemine, planlanan deney çalışmaları için gerekli miktarda hücre sayısına ulaşana kadar devam edildi.

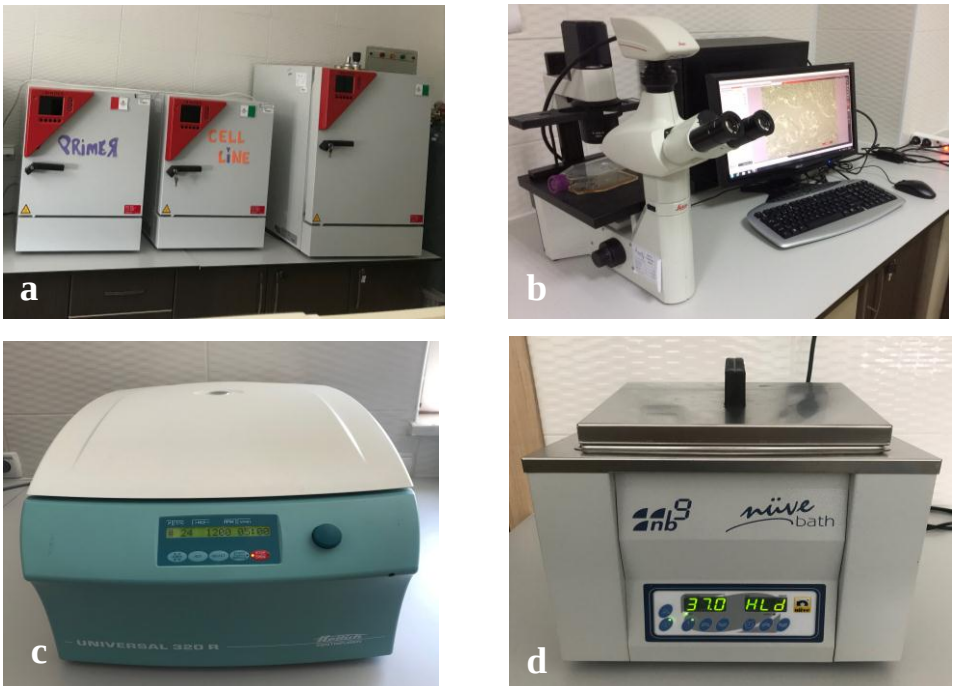



**Şekil 3.5.** (a) Sıvı azottan çıkarılan kriyotüp, (b) Çözdürülüp T-25 kültür kanına aktarılan Saos-2 hücre hattının İnvert mikroskop görünütüsü

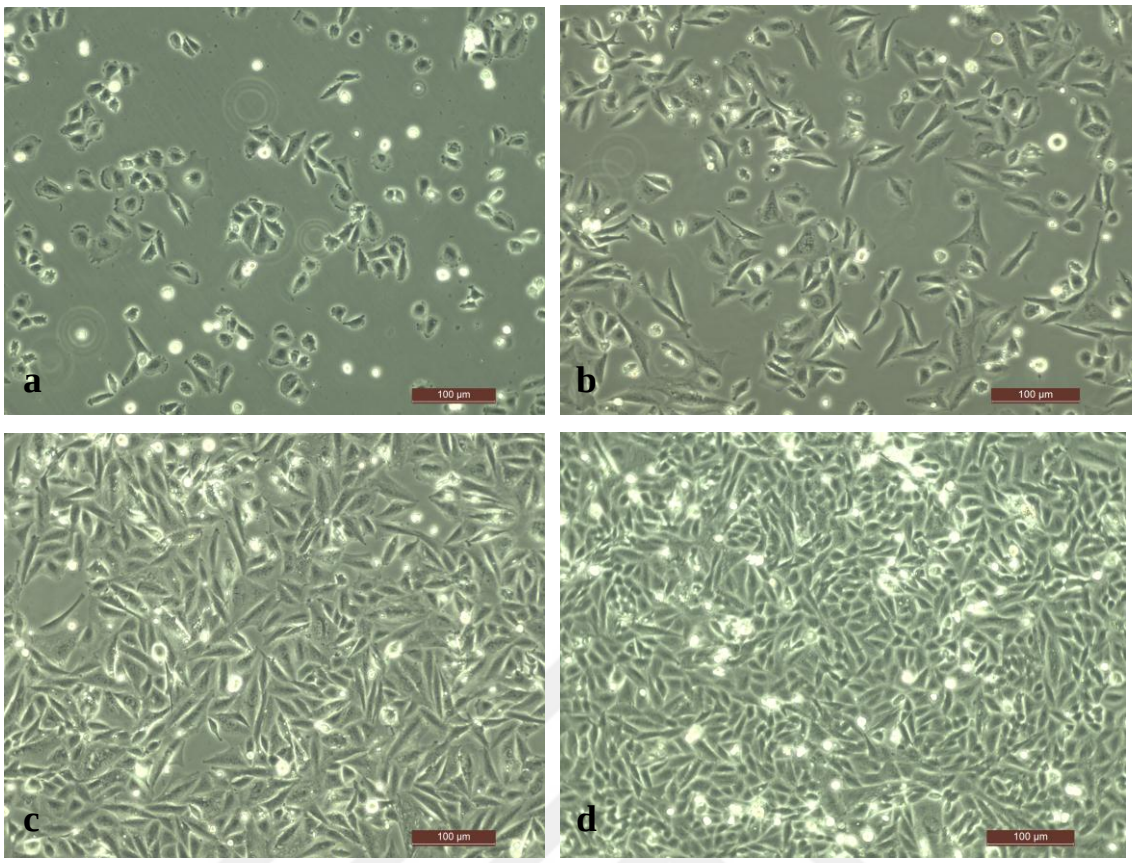
### 3.2.3. Hücre kültürü ve pasajı (alt kültürleme)

Saos-2 hücre hattının kültür ortamı için % 15 (v/v) fetal bovine serumu (fetal dana serumu, FBS), Dulbecco-MEM besiyeri kullanıldı. Dulbecco-MEM besiyerine, bakteri enfeksiyonuna karşı önlem almak için penicilin (5 mg/ml) eklendi. Daha sonra hücre kültür kabı 37 °C'de, % 5 $CO_2$'li inkübatöre yeleştirildi.

Kültür kabı yüzeyinin yaklaşık % 70'ini dolduran hücreler tampon çözeltisi (Hanks tuz solüsyon Biochrom-Merck, Almanya; L-2045) ile yüzeyi kaplayacak şekilde gerekli tekrarlarla yıkandıktan sonra hücreleri yüzeyden kaldırmak için yüzeye tutunmalarını sağlayan proteinleri (integrin gibi) yıkıma uğratan tripsin-EDTA (Biochrom-Merck, Almanya; L-2143) çözeltisi ile muamele edildi. Tripsin enzimi 37 ºC'de aktif olduğundan, hücreler yüzeyden kalkana kadar kültür kabı 37 °C, % 95 nem ve % 5 $CO_2$ içeren inkübatörde bekletildi. Bekleme sonrası tripsin enzimi hücre içinde de yıkıma sebep olmaması için komleks besiyeri eklendi. Yüzeyden kalkan hücrelerin bir kısmı dondurulup veya atık olarak ayrılırken, geriye kalan kısmı santrifüj tüpüne aktarılıp 1200 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatantı atılan hücre pelletine büyüme besiyeri eklenip homojen olarak seyreltildi. T-75 kültür kabına alınan hücreler invert mikroskopta incelenip fotoğraflandırıldıktan sonra % 5 $CO_2$, % 95 nem içeren 37 °C inkübatöre büyümeye bırakıldı (Uyar, 2014).




**Şekil 3.6.** Saos-2 hücre hattı kültüründe kullanılan cihazlar; (a) inkübatörler, (b) invert mikroskop, (c) santrifüj ve (d) su banyosu

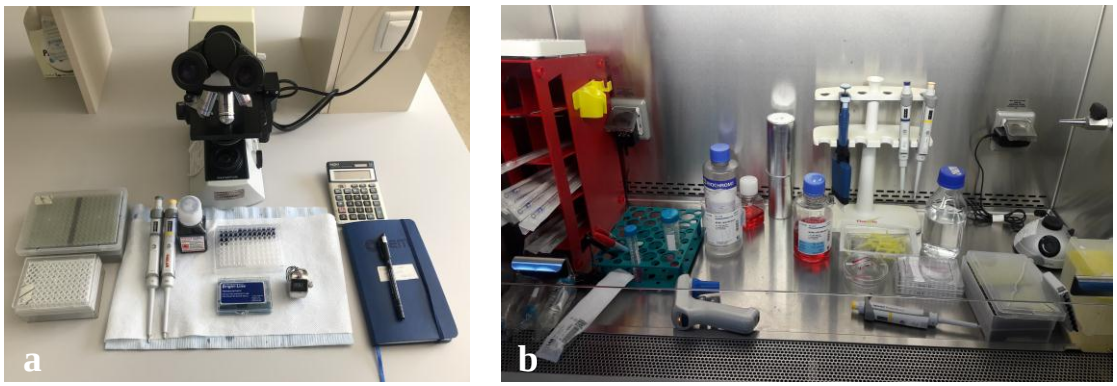



**Şekil 3.7.** Saos-2 hücrelerinin plakaya aktarıldıktan sonra yüzeye tutunma ve çoğalma süreçlerinin, invert mikroskopta 10X objektifle görüntülenmesi; (a) 10 saat sonra, (b) 24 saat sonra, (c,d) 48 saat sonra

### 3.2.4. Hücrelerin sayımı ve ekimi

Standart trifan mavisi tekniğini kullanılarak yapılan hemasitometre; her biri 1 x 1 mm olan 9 kareye bölünmüş iki bölmesi olan, örgülü-cam lamların kullanıldığı bir metottur. Hücre süspansiyonu kapiler hareketlerle bölmeye doğru ilerler. Hücreler her 1 x 1 mm kare için 0.1 µL olacak şekilde uzanır ve manuel olarak sayılır. Her kare için hesaplanan hücre sayısı ve seyreltme faktörü mililitredeki orijinal hücre konsantrasyonunu (hücre sayısı / ml) hesaplamak için kullanılır. Hemasitometre 1 x 1 mm boyutunda 9 kare içeren 2 bölme içerir, ml' deki hücre konsantrasyonu ise ortalama her bir kare x $10^4$ 'tür. Eğer herhangi bir seyreltme varsa hücre konsantrasyonu hesaplanırken formüle ilave edilmelidir.

(Hücre/ml) = Hemasitometre'deki hücre sayısı /2)x dilüsyon faktörü x $10^4$ (3.1)




**Şekil 3.8.** (a) hücre sayımında kullanılan malzemeler, (b) hücrelerin sayım ve ekimi için hazırlanması

Işık mikroskobu ile yapılan sayım işleminde, ölü hücreler membran bütünlüğü bozulduğu için mavi renkte görüntülenir. Canlı hücreler parlak ve saydamdır. Bu sayede hücre sayımı kolaylıkla gerçekleştirilir.

Hücrelerin ekim işlemi için yeterli yoğunluğa ulaşıp ulaşmadığı invert mikroskopta kontrol edildi. Kültür kabı yüzeyini kaplayan hücrelerin besiyeri çekilerek tampon çözeltisi ile yıkandı. Yüzeyi kaplayacak miktarda tripsin-EDTA çözeltisi eklenip % 5 $CO_2$ içeren 37 °C inkübatörde hücreler yüzeyden kalkana kadar bekletildi. Tripsin enzimini inaktif hale getirmek için büyüme besiyeri eklendi. Hazırlanan süspansiyon santrifüj tüpüne aktarılarak 1200 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Atık süpernatantı uzaklaştırılan pellet büyüme besiyeri ile seyreltilerek homojen bir dağılım sağlandı.

Mililitredeki yoğunluğu 96 kuyu plaka için $10x10^4$ ve 24 kuyu plaka için $15x10^4$ olacak şekilde sayım işlemi tamamlanan Saos-2 hücrelerinin plakalara ekimi yapılarak (% 5 $CO_2$, % 95 nem içeren 37 °C) inkübatörde 24 ve 48 saat büyümeye bırakıldı.

Tüm deneysel çalışmalarda (xtt konfokal analizi ve sem) hücre sayım ve ekim işlemi yukarıda bahsedildiği gibi yapıldı.

### 3.2.5. Hücre dondurma (freezing) tekniği

Dondurulacak olan Saos-2 hücreleri pasajlanıp, santrifüjden gelen hücre süpernatantı uzaklaştırlırken pellete 1.0 ml dondurma çözeltisi (% 10 DMSO, % 90 Fetal Sığır Serumu) eklenip kriyotüpe aktarıldı. Kriyotüp dondurulmak üzere içerisinde izopropil-alkol bulunan Mr. Frosty adı ile bilinen kriyotüp dondurma konteynırına yerleştirilerek -80 $^{o}$C'ye yerleştirildi. Bir gün sonra Mr. Frosty'den çıkarılan kriyotüp < -180 $^{o}$C sıvı azot tankına uzun süreli olarak stoklandı.



**Şekil 3.9.** < -180 $^{o}$C sıvı azot tankı ve azot üretim cihazı

### 3.2.6. XTT (hücre canlılık ) testi

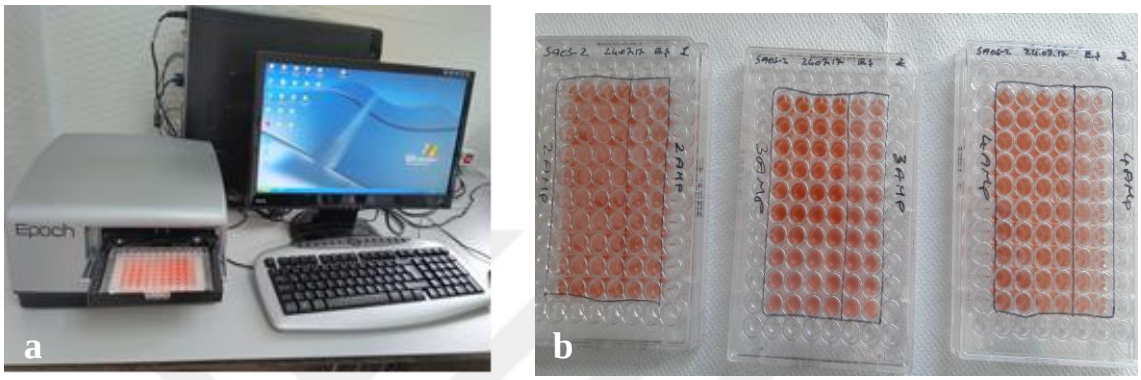
Sitotoksisite testleri, ilaç olması muhtemel ya da toksik etkisi bilinmeyen bir maddenin davranışı hakkında temel bilgiler verir ve daha sonra yapılacak hayvan denemeleri veya klinik denemelere kaynak oluşturur. Bu nedenle, ilgili çalışmalardan elde edilecek verilerin doğruluğu ve güvenilirliği önemlidir (Tokur ve ark., 2017).

Araştırmadaki sitotoksisite testlerinde XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) solüsyonu kullanıldı. 24 kuyu kültür kabına yerleştirilen kaliksaren nanolifler üzerine ekim yapılıp sitotoksisite ölçüm öncesi 48 saat (% 5 $CO_2$, % 95 nem içeren 37 °C) inkübatörde bekletidi.

96 kuyu kültür kaplarına ise hücre inkübasyonundan 24 saat sonra, nanolif eldesinde kullanılan 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin kimysal toz, ham halleri büyüme

besiyeri ile tamamen çözdürülüp konsantrasyon 500 µM'dan 1 µM'a kadar seri dilüsyon ile eklendi.

Hücre ekimi yapılmış ve inkübasyon süresi dolmuş olan 96 – 24 kuyu kültür plakalarına XTT solüsyonu eklenip (% 5 $CO_2$, % 95 nem içeren 37 °C) inkübatörde 4-5 saat bekletildi. Hücre canlılığını görmek için ELISA (Epoch Biotek) okuyucuda 460 ve 650 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.



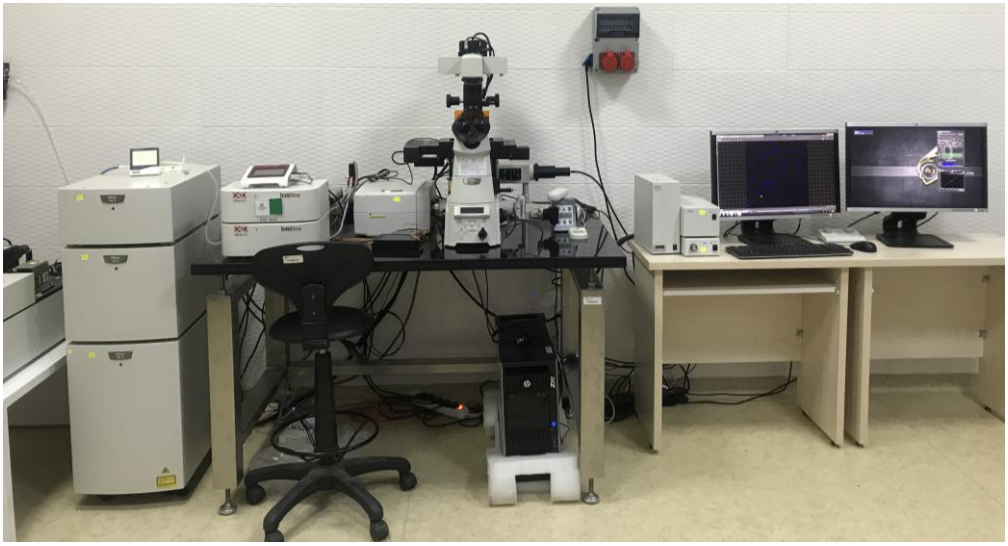

**Şekil 3.10.** (a) Elisa okuyucu cihazı (b) XTT solüsyonunda 5 saat bekletilen hücre plakaları

### 3.2.7. Lazer taramalı konfokal mikroskop uygulaması

Hücrelerin morfolojilerini incelemek için daha net bir görüntüleme sağlayan lazer taramalı konfokal mikroskop ile dokuya uygun floresan boyalarla analiz yapıldı.

Önceki deneysel çalışmalarda belirtilen şekilde hücre ekimi yapılan 24 kuyu kültürlerine yeterli inkübasyondan sonra PBS (Phosphate Buffered Saline) tamponuyla tekrarlı olarak muamele edildi. Tampon uzaklaştırılarak hücre yapısını kararlı hale getirmek için % 4 paraformaldehit eklendi, oda ısısında bekletildikten sonra tekrar PBS ile muamele edildi. Dezenfektan amaçlı % 0.5 Triton X-100 solüsyonu eklendi sonrasında PBS ile yıkandı. Stoplazma görüntüsü için boya olarak kültür plakalarına Phalloidin ilave edildip gerekli süre içerisinde PBS ile uzaklaştırıldı. Son olarak çekirdek görüntüsü için Dapi boyası kullanılarak aynı şekilde PBS ile uzaklaştırıldı.

Analiz için hazır olan hücre plakaları Nikon A1R-A1 lazer taramalı konfokal mikroskopta 488 ve 635 nm dalga boyunda görüntülendi.

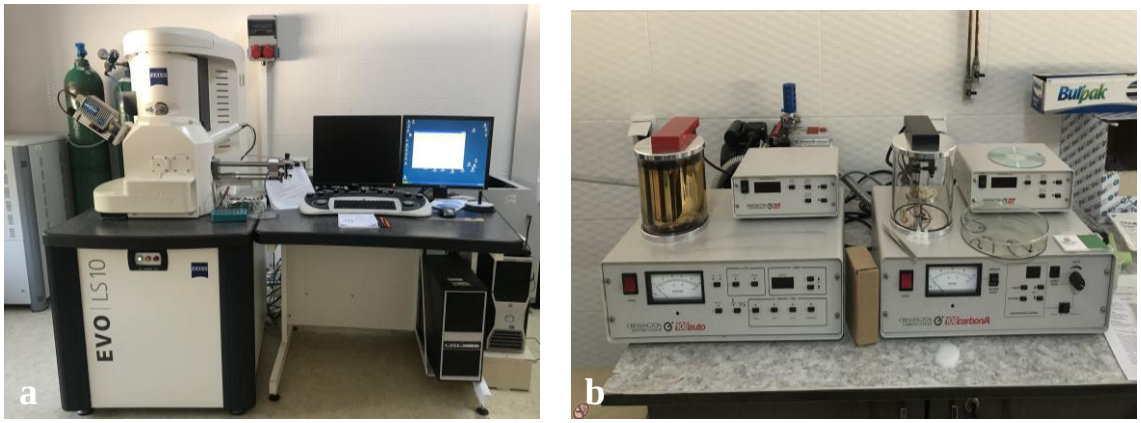


**Şekil 3.11.** Lazer taramalı konfokal mikroskop

### 3.2.8. SEM (taramalı elektron mikroskobu) uygulaması

Kaplama yüzeylerinin karakterizasyonunda kullanılan SEM yüksek enerjili elektronlarla yüzeyin taranması prensibiyle çalışır.

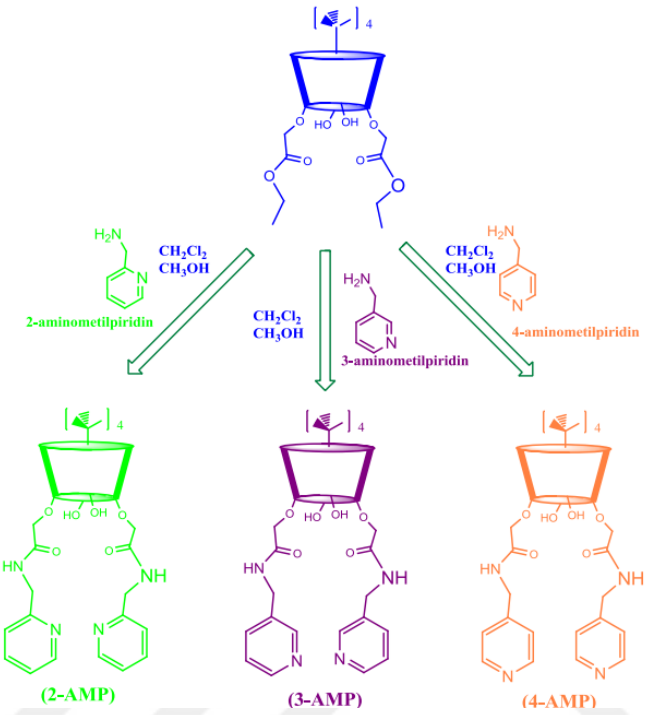
Nanolif yerleştirilmiş 24 kuyu palakalara ekimi yapılan hücreler gerekli inkübasyondan sonra 0.1 M Na kakodilat (pH: 7,3–7,4) tampon çözeltisiyle tekrarlı olarak yıkandı. Plakalara 0.1 M'lık Na kakodilat tamponu ile seyreltilen % 2.5 seyreltik glutaraldehit solüsyonu eklenip karanlık bir ortamda oda ısısında bekletildi. % 2.5 seyreltik glutaraldehit solüsyon uzaklaştırılarak 0.1 M Na kakodilat ile muamele edildi. Na kakodilat tampon çözeltisi aspiratörle ortamdan çekilerek numuneler ilk önce dondurulup sonrasında liyofilizasyon (kurutma) işlemi yapıldı. 5 nm AuPd ile kaplanan numuneler SEM'nda (Evo LS10, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) görüntülendi.




**Şekil 3.12.** (a) SEM ( taramalı elektron mikroskobu), (b) AuPd kaplama cihazı

# 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

## 4.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'nin Yapı, Karekterizasyon ve Sentez Sonuçları



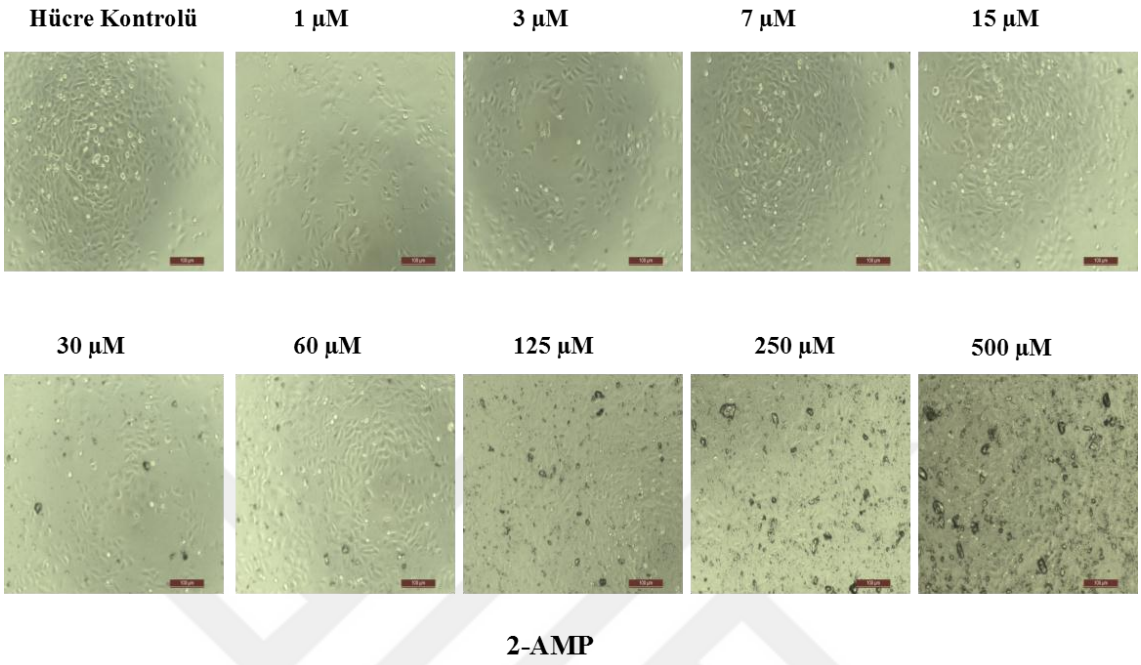

**Şekil.4.1** 2-Aminometilpridin, 3-Aminometilpridin, 4-Aminometilpridin p-tert-bütilkaliks[4]arenin Diamit Türevleri

Şekil.4.1'de $CH_2Cl_2$ : $CH_3OH$(45 ml/45 ml) içerisinde çözünmüş olan 2.13 g (2,5 mmol) Diester bileşiğine $CH_2Cl_2$ : $CH_3OH$(45 ml/45 ml) 15 mmol (1.62 g) ilave edilerek oda ısısında 72 saat manyatik karıştırıcıda reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon takibi ITK'den yapılarak maddelerden ürün eldesi izlendi. Son olarak bileşikler saflaştırılıp çalışmalarımız için hazır hale getirildi.

## 4.2. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin İnvert Mikroskopta Saos-2 ile Etkileşimlerinin İncelenmesi

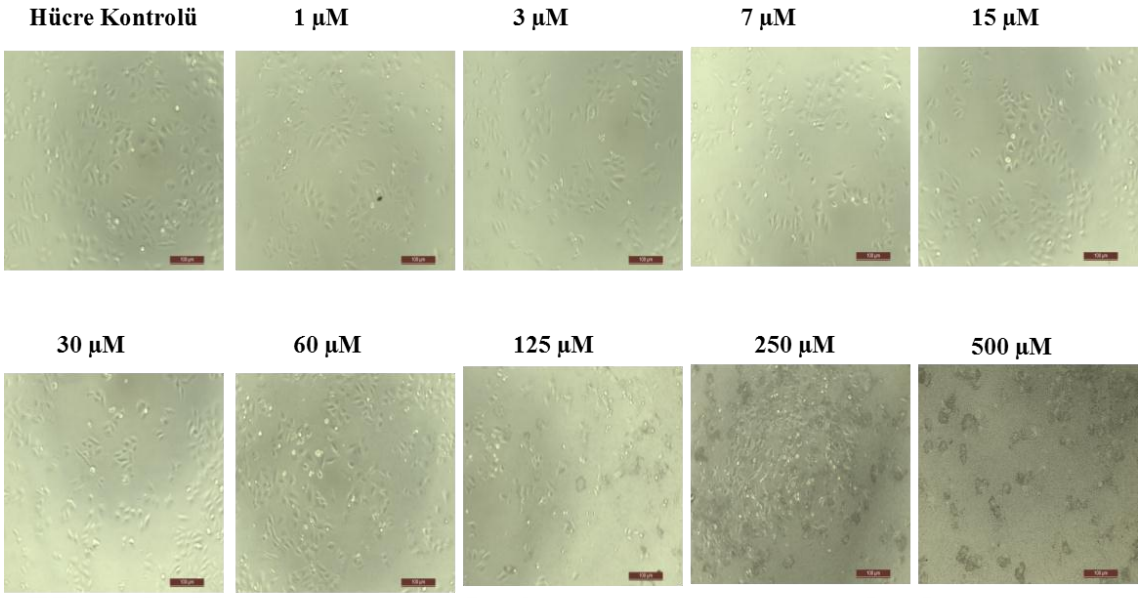
96 kuyu plakalara $10*10^4$ / ml olarak ekimi yapılan Saos-2 hücrelerine 24 saat sonra kimyasal toz numuneden büyüme besiyeriyle hazırlanan 2-AMP seri dilüsyon ile 1-500 µM eklenip bir gün süreyle inkübatöre bırakıldı. İnvert mikroskopla yapılan gözlemler sonucunda 2-AMP'nin Saos-2 hücre hattında doza bağlı sitotoksik bir

etkisinin olmadığı görüldü bununla birlikte yüksek konsantrasyonlarda madde yoğunluğu arttığı için hücreler görüntülenemedi (Şekil 4.6).



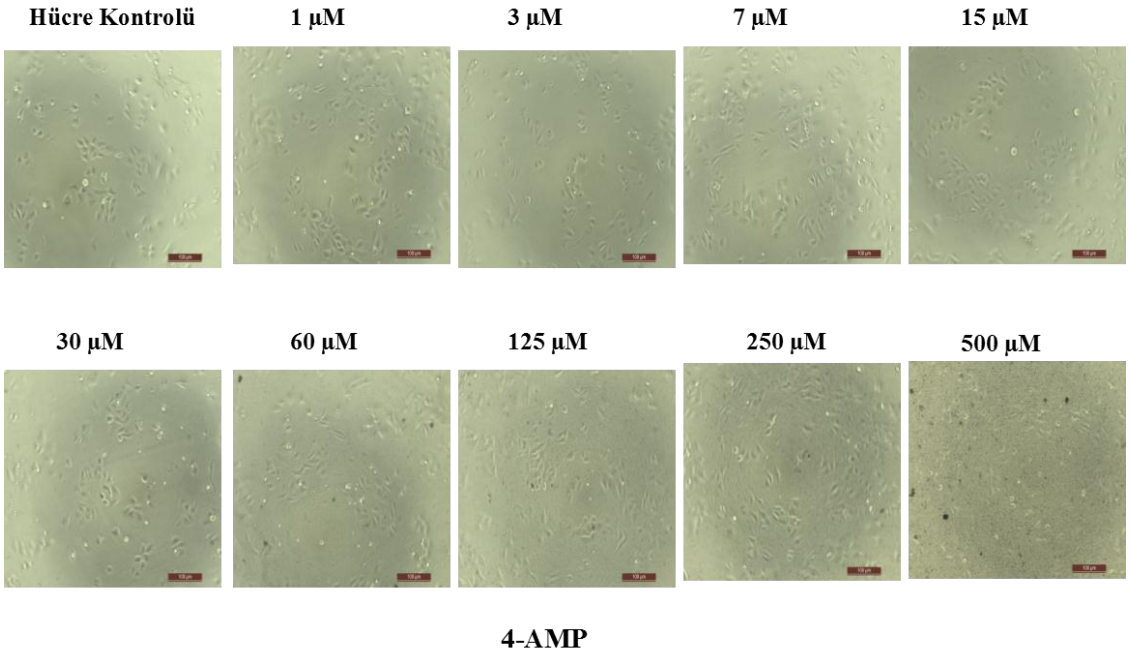

**Şekil 4.2.** 96 kuyu plakalara ekimi yapılmış olan Saos-2 hücrelerine 24 saat sonra 2-AMP'nin etkisinin 10x objektifteki invert mikroskop görüntüleri

96 kuyu plakalara $10*10^4$ / ml olarak ekimi yapılan Saos-2 hücrelerine 24 saat sonra kimyasal toz numuneden büyüme besiyeriyle hazırlanan 3-AMP seri dilüsyon ile 1-500 µM eklenip bir gün süreyle inkübatöre bırakıldı. İnvert mikroskopla yapılan gözlemler sonucunda 3-AMP'nin Saos-2 hücre hattında doza bağlı olarak sitotoksik etkisinin olduğu görüldü. Düşük dozlarda hücrelerin şişerek lizize uğradığı gözlemlendi, yüksek konsantrasyonlarda madde yoğunluğu arttığı için hücreler görüntülenemedi ancak maddenin sitotoksik etkisine dayanarak tamamen öldüğü tahmin edildi (Şekil 4.7).




**Şekil 4.3.** 96 kuyu plakalara ekimi yapılmış olan Saos-2 hücrelerine 24 saat sonra 3-AMP'nin etkisinin 10x objektifteki invert mikroskop görüntüleri

96 kuyu plakalara $10*10^4$ / ml olarak ekimi yapılan Saos-2 hücrelerine 24 saat sonra kimyasal toz numuneden büyüme besiyeriyle hazırlanan 4-AMP seri dilüsyon ile 1-500 µM eklenip bir gün süreyle inkübatöre bırakıldı. İnvert mikroskopla yapılan gözlemler sonucunda 4-AMP'nin Saos-2 hücre hattında doza bağlı sitotoksik etkisinin 2-AMP'den çok 3-AMP'den ise az olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8).



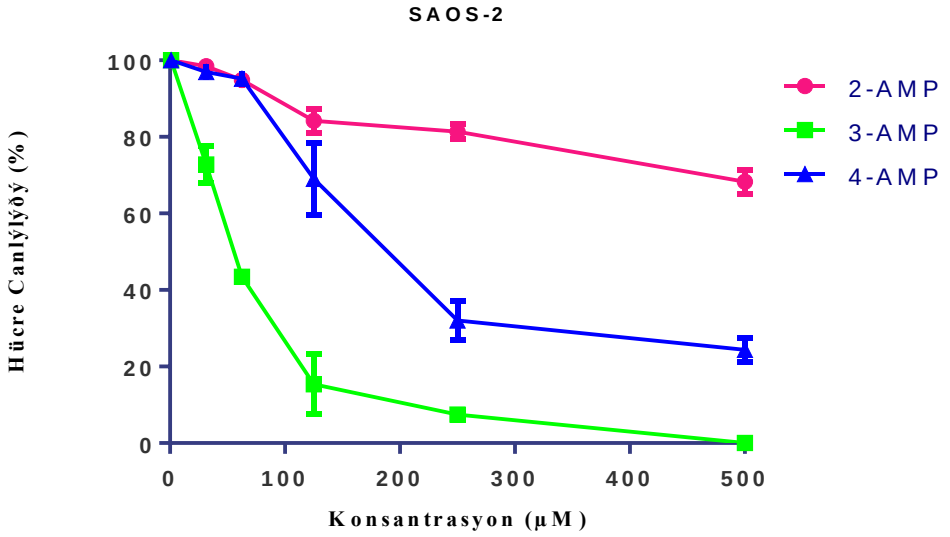

**Şekil 4.4.** 96 kuyu plakalara ekimi yapılmış olan Saos-2 hücrelerine 24 saat sonra 3-AMP'nin etkisinin 10x objektifteki inverted mikroskop görüntüleri

İnvert mikroskop görüntülerinden yola çıkarak 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin sitotoksik etki doz aralığını incelemek ve $IC_{50}$ değerlerini hesaplayabilmek için XTT testi yapıldı.

### 4.2.1. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin Saos-2 ile XTT (hücre canlılığı) analizlerinin değerlendirilmesi

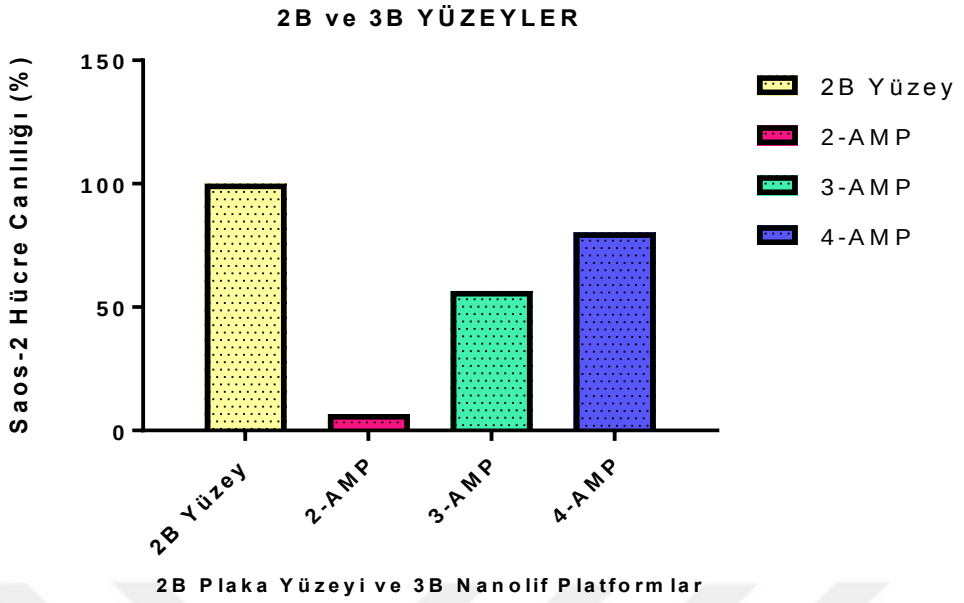
96 kuyu kültür plakalarına $10*10^4$ / ml, nanolif platformlar (2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP) yerleştirilmiş 24 kuyu plakalara ise $15*10^4$ olarak ekimi yapılan Saos-2 hücreleri bir gece inkübatörde bekletildi. Kaliksaren bileşiklerden elde ettiğimiz 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin toz numunelerinin sitotoksisite için hassas terazide ölçümleri yapılarak % 0.1 DMSO + büyüme besiyeri ile çözdürüldü. Partikül kalmaması ve homojen olması için ultrasonik homojenizatör olarakta bilinen sonikatör cihazı kullanıldı. Hücre ekiminden bir gün sonra 96 kuyu plakalara çözdürülmüş olan maddeler, en yüksek konsantrasyon 500 µM, en düşük konsantrasyon 1 µM olacak şekilde seri dilüsyon yaparak eklendi ve tekrar 24 saat inkübatörde bekletildi. İnkübasyon süresi tamamlanan 96 ve 24 kuyu plakalar invert mikroskopta incelenerek fotoğraflandırıldı. Plakalara aynı anda gerekli miktarda XTT solüsyonu eklenip, inkübatörde yaklaşık 5 saat bekletildi. Sitotoksisitesini incelediğimiz maddelerin etkisi, eklenen XTT solüsyonundaki tetrazolyum tuzunu formazana çeviren canlı Saos-2 hücrelerinin mitokondriyal aktivitesi ile oluşan turuncu renkle ve kaydettiğimiz fotoğraflarla ilişkilendirildi. Elisa cihazında 460 ve 650 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapılarak maddelerin Saos-2 hücre hattındaki $IC_{50}$ değerleri hesaplandı. Tekrarlı olarak yapılan XTT testleri ile çalışmalarımızda kullandığımız kaliksaren bileşiklerin ve nanoliflerin sitotoksik etkisi değerlendirildi.

Nanolif yüzeylerde sarımların yoğunluğundan dolayı invert mikroskopta hücre görüntüsü alınamadı. 3B kültür ortamımızdaki hücre proliferaayonunu incelemek için lazer taramalı konfokal mikroskop ve taramalı ekektron mikroskop (SEM) analizleri yapıldı.




**Şekil 4.5.** Saos-2 hücrelerinin 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP toz numuneleri ile 24 saat etkileşimi sonucunda elde edilen XTT sonuçları

Elde edilen XTT sonuçlarına göre Saos-2 hücrelerinde 3-AMP ve 4-AMP'nin düşük dozlarında hücre canlılığı belirgin derecede düşmekte fakat 2-amp'nin en yüksek dozunda bile canlılık % 50'nin altına düşmediği görülmektedir. Saos-2 hücrelerinde 3-AMP 54 µM dozda canlılığı % 50'nin altına düşürürken, 4-AMP'de ise bu doz 62 µM olmakta. 2-AMP en yüksek dozda bile canlılığı % 50'den aşağıya çekememekte. Türevlendirilmiş kaliksarenlerden 3-AMP ve 4-AMP'de doza bağlı toksik etki görülürken 2-AMP'de bu duruma rastlanılmadı.




**Şekil.4.6.** 3B nanolif platformlardaki Saos-2 hücrelerinin 24 saat sonraki XTT sonuçları

Fonksiyonlandırılmış kaliksaren türevlerinden sentezlenen 3B nanolif platformlardaki XTT sonuçlarını incelediğimizde 2-AMP sarımlı yüzeyin Saos-2 hücrelerinin büyümesine bile imkan vermediği, hücrelerin öldüğü görülmekte. 3-AMP sarımlı yüzeyde ise hücrelerin canlılığını koruduğu fakat istenilen % oranını vermediği gözlenmekte. Bununla birlikte 3-AMP'li ortamın Saos-2 hücreleri için optimal koşulları sağlamadığı ve hücrelerin çoğalamadığı tahmin edildi. Şekil 4.6'daki grafiğe göre 4-AMP sarımlı yüzeyin Saos-2 hücre hattı için uygun 3B ortamı sağladığı, hücrelerin çoğalmasına olanak verdiği görüldü.

Hedeflediğimiz 3B in vitro doku iskelesinin 4-AMP'li nanoliflerden elde edip edemeyeceğimize karar verebilmek için lazer taramalı konfokal mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobunda (SEM) incelemeler yapıldı.

### 4.3. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP Sarımlı Nanoliflerin Saos-2 Hücre Hattı ile Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop görüntülerinin değerlendirilmesi

24 kuyu plakalara yerleştirilmiş olan (2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP) nanolif platformlar üzerine $15*10^4$ olarak ekimi yapılan Saos-2 hücreleri 48 saat inkübatörde bekletildi. Hücrelerin protokoldeki yıkama, hücre çekirdeği ve stoplazması boyama

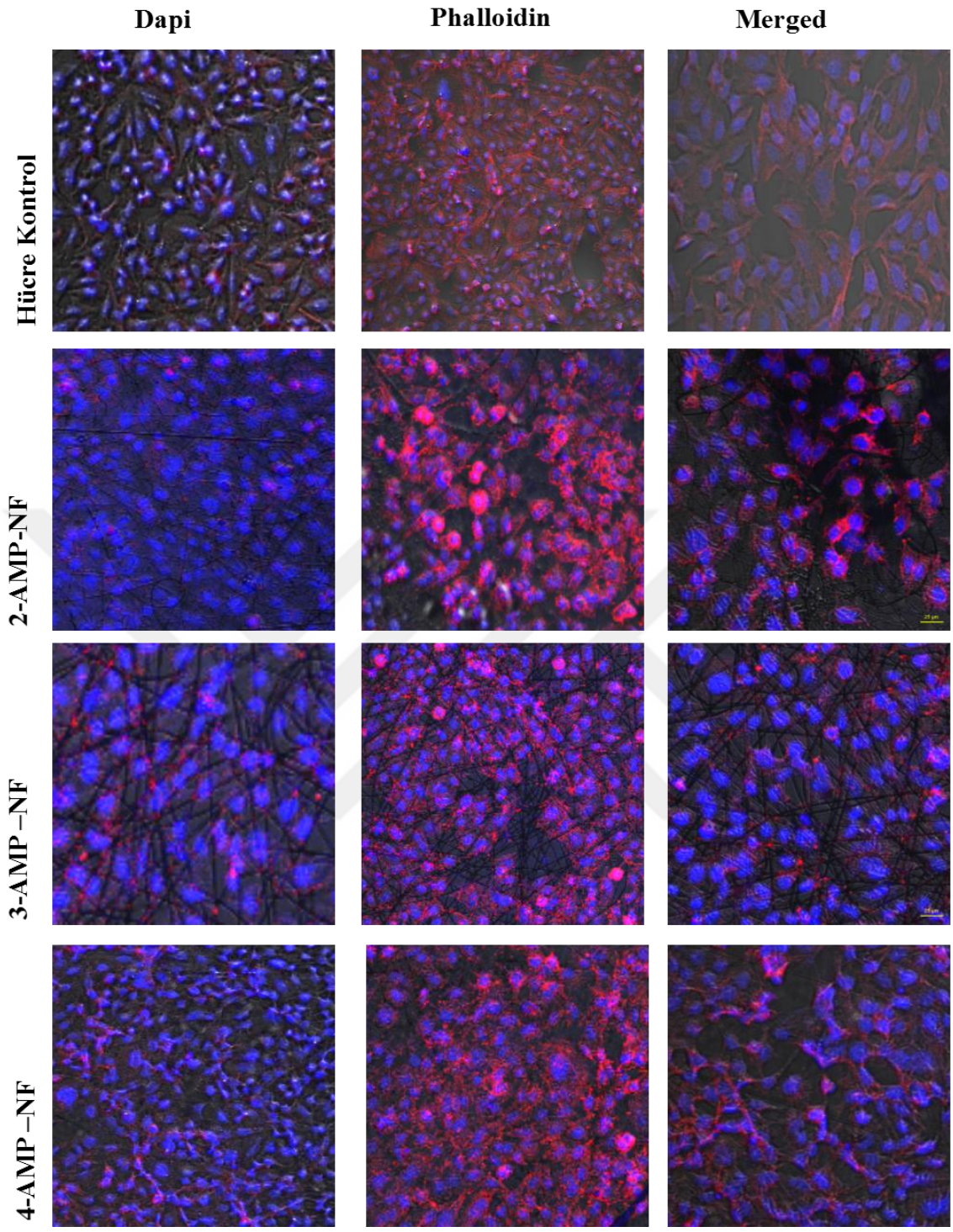
işlemleri tamamlanarak lazer taramalı konfokal mikroskopta 488 ve 635 nm dalga boyunda görüntülendi (Şekil 4.9).

2-AMP nanolif yüzeyinde Saos-2 hücrelerinin; tek tek büyüdüğü, hücreler arası sinyalin gerçekleşmediği görüldü. Hücrelerin 3B ortama uyum sağlayamadığı, yüzeyde kaldığı ve stoplazmalarının daha sıkışık elips şeklinde olduğu gözlemlendi.

3-AMP nanolif yüzeyinde Saos-2 hücrelerinin; bulunduğu noktalarda çoğalıp bölünebildiği, hücre iskelesinin 2-AMP'ye göre daha iyi korunduğu fakat hücrelerarası iletişim olmadığı görüldü.

4-AMP nanolif yüzeyinde ise Saos-2 hücrelerinin; özgün hücre iskelesini koruyup 2-AMP ve 3-AMP'ye göre daha büyük çekirdeklere sahip olduğu ve yayılarak çağaldığı görüldü. 4-AMP nanolif 3B ortamına uyum sağlayan Saos-2 hücrelerinin; fiberler arasına girdiği, hücrelerarası iletişimi sağladığı görüldü.

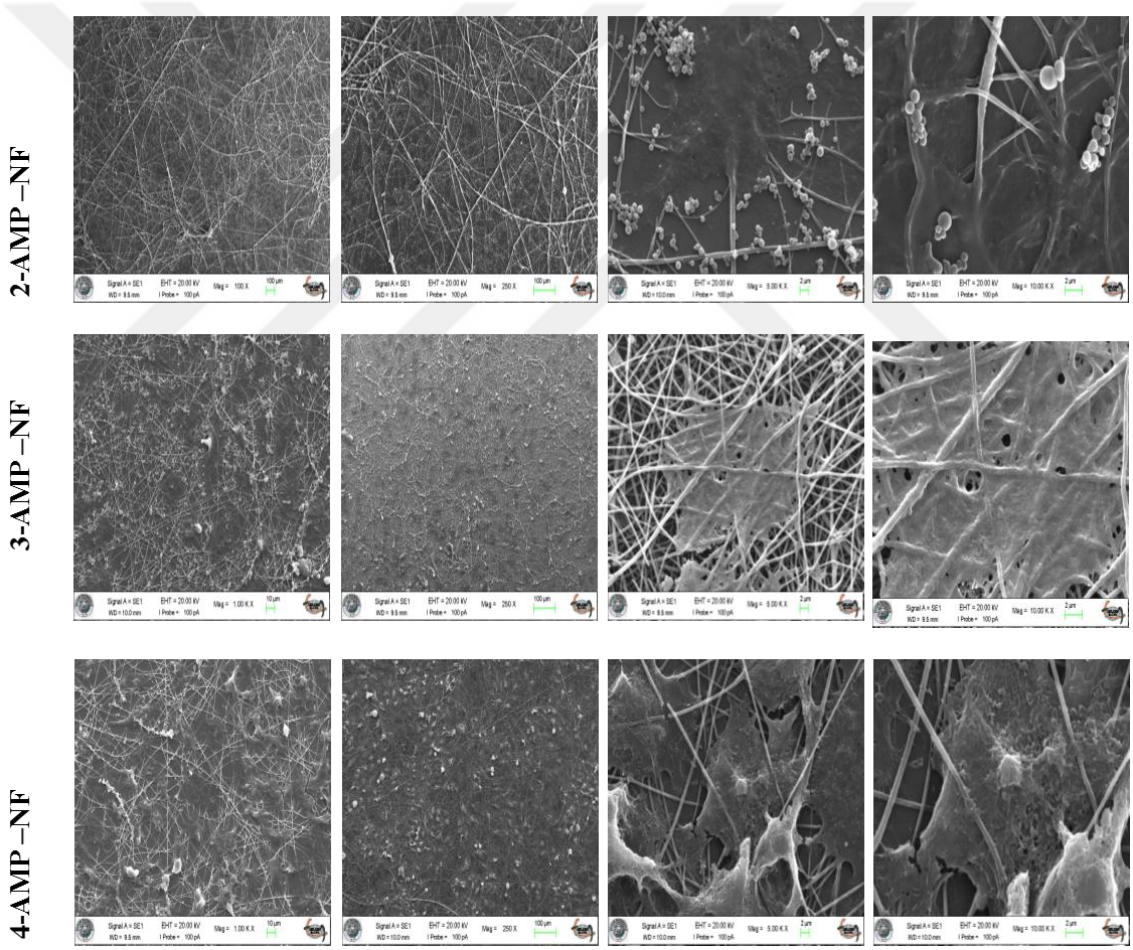
Bu verilere dayanarak Saos-2 hücrelerinin 4-AMP nanolif 3B ortamda dokulaşmaya gidebileceği öngörüldü.




**Şekil 4.5.** 15x10$^4$ Saos-2 hücrelerinin (2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP) nanolif platformlarda 48 saat sonraki Lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüleri.

### 4.4. 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP Sarımlı Nanoliflerin Saos-2 Hücre Hattı ile SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) görüntülerinin değerlendirilmesi

24 kuyu plakalara yerleştirilmiş olan (2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP) nanolif platformlar üzerine $15*10^4$ olarak ekimi yapılan Saos-2 hücreleri 48 saat inkübatörde bekletildi. Protokol işlemleri yerine getirilerek, nanolifler 5 nm AuPd ile kaplandı. Kullanılan malzemenin yüzey topografyasını incelemek ve malzeme-hücre etkileşimini gözlemlemek için daha yüksek çözünürlükte olan SEM' nda 3B olarak 100X, 250X, 500X ve 1000X büyütmeleriyle görüntülendi (Şekil 4.10).




**Şekil 4.6.** $15x10^4$ Saos-2 hücrelerinin (2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP) nanolif platformlarda 48 saat sonraki SEM (taramalı elektron mikroskop) görüntüleri.

SEM görüntülerinin de lazer taramalı konfokal mikroskop görüntülerini desteklediği gözlemlendi. Saos-2 hücrelerinin 2-AMP nanolif yüzeyinde kaldığı 3B ortama giremediği görüldü. Hücrelerin 3-AMP nanolif 3B ortamda hücrelerarası etkileşim kurmadan tekli küçük kümeler halinde bulunduğu görüldü. Saos-2 hücrelerinin 4-AMP nanolif 3B ortamda doku oluştururcasına uzayarak, fiber aralarını doldurup katmanlı olarak büyüyüp çoğaldığı gözlemlendi.

Hücre kültürü çalışmaları yapılırken, hangi hücre tipinin seçilmesi gerektiğiyle ilgili genel bir doğru cevap yoktur. Diploid hücreler laboratuvar çalışmaları için pek uygun bulunmayıp, devamlı hücre hatları tercih edilmiştir.

Carvalho ve arkadaşları, Ree ve arkadaşları, Zhang ve arkadaşları, primer insan osteoblastları ve insan osteoblast benzeri devamlı hücre hatları arasında çalışmaların sonuçları yönünden herhangi bir fark gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Saos-2 hücreleri insan osteosarkoma devamlı hücre hattıdır. Bu hücreler kemik belirteçlerini yüksek seviyelerde göstermeleri nedeniyle insan osteoblastlarına çok benzemektedir. Çalışmamızda ATCC'den temin edilen Saos-2 insan osteosarkoma hücre hattı kullanıldı. Hücre kültür ortamında mineralize olabilmesi ve osteoblastik belirteçler bakımından iyi karakterize edilebildiğinden tercih edilmiştir.

Literatürde doku iskeleleriyle ilgili benzer çalışmalar bulunmaktadır. Akay ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, rat osteoblastlarını farklı gözenek çapları olan doku iskelelerinde kültüre ederek kemik yapısının oluşumunu gözlemlemişlerdir. Hücreler hidroksiapatit eklenen ve eklenmeyen 40, 60 ve 100 μm gözenek çapına sahip doku iskelelerine ekilmiş ve çalışma sonucunda hidroksiapatit eklenmiş tüm gözenek boyutundaki doku iskelelerinde nodül oluşumu gerçekleştiği ancak 100 μm gözenek çapına sahip doku iskelesinde ise nodül oluşumunun en belirgin olduğunu belirtmişlerdir (Akay ve ark., 2004).

Elektrospin ile üretilmiş doku iskelelerinde fiber morfolojisi önemli bir parametredir. Fiberlerin çapları, gözeneklilik oranları, hidrofilisiteleri doku kültürü için önem taşımaktadır. Doğrusal ve paralel dizilmiş 0.5 - 2 μm çapındaki polimerler hücre düzenlenişini ve temasını yönlendirerek osteoblastik farklılaşmayı gösteren fenotipik belirteçleri arttırmaktadır. Düz yüzeylere göre yaklaşık 2 μm çapa sahip elektroeğirilmiş fiberler üzerinde hücre tutunmasının daha yoğun olduğu gösterilmiştir (Badami, 2006).

Benzer şekilde pre-osteoblastik hücre hatları kullanılarak yapılan elektrospinle üretilen doku iskeleleri kültürlerinde çapın nano ölçekten mikro ölçeğe geçtikçe hücre tutunması ve proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Luu ve ark., 2003).

Yapılan bir çalışmada 3B nanofibröz fibroin doku iskelesi üretilmiş ve kemik rejenerasyonundaki etkinliği araştırılmıştır. Hücre canlılığı testleri (MTT) 3B doku iskelesinin 2B doku iskelesine göre canlılığı arttığını göstermiştir (Ki ve ark., 2008).

Çalışmamaızda, SEM görüntülerinin analizi, nanoliflerin sahip olduğu boncuksuz yapı ve düzgün fiber morfolojisi kemik ekstraselüler matriksinin biyomimikrisi için ideal birer çalışma olduğunu göstermektedir. Üretilen kaliksaren türevli nanoliflerin kemik ECM'sini taklit edebilme ve uygun bir implant malzemesi olarak kullanılabilme kapasiteleri ALP testi ile belirlenebilir.

# 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

## 5.1 Sonuçlar

Yapılan tez çalışmasının; nanoteknoloji ve nanotıpta önemli yer tutan, başta kanser olmak üzere tedavisi oldukça zor ve hastaya yaşam kalitesi bakımından negatif etkisi bulunan hastalıkların teşhis ve tedavisinde, alternatif bir çözüm getirmesi hedeflenmiştir. Bu hedefe uygun olarak da yaşam kalitesini düşüren konvansiyonel kemik implant malzemeleri yerine elektrospin tekniği ile daha biyouyumlu ve biyobozunur organik kökenli implant malzemeleri üretmek, dolayısıyla hem kanser sonucu kemikte meydana gelebilecek hasarlı dokuyu onarmak hem de kanserli hücrelerin tekrar oluşmasını engellemek için bir hücre iskelesi oluşturulması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında; tüm dünyayı hızla etkisi altına alan kanser türevlerinden olan osteosarkomayı ve tedavi yöntemlerini incelendi. Bizim çalışmalarımızda kaliks[4]aren türevli bileşikleri ve bu bileşiklerden elde edilen 3B nanolifleri kullanıldı. Genellikle çocukluk döneminde ortaya çıkan ve sağ kalımın çok düşük olduğu primer malign kemik tümörü için önceliğimiz metastazı engellemek ve çıkarılan hasarlı bölgenin yerine in vitro koşullarda oluşturulmuş, biyouyumlu ve neredeyse orijinal dokuyu yerleştirmektir.

Kaliksarenlerin fonksiyonlaştırılmasıyla elde edilen 2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP sentezli nanolifler ile Saos-2 hücre hattının etkileşimini incelendi. Öncelikle XTT tekniğini kullanarak hücrelerin canlılık %'si hesaplandı. 4-AMP sarımlı platformlarda canlılığın yüksek olduğu görüldü. Buradan aldığımız sonuçları desteklemek, hücrelerin bu 3B platformlardaki morfolojisini ve sinyal iletimini gözlemleyebilmek için lazer taramalı konfokal mikroskop ile taramalı elektron mikroskop (SEM) kullanıldı. Elde edilen görüntüler incelendeiğinde ise 4-AMP'li nanoliflerde Saos-2 hücrelerinin orijinal yapısını koruyarak çoğaldığı, hücreler arası iletişimi sağladığı ve dokulaşmaya gidebileceği gözlemlendi.

Tüm deneysel çalışmalarımızın sonuçlarının birbirini desteklediği, kaliks[4]aren türevli 4-AMP sarımlı nanolif yüzeylerin Saos-2 hücre hattı için uygun bir doku iskelesi oluşturacağı görüldü.

Kaliksarenlerin fonksiyonlandırılmasıyla bir çok çalışmada hedefe yönelik tedavilerde amaca ulaşılabileceği öngörüldü. Çalışmalarımız neticesinde hedeflenen

sonucu elde edip 4-AMP sarımlı nanolifler doku iskelesi olarak tayin edilirken, 2-AMP sarımlı nanoliflerin ise toksik olduğu görüldü. Buradan yapılan çıkarımla 2-AMP sarımlı nanoliflerle antikanser çalışmaların yapılabileceği öngörüldü.

## 5.2 Öneriler

Günümüzde hızla çoğalan ve çeşitlenen kanser hastalıklarına karşı tedavi yöntemleri de bu oranda geliştirilmektedir. Fakat hasta sayısını, hastalığa yakalanma oranını ve tedavilerin yan etkilerini en aza indirmek için tıbbın ileride gitmesi gerekmektedir. Bu noktada hızla gelişen teknolojiden yardım alınarak yeni yöntemler geliştirilmekte. En dikkat çeken yöntemlerin başında 3B doku iskeleleri gelmektedir. Özellikle rejeneratif tıpta mutlak bir ihtiyacı karşılayacak olan iskelelerin, biyouyumlu olması ve in vitro koşullarda üretilebilmesiyle yaygın bir kullanım alanına sahip olacağı düşünülmekte.

Kaliks[4]aren türevlerinin farklı kompozisyonlarından elde edilen 3B nanolif doku iskeleleri oldukça umut verici. Hücre dışı matriks görevi sağlayıp hücreler arası sinyalleşmeyi gerçekleştirmesiyle ideal bir biyoiskeledir. Ayrıca kemik rejenerasyonu için, in vitro koşullarda kemik doku oluşumuna izin vermekte. Bununla birlikte doku oluşumunu etkileyecek biyomateryallerin ilavesiyle daha verimli sonuçlar alınacağı da ön görmekteyiz.

3B nanoliflerde kemik doku oluşumunu hızlandırmak için osteoblastik hücre aktivitesini tetikleyen alkalen fosfataz (ALP) uygulamalarının başarılı olacağını düşünmekteyiz. ALP kemik metabolizmasıyla ve osteoblast diferansiyasyonuyla bağlantılı olduğu bilinen bir enzimdir. ALP aktivitesi, osteoblast diferansiyasyonu ve osteojenik özelliğin belirlenmesinde en sık kullaıllan parametredir. ALP erken dönemde belirlenebilir bir kemik belirtecidir ve kemik mineralizasyonunda önemli rol oynamaktadır.

**KAYNAKLAR**

Abarrategi A, Tornin J, Martinez-Cruzado L, Hamilton A, Martinez-Campos E, Rodrigo JP, Gonzalez MV, Baldini N, Garcia-Castro J, Rodriguez R., 2016, Osteosarcoma: cells-of-origin, cancer stem cells, and targeted therapies. *Stem Cells Int*. 3631764. doi: 10.1155/2016/3631764.

Akay G, Birch M.A., Bokhari M.A., 2004, Microcellular polyHIPE polymer supports osteoblast growth and bone formation in vitro. *Biomaterials. Vol*.25; pp.3991-4000

Arduini, A., Pochini, A., Raverberi, S. and Ungaro, R., 1984, P-t-butyl-calix[4]arene tetracarboxylic acid, a water soluble calixarene in a cone structure, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communnications,* 15: 981-982.

Baggetto L.G., Coleman W.A., Lazar A.N., Magnard S., Michaud M.H., 2010, Calixarene Derivatives as Anticancer Agent., *US Patent 20100056482 A1*., March 4.

Barron, V., Lyons, E., McHugh, P. E., Pandit, A., and Stenson-Cox, C., 2003a, Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review. *Annals of Biomedical Engineering, 31*(9), 1017-1030pp.

Boccaccio, A., Ballini, A., Pappalettere, C., Tullo, D., Cantore, S. and Desiate, A., 2011, Finite Element Method (FEM), Mechanobiology and Biomimetic Scaffold in Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biological Sciences,* 7(1),112-132.

Buttafoco L, Kolkman NG, Engbers-Buijtenhuijs P, Poot AA, Dijkstra PJ, Vermes I, Feijen J., 2006, Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *University of Twente, Enschede, PO Box* 217, 7500 *AE.*

Cherenok S, Vovk A, Muravyova I., 2006, Calix [4] arene α-aminophosphonic acids: asymmetric synthesis and enantioselective inhibition of an alkaline phosphatase. *Org Lett.* 8(4):549–552.

Cherenok SO, Yushchenko OA, Tanchuk VY., 2012, Calix[4]arene-a-hydroxyphosphonic acids, synthesis, stereochemistry and inhibition of glutathione S-transferase. *ARKIVOC*. 4:278-298.

Consoli GM, Granata G, Galante E, Di Silvestro I, Salafia L, Geraci C., 2007, Synthesis of water-soluble nucleotide-calixarene conjugates and preliminary investigation of their in vitro DNA replication inhibitory activity.*Tetrahedron.* 63(44):10758–10763.

Consoli GM, Granata G, Galante E, Di Silvestro I, Salafia L, Geraci C., 2007, Synthesis of water-soluble nucleotide-calixarene conjugates and preliminary investigation of their in vitro DNA replication inhibitory activity.*Tetrahedron.* 63(44):10758–10763.

Deakin, B. Y., 2006, Wheater's functional histology: a text and colour atlas (5 ed.). Edinburgh: Churcill Livingstone/Elsevier.

Dersch, R., Steinhart, M., Boudriot, U., Greiner, A., Wendorff, J.H., 2005, Nanoprocessing of polymers: application in medicine, sensors, catalysis, photonics, *Polymers for Advanced Technologies, vol.*16, , 276-282.

Dong J, Liu Y, Liao W, Liu R, Shi P, Wang L., 2016, miRNA-223 is a potential diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. *J Bone Oncol*. 5:74–79. doi: 10.1016/j.jbo.2016.05.001.

Einhorn, T.A., 1994, Bone metabolism and bone disease, In: Orthopaedic knowledge update 4 home study syllabus. *Frymoyer, J.W. (eds), Am. Acad. Orthop. Surg., 69-88, Rosemont*.

Galindo-Murillo R, Olmedo-Romero A, Cruz-Flores E, Petrar P, Kunsagi-Mate S, Barroso-Flores J., 2014, Calix[n]arene-based drug carriers: a DFT study of their electronic interactions with a chemotherapeutic agent used against leukemia. *Comp Theor Chem.* 1035:84–91.

Galindo-Murillo R, Sandoval-Salinas ME, Barroso-Flores J., 2014, In silico design of monomolecular drug carriers for the tyrosine kinase inhibitor drug imatinib based on calix-and thiacalix [n] arene host molecules: a DFT and molecular dynamics study. *J Chem Theory Comput.* 10(2):825–834.

Gautam, S., Dinda, A. K., and Mishra, N. C.**,** 2013, Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, *33*(3), 1228-1235pp. doi: 10.1016/j.msec.2012.12.015.

Gutsche, C. D. and Lin, L.-G., 1986, Calixarenes 12: the synthesis of functionalize calixarenes. *Tetrahedron, 42*(6), 1633-1640p.

Gutsche, C. D., 1989, Calixarenes, monographs in supramolecular chemistr. Stoddart,J.F., Ed.; *The Royal Society of Chemistry: Cambridge*, Vol. 1.

Gutsche, C. D., Dhawan, B., Leonis, M. and Stewart, D., 1990a, p-ter-Butylcalix [6] arene. *Organic Syntheses*, 77-77.

Gutsche, C.D., Vicens, J. and Böhmer, V., 1990b, *Single Step Synthesis and Properties of Calixarenes*, pp. 3-37.

He, J.H., , Wan, Y.Q., Yu, J.Y., 2004, Allometric Scaling and Instability in Electrospinning , *International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulations*5(3), 243-252.

Horrocks, A. R, Anand, S. C., 2009, "Teknik Tekstiller El Kitabı", *Türk Tekstil Vakfı*, s. 449.

Hulíková K, Grobárová V, Křivohlavá R, Fišerová A., 2010, Antitumor activity of *N* -acetyl- *D* -glucosamine-substituted glycoconjugates and combined therapy with keyhole limpet hemocyanin in B16F10 mouse melanoma model. *Folia Microbiol.* 55(5):528–532.

Ki, C. S., Park, S. Y., Kim, H. J., Jung, H. M., Woo, K. M., Lee, J. W., and Park, Y. H., 2008, Development of 3-D nanofibrous fibroin scaffold with high porosity by electrospinning: implications for bone regeneration. *Biotechnol Lett*, 30(3), 405-410pp. doi: 10.1007/s10529-007-9581-5

Kim, S. J, Lim, J. Y, Kim, I. Y, Lee, S. H, Lee, T. S, Kim, S. I., 2005, "Optimum Parameters for Production of Nanofibres Based on poly(2acrylamido/2/methyl/1/propane/sulfonic acid by electrospinning, Smart Materials and Structures", *Institute of Physics Publishing*, (14) N16/N20.

Lian, J. and Stein, G., 2001, Osteoblast biology, In: Osteoporosis. Marcus, R., Feldman, D., Nelson, D.A. ve Rosen, C.J. (eds), *Elsevier Academic Press*, 93-150. *Amerika.*

Livshits Z, Rao RB, Smith SW. A.N., 2014, Approach to chemotherapy-associated toxicity. *Emerg Med Clin North Am.* 32(1):167–203.

Luu, Y. K., Kim, K. J., and al., e., 2003, Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *Journal of Controlled Release*, 89, 341-353pp.

Mastrangelo C., 1999, DNA analysis systems on a chip. *Adv. Sci. Technol*, 26:465-76.

Mulkins MA, Manolagas SC, Deftos LJ, Sussman HH., 1983, 1,25-Dihydroxyvitamin D, increases bone alkaline phosphatase isoenzyme levels in human osteogenic sarcoma cells. *J Biol Chem* 258:6219-6225.

Nasuhi Pur F, Dilmaghani KA., 2014, Calixplatin: novel potential anticancer agent based on the platinum complex with functionalized calixarene. *J Coord Chem.* 67(3):440-448.

Ou-Yang, H., Paschalis, E.P., Mayo, W.E., Boskey, A.L. and Mendelshon, R., 2001, Infrared microscopic imaging of bone: *Spatial disrtibution of (CO3)-2. J. Bone Miner. Res.*, 16, 893-900.

Ozcan, F., Sahin, O. and Yilmaz, M., 2009, Synthesis of a glutaraldehyde derivative of calix [4] arene as a cross-linker reagent for lipase immobilization. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 63: 123-129.

Peter, X. Ma., 2004, "Scaffolds for Tissue Fabrication, Materialstoday", s. 35/38.

Quinn, J.M. and Gillespie, M.T., 2005, Modulation of osteoclast formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 328, 739-745.

Ramakrishna, S., Zhang, Y., Lim, C.T., Huang, Z., 2005, Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications, *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, Vol.16, 933-946.

Sayin, S., Ozcan, F. ve Yilmaz, M., 2011, Preparation and Application of Calix[4]arene Derivatives Bearing Pyridinium Units-Grafted Magnetite Nanoparticles for Removal of Dichromate and Arsenate Anions, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 48 (5), 365-372.

Schmidt-Nielsen, K, 1984, Scaling: Why is animal size so important? *Cambrigde: Cambrigde University Press*.

Shor, L., Guceri, S., Wen, X., Gandhi, M., and Sun, W.**,** 2007, Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials*, *28*(35), 5291-5297pp.

Smith, L. A., 2004, "Nano/fibrous Scaffolds For Tissue Engineering", Colloids and Surfaces. *Biointerfaces*, s. 125.

Tokur, O., Aksoy, A., 2017, *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 6 (1): 112-118.

Uyar, P., 2014, Evaluation of in Vitro Antioxidative, Cytotoxic and Apoptotic Activities of Rheum ribes Ethyl Acetate Extracts, *Journal of Plant Sciences (Science Publishing Group)*, 2 (6).

Vacanti, C., 2006, The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine, 1*(3), 569-576pp.

Vunjak-Novakovic, G., Tandon, N., Godier, A., Maidhof, R., Marsano, A., Martens, T. P., and Radisic, M., 2010, Challanges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev, 16*(2), 169p.

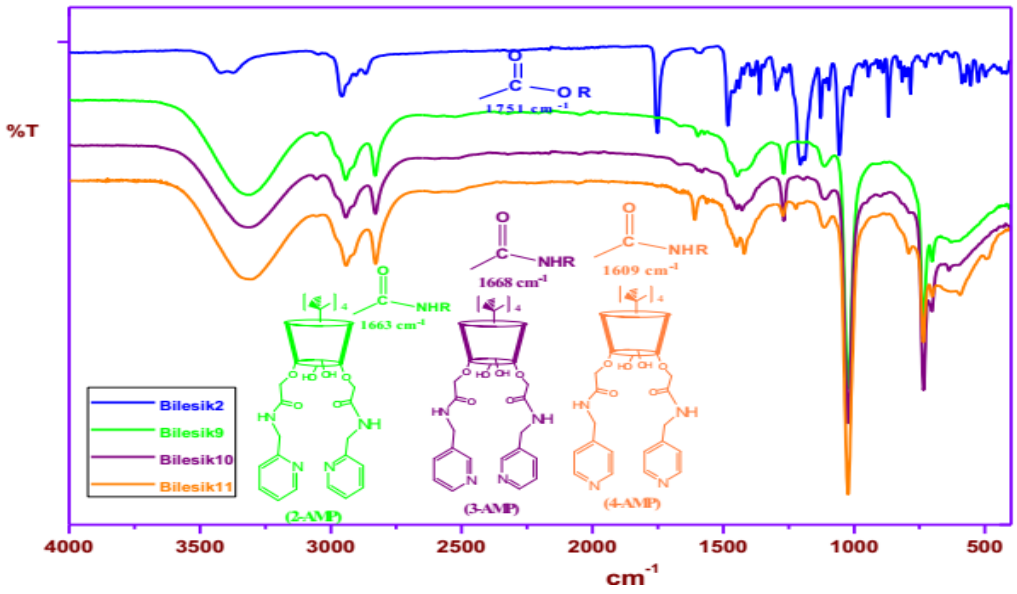
Yang, X. and Karsenty, G., 2005, Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects, In: Engineering bone. *Petite, H. ve Quarto, R. (eds) Landes Bioscience, 3-8, Georgetown*.

Zhang P, Feng FF, Cai QQ, Yao WT, Gao ST, Wang JQ, Wang X., 2014, Effects of metaphyseal bone tumor removal with preservation of the epiphysis and knee arthroplasty. *Exp. Ther. Med*. 8(2):567–572. doi: 10.3892/etm.2014.1744.

# EKLER

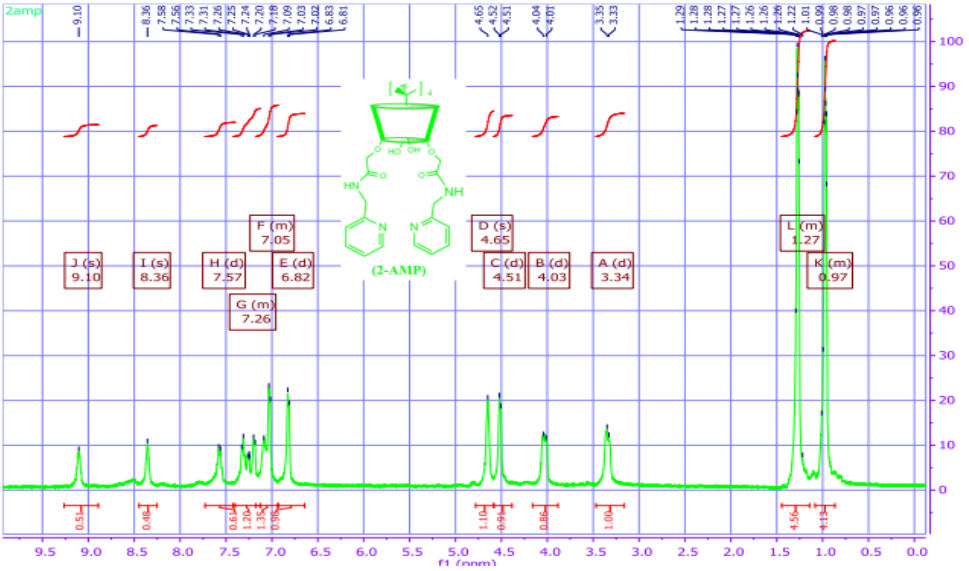
## EK-1:
## Kimyasal sıvı çözeltilerinde 2-AMP, 3-AMP, 4-AMP'lerin sentezlenmesi

2.13 g (2.5 mmol) ilk basamakta oluşan Diester bileşiği $CH_2Cl_2$ : $CH_3OH$ (45 ml/45 ml) içerisinde çözüldü. Üzerine 15 mmol (1.62 g) ilave edildi. Reaksiyon 72 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Reaksiyon ITK den takip edilerek başlangıç maddelerinin ürüne dönüşümü gözlendi (Etilasetat : n-Hekzan, 1:1). Ayrıca reaksiyon FT-IR spektroskopisinde 1751 $cm^{-1}$ deki ester karbonil bandının 2-AMP için 1676 $cm^{-1}$, 3-AMP 1681 $cm^{-1}$ 4-AMP için 1638 $cm^{-1}$ amid karbonil bandına dönüşümü gözlendi. Reaksiyon sonunda çözücü evaparasyon ile uzaklaştırılıp, geriye kalan katı partikül 250 ml $CHCl_3$ ile çözüldü ve ayırma hunisinde pH'ı 7 olan saf $H_2O$ ile yıkandı, yıkama sonunda organik faz kuru $MgSO_4$ ile kurutulup oluşan süzüntüye $CH_3OH$ damlatılarak evaparatör ile yoğunlaştırıldı ve kristallenmeye bırakıldı. Kristaller süzülerek alındı. (Sayin ve ark., 2011; Ozcan ve ark., 2015).



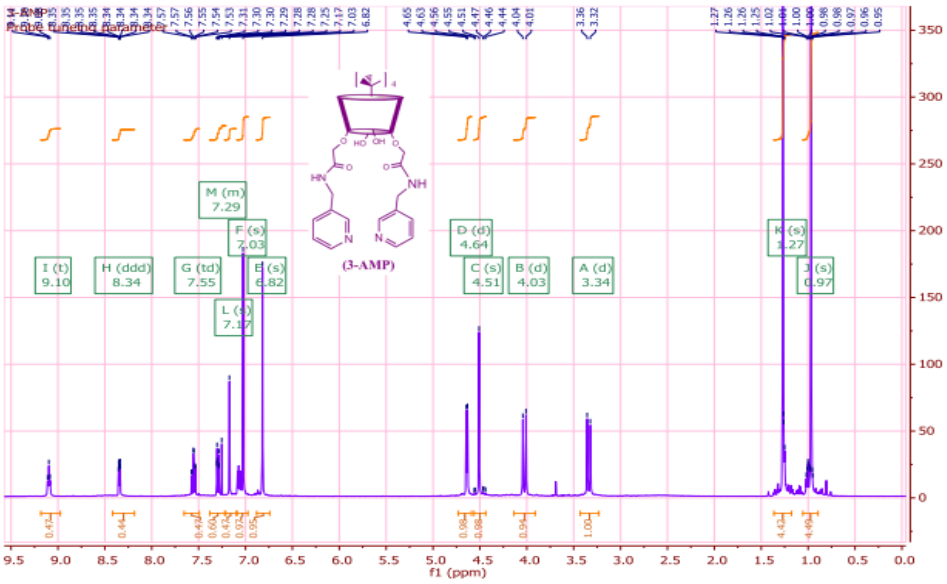

2-AMP, 3-AMP ve 4-AMP'lerin FT-IR analizleri

**2-AMP** (**2-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren)**; Verim: 1.48 g (% 65.0), E.n : 259-262 IR :1663 $cm^{-1}$ (C=N) $\nu_{max}$ (ATR): 3454, 3358, 1676 $cm^{-1}$; $^1$H-NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 0.98 (18H, s, tBu), , 3.31 (4H, d, *J*= 13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.02 (4H, d, *J* =13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 1.22(18H, s, tBu), 4.50–4.55 (8H, m, $OCH_2$, Ar–$CH_2$–NH), 6.85 (4H, s, ArH), 7.00 (4H, s, ArH), 7.18 (2H, s, OH), 7.61 (2H, d, *J*=7.8 Hz, PyH), 8.45 (2H, d, *J*=4.5 Hz, PyH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 8.62 (2H, d, PyH), 9.21(2H, t, NH). Anal. Hesapl. $C_{60}H_{72}O_6N_4$: C, 76.24; N, 5.93; H, 7.68. Bulunan; H, 7.70; C, 76.28; N, 5.88% (MA: 944.56 g/mol).



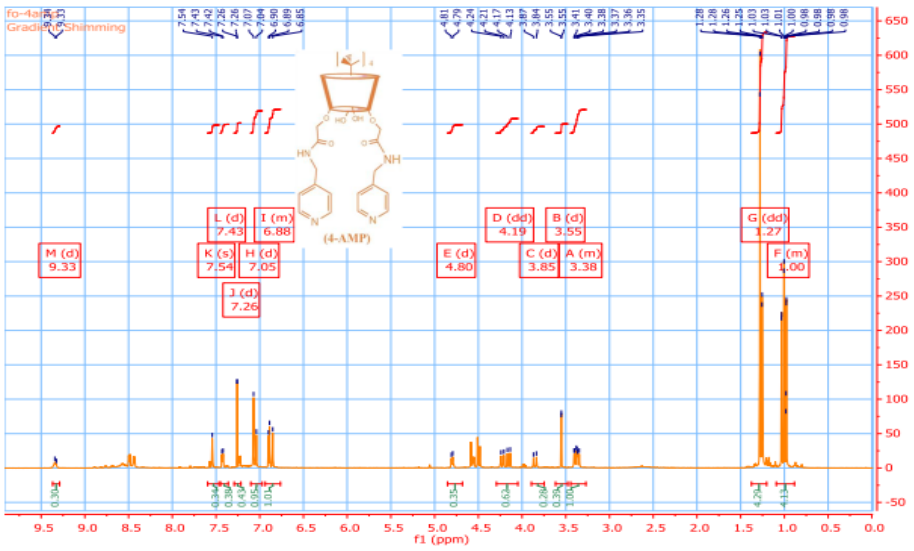

2-AMP **(**2-Aminometilpridin)'nin $^1$H-NMR spektrumu

**3-AMP** (**3-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren)**; Verim: 1.5 g, (% 65.8) , E.n : 239-242 IR :1668 $cm^{-1}$(C=N) $\nu_{max}$ (ATR): 3454, 3358, 1681 $cm^{-1}$; 1.22(18H, s, tBu), 3.27 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), $^1$H-NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 0.98 (18H, s, tBu), 3.90 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.46–4.49 (8H, m, $OCH_2$, Ar–$CH_2$–NH), 6.85 (4H, s, ArH), 7.18 (2H, s, OH), 7.61 (2H, d, *J*= 7.8 Hz, PyH), 7.00 (4H, s, ArH), 7.06–7.10 (2H, m, PyH), 8.45 (2H, d, *J*=4.5 Hz, PyH), 8.62 (2H, d, PyH), 9.21(2H, t, NH). Anal. Hesapl. $C_{60}H_{72}O_6N_4$: H, 7.68; N, 5.93; C, 76.23. Bulunan: C, 76.31; H, 7.74; N, 5.83% (MA: 944.56 g/mol).




3-AMP **(**3-Aminometilpridin)'nin $^{1}$H-NMR spektrumu

**4-AMP** (**4-Aminometilpridin *p-tert*-bütilkaliks[4]aren);** Verim: 1.72 g, (% 75.5) , E.n : 239-242 IR :1609 $cm^{-1}$ (C=N) $\nu_{max}$ (ATR): 3454, 3358, 1638 $cm^{-1}$; $^{1}$H-NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 1.0 (18H, s, tBu), 3.38 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 3.55 (4H, sAr–$CH_2$–NH), 3.86 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 1.27 (18H, s, tBu), 4.80 (4H, s, $OCH_2$), 6.85 (4H, s, ArH), 7.05 (2H, m, PyH), 7.26 (2H, d, *J*= 7.8 Hz, PyH), 6.88 (4H, s, ArH), 7.48 (2H, s, OH), 7.54 (2H, d, *J*= 7.8 Hz, PyH), 9.33 (2H, t, NH). Anal. Hesapl. $C_{60}H_{72}O_6N_4$:C, 76.23; H, 7.68; N, 5.93. Bulunan: H, 7.74; C, 76.31; N, 5.83% (MA: 944.56 g/mol).




4-AMP **(**4-Aminometilpridin)'nin $^{1}$H-NMR spektrumu

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Esin ŞİRİN
**Uyruğu** : TC
**Doğum Yeri ve Tarihi** : KONYA / 25.12.1990
**Telefon** : 05542352379
**Faks** :
**e-mail** : esiinsirin@gmail.com

## EĞİTİM

| Derece | | Adı, İlçe, İl | Bitirme Yılı |
|---|---|---|---|
| Lise | : | Ata İçil Yabancı Dil Ağırlıklı Lise – Kadınhanı/ KONYA | 2008 |
| Üniversite | : | Selçuk Üniversitesi-Selçuklu-KONYA | 2015 |
| Yüksek Lisans | : | Selçuk Üniversitesi-Selçuklu-KONYA | |
| Doktora | : | - | |

## İŞ DENEYİMLERİ

| Yıl | Kurum | Görevi |
|---|---|---|
| 2016-2019 | Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (İLTEK) | Araştırmacı Öğrenci |

## UZMANLIK ALANI

Fen Bilimleri
Hücre Kültürü

## YABANCI DİLLER

İngilizce

**YAYINLAR**

- **Esin Şirin**, Fatih Özcan, Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, 'A Study on Anticancer Activity of Calixarene on Human Osteosarcoma Saos-2 Cells, 5th International BAU Drug Design Congress : Novel Methods and Emerging Targets in Drug Discovery & Patented Drug Development, Bahcesehir University School of Medicine, Istanbul-Turkey, 2017 *(Poster Sunum)*

- **Esin Şirin**, Fatih Özcan, Mohammed Farman Ahmed, Pembegül Uyar Arpacı,3 'Synthesis and Anticancer Study of p-tert-butylcalix[4]arene on Human Osteosarcoma Saos-2 Cells, 4th International Turk-Pak Conference on Chemical Sciences (ITPCCS 2017), Konya-Turkey, 2017, *(Poster Sunum)*

- **Esin Şirin**, Fatih Özcan, Şeref Ertul, Pembegül Uyar Arpacı, 'Tumor Preferential Activity of p-tert-butylcalix[4]arene on Human Osteosarcoma Saos-2 Cells, 7th Internatıonal Molecular Bıology and Bıotecnology Congress,Konya-Turkey, 2018, *(Poster Sunum)*