

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MANYETİK JELATİN NANOPARTİKÜLLERİNİN
HAZIRLANMASI VE KEMOTERAPİ AJANI
OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Habibe YILMAZ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Şenay ŞANLIER

Biyokimya Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 405.05.01

Sunuş Tarihi : 22.12.2011

Bornova-İZMİR

2011

Sayın Habibe YILMAZ tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “MANYETİK JELATİN NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI VE KEMOTERAPİ AJANI OLARAK KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 22.12.2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:	
Raportör Üye	:	
Üye	:	

ÖZET**MANYETİK JELATİN NANOPARTİKÜLLERİNİN
HAZIRLANMASI VE KEMOTERAPİ AJANI OLARAK
KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

YILMAZ, Habibe

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şenay ŞANLIER

Aralık 2011, 86 sayfa

Akciğer kanseri erkeklerde en sık görülen, kadınlarda görülen kanser türlerinde ise görülme sıklığı 4. sırayı alan ve ölüm oranı en yüksek olan kanser türüdür. Nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin hasta dokuya hedeflendirilmesi ve terapötik indeksi artırma çalışmalarında manyetik hedeflendirme kullanılmaktadır. Cisplatin kimyasal olarak sentezlenen, çekirdeğinde platin ağır metali içeren basit ancak etkili bir ilaçtır. Klinikte akciğer, kolon, mide, over ile baş ve boyun tümörlerinin tedavisinde gerek tek başına gerekse başka ilaçlar ile kombine edilerek yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Çalışmanın amacı, manyetik jelatin nanopartiküllerin hazırlanması, cisplatin ilacının partiküllere adsorpsiyon yolu ile yüklenmesi ve her adımda nanopartikül karakterizasyonunun yapılmasıdır. Elde edilen sonuçlar nanopartikül boyutunun 301 nm olduğunu ve ilaç yükleme veriminin %94 olduğunu göstermiştir. Cisplatin yüklü manyetik jelatin nanopartiküllerinin manyetizasyon miktarının 0,1 T manyetik alanda 20,2 emu/g olup dışarıdan uygulanacak olan manyetik alanda cevap oluşturacak kadar yüksek olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak, hazırlanan cisplatin yüklü manyetik jelatin nanopartiküllerinin dışarıdan uygulanan manyetik alanla kolaylıkla yönlendirilebilir olması ve ilacın nanopartiküler sistemde deriştirilmesiyle kemoterapötik indeksi artacağı, özellikle akciğer kanserinde kemaoterapi ajanı olarak kullanılabilirliğinin mümkün olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Nanopartikül, jelatin nanopartikül, magnetit, cisplatin, manyetik nanopartikül

ABSTRACT**PREPARATION OF MAGNETIC GELATINE NANOPARTICLES
AND INVESTIGATING THE POSSIBLE USE AS
CHEMOTHERAPEUTIC AGENT**

YILMAZ, Habibe

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

December 2011, 86 pages

Lung cancer is a cancer type that mostly seen cancer in men, the fourth common cancer type in women contrary to other cancer types and death rate is the highest one. In some studies, magnetic controlling is used for targeting of nanoparticulate carrier systems to diseased site and increase the therapeutic index of drug. Cisplatin is a simple but effective drug that contains platinum, which is one of the heavy metals, can be synthesised by chemically. It is used to treat lung, head and neck, stomach, ovarian and colon cancer either alone or in combination with other chemotherapeutic agents.

The aim of this study is synthesis of magnetic gelatine nanoparticles, loading cisplatin to particles by adsorption technique and characterization of nanoparticles in each step. Obtained results revealed that the size of nanoparticles was 301 nm and the cisplatin adsorption yield is 94%. The prepared cisplatin loaded magnetic gelatine nanoparticles showed 20 emu/g response in 0,1 T magnetic field which is enough to be controlled from externally under a magnetic field.

As a consequent, it was believed that, since the cisplatin loaded magnetic gelatine nanoparticles can be control by external magnetic field and concentrating the drug onto nanoparticulate system may cause to increase therapeutic index, prepared nanoparticulate system should be useful as a chemotherapeutic agent especially for lung cancer.

Keywords: Nanoparticle, gelatine nanoparticle, magnetite, cisplatin, magnetic nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca her türlü bilgi, tecrübe ve manevi desteği ile yanımda olan ve karakterinden hep ilham aldığım danışmanım sayın Doç. Dr. Şenay ŞANLIER'e, her zaman benimle beraber olup bana her konuda inanan ve destek veren çok sevgili aileme ve bu çalışmanın her anında fikirleriyle ve güler yüzüyle bana devam etme cesareti ve hevesi veren arkadaşım Arş. Gör. Güliz AK'a, FTIR ve TGA analizlerinde yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Yeliz YILDIRIM'a, maddi ve manevi katkılarını hiçbir zaman unutmayacağım çok değerli arkadaşlarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 11 FEN 074 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
İÇİNDEKİLER	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
TABLolar Dizini	XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVII
1. GİRİŞ	1
1.1 Kanser	2
1.1.1 Akciğer kanseri	3
1.1.2 Kemoterapi ilaçları.....	5
1.2 İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Nanopartiküller	10
1.2.1 Nanopartiküllere genel bakış	12
1.2.2 Nanopartiküllerin karakterizasyonu	21
1.2.3 Nanopartiküllere ilaç yüklenmesi	23
1.3 Nanotaşıyıcıların Kanserli Bölgeye Hedeflendirilmesi	32
1.3.1 Pasif hedeflendirme.....	32
1.3.2 Aktif hedeflendirme	35

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2. MATERYAL VE METOT	38
2.1 Materyal.....	38
2.2 Metot	38
2.3 Jelatin Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	39
2.3.1 Protein Tayini	39
2.3.2 Jelatin Konsantrasyonu Optimizasyonu	40
2.3.3 pH Optimizasyonu.....	40
2.3.4 Aseton Akış Hızı Optimizasyonu.....	40
2.4 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerin Hazırlanması	40
2.4.1 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	41
2.5 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerine Cisplatin Adsorpsiyonu	41
2.5.1 Cisplatin Tayini	41
2.5.2 Optimum Adsorplanma Sıcaklığının Belirlenmesi	41
2.5.3 Optimum Adsorpsiyon Süresinin Belirlenmesi.....	41
2.5.4 Adsorplanan Optimum Cisplatin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	41
3. SONUÇLAR VE YORUM.....	43
3.1 Jelatin Nanopartiküllerin Sentezi	43
3.1.1 Jelatin Konsantrasyonu Optimizasyonu	45

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.1.2 pH Optimizasyonu	46
3.1.3 Aseton Akış Hızı Optimizasyonu	47
3.2 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerin Hazırlanması	48
3.2.1 Magnetit Konsantrasyonunun Etkisinin Belirlenmesi	49
3.2.2 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	52
3.3 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerine Cisplatin Adsorpsiyonu.....	55
3.3.1 Cisplatin Tayini.....	55
3.3.2 Optimum Adsorplanma Sıcaklığının Belirlenmesi.....	55
3.3.3 Adsorpsiyon Süresi	56
3.3.4 Cisplatin Yükleme Konsantrasyonu	57
4. GENEL DEĞERLENDİRME	59
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	61
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1 Türkiye 1999-2005 yılları kanser istatistikleri	3
Şekil 1.2 Türkiye’deki ilk 10 kanser türü.....	3
Şekil 1.4 Türkiye’de kadınlarda görülen ilk 10 kanser türü.....	4
Şekil 1.5 Cisplatinin yapısı.....	6
Şekil 1.6 Cisplatinin sentezi	7
Şekil 1.7 Cisplatinin hidrolizi.....	8
Şekil 1.8 Cisplatinin bazlarla etkileşimi.....	9
Şekil 1.9 Cisplatinin DNA etkileşim şekilleri	9
Şekil 1.10 Nanopartiküller ve etken madde yükleme yolları.	13
Şekil 1.11 Koaservasyon metodu ile albumin nanopartiküllerinin hazırlanması..	17
Şekil 1.12 Kollojenden asidik ve bazik jelatin hazırlama prosesi	20
Şekil 1.13 Freunlich izotermi.	27
Şekil 1.14 Langmiur izotermi.....	28
Şekil 1.15 Pasif hedefleme.	34
Şekil 1.16 Aktif hedefleme.....	36
Şekil 1.17 Manyetik nanopartikül hazırlanması ve kullanım şekilleri.....	37
Şekil 3.1 Jelatin nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.....	44
Şekil 3.2 Jelatin konsantrasyonunun nanopartikül oluşum verimine etkisi.	46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 3.3 Nanopartikül oluşum verimi üzerine pH etkisi.....	47
Şekil 3.4 Aseton akış hızının nanopartikül oluşum verimi ve boyut üzerine etkisi.	48
Şekil 3.5 Manyetik jelatin nanopartiküllerin elementel analizi.	49
Şekil 3.6 Magnetitin manyetik alandaki manyetizasyonu.	50
Şekil 3.7 Değişen konsantrasyonlarda magnetit içeren GNP'lerin manyetik alandaki manyetizasyonu.	51
Şekil 3.8 Jelatin tip B, magnetit, GNP ve MGNP'nin FTIR analizi.	52
Şekil 3.9 a) Jelatinin magnetit üzerine adsorpsiyonu, b) aseton eklenmesiyle jelatinin katlanması c) glutaraldehit ile jelatinin çapraz bağlanarak magnetitin enkapsülasyonu	53
Şekil 3.10 Jelatin Tip B, magnetit, GNP ve MGNP'ye ait TG analizi.	54
Şekil 3.11 Manyetik jelatin nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri.....	54
Şekil 3.12 CDDP'nin adsorpsiyonu üzerine sıcaklık etkisi.	55
Şekil 3.13 Adsorpsiyon süresinin ilaç yüklenmesi üzerine etkisi.	56
Şekil 3.14 Adsorpsiyon verimi üzerine optimum cisplatin konsantrasyonunun belirlenmesi.	57
Şekil 3.15 Dubinin – Radushkevich izotermi.	58

TABLolar DİZİNİSayfa

Tablo 1.1 Kanser ilacı sınıfları ve karakteristikleri	6
Tablo 1.2 Polimer tiplerine göre nanopartikül hazırlama yolları	15
Tablo 1.3 Doğal makromoleküllerden nanopartikül hazırlama yöntemleri	18

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklamalar</u>
μm	Mikrometre
nm	Nanometre
kDa	Kilodalton
G	Gauss
g	Gram
emu	Manyetik dipol moment
$^{\circ}\text{C}$	Derece santigrat
T	Tesla
γ	Gama
rpm	Dakikadaki tur sayısı
Cu	Bakır
ppm	Milyonda bir madde miktarı
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
PCL	Polikaprolakton
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PACA	Poli(siyanoakrilat)
RES	Retiküloendotelyal sistem
DNA	Deoksiribonükleik asit
MRI	Manyetik rezonans görüntüleme

XVIII

Kısaltmalar (devam)

ATP

MDR

P-gp

BSE

SEM

TEM

AFM

GNP

MGNP

EPR

DMF

OPDA

TG

D – R

PI

BCA

IR

FTIR

S/Y

CDDP

iv

Açıklamalar (devam)

Adenozin trifosfat

Çoklu ilaç direnç mekanizması

P-glikoprotein

Sığır spongiform encephalopathy

Taramalı elektron mikroskopisi

Geçirimli elektron mikroskopisi

Atomik kuvvet mikroskopisi

Jelatin nanopartikül

Manyetik jelatin nanopartikül

Artan geçirgenlik ve alıkonma etkisi

N,N-dimetikformamid

Orto - fenilendiamin

Termogravimetri

Dubinin - Radushkevich

İzoelektrik nokta

Bisinkoninik asit

Kızıl ötesi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi ve Raman Spektrometresi

Su/yağ

Cisplatin

İntravenöz

XIX

Kısaltmalar (devam)

CuSO_4

Na_2CO_3

NaOH

Na/K

Açıklamalar (devam)

Bakır sülfat

Sodyum karbonat

Sodyum hidroksit

Sodyum/potasyum

1. GİRİŞ

Dünya istatistiklerinde 2020 yılında kanser hastalarının sayısının on beş milyondan fazla olacağı belirtilmiştir. Kanser, dünyadaki ölümlerin ana sebeplerinden birisidir ve insanlardaki kanserleşme oranı gittikçe artmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan yaygın metotlar kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahale ile sınırlıdır. Günümüzde kanserle mücadelede geçerli kanser terapilerinde antitümör ajanların non spesifik sistemik dağılımı, tümöre ulaşan ilaç konsantrasyonunun yetersizliği, ve terapötik cevabın izlenmesinin limitli olması gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. İlacın hedef bölgeye az ulaşması ise çoklu ilaç direnci gibi önemli komplikasyonlara sebep olmaktadır.

Büyük bir hedefleme seçiciliği ve daha iyi terapötik ajan sistemik dağılımı, kontrast görüntüleme ajanı ve terapötik ajan formülasyonu geliştirmenin iki temel hedefidir. İdeal olarak, bir terapötik ajan sağlıklı dokulara en az hasarı vererek tümör lezyonlarında seçimli olarak birikmelidir. Bu hedeflere ulaşmada kullanılan rasyonel yaklaşım genellikle terapötik ilaçları seçici olarak tümör hücrelerinin yüzeyinde bolca ya da nadiren eksprese edilen antijen ya da reseptörlere bağlanan monoklonal antikörlerle ya da diğer ligantlarla konjuge etmektir. İmmunotoksinleri, radyoimmünoterapötikleri ve ilaç immünokonjugatlarını da içeren birkaç ligant hedefli terapötik stratejisi geliştirilmiştir.

Nanoteknolojinin farmasötik yaklaşımı oldukça geniştir. Nanoteknolojinin ilaç taşıyım sistemi olarak kullanımı ve non-invaziv görüntüleme amacıyla kullanımı ile ilgili prensipler hemen ortaya konmaya başlamıştır. Günümüzde kullanılan kanser terapi ajanlarına göre karakteristik üstünlükleri şöyle sıralanabilir;

- Nanoteknoloji, atom gruplarını inşaa ederek çok küçük fonksiyonel birimler üretebilmektedir.
- Nanopartiküller 100 nm'den daha küçük olabilirler ve DNA, proteinler ya da virüslere benzer boyutlarda dağılım gösterirler.

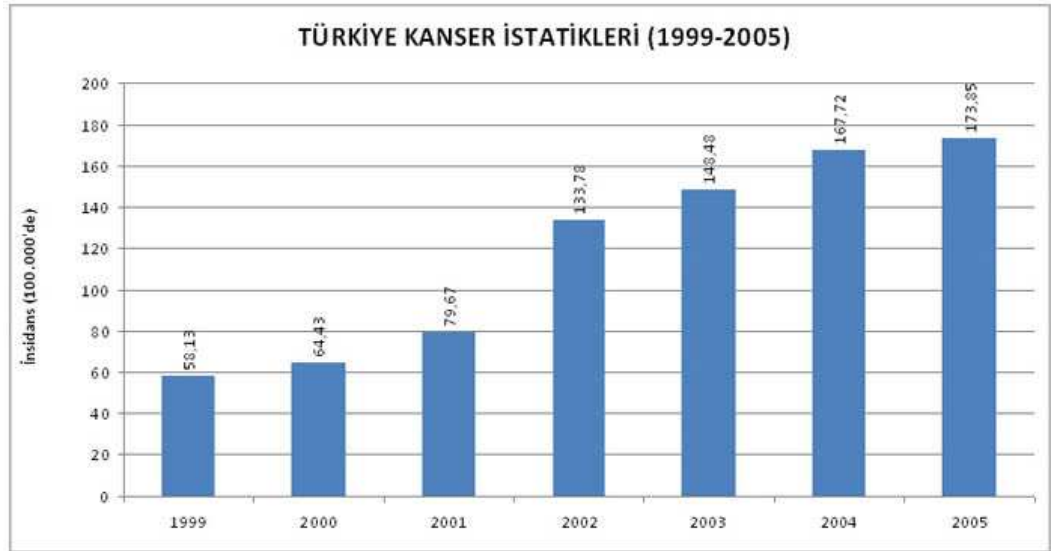
Nanopartiküller biyoteknoloji, nanoteknoloji ve bilgi teknolojileri platformu üzerine inşaa edilmişlerdir. Moleküler, biyokimyasal ve biyolojik proseslerde, örneğin genetik ve farmakogenetikte rol alabilirler.

Nanopartiküllerin yüzeyleri immün sistem tarafından tanınmayacak şekilde, hedeflerine çok daha etkin bir şekilde ulaşmasını sağlayacak çeşitli moleküllerle

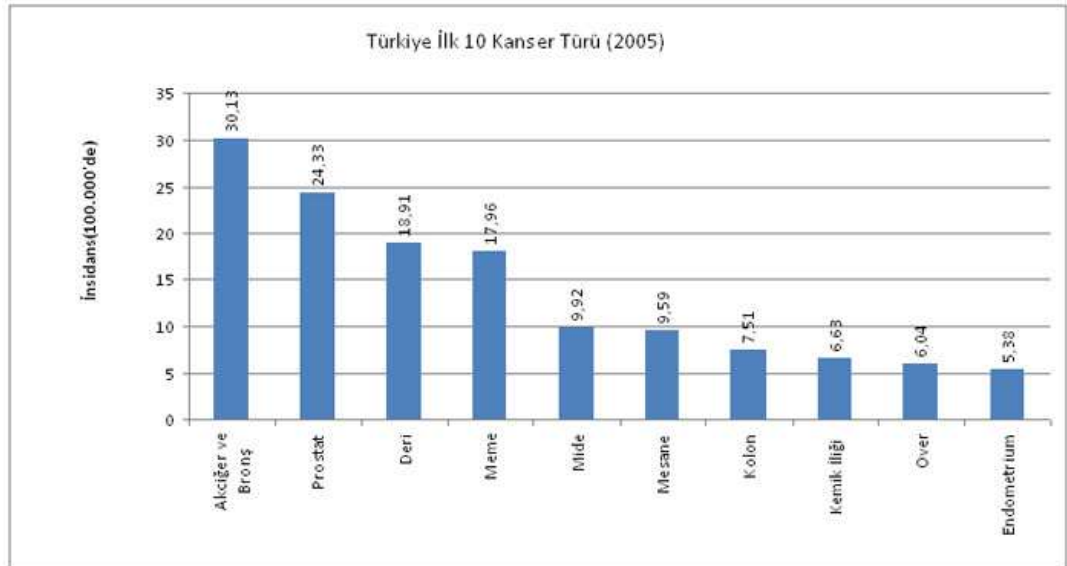
modifiye edilebilmektedir. Kan-beyin bariyeri veya dermal sıkı bağlar gibi bariyerleri aşacak şekilde tasarlanabilirler. Damarlanması olmayan sızıntılı malignant tümörlerde lezyonlu bölgeye girebilirler. Nanopartiküller, ilaç taşıyabildikleri gibi hastalıklı bölgeye ilaç salımı yapacak şekilde de tasarlanabilirler. Nanopartiküller örneğin dekstran gibi bir polimerle kaplanmış süperparamanyetik materyal içeren inorganik bir çekirdeğe sahip olabilir. Bu partiküller tanı ve tedavi uygulamalarında MRI için kontrast ajanlar olarak kullanılabilirler. Çok daha spesifik doku hedeflemesi (fonksiyonellendirme) ise, nanopartikülün bir ligantla konjugasyonu ile elde edilebilir (Kalevi et al.,2008).

1.1 Kanser

Kanser en temel olarak, daha önceden normal olan hücrelerin anormal ve kontrol edilemez bir şekilde çoğalmasıdır. Bir hücrenin transformasyonu, zamanla hücrede DNA'daki değişimlerin birikmesinin sonucudur. Genetik bilgidaki değişim, bir hücrenin normal fonksiyonlarını doğru şekilde yürütememesine sebep olur. Kanser hücrelerinin birincil karakteristiği hızlı bölünmeleri ve kanser hücrelerinin birikimiyle sonuçlanan tümör oluşumudur. Tümör kütlesi büyürken çevre dokulara saldırmıyorsa bening (iyi huylu) tümör olarak adlandırılır. Ancak eğer tümör çevre dokulara ya da daha uzaktaki dokulara yayılırsa malign (kötü huylu) tümör olarak adlandırılır. Metastaz ise, asıl birincil tümörden kopan kanser hücrelerinin çevre dokulara veya daha uzaktaki dokulara göçü ile yayılması ve ikincil tümörlerin oluşması olarak basitçe tanımlanabilir. Kanserin dört ana türü karsinoma, sarkoma, lösemi ve lenfomadır. İnsanlardaki kanserlerin yaklaşık % 90'ı iç organların, bezlerin ve boşlukların epitelinde veya deride ortaya çıkan karsinomadır. Karsinomaların görüldüğü organlar genellikle meme, kolorektal, akciğer, prostat ve deridir. Sarkomalar karsinomalardan daha az görülmektedir ve kıkırdak, kemik, kas ya da yağ doku gibi bağ dokulardaki hücrelerin başkalaşımı ile meydana gelir. Sarkomalar vücudun genellikle kol ya da bacaklardaki eklem bölgelerinde görülmektedirler. Kanserin bazı türlerinde ise katı tümörler görülmez. Örneğin; lösemi, kemik iliğinin olgunlaşmamış lökositleri çok fazla sentezleyerek erken salımı ile meydana gelir. Lenfomalar ise vücudun immün sisteminde meydana gelen kanserlerdir. Kan ve dokular için filtre sistemi gören lenf nodülleri, lenf bezlerinde görülmektedir (Almedia and Barry, 2010). Şekil 1.1 ve Şekil 1.2'de bulunan istatistikler sırasıyla, Türkiye'de 1999 – 2005 yılları arasındaki kanser vakalarındaki artış ve kanser türlerine göre görülme sıklığına aittir.



Şekil 1.1 Türkiye 1999-2005 yılları kanser istatistikleri (Kanser erken teşhis, tarama ve eğitim merkezi, 2011).

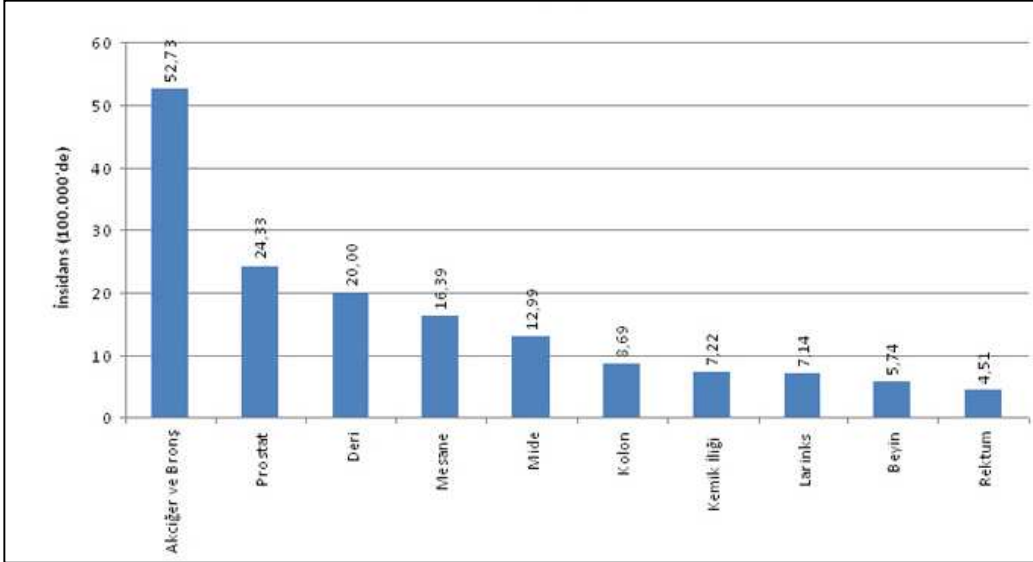


Şekil 1.2 Türkiye'deki ilk 10 kanser türü (Kanser erken teşhis, tarama ve eğitim merkezi, 2011).

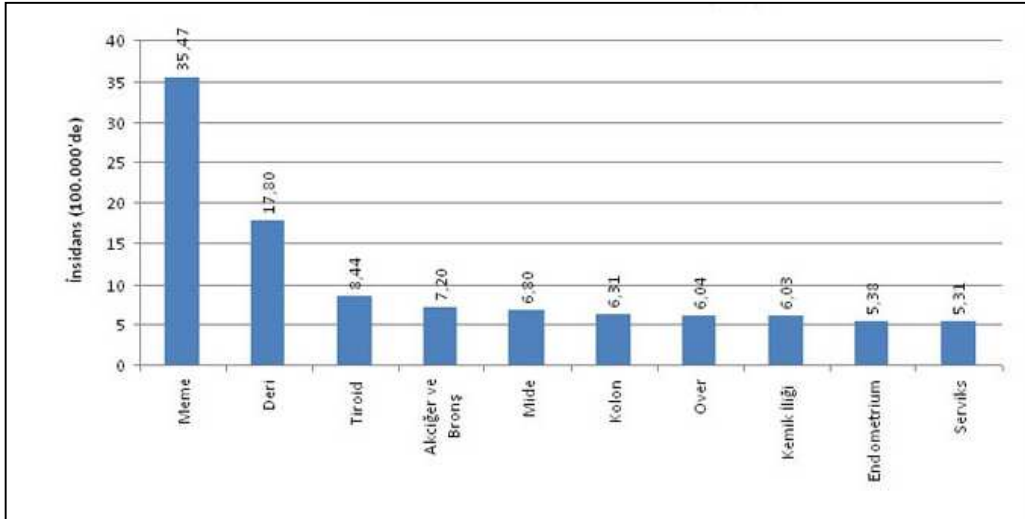
1.1.1 Akciğer kanseri

Akciğer kanseri, 1985 yılından bu yana dünya çapında en çok görülen kanser türüdür. En yüksek oranlara Güney Amerika ve Avrupa erkeklerinde ulaşmaktadır ki bunların bir kısmı Doğu Avrupa'dandır. Ancak yine de kanser türleri içerisinde en önlenelidir. Sigara kullanımı akciğer kanseri oluşumunun en önemli faktörüdür. Dünya çapında kadın ve erkeklerin diğer kötü huylu kanser türlerine kıyasla akciğer kanserinden ölüm sebeplerinin başında gelmektedir. 2008 yılında Amerika'da akciğer kanseri tanısı konulan 214,000 Amerikalı'dan 162,000'i ölmüştür. Akciğer kanseri tanısı konulan hastaların % 60'ı bir yıl

içerisinde ve % 85'i ise 5 yıl içerisinde hayatlarını kaybetmektedirler. Türkiye’de Şekil 1.3 ve Şekil 1.4’te bulunan istatistiklerden de görüleceği üzere erkeklerde akciğer kanseri en sık görülen kanser türüdür ve kadınlarda da en sık görülen dördüncü kanser türüdür.



Şekil 1.3 Türkiye’de erkeklerde görülen ilk 10 kanser türü (Kanser erken teşhis, tarama ve eğitim merkezi, 2011).



Şekil 1.4 Türkiye’de kadınlarda görülen ilk 10 kanser türü (Kanser erken teşhis, tarama ve eğitim merkezi, 2011).

İstatistiki verilerin yüksek olması ve hızla ilerleyen bir hastalık olmasına karşın 400,000’den fazla akciğer kanseri hastası bugün hala hayatlarını sürdürmektedir.

1.1.2 Kemoterapi ilaçları

Çoğu kanser türleri lokalizasyonuna ve evrelerine bağlı olarak cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi gibi uygulamalarla tedavi edilebilmektedir. Kemoterapi uygulamasında farmakolojik olarak aktif kanser ilacı tümör dokusuna düşük spesifikite ve doza bağımlı toksisitesi ile ulaşır. Klasik ilaç uygulama yolları oral ve intravenözdür. Bu metotların birkaç dezavantajı vardır. Tablet veya kapsüllerin oral alımı metabolik yollar nedeniyle düzensiz farmakokinetikle sonuçlanır. Dolayısıyla verilmesi gereken dozdan daha yüksek miktarda uygulamak gerekir, fakat bu durum da toksisitenin artmasına neden olur. İntravenöz uygulanan ilaçların da spesifikliğinin düşük olması ve sağlıklı dokulara zarar vermesi nedeniyle problem yarattığı bilinmektedir

Kanser kemoterapisindeki bir diğer problem ilaç direnç mekanizmasıdır. Tek bir ilaca karşı ortaya çıkan direnç mekanizması sonrasında hücreler bu ilaçla yapısal ve mekanik ilişkili olmayan diğer ilaçlara karşı çapraz direnç gösterebilir. Bu fenomene genellikle ATP bağımlı transporterların görev aldığı çoklu ilaç direnç mekanizması (Multiple Drug Resistance, MDR) denir. Bu mekanizma, tümörün kemoterapiden etkilenmemesine ve kaçmasına neden olur. MDR esas olarak P-glikoprotein (P-gp) adı verilen bir plazma membran proteininin aşırı ekspresyonu sonucunda gelişir. P-gp, genellikle pozitif yüklü çeşitli ksenobiyotikleri hücre dışına pompalar. Bununla birlikte MDR her zaman multifaktöryeldir, enzimatik fonksiyon modifikasyonu (topoizomeras, glutatyon-S-transferaz) veya değişen intrasellüler ilaç dağılımı gibi mekanizmalar kanser hücrelerindeki ilacı dışarı pompalayan bu sistem ile ilişki içerisindedir.

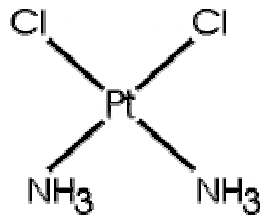
Kanser ilaçlarını birkaç yolla gruplandırmak mümkündür. Bazı kategoriler kimyasal olarak benzer ilaçları bir araya alırken bazıları ilaçların hedef aldığı hücresel fonksiyonlara göre gruplama yapar bazıları da ilaçları orijinlerine göre gruplandırır. Tablo 1.1’de kanser ilacı sınıfları ve karakteristikleri görülmektedir (Ak, 2010).

Tablo 1.1 Kanser ilacı sınıfları ve karakteristikleri (Ak, 2010)

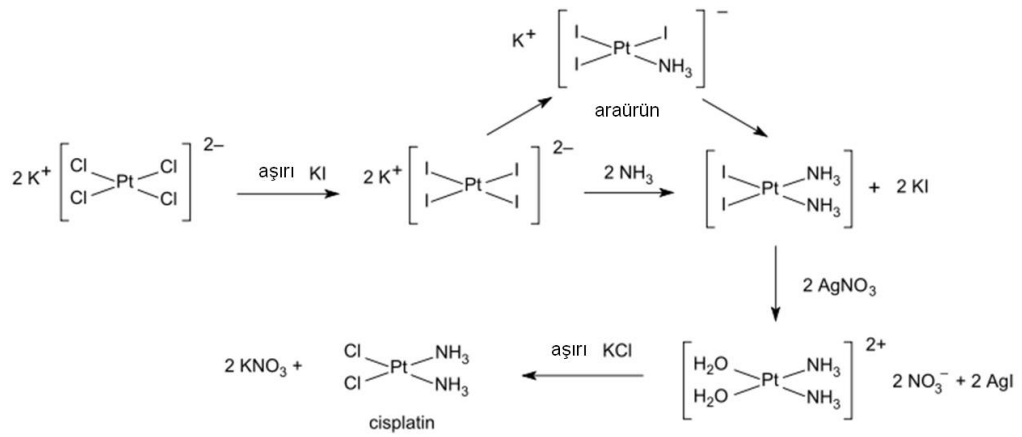
Sınıf	Karakteristik
Alkilleyici ajanlar	Benzer kimyasal yapı içerirler.
Antimetabolitler	Metabolizmayı hedef alırlar.
Doğal ve yarıdoğal ürünler	Bitkive mikroorganizma kaynaklıdır.
Hormon ve hormon antagonistleri	Hormonları taklit ederler veya onları bloke ederler.
Moleküler hedefli ajanlar	Özellikle hücrel kimyasalları hedef alırlar.
Biyolojik cevap modifiye ediciler	İmmün sistem cevabına etki ederler.
Diğer ajanlar	Çeşitli mekanizma, yapı ve kaynağa sahiptirler.

1.1.2.1 Cisplatin

Cisplatin 1965 yılında keşfedilmiş, 1969 yılında tanımlanmış ve 1970 yılında klinikte kullanılmaya başlanmıştır. Halen daha kemoterapi ajanı olarak epitelyal malignantların tedavisinde diğer sitotoksik ajanlar arasından en çok tercih edilenidir. Şekil 1.5’ te görülen cisplatin, klinikte genellikle diğer ilaçlar ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Akciğer, baş ve boyun, özafagus, mide, kolon, mesane, testis, over, serviks, uterus kanserlerinde öncelikle kullanılırken meme, pankreas, karaciğer, böbrek, prostat gibi diğer gliyoblastomalarda, metastatik melanomalarda ve peritoneal ya da plevral mezoteliyomalarda ikincil olarak tercih edilmektedir. Cisplatinin klinikteki kullanımı renal toksisite, gastrointestinal toksisite, periferik nöropati, halsizlik ve ototoksisite gibi bazı yan etkileri sebebiyle kısıtlıdır (Boulikas et al., from Missailidis 2007).

**Şekil 1.5** Cisplatinin yapısı.

Cisplatin sentezi Şekil 1.6'da görüldüğü gibi potasyum tetrakloroplatin(II)'ne doymuş potasyum iyodür eklenerek tetraiyodo analoguna dönüştürülmesiyle başlar. Potasyum tetraiyodoplatin(II)'e amonyak eklenerek cis-diaminodiiyodoplatin(II) elde edilir ve kurutulur. Ardından Cis-diaminodiiyodoplatin(II)'e sulu gümüş nitrat çözeltisi eklenerek iyodun ortamdan gümüş iyodür tuzu şeklinde uzaklaştırılması ve çıkan iyotların yerine su moleküllerinin geçmesi sağlanır. Bu formu oldukça reaktiftir ve potasyum klorür ile verdiği reaksiyon sonucu su molekülleri çıkıp yerine klor iyonları geçerken hedeflenen son ürün olan sarı renkli cis-diaminodikloroplatin(II) çökeleği elde edilir (Alderden et al., 2006).

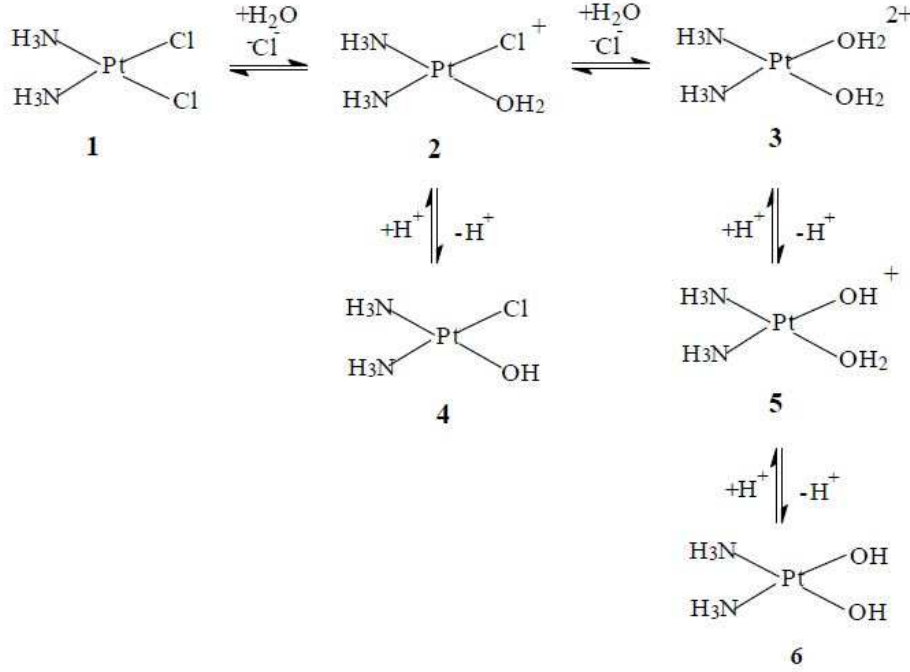


Şekil 1.6 Cisplatinin sentezi (Alderden et al., 2006).

Cisplatinin antikanser etkisini DNA ile etkileşerek ve apoptozisi uyarak gerçekleştirildiğine inanılmaktadır. Cisplatinin bir hastanın kan dolaşımına verilmesini takiben, cisplatinin klorlarının su molekülleriyle yer değiştirmesini kısıtlayan yüksek kan plazma konsantrasyonunda (100 nM) olduğu görülür. Ancak cisplatin, insan serum albumini ve sistein aminoasidi gibi tiyol grupları içeren kan plazma proteinlerince saldırıya açıktır. Gerçekte, yapılan bazı çalışmalar, kan dolaşımına verilen cisplatinin bir gün sonrasında % 65-98 oranında kan plazma proteinlerince bağlanmış olduğunu göstermiştir. Cisplatinin kan plazma proteinlerince bağlanması ilacın deaktivasyonuna ve ilacın tedavi esnasında bazı yan etkiler göstermesine sebep olmaktadır.

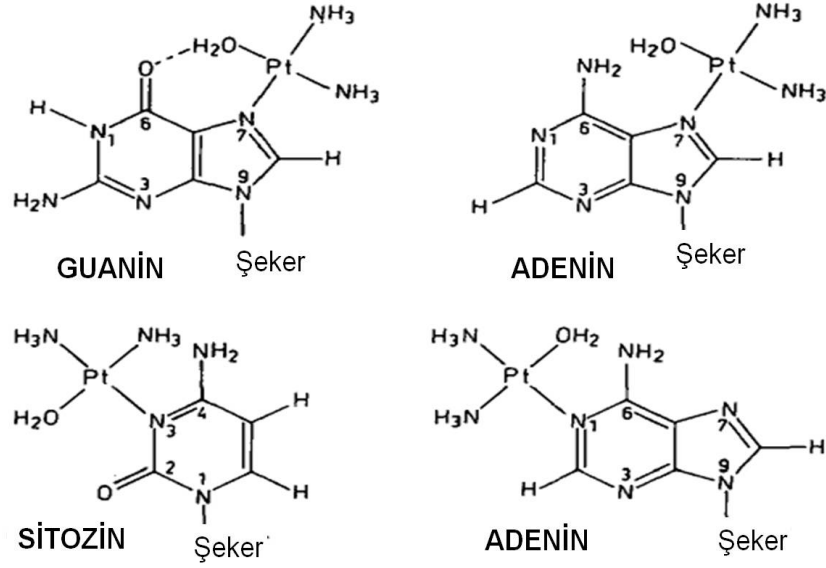
Aktif halde kalan cisplatin çoğunlukla difüzyon yoluyla tümör hücrelerine giriş yapmaktadır. Ancak son yapılan çalışmalarda cisplatinin hücre membranından Cu-taşıyıcı proteinlerce aktif transport yoluyla girdiği belirtilmektedir. İntra selüler klor iyonu konsantrasyonu (yaklaşık 4-20 mM)

göreceli olarak daha düşüktür ve bu sayede Şekil 1.7' de görüldüğü gibi cisplatinin bir klor iyonu su molekülü ile yer değiştirerek hücreden çıkışını önleyen reaktif ve pozitif yüklü formuna dönüşür (Alderden et al, 2006).



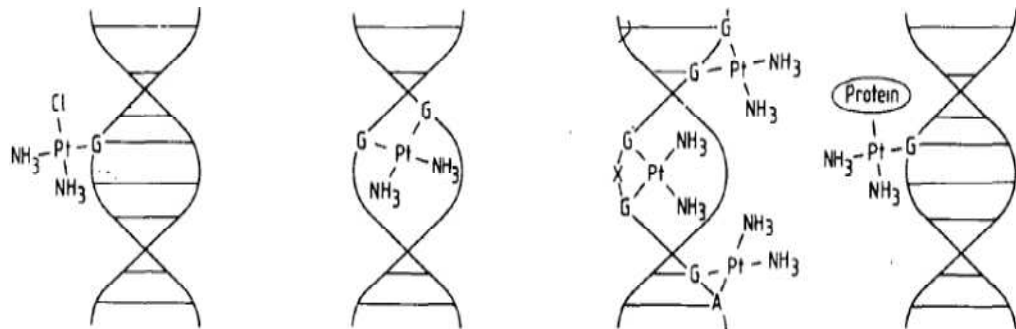
Şekil 1.7 Cisplatinin hidrolizi (Alderden et al., 2006).

In vitro çalışmalar göstermiştir ki cisplatinin tek sulu formu hücre nükleusundaki DNA ile etkileşiminden % 98 oranında sorumludur. Cisplatin hücre içine girdikten sonra DNA üzerindeki adenin; guanin ve sitozin bazları ile etkileşime girebilir. Ancak tercihen guanin bazını ve N^7 pozisyonundaki atomunu veya N^1 pozisyonundaki atomu ile etkileşir. Cisplatin DNA'nın genellikle guanin bazının N^7 pozisyonu ile etkileşerek mono fonksiyonel DNA bileşiği oluşturur.



Şekil 1.8 Cisplatinin bazlarla etkileşimi (Reedijk and Lohman., 1985).

Bifonksiyonel DNA bileşiği oluşturmak için halka kapanması direkt olarak mono - fonksiyonel bileşikten ya da cisplatinin ikinci klor ligantının su ile yerdeğiştirmesiyle ikinci reaktif ucun oluşması ve halka kapanması şeklinde iki farklı yol mevcuttur. Birincil bifonksiyonel bileşikler guanin-guanin veya adenin-guanindir ve kayda değer bir DNA bozulmasına sebep olur. Bu DNA bozulmaları DNA bağlayıcı proteinlerce tanınabilir. DNA bağlayıcı proteinler DNA hasarı tamir mekanizmasını başlatabilir veya apoptozisi başlatıcı sinyal oluşmasına sebep olabilir (Alderden et al., 2006). Cisplatinin bazlarla etkileşim şekilleri farklı olabilir. İlk reaktif ucunun bazla bağlanması ardından diğer sarmaldaki guanine, komşu guanine veya aynı sarmal üzerindeki guanine bağlanabilir (Reedijk and Lohman, 1985).



Şekil 1.9 Cisplatinin DNA etkileşim şekilleri (Reedijk and Lohman, 1985)

1.2 İlaç Taşıyıcı Sistemler Olarak Nanopartiküller

Kontrollü ilaç taşıma teknolojisi insan sağlığına katkısı olan, multidisipliner bilimsel yaklaşımı da içeren bilimin sınır alanlarından biridir. İlaç hedefleme ve kontrollü ilaç salımı, ilaçların terapötik indeksini spesifik organ, doku veya hücrelerde lokalizasyonunu arttırmak ve normal sağlıklı bölgelerdeki potansiyel toksik yan etkileri azaltmak yoluyla geliştirmeye yönelik bir yaklaşım şeklidir. Bilindiği gibi kanser terapisi alanında, kemoterapötik ajanlar tümör hücrelerine toksik etki gösterdikleri gibi normal hücrelere de toksik yan etki gösterirler. Bu tedavi edici ajanların hastalıklı bölgeye kontrollü taşınımı terapötik etkiyi artırmak amacıyla dozlarının artırılmasının önüne geçebilir. Kontrollü ilaç taşınımı, ilacın taşıyıcı sistemle etkileşmesini dolayısıyla ilacın biyodağılımını ve farmakokinetik özelliklerinin modülasyonunu kapsamaktadır. Nanopartiküller, polimerik miseller, yüzeyi modifiye edilmiş nanopartiküller ve katı lipid nanopartiküller gibi farklı nano boyutlu taşıyıcılar geliştirilmiştir ve kontrollü ilaç taşınımına yönelik olarak önerilmişlerdir. Lipozomlar ilaçları degradasyondan korumak, etki göstereceği bölgeye hedeflendirilmesi ve toksisite ya da yan etkilerin azaltılması gibi önemli avantajlarından dolayı potansiyel bir taşıyıcı olarak kullanılmasına rağmen, uygulamalarında yapısı nedeniyle düşük enkapsülasyon verimi, kan bileşenleri varlığında suda çözünebilen ilacı hızla sızdırması ve düşük depolanma stabilitesi gibi bazı problemlere sahiptir. Diğer yandan, nanopartiküllerin lipozomal taşıma sistemlerine kıyasla depolama boyunca yüksek stabilite göstermesi, in vivo uygulamadan sonra stabilitesini koruması ve üretiminin büyük çapta gerçekleştirilebilir olması gibi avantajlara sahiptir. Örneğin; ilaçların/proteinlerin stabilitesinin artırılmasına yardımcı olmaktadır ve daha uygun kontrollü salım özelliklerine sahiptirler (Jahanshahi and Babaei, 2008).

Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler serbestleştirme mekanizmalarına veya uygulama yollarına göre sınıflandırılabilirler.

Serbestleştirme mekanizmalarına göre kontrollü ilaç taşıma ve salım sistemleri;

1. Difüzyon kontrollü sistemler
 - Membran sistemler
 - Matriks sistemler
2. Kimyasal kontrollü sistemler
 - Vücutta aşınan sistemler
 - Zincire takılı sistemler
3. Çözücünün harekete geçirdiği sistemler
 - Şişme kontrollü sistemler
 - Ozmotik kontrollü sistemler
4. Diğer sistemler
 - Manyetik kontrollü sistemler
 - Ultrasonik sistemler
 - Ortama duyarlı sistemler

Uygulama yollarına göre kontrollü ilaç taşıma ve salım sistemleri;

1. Mikrokapsüller ve mikroküreler
2. Nanopartiküller
3. Lipozomlar
4. İmplantlar
5. Biyoadeziv sistemler (mukozaya yapışan sistemler)
6. Oküler sistemler
7. Transdermal sistemler
8. Nazal sistemler
9. Bukkal sistemler
10. İntrauterin sistemler
11. İntravajinal aygıtlar

olarak sınıflandırılabilir.

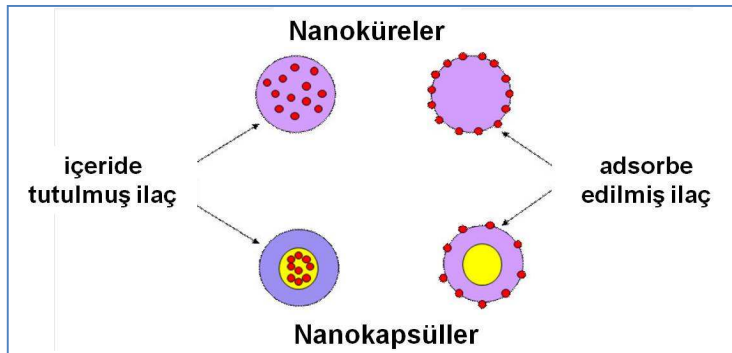
İlaç taşıma sistemlerinin geliştirilme aşamasında genellikle uygulanan bölgeden uzakta bulunan hedef bölgeye ulaşması, ilacın salınımı için yeterli

sürede hedef bölgede kalması, tercihen zaman kontrollü salım yapması, ilacın zararlı yan etkilerini sınırlandırması ve biyouyumlu olması gibi bazı parametrelerin optimizasyonuna ihtiyaç duyar. İlaç taşınımında kullanılan polimerik partiküller, katı polimerlerden yapılan kolloidal sistemler olarak tanımlanmaktadır. İntravenöz (iv) formülasyonlara duyulan ihtiyaç ve dış ortamla olan yüzey etkileşiminin artırılmasıyla salım kinetiklerinin kontrol edilmesi nanopartiküllerin geliştirilmesini teşvik etmiştir (Wang et al., 2008).

1.2.1 Nanopartiküllere genel bakış

Son yıllarda ilaçların etkin kullanımını artırmada kullanılan nanoteknoloji oldukça umut vaat etmektedir. İlaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküllerin kullanımı 1970’li yıllarda keşfedilmiştir. İlk olarak aşılarda ve kanser ilaçlarının taşınımı amacıyla mikron altı parçacıklar ($<1\mu\text{m}$) olarak tasarlanmışlardır (Jahanshahi and Babaei, 2008). Medikal uygulamalarda kullanılan nanopartikül türleri; dendrimerler, miseller, nanoküreler, nanokapsüller, fulleren ve nanotüpler, lipozomlar ve kuantum dot’lar olarak sıralanabilir (Haley and Frenkel, 2008).

Nanopartiküller, büyüklükleri 10 – 1000 nm arasında değişen, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan etken maddeyi kontrollü olarak salan katı koloidal partiküllerdir. Nanopartiküller, çoğunlukla nanoküre ve nanokapsül olarak da isimlendirilmiştir (Kaş, 2002). Hazırlanma metoduna bağlı olarak Şekil 1.10’da görüldüğü gibi nanopartiküller nanoküre ya da nanokapsül olarak elde edilebilirler. Nanokapsülde etken madde polimerik bir membran ile bir kavite içerisinde hapsedilmiştir. Nanokürede ise etken madde matriks sistem içinde homojen olarak dağıtılmıştır. Nanopartiküllerden istenen özellikler; ilacı kontrollü olarak salması, etki etmeleri istenen bölgede toplanması, stabilite sorunları olmaması, taşıyıcının fizyolojik ortamda parçalanması, parçalanma ürünlerinin toksik olmaması ve sterilize edilebilmesi olarak sıralanabilir.



Şekil 1.10 Nanopartiküller ve etken madde yükleme yolları.

İlaç taşıma sistemi olarak nanopartikül kullanımının avantajları:

1. Nanopartikül boyutu ve yüzey karakteristikleri parenteral uygulamanın ardından hem pasif ve hem de aktif ilaç hedeflenmesi için kolaylıkla kontrol edilebilir.
2. Nanopartiküller, ilacın etkinliğini artırma ve yan etkilerinin azaltılması için lokalizasyon bölgesinde ve taşınması süresince ilaç salınımını, ilacın organ dağılımındaki değişimini ve ilacın daha sonra organdan atılımını kontrol ederler.
3. Matriks bileşenlerinin uygun seçimiyle kontrollü salımı ve partikül degradasyon karakteristikleri belirlenebilir. İlaç yükleme herhangi bir kimyasal reaksiyon olmaksızın taşıyıcı sistemlere göreceli bir şekilde yüksek dozda gerçekleştirilebilir ki bu ilaç aktivitesinin korunması bakımından oldukça önemli bir faktördür.
4. Bölgeye spesifik hedefleme nanopartikül yüzeyine hedefleyici ligantların tutturulması veya manyetik alan kullanılarak gerçekleştirilebilir.
5. Nanopartiküler sistemler, oral, parenteral, nazal ve intra-oküler gibi çok çeşitli yollarla uygulanabilir.

Bu avantajlarının tersine, nanopartiküllerin kullanımında bazı kısıtlamalar mevcuttur. Örneğin; küçük partikül boyutları ve büyük yüzey alanına sahip olmaları partikül-partikül agregasyonuna neden olabilir, ve bu sebeple nanopartiküllerin kuru formları ve sıvı formdaki kullanımlarını zorlaştırır. Bunun yanı sıra, küçük partikül boyutu ve büyük yüzey alanları kısıtlı miktarda ilaç yüklenmesine ve partikülün yüzeyinde adsorblanmış olan veya enkapsüle edilen ilacın yüzeye yakın olanlarının uygulanmasının hemen ardından hızlıca salınmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle bu ve buna benzer sorunların klinik uygulamaya geçmeden ve yaygın olarak kullanılmadan önce çözülmesi gerekmektedir (Mohanraj and Chen, 2006).

Matriks materyalinin seçiminde dikkate alınması gereken temel özellikler Jahanshahi and Babaei, 2008):

- Gerekli nanopartikül boyutu

- İlacın doğasına bağlı olan suda çözünürlük ve stabilite
- Yük ve geçirgenlik gibi yüzey karakteristikleri
- Biyobozunabilme, biyouyumluluk ve toksisite dereceleri
- İstenen ilaç salım profili
- Son ürünün antijenikliği

Nanopartiküllerin hazırlanmasında, doğal ve sentetik polimerler kullanılır. Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan doğal polimerler:

- Proteinler (albümin, jelatin, legümin)
- Polisakkaritler (aljinat, kitosan,dekstran)

Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan sentetik polimerler:

• Önceden sentezlenen; polianhidrit, polikaprolakton- PECL, poli(laktik asit) – PLA, poli(laktik-ko-glikolik asit) – PLGA

• Hazırlanma sırasında sentezlenen; poli(siyanoakrilat)–PACA gibi polimerlerden faydalanılır.

Yakın zamanda peptit, protein ve nükleik asitlerin nanopartiküller ile taşınmasında polisakkaritler kullanılmaktadır. İlk nanopartiküller albumin gibi doğal ve poli(akrilamit), poli(metakrilat) gibi biyolojik olarak parçalanmayan sentetik polimerlerden hazırlanmıştır. Protein bazlı polimerlerin sakıncası antijenik yanıtlar iken, biyolojik olarak parçalanmayan sentetik polimerlerin en önemli sakıncaları ise kronik toksisite riskidir. Hazırlanma sırasında sentezlenen polimerler toksik özellikte olan monomerlerin kalabilme olasılığı nedeniyle tercih edilmezler (Peppas and Peppas; Gürsoy’dan 2002).

Nanopartikül hazırlama yöntemleri oldukça çeşitlidir ve Çizelge 1.2’ de özetlenmiştir.

Çizelge 1.2 Polimer tiplerine göre nanopartikül hazırlama yolları (Heath and Davis, 2008).

Polimer Tipi	Hazırlama Yöntemi	Etkin Madde
Hidrofilik •Albumin, jelatin •Aljinat, kitosan •Dekstran	•S/Y emülsiyonunun ısı denatürasyonu ve çapraz bağlanma •Sulu ortamda desolvasyon ve çapraz bağlama •Sulu ortamda çapraz bağlama •Organik çözücünden polimer çöktürmesi	•Hidrofilik, hidrofilik protein •Hidrofilik, protein •Hidrofilik
Hidrofobik •Poli(alkilsiyanoakrilat) (PACA) •Poliesterler (PLA, PLGA, PECL)	•Emülsiyon polimerizasyonu •Yüzeyle arası polimerizasyon •Çözücü buharlaştırılması •Çözücü yer değişimi •Tuzla çöktürme	•Hidrofilik, hidrofobik •Hidrofilik/ Hidrofobik Polar çözücülerde çözünen

Misel polimerizasyonu yönteminde, bir ilacı nanopartikül haline getirmede akrilamit gibi suda çözünen bir monomer kullanılır. Dış faz olarak da bir hidrokarbon, genellikle n-hekzan kullanılır. Yöntemin aşamaları, miselizasyon, polimerizasyon, saflaştırma ve ayırmadır. Suda çözünen polimerize edilecek olan monomerler ve kaplanacak maddeler suda çözülür. Bu çözelti, yüzey etkin maddeler yardımıyla hidrofobik fazda dağıtılır ve miseller elde edilir. Polimerizasyon başlatıcısı olarak x-ışını, IR ışını gibi bir enerji yardımıyla katı tanecikli koloidal bir sistem elde edilir. Ultrasontrifüj ile ayrılan nanopartiküller 80 – 100 nm civarında ve küreseldir. Bu yöntem fazlaca hidrokarbon ve yüzey etkin madde gerektirdiği için her türlü etkin madde ve antijen için uygun olmadığından sulu ortamda polimerizasyon yöntemi geliştirilmiştir.

Sulu ortamda polimerizasyon yönteminde, metil metakrilat sulu etken madde süspansiyonunda çözülür. Daha sonra x-ışını ile monomerler polimerize edilir ve 100 – 200 nm boyutunda partiküller elde edilir. Kreuter ve arkadaşları virüsleri bu yöntem ile nanopartiküller içine hapsetmişlerdir.

Yüzeyle arası polimerizasyon yönteminde, monomerlerin ara yüzeyde polimerleşmesi sonucu nanopartiküller oluşur. Öncelikle su/yağ emülsiyonu hazırlanır ve bu emülsiyona polimeri oluşturacak olan monomer çözeltisi eklenir. İç faz olarak metanol ve dış faz olarak yüzey etkin madde ve organik çözücü

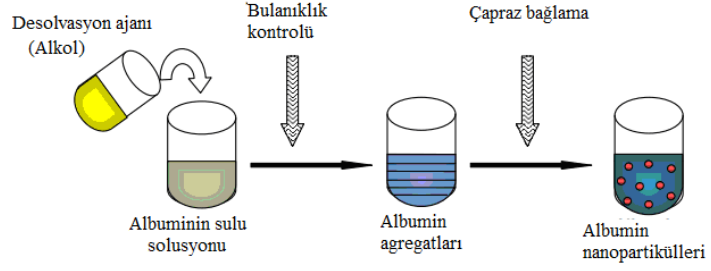
içeren emülsiyon yüksek devirde karıştırılıp monomerin organik çözücüdeki çözeltisi eklenip polimerizasyon gerçekleştirilir. Oluşan nanopartiküller santrifüj ile uzaklaştırılıp yıkanır ve liyofilize edilir.

Çözücü buharlaştırma yönteminde, polimer ve etken madde organik çözücüde çözülür. Sulu fazda çözünen süspansiyon ajanı eklendikten sonra homojenize edilir. Elde edilen su/yağ emülsiyonundan çözücü buharlaştırılır ve nanopartiküller elde edilir. Poli(laktik asit) nanopartikülleri bu yöntemle hazırlanmaya örnektir.

Su/yağ emülsiyonunda ısı denatürasyonu ve çapraz bağlanma yönteminde, protein yapıdaki polimerlerin sudaki çözeltisiyle yüzey etkin madde ve yağın organik çözücüdeki çözeltisi karıştırılıp homojenizatörde emülsifiye edilir ve su/yağ tipi emülsiyon elde edilir. Yüksek sıcaklıkta ısıtma ve çapraz bağlayıcı maddelerle sertleştirilen nanopartiküller elde edilmiş olur (Kaş; Gürsoy'dan 2002).

1.2.1.1 Desolvasyon (Koaservasyon) tekniği ile nanopartikül sentezi

Bu metotta, partiküller koaservasyon prosesi ile oluşturulur. Nanopartiküller glutaraldehit gibi çapraz bağlama ajanı ile stabilize edilmektedir. Metodun temeli, alkol ya da doğal tuzlar gibi bir desolvasyon faktörü kullanmayı içerir. Bu desolvasyon faktörünün eklenmesiyle proteinin tersiyer yapısı değişmektedir. Desolvasyonun belirli bir seviyesine ulaşıldığında protein yığınları oluşturur. Bir sonraki aşamada, nanopartiküller glutaraldehit ile çapraz bağlanmış polimer yığını oluşturur. Dağılmış nanopartikülleri bir kitle şeklinde elde etmemek için, birikmenin başlamasından önce sistemi durdurmak gereklidir. Sistem bulanıklığı desolvasyon faktörüne bağlı olarak artar. Partiküllerin birikimi sadece artan sistem bulanıklığı ile oluşur. Bu tür birikimi durdurmak için ve ideal nano - dağılım yaratmak için desolve edici bir ajan kullanmak gerekir (Pınarbaşı, 2010). Şekil 1.11'de desolvasyon (koaservasyon) metodu görülmektedir.



Şekil 1.11 Koaservasyon metodu ile albumin nanopartiküllerinin hazırlanması (Pınarbaşı, 2010).

Jelatin nanopartikülleri, non solvent olarak etanol veya aseton, salting-out ajanı olarak sodyum ya da amonyum sülfatın ilave edilmesiyle hazırlanırlar. Homojen jelatin kürelerin elde edilmesini sağlamak için iki aşamalı desolvasyon tekniği geliştirilmiştir. Birinci desolvasyon aşamasında yüksek moleküler ağırlıklı partiküller düşük moleküler ağırlıklı partiküllerden ayrılır (Zillies et al., 2008).

İki aşamalı desolvasyon ile jelatin nanopartiküllerinin hazırlanması çok düzenli ve sağlam bir tekniktir. İlk desolvasyon aşaması sonrası spesifik jelatinden nanopartiküllerin hazırlanması için daha fazla avantaja sahiptir. Stabil ve homojen nanopartiküllerin üretimi için yararlıdır.

Küçük boyutları ve gözenekli yapıları nedeniyle nanopartiküller pek çok ilacı adsorbe edebilmektedir. Taşıyıcıya adsorbe olacak ilaçlar monomerin eklenmesinden önce polimerizasyon ortamına konulabilir veya oluşan nanopartikül sistemine eklenebilir (Zwiorek, 2006).

1.2.1.2 Protein nanopartiküller

Protein nanopartiküller doğal biyolojik moleküllerden oluşturulurlar ve dolayısıyla biyouyumlu, biyobozunabilir ve non-antijenik özellikleri vardır. Çok sayıda serbest amino ve karboksilik asit grupları nanopartiküllerin yüzeyinde bulunur ve bu gruplar ya da ligantlar hücre hedeflenmesi ile fonksiyonellendirilebilir (Shruti and Banerjee, 2010).

Doğal polimerlerin kendi içlerinde oldukça fazla üstünlükleri bulunmaktadır:

- Genellikle biyolojik olarak parçalanabilir ve biyouyumlu olmaları,

- Monodispers olmaları,
- Antijenik olmaları,
- Retiküloendotelyal sisteme (RES) taşınabilir olmaları,
- Stabil olmaları,
- Suda çözünen ilaçlar için yüksek yükleme kapasitesine sahip olmaları,
- Büyüklük dağılımlarının kolay edilebiliyor olmasıdır.

Doğal polimerler, doğal olmaları nedeniyle seriden seriye tekrarlanabilirlikleri zor olmasına rağmen *in vivo* kullanım için öncelikli olarak tercih edilirler. Çünkü yaşayan organizmadan elde edilen ürünlerdir, kolay bulunabilir ve nispeten daha ucuzdurlar (Pınarbaşı, 2010).

Birçok mevcut makromolekül nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Bu makromoleküller protein yapısındadır. Tablo 1.3' te doğal makromoleküllerden nanopartikül hazırlama yöntemleri gösterilmektedir (Jahanshahi and Babaei, 2008).

Tablo 1.3 Doğal makromoleküllerden nanopartikül hazırlama yöntemleri (Jahanshahi and Babaei, 2008).

Makromolekül	Üretim prensibi
Albumin	S/Y emulsifikasyon Bir desolvasyon ajanı ekleyerek, sulu bir ortamda faz ayrılması pH'in modifikasyonu ile
Jelatin	S/Y emulsifikasyon Bir desolvasyon ajanı ekleyerek, sulu bir ortamda faz ayrılması Sıcaklığın modifikasyonu ile
Visilin, legumin	pH'in modifikasyonu ile sulu bir ortamda faz ayrılması

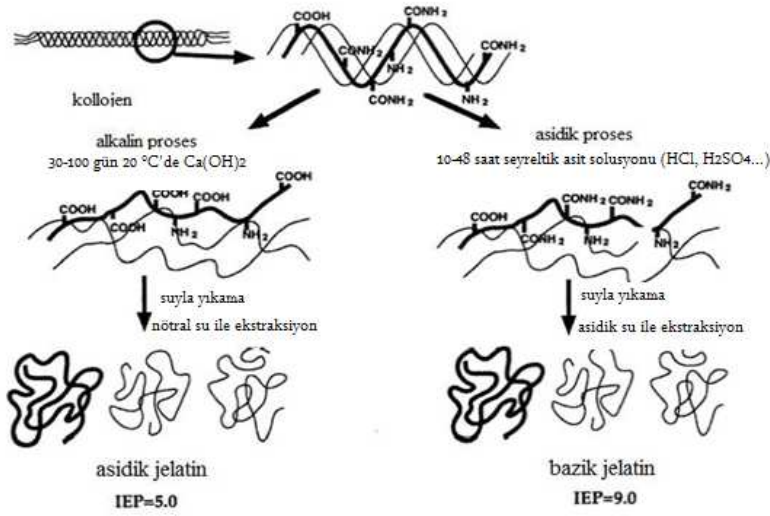
Jelatin nanopartiküller

Jelatin, termohidroliz ile kollojenden elde edilen denatüre bir proteindir. Sol-jel yapıları sıcaklıkla tersinir dönüşüm yapabilir. Jelatin gıda, ilaç kozmetik ve fotoğrafçılık endüstrisinde kullanılan önemli biyolojik polimerlerden birisidir. Ticari olarak sığır ile domuzun deri ve iskeletinden üretilir. Jelatinin kalitesi genel olarak birkaç fonksiyonel özelliği esas alınarak değerlendirilir. Memeli jelatininin sığır spongiform encophalopaty (BSE) ile kontaminasyon riski vardır. Bu nedenle balık işleme yan ürünleri kullanılarak, balık jelatini üzerinde araştırmalar, yeni yöntemlerin geliştirilmesi için önemlidir. Ayrıca balık jelatini koyu renkli ve balık kokusundadır. Bu nedenle ticari olarak nadiren kullanılır ve seri üretimi yapılmaz. Jel gücü, endüstriyel uygulamalar için jelatinin en önemli özelliğidir. Ayrıca ticari jelatinin kalitesini vizkozite, erime noktası, jelleşme noktası, çözünürlük ve bulanıklık gibi diğer özellikleri de belirlemektedir. Bu özellikler de aminoasit kompozisyonu ve zincir oranı içeriği gibi birçok faktörden etkilenir (Cho et al., 2004).

Kollojenin jelatine dönüşüm derecesi, pH, sıcaklık ve ekstraksiyon zamanının bir fonksiyonu olarak ön muamele ve sıcak su ekstraksiyon prosesi ile ilişkilendirilmiştir. Ön muamele prosedürüne bağlı olarak iki tip jelatin elde edilebilir. Bunlar, tip A jelatin (izoelektrik noktası pH:8-9) ve tip B jelatin (izoelektrik noktası pH 4-5) olup asidik ve alkali ön muamele ile elde edilirler. Kollojen ve jelatinin yüzey özellikleri, protein yan zincirinde yüklü grupların varlığına, hidrofilik ve hidrofobik aminoasitleri içeren kollojenin bazı kısımlarına bağlıdır. Hem hidrofilik hem de hidrofobik kısımların yüzeyden göçmeye eğilimi vardır. Dolayısıyla sulu sistemlerin yüzey geriliminin azalması ve dağılmış fazların bileşenleri etrafında gerekli aynı şekilde yüklü film oluşturması jel oluşumu ile güçlendirilir (Gómez-Guillén et al., 2011).

Şimdiye kadar izole edilmiş 27 kollojen tipinin arasında sadece kollojen tip 1 (cilt, tendon, kemik), tip 2 (hiyalin damarlar) ve tip 3 jelatin üretimi için kullanılmaktadır. Kullanılan kollojenin ön işlemleri ve orijinine göre iki önemli tip jelatin ticari olarak üretilmektedir. Şekil 1.12’de görüldüğü gibi jelatin tip A (asit), ekstraksiyon prosesi öncesinde asidik ön muamele ile domuz cildinden elde edilir. İkinci yaygın jelatin türü tip B (bazık) olup sığır orijinli kemikten elde edilir. Bu ekstraksiyon boyunca, asparagin ve glutaminin amid grupları karboksil gruplarına hidrolize edilmiştir. Böylece kalıntıların çoğu aspartat ve glutamata dönüşür. Sonuçta, tip A jelatinin izoelektrik noktası 9 ve molekül başına daha

fazla karboksilik gruba sahip olan tip B jelatinin izoelektrik noktası ise 5 olur (Zwiorek, 2006).



Şekil 1.12 Kollojenden asidik ve bazik jelatin hazırlama prosesi (Zwiorek, 2006).

Sentetik ve doğal makromoleküller kullanılarak biyobozunur nanopartiküller sentezlenebilir. Bu makromoleküller, serum albumin, kitosan, polisiyanoakrilat vb. olabilir. Birçok araştırmacı, ilaç salım sistemlerinin sentezinde biyomateryal olarak jelatin kullanmaktadır. Jelatin nanopartiküller hem gen salımı hem de farklı ilaçların salımında kullanılabilir (Raz'em and Katus'in-Raz'em, 2008).

Kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler olarak jelatinin kullanılması bir çok kişi tarafından araştırılmıştır. Jelatin, düşük antijenikliği ile doğal bir polimer oluşumdur. Jelatin, onaylı bir plazma genişletici ve parenteral formülasyonlar olarak yıllardır kullanılmaktadır. Buna ek olarak, jelatinin biyobozunurluğu, biyouyumluluğu, non-toksitesisi, kimyasal modifikasyonunun kolaylığı ve çapraz bağlanabilirliği onu umut verici bir taşıyıcı sistem yapmaktadır. Jelatin, glisin, prolin ve alaninin yüksek konsantrasyonunu içerir. Ve bunların tekrar dizilerinden oluşurlar. Ticari jelatin polipeptid zincirlerin heterojen protein karışımıdır. Birkaç yüz bin ile birkaç bin arasında değişen geniş bir moleküler ağırlık aralığına sahiptirler. Jelatinin primer yapısı kovalent ilaç bağlanması ve kimyasal modifikasyon gibi pek çok olanak sağlamaktadır. Bu modifikasyonlar özellikle hedeflenen bölgeye ilaç taşınımını geliştirmek için kullanışlı olabilir. İlaç hedeflendirilmesi için, jelatin nanopartiküllerinin yüzeyinde ya da matriksi içinde çalışılabilir. Matriks içinde çalışılacaksa, kimyasal modifikasyonların

nanopartiküller oluşturulmadan önce jelatin makromoleküllere uygulanması gerekir (Ofakansi et al., 2010).

1.2.2 Nanopartiküllerin karakterizasyonu

1.2.2.1 Etken madde salımı

Nanopartiküllerden ilaç salımı sızma, aşınma, kopma, parçalanma ve difüzyon mekanizmalarıyla olmaktadır. Difüzyon mekanizması hariç diğer tüm mekanizmalar kontrollü salım sağlar. Difüzyon mesafesi partikül boyutu nedeniyle çok kısa olduğundan bu mekanizmayla salım sağlayan sistemler kontrollü ve sürekli salım göstermezler.

1.2.2.2 Degradasyon

Nanopartiküllerden ilaç polimerin degradasyonu ile salınır. Bu nedenle ilaç salım kinetiği, polimer degradasyonu ile karşılaştırılır. Degradasyon hızları alkil zincir uzunluğuna dayanmaktadır. Polimer yüzeyinden olan degradasyon kimyasal ve enzimatik olabilmektedir. *In vitro* degradasyon ester fonksiyonlarının hidrolizi ile kimyasal yol izlemekte ve formaldehit ile siyanoasetat oluşumuna neden olabilmektedir. Fizyolojik koşullarda ise akrilatlar enzimatik işlem ile degrade olurlar.

1.2.2.3 Sterilizasyon

Parenteral amaçla kullanılacak nanopartiküllerin steril olmaları gerekir. Bu nedenle nanopartiküller, steril filtrasyon ile, otoklavda 121°C’de 15-20 dakika veya γ -radyasyonuyla sterilize edilebilir. Bazı araştırmacılara göre işlemin boyut, yapı ve molekül ağırlığında değişikliklere neden olduğu gösterilirken, bazıları ise herhangi bir değişiklik saptanmadığını göstermiştir. Sterilizasyon işleminde polimerin yapısına göre en uygun yöntemin seçilmesi gerektiğine dikkat edilmelidir (Kaş; Gürsoy’dan 2002).

1.2.2.4 Partikül büyüklüğü

10 – 1000 nm arasında partikül boyutuna sahip olan nanopartiküllerde partikül büyüklüğünü saptamak amacıyla çeşitli metotlar geliştirilmiştir:

- ***Light Scattering (LS)***

Foton korelasyon spektroskopisi olarak da bilinmektedir. Ortalama boyutu, boyut dağılımını ve polidispersite indeksini kısa sürede belirlemeye yarayan bir metottur. Işığın genellikle 90° lik açıyla nanopartikül ile etkileşiminden partikül boyutu saptanmaktadır. Ancak yine de doğru bir boyut ölçümü için başka açılarla da denenmesi gerektiği önerilir. Bu yöntem pH, viskozite, sıcaklık ve partikül sedimentasyonundan etkilenmektedir. Ayrıca nanopartikülün agregasyonu ile ortalama boyut daha büyük olarak ölçülür. 50 nm ila $1\mu\text{m}$ arasındaki partikül boyutu ölçümleri için uygundur. İndirekt bir metottur (Gaumet et al., 2008).

- ***Laser Light Diffraction (LLD)***

Partikül boyutu $1\mu\text{m}$ 'den büyük örneklerin karakterizasyonu bu yöntemle yapılabilir. 1 – 1000 μm arasındaki partikül boyutları için uygundur. İki önemli kısıtlaması vardır. Bunlardan ilki fazla miktarda örnek gerektirmesi ve ikincisi 500 nm'den daha küçük partikül boyutlarını ölçemez. İndirekt bir metottur (Gaumet et al., 2008).

- ***Scanning Electron Microscopy (SEM)***

SEM, 50 nm -100 μm boyutundaki örnekler için uygun bir yöntemdir. Örnek kurutulduktan sonra ince bir tabaka halinde altın veya platin ile kaplanarak mikroskopik olarak görüntülenir ve boyutları ölçülebilir. Bu yöntemle 3 – 5 nm'ye kadar çözünürlük sağlanarak düzgün görüntü elde edilebilir hatta daha gelişmiş olanları ile çözünürlük 1 nm'ye kadar düşmektedir (Gaumet et al., 2008).

- ***Transmission Electron Microscopy (TEM)***

Mikroskopik bir yöntemdir. Partikül boyutu 50 nm – 100 μm olan örnekler için uygundur. Örneğe göre farklı hazırlama metotları mevcuttur (Gaumet et al., 2008).

- ***Atomic Force Microscopy (AFM)***

Sulu ve yarı iletken örnek piezoelektrik ucun bulunduğu keskin bir metal uç ile boyut ve şekli belirlenebilir. Metal uç örneğin yüzeyini tarar ve arkasında

bulunan bir lazer sistemi ile yüzeydeki saptmaları belirleyebilir. Boyut çözünürlüğü >1 nm'dir. Bu yöntemin dezavantajı ucun, örneğin dış bükey topografisini belirleyememesidir. Ancak bu durumda tapping (itme ve çekme) moduyla örneklerin çapları ve şekilleri belirlenebilir. 10 nm – 1 µm boyutundaki örnekler için uygun bir yöntemdir (Duclaoir and Nakache, 2002).

Bu metotlar nanopartiküllerin boyutlarının belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan metotlardır. Ancak bu metotların dışında analitik ultrasantrifüj, alan akış fraksiyonlama, kapiler elektroforezi, dolgulu kolon hidrodinamiği, jel geçirgelik kromatografisi metotları da kullanılmaktadır (Gaumet et al., 2008).

1.2.3 Nanopartiküllere ilaç yüklenmesi

Başarılı bir nano taşıyıcı sistem yüksek bir ilaç yükleme kapasitesine sahip olmalıdır, dolayısıyla dolaşım sistemi için matriks materyali miktarını düşürebilmelidir. İlaç yükleme iki metot ile gerçekleştirilebilir. Enkapsülasyon metodu ilacın nanopartikül sentezi sırasında ortama eklenmesini gerektirmektedir. Adsorpsiyon metodunda nanopartikül sentezi sonrasında ilacın yüklenmesi gerekmektedir. Bu metotta nano taşıyıcı konsantre ilaç çözeltisinde inkübe edilmektedir. İlaç yükleme ve tutuklanma verimi, ilacın matriks materyalindeki (katı polimer ya da sıvı dispersiyon ajanı) matriks kompozisyonu, moleküler kütlesi, ilaç – polimer etkileşimi ve ilacın ya da matriksin fonksiyonel gruplarının (ester ya da karboksil grubu gibi) varlığına bağlı olan çözünürlüğüne bağlıdır.

Ayrıca, nanopartikül içerisine enkapsüle edilen makromoleküller, ilaçlar ya da proteinler izoelektrik noktalarına yakın pH'larda yüksek ilaç yükleme kapasitesi göstermektedirler. Çalışmalar göstermiştir ki, küçük moleküller, ilaç ve matriks materyalleri arasındaki iyonik etkileşimler kullanılarak ilaç yükleme verimi arttırılabilmektedir (Shing and Lillard, 2009).

1.2.3.1 Adsorpsiyon tekniği

Bir iyonun ya da molekülün, başka bir fazın yüzeyinde ya da boşluklarında yoğunlaşmasına, yani, birikmesine adsorplama denir. Birikim gösteren maddeye adsorbat, adsorplayan katıya da adsorbant denir. Sıvıların, bir katının yüzeyindeki mikro ya da nano çatlaklarda ve gözeneklerde yoğunlaşmasına kılcal adsorplama denir. Çözelti içerisindeki kirleticinin adsorplanması, adsorbe olacak maddenin çözelti içerisindeki konsantrasyonuna bağlıdır. Bunun yanında sıcaklık, pH,

adsorbant madde miktarı ve karışım hızı gibi etkenler de adsorplama olayını etkileyen faktörlerden bazılarıdır.

Adsorplama tipinin belirlenmesinde etkili olan faktörler, elektriksel çekim, Van der Waals etkileşmesi ve kimyasal yapıdır. Adsorbant ve adsorbat arasındaki etkileşmeye bakarak, adsorblama tipinin değişim, fiziksel veya kimyasal olduğundan bahsedilebilir.

Değişim Adsorplama

Değişim adsorplaması, iyon değiştirmeye dayanan adsorblama tipidir. Adından da anlaşılacağı gibi, bir maddenin iyonlarının, diğer maddenin yüzeyindeki yüklü alanlara doğru elektrostatik çekim sonucu birikmesidir. Değişim adsorblaması, adsorbat ile adsorbant yüzeyi arasındaki elektriksel çekim kuvvetinden dolayı gerçekleştiği için elektrik yükü fazla olan iyonlar ve küçük boyutlu iyonlar daha iyi adsorbe olurlar.

Fiziksel Adsorplama

Fiziksel adsorplama, adsorplanan madde ile adsorplayan madde arasındaki van der Waals etkileşmesinden kaynaklanır. Van der Waals kuvveti, birbiri ile kimyasal bir reaksiyona girmeyen atomlar için çekici bir kuvvettir. Adsorbe olan molekül, katı yüzeyinin belirli bir yerine bağlanmamıştır ve yüzey üzerinde hareketli durumdadır. Bu kuvvetler uzun mesafede etkili olmalarına rağmen zayıftırlar. Bu nedenle, fiziksel adsorblamada, adsorbant yüzeyine bağlanan molekülün ya da iyonun yapısı değişmez ve adsorblama geri dönüşümlüdür.

Kimyasal Adsorplama

Kimyasal adsorplamada, adsorbant ile adsorbat arasında kimyasal bağlanma olur. Bu bağ genelde non - kovalent bağdır. Kimyasal adsorblama genelde yüksek sıcaklıklarda meydana gelir ve yüzeyde moleküllerin bağlanacağı yer kalmayınca adsorblama durur. Genelde tersinir bir adsorblama çeşidi değildir.

Adsorpsiyon kinetiği

Adsorblama kinetiğinin anlaşılması ile etkin adsorbat-adsorbant temas süresi yani alıkoyma süresi bulunur. Adsorblama işleminin hızına etki eden

adsorblama basamaklarının anlasılması için önemli bir adımdır. Bir çözeltide bulunan adsorbatın adsorbant tarafından adsorblanması işleminde dört ana basamak vardır:

1.Gaz ya da sıvı fazda bulunan adsorbat, adsorbantı kapsayan bir film tabakası sınırına doğru difüzenir. Bu basamak, adsorblama düzeneğinde belirli bir hareketlilik (karıştırma) olduğu için çoğunlukla ihmal edilir.

2.Film tabakasına gelen adsorbat buradaki durgun kısımdan geçerek adsorbantın gözeneklerine doğru ilerler.

3.Sonra adsorbantın gözenek boşluklarında hareket ederek adsorblamanın meydana geleceği yüzeye doğru ilerler.

4.En son olarak da adsorbatın, adsorbantın gözenek yüzeyine tutunması meydana gelir.

Adsorpsiyon kinetiği hesaplamada kullanılan eşitlikler aşağıdaki gibidir;

$$K_c = C_A / C_e \quad (1)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_c \quad (2)$$

$$\log K_c = (\Delta S^\circ / 2,303R) - (\Delta H^\circ / 2,303 RT) \quad (3)$$

$$\Delta H^\circ = \Delta G^\circ + T\Delta S^\circ \quad (4)$$

K_c = Denge sabiti,

C_e = Çözeltideki denge konsantrasyonu (mg/l)

C_{Ae} = Dengedeki katı faz konsantrasyonu (mg/l)'dur.

ΔG° , ΔH° ve ΔS° : Sırasıyla serbest enerji, entalpi ve entropidir (Pehlivan, 2010).

Adsorpsiyon izotermi

Adsorblama sırasında çözelti belli bir miktardaki adsorbant ile temas ettirildiğinde, çözeltide adsorblanan maddenin konsantrasyonu, adsorblayıcı madde üzerindeki konsantrasyonla dengeye gelene kadar azalır. Adsorblama dengesi kurulduktan sonra, adsorblanan maddenin çözelti fazındaki konsantrasyonu sabit kalır. Bir adsorbant ile adsorbe edilen madde miktarı, çözelti içerisindeki adsorbatın konsantrasyonu olarak saptanır. Sabit sıcaklıkta, denge durumunda çözeltide kalan adsorbat konsantrasyonuna karşı, birim adsorbant da adsorbe edilen madde miktarı grafiğe geçirilerek adsorblama izotermi denilen bir fonksiyon elde edilir. Adsorblama izotermelerini matematiksel olarak ifade eden birçok model ortaya konulmuştur. Bir adsorblamanın hangi izoterme daha uygun olduğunu bulmak için verilen tüm izoterm denklemlerine uygulanır. Elde edilen verilerin doğrusal bir grafik oluşturması izoterm çeşidi hakkında bilgi sahibi olmamızı kolaylaştırır. Elde edilen eğrinin R^2 'si 1'e en yakın olan o adsorblama için en uygun izotermidir. Adsorblama işlemini daha etkin ve az maliyetli bir hale getirmek için bir çok araştırmacı ucuz ve yenilenebilir adsorbantlar bulmaya çalışmaktadırlar. Adsorblama, adsorbant yüzeyinde biriken madde konsantrasyonu ve çözeltide kalan madde konsantrasyonu arasında bir denge oluşuncaya kadar devam eder. Matematiksel olarak bu denge, adsorblama izotermi ile açıklanmaktadır. Çözeltiler için konsantrasyon kütle birimleri olarak verilir (mg/L, ppm v.s.) (Karaboyacı, 2010) .

Freundlich izotermi

En genel kullanım gören izotermi birisi Freundlich izotermidir. Freundlich'e göre bir adsorbantın yüzeyi üzerinde bulunan adsorblama alanları heterojendir yani farklı türdeki adsorblama alanlarından teskil edilmistir. Freundlich, çözeltilerin adsorblanmasını açıklamak için aşağıdaki esitliği türetmiştir.

$$q_e = K_F C_e^{1/n}$$

Bu denklemde,

C_e = Adsorblama sonrası çözeltide kalan maddenin konsantrasyonu (mg/dm³).

q_e = Birim adsorbant üzerine adsorblanan madde miktarı (mg/g).

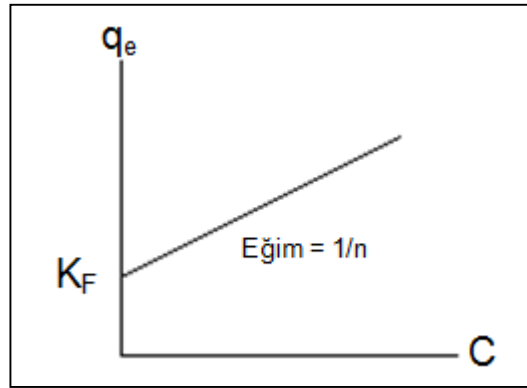
K_F = Adsorblama kapasitesi (deneysel olarak hesaplanır).

n = Adsorblama yoğunluğu.

Freundlich izoterm denkleminde eşitliğin her iki yanının da logaritmasını alarak doğrusal hale getirirsek;

$$\log q_e = \log K_F + 1/n \log C_e$$

ifadesi elde edilir. Log q_e 'nin log C_e 'ye karşı değişimi grafiğe geçirilirse K_F ve n sabitleri bulunur. Genel olarak Freundlich modeli kirletici derişimi arttıkça, dengede adsorblanan miktarların arttığı, heterojen yüzeylerdeki adsorblamayı ifade eden daha gerçekçi bir modeldir. Şekil 1.13'te temsili Freundlich izotermi görülmektedir(Karaboyacı, 2010) .



Şekil 1.13 Freunlich izotermi.

Langmuir izotermi

Langmuir modeline göre, adsorblanan moleküller adsorbantın yüzeyinde doymuş tek bir tabaka oluşturur ve maksimum adsorblama, adsorbant yüzeyine bağlanan moleküllerin hiçbirinin hareket etmediği ve doymuş bir tabaka oluşturduğu andaki adsorblamadır. Ayrıca, adsorblama hızı, adsorblanan maddenin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Langmuir modeli şu denklemle ifade edilir.

$$Q_e = (Q_{\max} a_L C_e) / (1 + a_L C_e) \quad \text{ya da} \quad q_e = (K_L C_e) / (1 + a_L C_e)$$

Bu denklemde,

C_e = Adsorblama sonrası çözeltide kalan maddenin konsantrasyonu (mg/dm^3)

q_e = Birim adsorbant üzerine adsorblanan madde miktarı (mg/g)

K_L = Adsorbata bağlı sabit (dm^3/g).

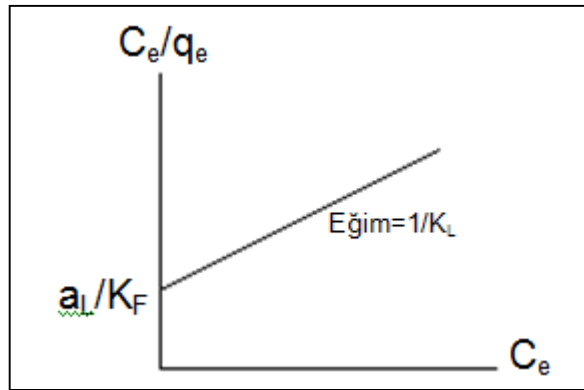
a_L = Adsorblama enerjisine bağlı olan sabit (dm^3/mg).

$Q_{\max}$ = Tek tabakalı adsorbant kapasitesi (mg/L).

C_e/q_e değerinin, C_e değerine göre değişimi grafiğe çizilmesiyle ortaya çıkan doğrunun eğimi ve kesim noktası sırasıyla a_L/K_L ve $1/K_L$ sabitlerinin değerini verir. Burada $Q_{\max}$ değeri adsorbantın maksimum adsorblama kapasitesini verecektir. Özellikle tek tabakalı adsorblamanın meydana geldiği heterojen adsorblama sistemlerinde bu izoterm denge durumunu net olarak açıklayamaz. Adsorblamanın elverişliliğini bulmak için boyutsuz R_L (dağılıma) sabiti hesaplanır ve bu sabitin 0 ile 1 arasında değerler alması elverişlilik durumunun sağlandığını gösterir. Şekil 1.14'te temsili Langmiur izotermi görülmektedir.

$$R_L = 1 / (1 + a_L C_0)$$

Burada, C_0 maddenin çözeltideki başlangıç derisimidir (Karaboyacı, 2010).



Şekil 1.14 Langmiur izotermi

Temkin izotermi

Adsorblama izotermlerinden bir diğeri de Temkin adsorblama izotermidir. Bu izoterm, adsorbe olan maddeler arasındaki etkileşimleri göz önüne almaktadır.

Çözelti içerisindeki tüm moleküllerin adsorblama ısısı dikkate alınarak gelistirilmiştir. Temkin izotermini ifade eden esitlik aşağıda gösterildiği gibidir.

$$q_e = (RT/b) \ln(a_T C_e) \quad (1)$$

$$q_e = (RT/b) \ln a_T + (RT/b) C_e \quad (2)$$

$$q_e = K_T \ln a_T + K_T C_e \quad (3)$$

Bu denklemde,

R = gaz sabiti (J/mol K).

T = sıcaklık (K).

a_T = Toth sabiti (L/g).

q_e değerleri, $\ln C_e$ 'ye göre grafiği çizilirse elde edilen doğrudan a_T ve K_T sabitleri bulunur (Karaboyacı, 2010) .

BET izotermini

BET izotermini, adsorbantın, yüzeyde birden fazla tabaka oluşturduğunu varsaymaktadır ve bu açıdan Langmuir izoterminin her bir tabakaya uygulanmış şeklidir. Çok tabakalı adsorblamanın açıklanabilmesi için, Langmuir izotermine göre daha kullanışlıdır. BET modeli, diğer bir tabakanın adsorblamaya başlaması için bir öncekinin tamamen dolmasının gerekmediğini kabul eder. Ayrıca her bir tabakada eşit adsorblamanın olduğunu kabul eder. BET izotermini şu şekilde verilebilir.

$$q_e = (KC_e b) / (C_s - C_e) [1 + (K-1)(C_e / C_s)] \quad (1)$$

Bu denklemi doğrusal hale getirirsek;

$$C_e / (C_e / C_s)q_e = 1 / K_b + (K - 1)C_e / K_b C_s \quad (2)$$

denklemi elde edilir. Burada;

C_e = Adsorblama sonrası çözeltide kalan maddenin konsantrasyonu (mg/dm³)

q_e = Birim adsorbant üzerine adsorblanan madde miktarı (mg/g)

K = Enerji ile ilgili sabit (dm³/mg).

b = Birim adsorbant üzerinde tutulan maksimum madde ağırlığı

C_s = Çözeltinin doygunluk konsantrasyonu (mg/dm³).

Burada, C_e/C_s 'ye karşılık $C_e/(C_s - C_e)q_e$ grafiği çizilirse, grafiğin eğimi

$(K-1)/K.b$ ve kesim noktası da $1/K.b$ olur. Buradan K ve b sabitleri bulunabilir (Karaboyacı, 2010).

Redlich-Peterson izotermi

Diğer modellere uygunluk göstermeyen adsorblama modelleri için üretilmiş üç parametrelili bir izotermidir. Matematiksel olarak aşağıda gösterildiği gibidir (Karaboyacı, 2010).

$$Q_e = (K C_e) / (1 + a C_e^b) \quad (1)$$

Burada, $\hat{a}$, 0 ile 1 arası değerler alır. $\hat{a} = 1$ ise denklemi şu şekilde yazabiliriz.

$$q_e = (K C_e) / (1 + a C_e) \quad (2)$$

Eğer $\hat{a} = 0$ ise denklem Henry Kanununa dönüşür.

$$q_e = (K C_e) / (1 + a) \quad (3)$$

C_e = Adsorblama sonrası çözeltide kalan maddenin konsantrasyonu (mg/dm³).

q_e = Birim adsorbant üzerine adsorblanan madde miktarı (mg/g).

K = Redlich-Peterson adsorblama sabiti (L/g).

a = Redlich-Peterson adsorblama sabiti (Lâ/mgâ).

$\hat{a}$ = Redlich-Peterson üsseli ($0 \leq \hat{a} \leq 1$).

Dubinin-Radushkevich izotermi

Diğer izotermilerin çoğunda elde edilen sabitler, adsorblamanın fiziksel ve kimyasal özellikleri hakkında bilgi vermezler. Fakat D-R izoterminden hesaplanan ortalama adsorblama enerjisi, adsorblamanın fiziksel ve kimyasal özellikleri hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar.

Bu izoterm homojen bir yüzey ve sabit bir adsorblama potansiyeli temeline dayanmaz. D-R izotermi aynı tip gözenekli yapılarda gerçekleşen adsorblama işlemlerini açıklamada kullanılır. Matematiksel olarak aşağıda gösterildiği gibi ifade edilir.

$$\ln q_e = \ln q_m - k \epsilon^2$$

Denklemden $\hat{a} = RT \ln (1 + 1/C_e)$ olarak ifade edilebilir. Bu denklemden,

C_e = Adsorblama sonrası çözeltide kalan maddenin konsantrasyonu (mg/dm³).

q_e = Birim adsorbant üzerine adsorblanan madde miktarı (mg/g).

$\hat{a}$ = polanyi potansiyeli

q_m = Adsorbantın maksimum kapasitesi

k = D-R izotermi sabiti

R = evrensel gaz sabiti (8,314.10⁻³ kJ/mol.K)

T = sıcaklık (K).

$\ln q_e'$ ye karşılık d^2 grafiği çizilirse, k ve q_m değerleri hesaplanabilir. Bu izotermden elde ile k sabiti kullanılarak ortalama adsorblama enerjisi bulunabilir.

$$E = (2k)^{1/2}$$

Bulunacak olan enerji değerinin 8-16 kJmol⁻¹ değerleri arasında yer alması adsorblamanın genel olarak iyon değişimi ile olduğu anlamına gelir. Enerjinin 8,4 kJ/mol'den küçük olması durumunda, adsorblama fiziksel etkileşmeler ile açıklanabilir. Bunun tersine, enerji değeri 8,4 kJ/mol'den daha büyük ise, adsorblama mekanizması kimyasal etkileşmeler ile açıklanabilir (Karaboyacı, 2010).

Toth izotermi

Langmuir denkleminden türetilmiş bir izotermdir. Aşağıdaki şekilde matematiksel olarak ifade edilebilir.

$$q_e = q_m C_e (b_T + C_e^{nT})^{-1/nT}$$

Bu denklemde, b_T , Toth izoterm sabitidir. n , ise Toth izoterm üstelidir ve 0 ile 1 arası değerler alır. Eğer $n = 1$ ise, izoterm, Langmuir izotermine dönüşür (Karaboyacı, 2010).

1.3 Nanotaşıyıcıların Kanserli Bölgeye Hedeflendirilmesi

1.3.1 Pasif hedeflendirme

Pasif hedefleme, gereken boyuttaki nanopartiküller ve tümör anjiyogenezinin özellikleri, artan geçirgenlik ve alıkonma etkisi (Enhanced permeability and retention effect, EPR effect) ile tümör mikro çevresinin özellikleri dikkate alınarak gerçekleştirilir. EPR etkisi sadece kanserde değil kronik inflamasyon ve enfeksiyon gibi diğer hastalıklarda da görülebilmektedir. Pasif hedeflendirmede tümör ilacı veya nanopartikül hücreye basit difüzyon yolu ile girmektedir.

Tümör büyümesi için anjiyogenez oldukça önemlidir. Tümör dokularındaki anjiyogenik kan damarları, normal dokulardakinden farklı olarak, komşu endotelial hücreler arasında 600 – 800 nm boyutunda boşluklara sahiptir. Bu

defektif damar yapıları zayıf lenfatik drenaj nedeniyle iki kat defektif özellik kazanarak, nanopartiküllerin bu boşluklardan ekstra vasküler alanlara girişine ve tümör dokularının içinde birikmesine olanak sağlayarak EPR etkisini indükler (Mohanraj and Chen, 2006).

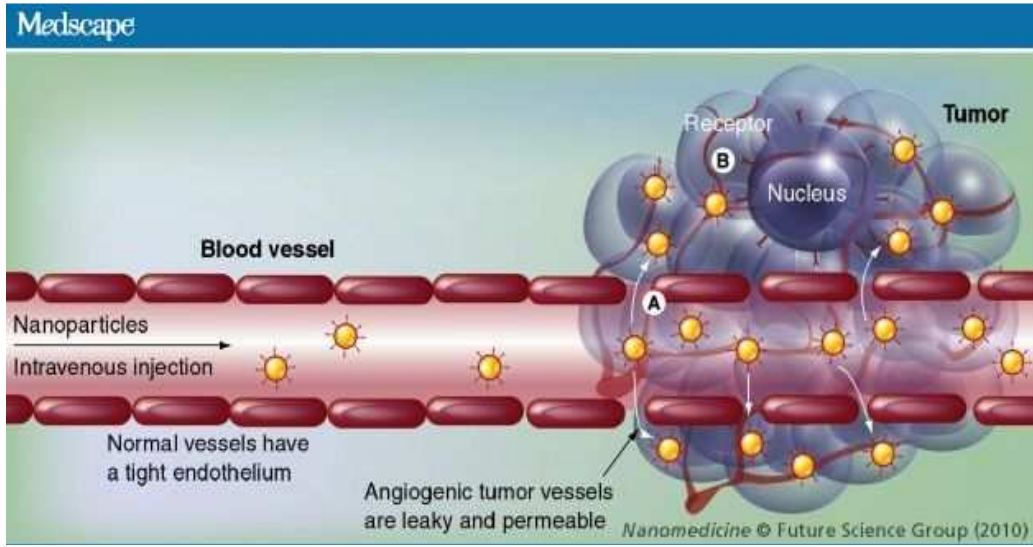
Pasif hedeflemede spesifik uyarı duyarlı dağıtım sistemi kullanımı yolu ile enkapsüle edilmiş veya adsorplanmış antikanser ajanı spesifik uyarıda nanopartikülden salınabilir. Örneğin, vücutta tümörlü veya diğer hipoksik hastalıklı dokularda pH ~ 5,5 – 6,5 aralığında olup sağlıklı dokuya kıyasla daha asidiktir. pH duyarlı nanopartikül sistemi ile antikanser içeriğinin hedef dokuda salınımı gerçekleştirilebilir (Ganta et al., 2008).

Pasif hedeflemenin daha ileri uygulamalarında nano taşıyıcıların boyutu ve yüzey yükü modülasyonundan faydalanılabilir. Çapı <200 nm olan nanopartiküllerin ve yüzey yükü pozitif olan nanopartiküllerin tümörlü dokuda daha fazla birikme eğiliminde olduğu ve tümörlü dokuda kalım süresinin nötral yüklü ya da negatif yüklü nanopartiküllere göre daha uzun olduğu bilinmektedir.

Tümör ilacının serbest ilaç formuna göre genellikle en az 10 – 100 kat daha fazla tümörlü dokuda birikimi, ilacın nanopartiküllere yüklenmesi ve tümörlü dokudaki EPR etkisi ile gerçekleştirilebilir. Ancak, nanopartiküllerin tümör dokusundaki birikimi homojen değildir. Nanopartiküllerin tümör dokusunun bir bölgesinde yüksek konsantrasyonlarda, diğer bölgesinde ise az birikmesinin sebebi henüz tam anlamıyla anlaşılamamıştır. Genellikle, tümörlerde nanopartikülün birikimi, partikül boyutu, yüzey karakteristikleri ve dolaşım yarı ömrü ile tümörün anjiyogenez derecesine bağlıdır. Çoğunlukla az nanopartikül birikimi preanjiyogenik veya nekrotik tümörlerde görülmektedir.

Pasif hedeflemede, nanopartiküller hedef hastalıklı organ veya dokuya taşındığında, ilgilenilen hücreye girmeleri ve sub-selüler organellere taşıdıkları antikanser ajanını salmaları gerekmektedir. Bu amaçla, spesifik ya da non-spesifik hücre içine giriş stratejileri seçilmelidir. Nano taşıyıcıların non-spesifik olarak hücre içine alınmaları hücre içinde nanopartiküllerin membran tarafından etrafında zarf oluşturmasıyla endozom adı verilen vezikül oluşturan endositotik proses ile gerçekleşir. Endozomlar içeriklerini, hayli asidik bir organel olan ve degrade edici enzimlerce zengin olan lizozimlere taşır. Endositoz edilen nano taşıyıcılar genellikle spesifik bir yönde ilerlerler ve nukleus membranı ile

birleşirler (Ganta et al., 2008). Şekil 1.15'te pasif hedeflendirme ile tümörlü dokuya nanopartiküllerin nasıl ulaştığı gösterilmektedir.



Şekil 1.15 Pasif hedefleme.

1.3.1.1 Tümör mikroçevresi

Hiper proliferatif kanser hücreleri, onları çevreleyen mikro çevreyi oldukça etkiler. Tümörler ekstra enerji elde edebilmek için glikolizi kullanmaya (hipoksik metabolizma) adapte olmak zorundadırlar ve bu asidik bir mikro çevreye sebep olur. Bunun yanı sıra, kanser hücreleri over eksprese olur ve tümör göçü, invazyon ve metastaz için çok önemli olan matriks metaloproteazları da dahil olmak üzere bazı enzimler salgırlar.

1.3.1.2 EPR (Enhanced Permeability and Retention) etkisi

Pek çok polimerik nanopartikül, EPR etkisinden faydalanmaktadır. EPR etkisi iki temel faktöre dayanmaktadır:

- Malignant dokudaki kapiler endotelyum normal dokudaki kapiler endotelyuma göre daha düzensiz bir yapıdadır ve makromoleküllere karşı daha geçirgendir. Bu türden bir yapılanma polimerik nanopartiküllerin tümörlü dokunun içerisine veziküler taşınımına olanak sağlar.
- Tümörlü dokunun lenfatik drenajının zayıflığı da nanopartiküler ilaç formunun birikimine neden olmaktadır. Eğer uygun kemoterapötik ajan uygun bir polimer ya da moleküler taşıyıcıya bağlanıp degrade edilebilirse, bu tip taşıyıcılar kemoterapötik ajanın tümörlü dokuda

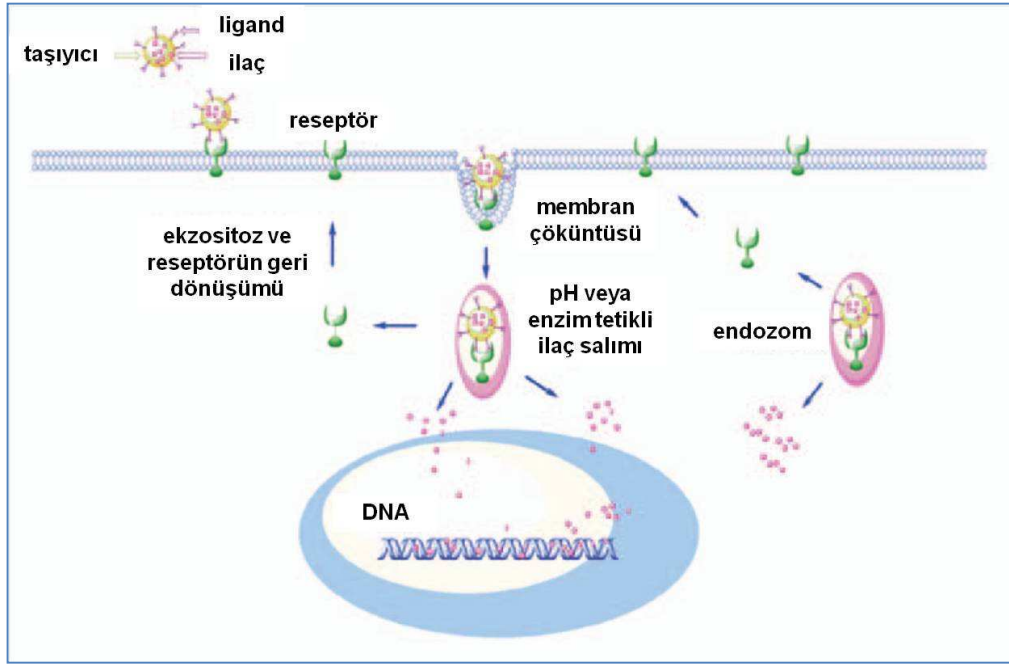
konsantrasyonlarının artırılması potansiyeline sahip olabilirler (Sinha et al., 2006).

1.3.2 Aktif hedeflendirme

Pasif hedeflendirmeye alternatif olarak, hedefleyici bir ligant ya da antikoron nanopartiküle konjuge edilmesi mümkündür. Sadece tümör yüzeyinde eksprese edilen veya tümörlü dokuda daha fazla eksprese edilen ligant veya reseptörün hedeflendirici molekül olarak nanopartikülle konjugasyonu ile ligant hedefli bu yaklaşımın kanser ilaçlarının tümörlü dokulara daha yüksek bir etkinlik ve seçicilikle gönderilmesi beklentisini doğurur (Mohanraj and Chen, 2006). Tümör hücrelerinin hızla çoğalması sebebiyle nutrientlerin daha fazla hücre içine alınabilmesi amacıyla folik asit, vitaminler ve şekerler gibi belli reseptörleri daha fazla eksprese etmektedirler (Ganta et al., 2008).

Nanopartikülün optimum dizaynı için kanser hücrelerindeki uygun bir ligantın veya reseptörün seçilmesi oldukça önem taşımaktadır. İdeal hedefler tümör hücrelerinde çok fazla sentezlenen veya sadece tümör tarafından sentezlenen ancak normal dokuda sentezi olmayan ya da çok az olanlardır. Hedeflenen antijen ya da reseptör aynı zamanda hedeflenen tümör dokusunun yüzeyinde yüksek yoğunlukta olmalıdır. Aynı zamanda nanopartiküle konjuge edilen ligant veya reseptörün hücre yüzeyine bağlandıktan sonra nanopartikülün hücre içine alınma prosesini de başlatabilmesi gerekmektedir. Aksi takdirde nanopartikül basit difüzyon ya da gönderilmesi düşünülen ilacın hücre çevresinde salınmasının ardından başka bir transport mekanizması ile hücreye giriş yapar (Mohanraj and Chen, 2006).

Şekil 1.16’da da görüldüğü gibi aktif hedeflemede, nanopartiküllerin hücre içine alınmaları reseptör aracılıklı endositoz ile gerçekleşir. Ligant ile modifiye edilmiş nano taşıyıcı hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak nano taşıyıcı – reseptör kompleksinin oluşumu ve endozomlara veziküler transportu ile hücre içine giriş yapar. Reseptör ile nano taşıyıcının birbirinden ayrılmasından sonra reseptör hücre membranına geri döner (Ganta et al., 2008).



Şekil 1.16 Aktif hedefleme.

1.3.2.1 Manyetik hedeflendirme

Kanser tedavisinde kemoterapötik yaklaşımların ana dezavantajı çoğunun non-spesifik olmasıdır. Genellikle sitotoksik terapötik ilaçlar sistemik dağılıma direkt intravenöz olarak verilmektedir. Bu tekniğin non-spesifik olması sebebiyle ilaçların sitotoksik etkilerinin hem hedeflenen hem de sağlıklı dokuda gözlemlendiği iyi bilinmektedir. Bu dezavantajı azaltmak için manyetik nanopartiküller kullanılabilir. Şekil 1.17’de de görülebileceği gibi tümör tedavisinde nanopartiküller 3 farklı yolla kullanılabilirler;

1. İlgili reseptöre bağlanması ve tümör büyümesini yavaşlatmak amacıyla manyetik nanopartiküller spesifik antikörlerle konjuge edilebilirler.
2. Tümör terapisi amacıyla manyetik nanopartiküllerin hipertermiya özelliği kullanılabilir.
3. Hedefli terapi için manyetik nanopartiküllere ilaç yüklemesi yapılabilir.

İlaç yüklü manyetik nanopartiküller ilgili bölgede dışarıdan uygulanan manyetik alan yardımıyla hedef bölgede konsantre bir şekilde birikirler. Ardından hedef bölgede farklı yollarla nanopartikül üzerinde yüklü olan ilaçlar salınır. 4 μm ’den daha küçük partiküller hücrelerde retikuloendotelial sistem (RES) tarafından elimine edilir, çoğunlukla karaciğerde (%60-90) ve dalakta (%3-10) bu proses gerçekleşmektedir. Partikül boyutu 200 nm’den büyük olan partiküller

genellikle dalakta filtrelendir, boyutu 100 nm'ye kadar olan nanopartiküller ise karaciğer hücreleri tarafından fagositoza uğratılır. Genellikle partikül boyutu ne kadar büyürse plazmadaki yarı ömürleri o kadar kısa olur (Jana et al., 2010).

Hedefli kanser terapisi gibi biyomedikal alanlarda manyetik nanopartiküllerin etkili kullanımı partikülün boyutu ve manyetizasyon derecesi gibi birkaç parametreye bağlıdır. Bu yöntemin etkinliğini ilaç yüklü manyetik nanopartikülün fizikokimyasal özellikleri, manyetik alanın kuvveti ve geometrisi, hedef dokunun derinliği, kan akış hızının oranı ve kas kitlesi gibi parametreler oldukça etkilemektedir (Jana et al., 2010).

Manyetik alan kuvvetini artırmak ilaç dağılımını kolaylaştıran bir avantajdır. Nanopartiküllerin süperparamanyetik özellik göstermeleri için oldukça küçük olmaları gerekmektedir ki manyetik alan ortadan kaldırıldığında karaciğer ve immün sistem gibi vücudun filtre sistemleri tarafından ortadan kaldırılmadan ve aglomere olmadan sistemik dolaşımda kalabilsinler (Jana et al., 2010).



Şekil 1.17 Manyetik nanopartikül hazırlanması ve kullanım şekilleri (Jana et al., 2010).

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Jelatin (Tip B, bovine skin) ve orto-fenilendiamin (OPDA) Sigma; aseton Tekkim; glutaraldehit ve N,N-dimetilformamid (DMF) Merck; cisplatin (Kemoplat) Ebewe firmalarından sağlandı. Kopresipitasyon yöntemine göre sentezlenen magnetit kullanıldı. Diğer kimyasallar analitik saflıktadır. Çalışmada kullanılan cihazlar; santrifüj (Beckman microfuge E), orbital karıştırıcı (Yellow line), HPLC pompası (ERC HPLC pump 64), su banyosu (Memmert), spektrofotometre (Perkin Elmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer), hassas terazi (Denver Instrument, SI-234A), manyetik karıştırıcı (IKA, RCT basic) (Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü), zeta boyut analiz cihazı (Malvern dynamic laser scattering zeta sizer Nano SZ, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü), fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopu (FTIR) (Perkin Elmer FTIR Spectrum One-B Spectrometer), termogravimetrik analiz cihazı (TGA) (Perkin Elmer Diamond TG/DTA, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) (JEOL JEM-2100F, Muğla Üniversitesi, Araştırma Laboratuvarları Merkezi), taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Phillips XL-30S FEG ve FEI Quanta 250 FEG, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezi).

2.2 Metot

Bu çalışmada, manyetik özellikteki jelatin nanopartikülleri sentezlendi. Manyetik jelatin nanopartiküllerinin sentezinde iki adımlı desolvasyon metodu kullanıldı. Hazırlanan nanopartiküllerin hedeflendirilmesi amacıyla manyetik özelliği olan magnetit nanopartiküllerinin jelatin içerisinde enkapsülasyonu sağlandı. Akciğer kanserine yönelik bir kontrollü ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi amaçlandı ve bu amaçla ilaç olarak akciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan cisplatin manyetik nanopartiküllere adsorpsiyon yoluyla yüklendi. İlacın adsorpsiyon izotermi belirlendi ve tüm sonuçlar Sonuçlar ve tartışma bölümünde verilerek yorumlandı.

2.3 Jelatin Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

İki aşamalı desolvasyon tekniği, Coester ve arkadaşları, 2000, Kenneth Ofokansi ve arkadaşları, 2010, Babita Gaihre ve arkadaşları, 2008, tarafından kullanılan yöntemlerin modifikasyonu ile gerçekleştirildi (Coester et al, 2000; Ofokansi et al., 2010; Gaihre et al., 2008). 50 mg jelatin tip B 37 °C sıcak su banyosunda 1 mL distile suda çözüldü. Üzerine hızlı bir şekilde 1 ml aseton eklenerek orbital çalkalayıcıda 480 rpm’de karıştırıldı. Çökme tamamlandıktan sonra, süpernatant atıldı. 1 mL distile su eklenerek 37 °C’de sıcak su banyosunda pellet tekrar çözüldü ve pH 12-13’e ayarlandı. 480 rpm’deki orbital çalkalayıcı üzerinde 2 mL aseton 1 mL/dk hızla pompa yardımıyla damlatıldı. 12 µL glutaraldehit (%4) eklendikten sonra çalkalayıcıda 24 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresinin sonunda 1 saat 13000 rpm’de santrifüjlenerek üst faz ayrılarak protein tayinleri yapıldı. Nanopartiküllerin bulunduğu pellet 2 kez 1 mL distile su ile 45 dakika 13000 rpm’de santrifüjlenerek yıkandı. Süpernatantlarda protein tayini yapılarak desolvasyon verimleri hesaplandı.

2.3.1 Protein Tayini

Protein tayininde modifiye edilmiş Lowry yöntemi kullanıldı (Komsa-Penkova, 1996).

Reaktifler :

Reaktif A: % 0,4 Na/K Tartarat, % 10 Na₂CO₃ ve 0,5 M NaOH içeren çözelti.

Reaktif B: Sırasıyla, % 3 CuSO₄, % 2 Na/K Tartarat ve 0,1 M NaOH içeren çözelti.

Folin Reaktifi 1:15 kat seyreltilerek ~ 0,15 N hazırlanarak kullanıldı.

400 µl jelatin çözeltisine 360 µl reaktif A ve 40 µl reaktif B eklenerek 50°C sıcaklıkta 20 dakika inkübe edildi. Örnekler oda sıcaklığına soğutulduktan sonra 1,2 ml Folin reaktifi eklenerek 10 dakika daha 50°C sıcaklıkta inkübe edildi. Inkübasyon sonunda oda sıcaklığına gelen örneklerin 650 nm’de spektrofotometrik tayinleri gerçekleştirilerek protein miktarları belirlendi. Jelatin kullanılarak çizilen standart grafiğin aralığı 0.02 – 0.3 mg/ml olup bu grafikten elde edilen denklem yardımıyla protein miktarları her bir örnek için belirlendi.

2.3.2 Jelatin Konsantrasyonu Optimizasyonu

%1, %3, %5, %8 (w/v) konsantrasyonlarında jelatin B ile Bölüm 2.3 te belirtilen standart yöntem kullanılarak nanopartiküller hazırlandı ve her bir örnek için desolvasyon verimleri saptandı. Nanopartikül yapılarının korunduğu, maksimum desolvasyon veriminin saptandığı ve nanaopartikül boyutları dikkate alınarak optimum jelatin konsantrasyonu belirlendi.

2.3.3 pH Optimizasyonu

Optimum olarak saptanan %5 lik jelatin konsantrasyonu 1 mL/dk aseton damlatma hızı seçilerek, pH 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 değerlerine ayrı ayrı ayarlandı. Bölüm 2.3'teki standart prosedür uygulanarak nanopartiküller hazırlandı ve optimum pH değeri belirlendi.

2.3.4 Aseton Akış Hızı Optimizasyonu

%5'lik jelatin konsantrasyonu seçilerek, ikinci desolvasyon aşamasında HPLC pompası ile 2 mL aseton 0,7, 1,3, 1,7 mL/dk hızlarında damlatıldı. Bölüm 2.3'teki standart prosedür uygulanarak nanopartiküller hazırlandı ve optimum akış hızı belirlendi.

2.4 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerin Hazırlanması

50 mg jelatin tip B 37 °C sıcak su banyosunda 1 mL distile suda çözüldü. 480 rpm' deki orbital çalkalayıcıda 1 mL aseton hızlıca eklendi. Çökme tamamlandıktan sonra, süpernatant atılarak pellet 0,5 mL distile su ile 37 °C'de sıcak su banyosunda çözüldü ve pH 12-13'e ayarlandı. 480 rpm'de karıştırma yapılarak 0,5 ml 3mg/ml, 4 mg/ml, 5mg/ml ve 6mg/ml konsantrasyonlardaki magnetit (Dung et al., 2009) ortama eklendi ve 2 mL aseton 1 mL/dk hızla HPLC pompası yardımıyla damlatıldı. 12 µL glutaraldehit (%4) eklenmesinin ardından orbital çalkalayıcıda 24 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresinin sonunda 1 saat 13000 rpm'de santrifüjlendi ve nanopartiküllerin bulunduğu pellet 2 kez 1 mL distile su ile 45 dakika 13000 rpm'de santrifüjlenerek yıkandı. Manyetizasyon dereceleri magnetometer cihazı ile belirlendi ve optimum magnetit miktarı belirlendi.

2.4.1 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan manyetik jelatin nanopartiküllerin karakterizasyonu amacıyla FTIR, TGA analizleri ile TEM görüntülemeleri gerçekleştirildi.

2.5 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerine Cisplatin Adsorpsiyonu

2.5.1 Cisplatin Tayini

Cisplatin tayini Anılanmert ve arkadaşlarının geliştirdiği metot kullanılarak gerçekleştirildi (Anılanmert et al., 2011). Cisplatinin renkli kompleks oluşturacağı reaktif olan OPDA konsantrasyonu 1,4 g/l olacak şekilde DMF içerisinde çözüldü. 1 ml cisplatin 1 ml OPDA renk reaktifi ile 30 dakika boyunca 90°C sıcaklıktaki su ile ısıtıldı ve süre sonunda oda sıcaklığına soğutuldu. Oluşan renk reaksiyonu sonucunda ilacın konsantrasyonu 712 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aynı koşullarda 1 – 8 µg/ml konsantrasyon aralığında cisplatinle çizilen standart grafiği yardımıyla ilaç konsantrasyonları tespit edildi.

2.5.2 Optimum Adsorplanma Sıcaklığının Belirlenmesi

50 mg jelatinden yola çıkılarak Bölüm 2.4'te açıklanan yöntemle göre hazırlanan manyetik jelatin nanopartiküller, 1 mg cisplatin içeren çözeltide dağıtılarak 25°C, 30°C, 37°C ve 40°C'teki sıcak su banyoları içerisinde 48 saat inkübe edilerek adsorpsiyon gerçekleştirildi. İnkübasyon süreleri sonunda yapılan analizler ile optimum adsorpsiyon sıcaklığı belirlendi.

2.5.3 Optimum Adsorpsiyon Süresinin Belirlenmesi

50 mg jelatinden yola çıkılarak Bölüm 2.4'te açıklanan yöntemle göre hazırlanan manyetik jelatin nanopartiküller 1 mg/ml konsantrasyondaki cisplatin çözeltisinde dağıtılarak 3, 6, 9, 12, 24, 48 ve 72 saat 25°C sıcaklıktaki su banyosunda adsorpsiyona bırakıldı. Süre sonunda yapılan ilaç analizleriyle optimum adsorpsiyon süresi belirlendi.

2.5.4 Adsorplanan Optimum Cisplatin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

50 mg jelatinden yola çıkılarak hazırlanan manyetik jelatin nanopartiküller 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 µg/ml konsantrasyonda 1 ml cisplatin çözeltisinde dağıtıldı. 37°C'de 48 saat sıcak su banyosunda inkübe edilerek

adsorpsiyon sağlandı. Süre sonunda cisplatin çözeltilerinde dağıtılan nanopartiküller 13.000 rpm’de 1 saat santrifüjlenerek üst fazda adsorbe olmayan cisplatin tayini 712 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Maksimum adsorpsiyon kapasitesinin gözlemlendiği cisplatin konsantrasyonu belirlendi.

2.5.4.1 Adsorpsiyon izoterminin saptanması

Adsorplanma türünün belirlenmesi amacıyla kullanılan pek çok adsorpsiyon izotermi türü mevcuttur. Çalışmanın ilaç adsorpsiyonu adındaki temel amaç, adsorplamanın fiziksel ya da kimyasal adsorpsiyon olup olmadığının belirlenebilmesidir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar ile Dubinin – Radushkevich izoterminin çizilmesine karar verildi. Elde edilen veriler ve grafik sonuçlarda gösterilerek yorumlanmıştır.

3. SONUÇLAR VE YORUM

3.1 Jelatin Nanopartiküllerin Sentezi

Jelatin nanopartiküller (GNP) iki adımlı desolvasyon tekniği kullanılarak hazırlandı. Jelatinin, molekül ağırlığı geniş aralıkta değişir ve çözeltideki düşük molekül kütleli fraksiyon farklı boyutta nanopartikül oluşumuna sebep olur ve nanopartiküllerin agregasyonu gerçekleşir. Bu nedenle, iki adımlı desolvasyon tekniği kullanılarak ilk desolvasyon adımında düşük molekül kütleli jelatin molekülleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Jelatinin sudaki çözünürlüğü, jelatin zincirlerinin su molekülleri ile hidrojen bağı yapabilen gruplarının etkileşimine bağlıdır. Ortama katılan aseton hacminin artışı ile kompozit nanopartiküllerin çevresini saran su molekülleri ve su ile kompozit nanopartiküller arasında intermoleküler hidrojen bağları azalmaktadır. Su ile kompozit nanopartiküller arasındaki hidrojen bağlarının azalması hidratlanmış jelatin zincirlerinin küçülmesine yol açmaktadır. Belirli bir aseton hacminden sonra hidrasyon o kadar azalır ki jelatin zincirleri nanopartikül formunda çöker (Gaihare et al., 2008)

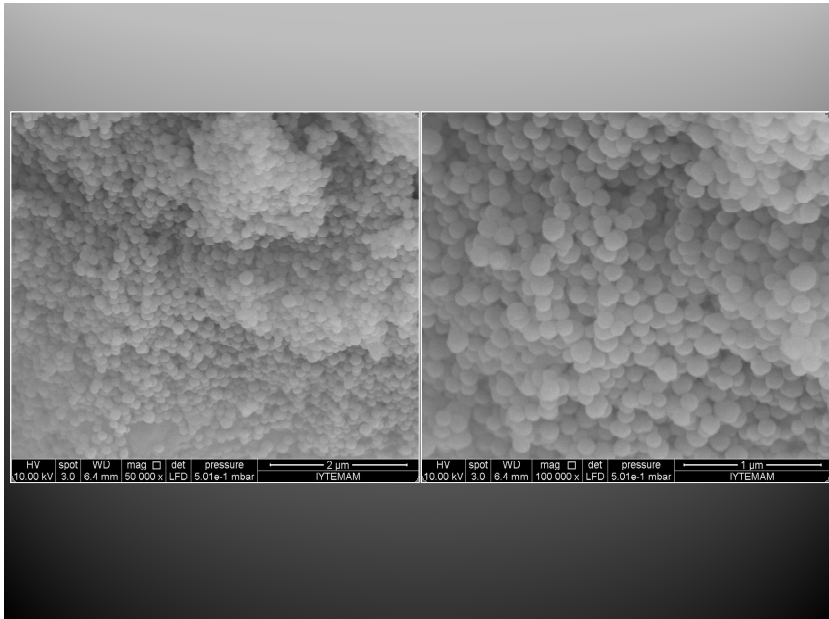
Bu çalışmada nanopartikül oluşumu üzerinde etkili olan jelatin konsantrasyonu, pH, aseton akış hızı, süre, sıcaklık ve ilaç konsantrasyonunu değiştirerek nanopartikül oluşumu ve nanopartikül boyutu üzerine etkileri incelenmiştir.

Jelatinin biyobozunurluğu, biyouyumluluğu, non-toksikliği, kimyasal modifikasyonunun kolaylığı ve çapraz bağlanabilirliği onu umut verici bir taşıyıcı sistem yapar. Ayrıca jelatinin amino ve karboksil grupları çeşitli kimyasal modifikasyonlara izin verir. Bu modifikasyonlar özellikle hedeflenen bölgeye ilaç taşınımını geliştirmek için kullanışlı olabilir.

Jelatin nanopartiküllerin oda sıcaklığında (25°C) hazırlanması jelatinin viskozitesi sebebiyle mümkün değildir. 40°C, 50°C ve 60°C gibi sıcaklıklarda jelatinin çözülmesi partikül boyutuna etki eder. 50 ve 60 °C’ de oluşan partiküllerin boyutu sıcaklıkla jelatinin üç boyutlu yapısının açılması sebebiyle artmaktadır. Bunun dışında jelatin moleküllerinin bu kadar yüksek sıcaklıklarda denatüre olabilmesi nedeniyle bu sıcaklık değerleri tercih edilmemiştir. Ancak 37°C ve 40°C sıcaklık değerlerinde jelatin moleküllerinin üç boyutlu yapısı yine

açılmakta ancak denatüre olma ihtimali ortadan kaldırılmaktadır. Sıcaklıkla çözülen jelatin moleküllerinin üç boyutlu yapısının açılmasının dışında viskozitesinin azalmasıyla çöktürücü ajanla iyi bir çökme sağlanır.

Tip B jelatinin pI değeri 4-5 civarındadır. pH 12 - 13 jelatinin izoelektrik noktasının açıkça üstünde bir değerdir. İkinci desolvasyon adımının ardından elde edilen jelatin çözeltisinin pH'sı 12 – 13 aralığına ayarlanarak, jelatin moleküllerinin desolvasyona duyarlı kalması sağlanmış ve nanopartikül oluşumu sırasında partiküllerin agregasyonu önlenmiştir. Böylece ikinci desolvasyon adımında eklenen aseton ile jelatinin sudaki çözünürlüğü azaltılarak çökmesi sağlanmıştır. Glutaraldehit eklenmesiyle ikinci desolvasyon adımında elde edilen stabil olmayan jelatin nanopartiküllerinin yüzeyindeki amin ve karboksil uçlarından çapraz bağ oluşumu sağlanarak rijit ve stabil nanopartiküller elde edilmiştir. Glutaraldehit gibi bir çapraz bağlayıcı ajanın kullanılmaması durumunda damlatma esnasında oluşan jelatin nanopartiküllerinin suya olan ilgisi nedeniyle tekrar çözünme olasılığı ve hidrodinamik boyutu artmaktadır (Gaihre et al., 2007). Şekil 3.1' de jelatin nanopartiküllerin SEM görüntüsü verilmiştir. SEM görüntüsü incelendiğinde nanopartiküllerin 136 nm boyutunda ve oldukça homojen oldukları gözlemlendi.



Şekil 3.1 Jelatin nanopartiküllere ait SEM görüntüsü.

3.1.1 Jelatin Konsantrasyonu Optimizasyonu

Jelatin nanopartiküllerin oluşumu üzerine etki eden parametrelerin incelenmesinde protein tayini ile nanopartikül oluşturma verimleri belirlendi. Jelatinin protein tayini için jelatin standart grafiği, modifiye edilmiş Lowry metodu kullanılarak hazırlandı. Lowry metodu ile protein tayininin prensibi Folin reaktifi ile protein-bakır kompleksinin oksidasyonu ile bir dehidrojenasyon olayı ve her birim için dört dişli bakır kompleksine iki elektron transferi gerçekleşmesine eşlik eden bir imino peptid oluşumuna dayanmaktadır. Tirozin ve triptofan yan zincirleri dört ek indirgeyici ekivalent daha katmaktadır. Peptidlerden elektron transferi temelde dört dişli bakır kompleksi oluşturabilme yetilerine bağlı olarak tayin edilmektedir. Hidroksiprolin ve prolin içeren peptidlerin cevabı iminoasitlerin kompleks oluşumu ile büyük oranda azalmaktadır.

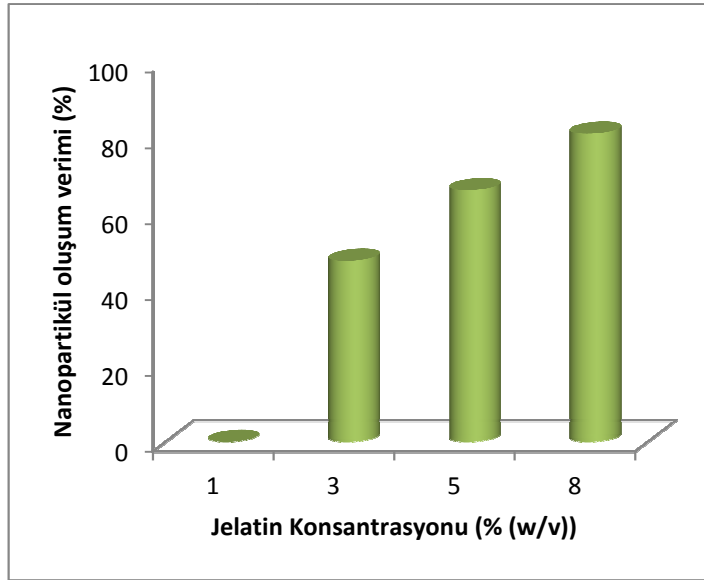
Bilindiği gibi Lowry metodu jelatin tayininde tipik olarak baskılanmış yani düşük cevap vermektedir. Diğer bir metot olan BCA yönteminin ise jelatin tayininde duyarlılığı oldukça düşüktür. Bu nedenle modifiye edilmiş olan bu yeni Lowry metodu ile duyarlılık artırılmıştır (Komsa-Penkova et al., 1996).

%1, %3, %5, %8 (w/v) jelatin konsantrasyonlarının nanopartikül oluşum verimine etkisi incelendi.

Zillies ve arkadaşlarının çalışmasında jelatinin, yüksek konsantrasyonda fibril yapısına sahipken düşük konsantrasyonda morfolojik yapısının küresel agregat şeklinde olduğu ve nadiren fibril yapısına sahip olduğu gösterilmiştir. Jelatin konsantrasyonunun artması ile daha büyük fibröz yapılar meydana gelir. Ayrıca konsantrasyonun artması ile jelatinin vizkositesi artar (Zillies et al., 2008) .

% 1' lik ve % 3 ' lük jelatin konsantrasyonlarında partikül oluşumu çok az görülmüştür. Ayrıca % 3 ' lük jelatin konsantrasyonunda oluşan nanopartiküllerin stabil olmadığı ve suda kolayca çözündüğü gözlemlendi. Zeta sizer ile yapılan ölçümlerinde boyutlarının 198 nm olduğu saptandı. %8 jelatin konsantrasyonunda oluşan nanopartikül miktarı diğerlerine göre oldukça fazladır. Ancak partiküller yumuşak olduğundan dolayı nanopartikül özelliğinin iyi olmadığı düşünüldü. Daha önce de belirtildiği gibi nanopartikül içine yüklenecek kimyasal ajanların

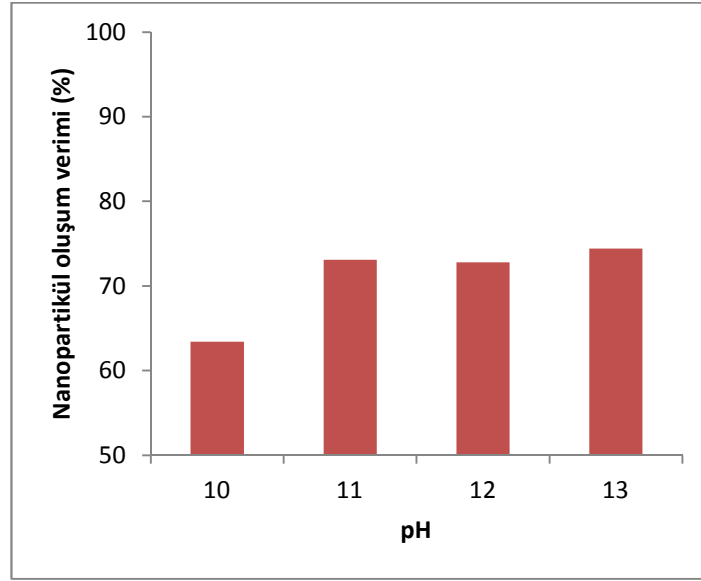
sert nanopartikül ile degradasyondan korunması amaçlandığından %8'lik jelatin konsantrasyonunda elde edilen nanopartiküllerin yumuşak olması istenmeyen bir durumdur. Yapılan çalışma sonucunda %5 konsantrasyonu ile elde edilen nanopartikül veriminin yeterince yüksek olduğu ve boyutun 136 nm olmasından dolayı çalışmanın devamı için daha uygun olduğuna karar verildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Jelatin konsantrasyonunun nanopartikül oluşum verimine etkisi.

3.1.2 pH Optimizasyonu

pH 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 değerlerinin partikül oluşum verimi üzerine etkisi incelendi. pH 7 ve 8'de agregat oluşumu gözlenirken pH '9 da santrifüj sonrası çökelme gözlenmeyip örneğin süspanse halde olduğu görüldü. Bu nedenle bu değerlerde protein tayini gerçekleştirilmedi. Şekil 3.3 ile verilen grafikten de görüldüğü gibi pH 10-13 arasındaki değerlerde nanopartikül oluşum verimi incelendi.



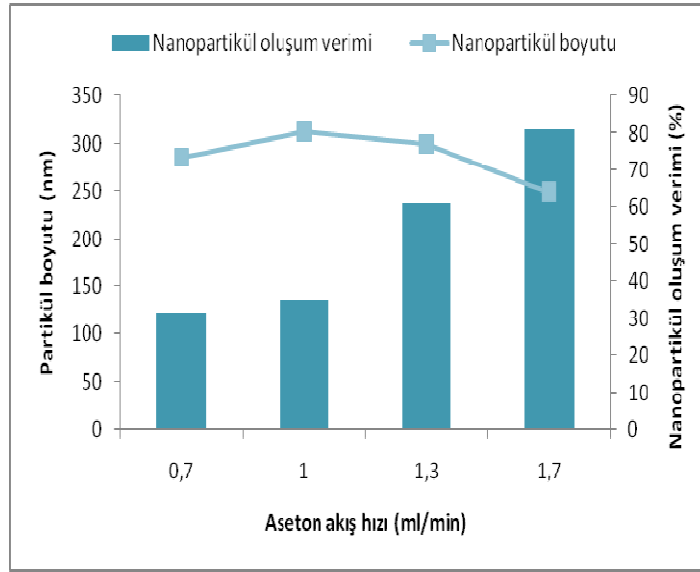
Şekil 3.3 Nanopartikel oluşum verimi üzerine pH etkisi.

Babita ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, değişik pH değerlerinin koloidal dispersiyon stabilitesinde etkili olduğu belirtilmiştir (Babita et al., 2008). Bu çalışmada, pH 2-12 aralığında çalışıldı ve izoelektrik noktaya yakın pH değerlerinde stabil olmayan partiküller elde edildi. pH değeri jelatinin izoelektrik noktasından uzaklaştıkça daha stabil nanopartiküller elde edildi. Bu nedenle çalışmanın devamında en yüksek verimin elde edildiği pH 12-13 seçildi. Ortamın alkali özelliğinin artmasıyla nanopartikel oluşumu veriminin artışının, bu pH değerlerinde jelatinin aminlerindeki hidroksilleri de kaybetmesi ve karboksil gruplarının hidroksillenmesiyle negatif yük kazanmasına ve negatif yüklü jelatin moleküllerinin çözelti içerisinde birbirlerini itmelerinden dolayı daha iyi disperse olmalarına ve bu sebeple desolvasyon ajanı ilavesinde moleküllerin daha büyük miktarının organik çözgenle muamele olup çökmesi olabileceği düşünüldü.

3.1.3 Aseton Akış Hızı Optimizasyonu

İkinci desolvasyon adımında 2 mL asetonun 0,7, 1,3, 1,7 mL/dk akış hızlarında damlatılması ile oluşan partikül verimi hesaplandı. Gomez ve arkadaşlarının çalışmasında, 1 mL/dk ile 5 mL/dk arasında partikül boyutunda çok büyük bir fark görülmemişken PI değeri 1 mL/dk ve 5 mL/dk için benzerdir. Bu çalışmada ayrıca 5 mL/dk akış hızının üstündeki değerlerde karıştırma hızının

artırılması gibi standart koşullarda değişiklik yapılması gerektiği belirtilmiştir (Gomez-Guillen et al., 2011).

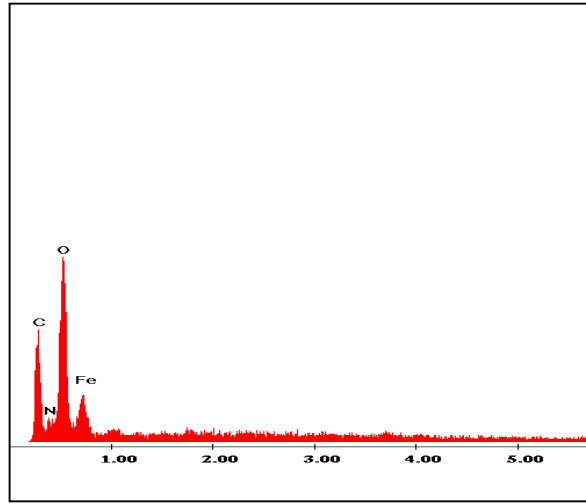


Şekil 3.4 Aseton akış hızının nanopartikül oluşum verimi ve boyut üzerine etkisi.

Şekil 3.4’ te, 1,3 mL/dk akış hızında en iyi verim elde edildiği görülmektedir ancak bütün akış hızlarındaki verim değerleri arasında çok büyük farklılık görülmedi ve jelatin nanopartikül hazırlama yönteminde kullanılan 1 mL/dk akış hızında aseton damlatmadaki sonuç benzer olduğundan bu akış hızıyla devam etmeye karar verildi.

3.2 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerin Hazırlanması

Manyetik jelatin nanopartiküllerin (MGNP) hazırlanmasında manyetiklik özelliği katmak amacıyla magnetit (Fe_3O_4) kullanıldı. Magnetit, jelatin nanopartikül sentezi sırasında iki desolvasyon adımı arasına disperse edilmiş çözelti halinde eklenerek jelatin tarafından enkapsüle edildi. Karakterizasyonu TEM analizi ve SEM elemental analiz yolu ile gerçekleştirildi.



Şekil 3.5 Manyetik jelatin nanopartiküllerin elementel analizi.

Elementel analizinde görülen karbon, azot atomları ile oksijen atomunun belirli bir kısmının jelatin ve glutaraldehite ait olduğu düşünüldü. Bunun yanı sıra grafikteki demir atomu ile oksijen atomunun belirli bir kısmının ise demir oksit türevi olan magnetite ait olduğu düşünüldü. Tüm atomların bir arada sinyal vermeleri magnetitin jelatin nanopartikülleri içerisinde enkapsüle edildiğini göstermektedir (Şekil 3.5).

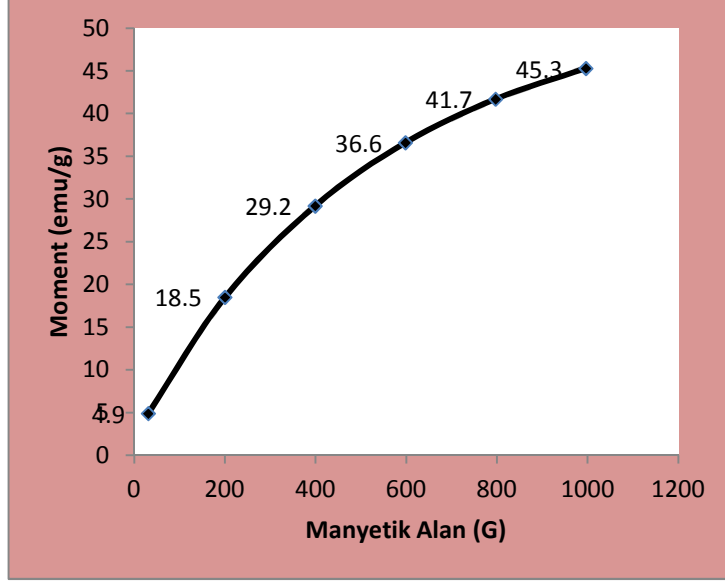
3.2.1 Magnetit Konsantrasyonunun Etkisinin Belirlenmesi

Magnetit nanopartikülleri jelatinin sulu çözeltisi içerisinde disperse edildi, disperse edilen magnetit öncelikle jelatin zincirlerine amid bağları üzerinden kimyasal olarak adsorplanmaktadır.

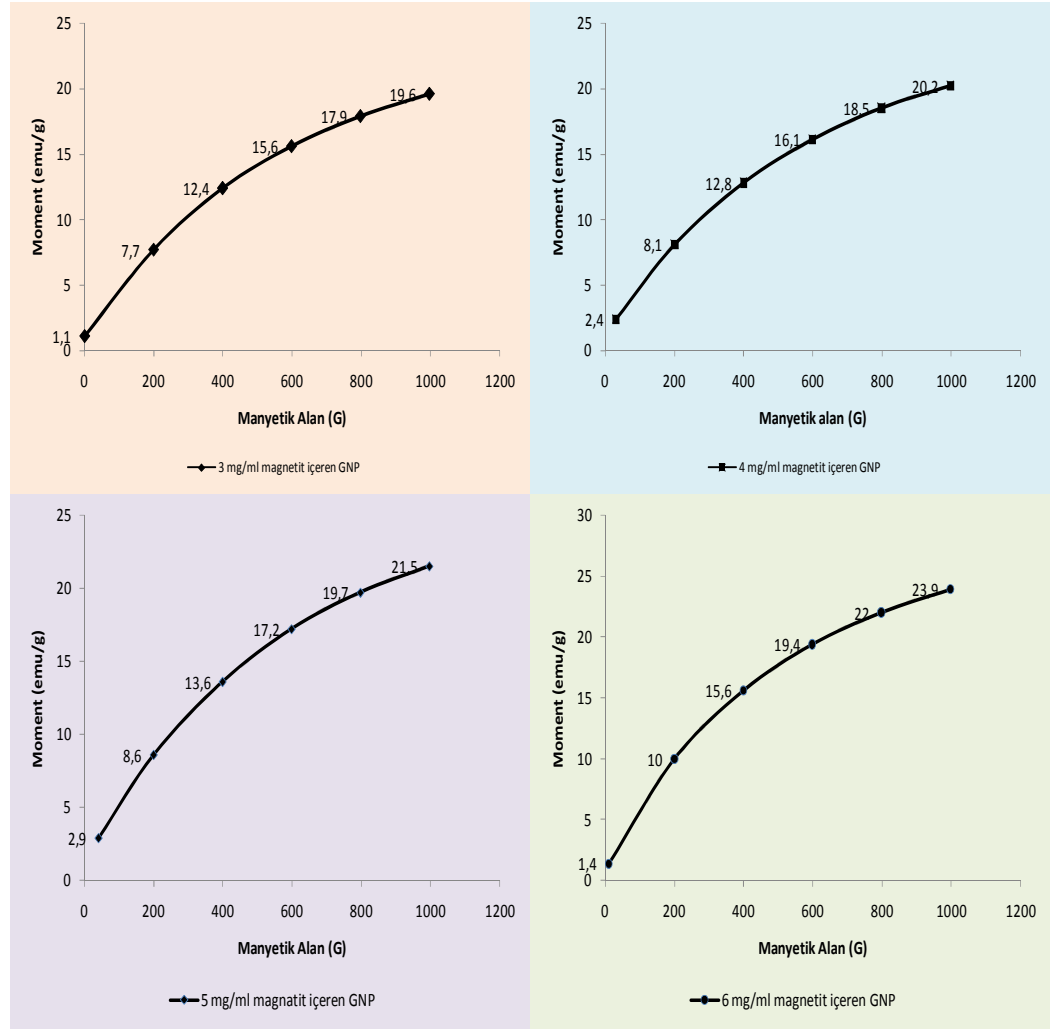
Magnetitin nanopartikül stabilitesi üzerine olan etkisini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda magnetit içeren çözeltiler kullanılarak nanopartikül sentezi gerçekleştirildi.

3 mg/ml magnetit konsantrasyonu ile hazırlanan örneklerde nanopartikül içerisindeki magnetit miktarının yetersiz olduğu görüldü. 5 ve 6 mg/ml konsantrasyondaki magnetitler ile hazırlanan nanopartiküllerde ise magnetit miktarının aşırı geldiği ve nanopartiküllerde agregatlaşma olduğu görüldü. 4 mg/ml konsantrasyonda magnetit içeren nanopartiküllerin ise agregatlaşmadığı ve nanopartiküller içerisindeki magnetit miktarının ise yeterli olduğu görüldü. Sonuçlar manyetizasyon ölçümleri ile de doğrulandı.

Hazırlanan manyetik jelatin nanopartiküllerine manyetiklik kazandırması amacıyla eklenen magnetitin manyetizasyonu ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanan magnetitlerin jelatin ile enkapsülasyonu sonucunda manyetizasyonun değişiminin izlenmesi amacıyla manyetometre cihazında alınan ölçüm sonuçları Şekil 3.6 de verilmiştir.



Şekil 3.6 Magnetitin manyetik alandaki manyetizasyonu.

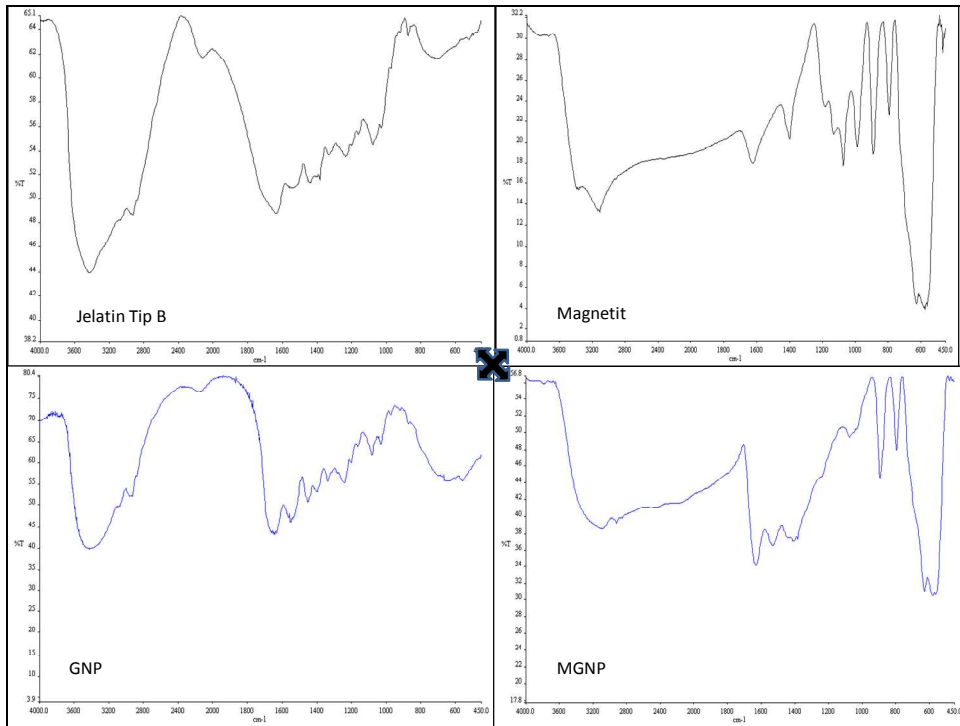


Şekil 3.7 Değişen konsantrasyonlarda magnetit içeren GNP'lerin manyetik alandaki manyetizasyonu.

Şekil 3.7' de görüldüğü gibi saf magnetitin manyetizasyonunun enkapsüle edilmiş olan formlarına göre daha düşük olması magnetitin jelatin ile kaplandığını göstermektedir. Değişen konsantrasyonlarda magnetit içeren örneklerde manyetizasyonun az miktarda da olsa değişiminin magnetit oranının arttıkça jelatinin enkapsülasyon miktarının azalmasına ve nanopartiküler yapının bozulmasına bağlı olduğu düşünüldü. Bu ölçüm sonucunda en iyi olan magnetit konsantrasyonunun 4 mg/ml olduğu doğrulandı. Magnetit vücutta metabolize olabilen ancak belli bir düzeyden sonra birikim yapan bir maddedir. Lethal dozu yaklaşık 4 -5 g/kg düzeyinde olup bu miktarın çok yüksek olmasına rağmen hastalığın evresine de bağlı olarak kullanılacak ilaç dozu sebebiyle mümkün olan en az magnetit konsantrasyonunda dışarıdan uygulanan alana en iyi cevap verebileceği düşünülen ve nanopartikül yapısının stabilizasyonunu da bozmayacak konsantrasyon tercih edildi. Jurgons' un çalışmasında dışarıdan uygulanan manyetizasyon miktarının ~1 T (tesla)'lık manyetik alanda yanıt

oluşturması için yeterli olduğu belirtilmiştir (Jurgons et.al, 2006). 3 mg/ml konsantrasyondaki magnetit miktarının tüm GNP'lerin çekirdeklerinde görülmemesinden dolayı yetersiz olduğuna karar verildi. 4 mg/ml konsantrasyonunun üstündeki diğer konsantrasyonlardaki magnetitlerin ise manyetizasyonları arasında çok fark olmadığından ve nanopartiküllerin küresel yapılarının bozulmasından dolayı optimum magnetit miktarı olarak 4 mg/ml konsantrasyonu seçildi.

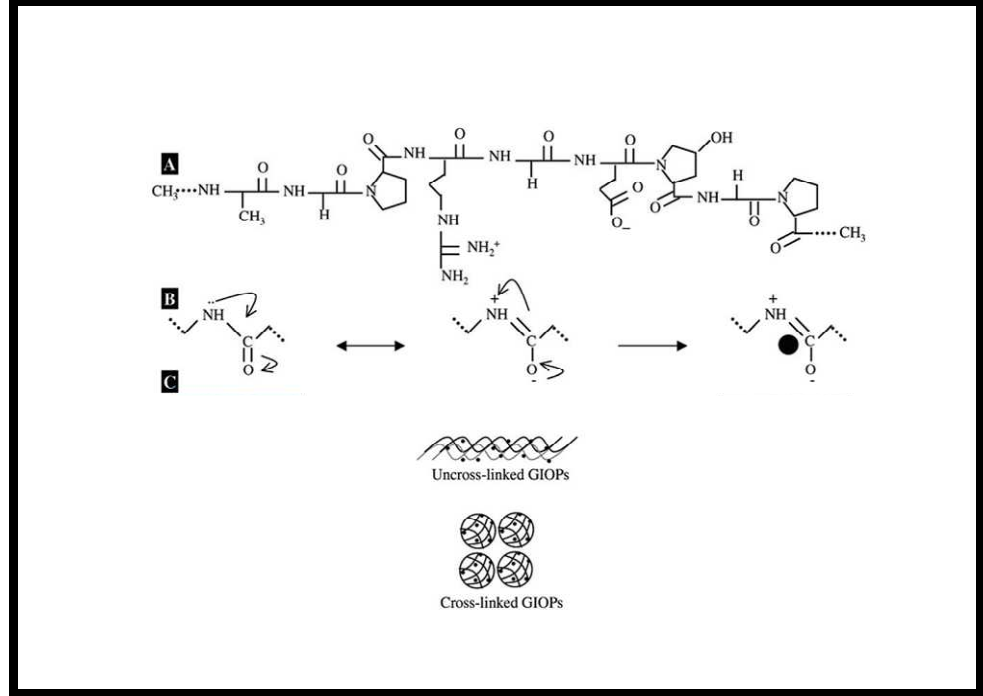
3.2.2 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerin Karakterizasyonu



Şekil 3.8 Jelatin tip B, magnetit, GNP ve MGNP'nin FTIR analizi.

Şekil 3.8' de jelatin, jelatin nanopartikül, magnetit ve manyetik nanopartiküllerin FT- IR sonuçları görülmektedir. Jelatinin karakteristik amid I ve II bağları 1670 cm^{-1} ve 1565 cm^{-1} de saptanmıştır. Amid I bağı C=O gerilme, Amid II bağı ise N-H bozulma vibrasyonu ile gözlemlenir (Gaihre et al., 2008). Jelatinde gözlenen bandlar, jelatin nanopartiküllerde 1635 cm^{-1} ve 1541 cm^{-1} , de gözlenmiştir. Amid I ve amid II band değerlerinde gözlenen düşüş amid bağları ve magnetit arasındaki elektrostatik etkileşimi göstermektedir. Amid A olarak ifade edilen $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, de N-H gerilme vibrasyonu ile gözlemlendiği literatür verilerinde belirtilmiştir (Gaihre et al, 2009). Çalışmamızda $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, de gözlenen band genişliği manyetik jelatin nanopartiküllerde oldukça azalmıştır. H-bağlarındaki azalmayı ifade eden bu bulgu, magnetitin jelatin nanopartikülde

kimyasal adsorbsiyon ile bağlandığını göstermektedir. Bulgu literatür verileriyle uyumludur(Gaihre et al, 2008 and 2009). Şekil 3.9’da jelatinin kimyasal yapısı ve magnetitle muhtemel etkileşimi görülmektedir.

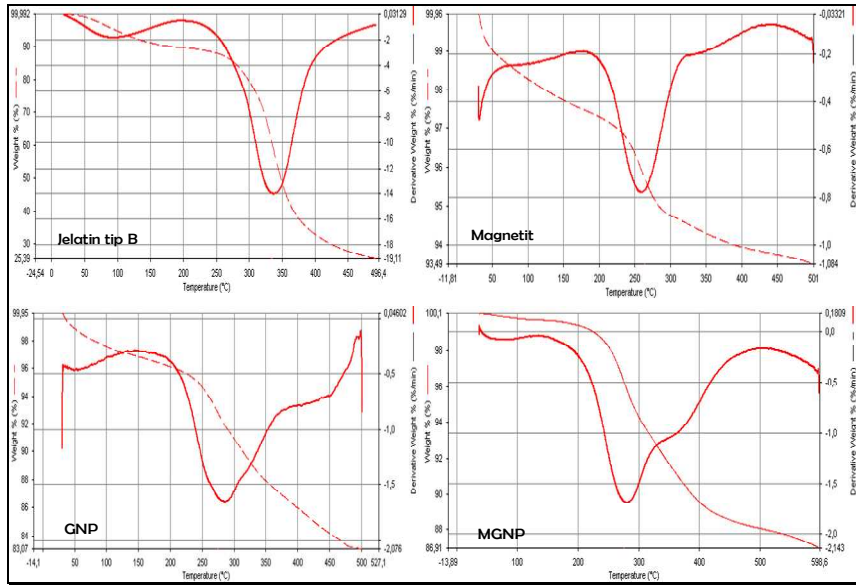


Şekil 3.9 a) Jelatinin magnetit üzerine adsorpsiyonu, b) aseton eklenmesiyle jelatinin katlanması c) glutaraldehit ile jelatinin çapraz bağlanarak magnetitin enkapsülasyonu (Gaihre et al., 2008)

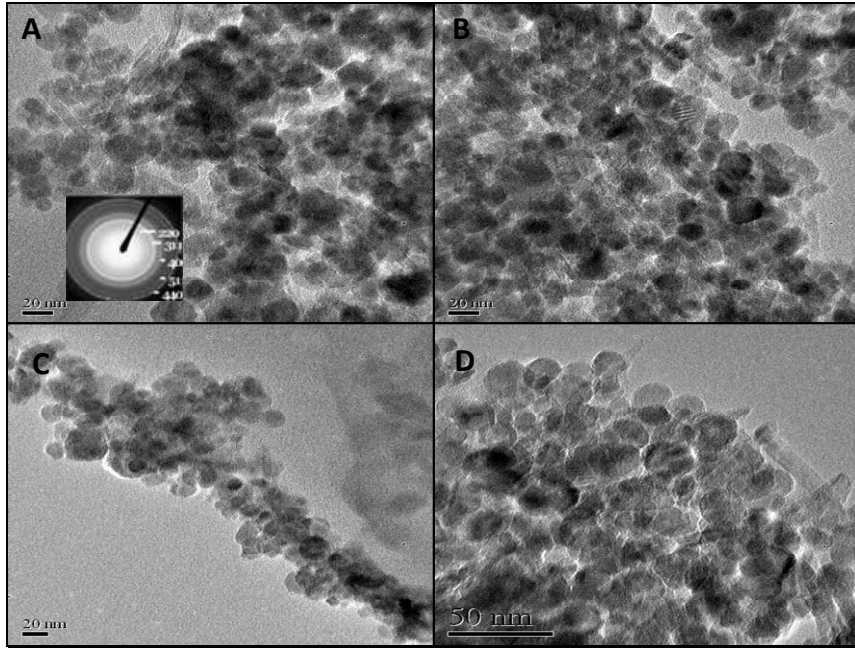
Magnetit $620-580\text{ cm}^{-1}$ ’ de karakteristik band verir. Çalışmada $627-575\text{ cm}^{-1}$ de belirlenen söz konusu bandlar manyetik jelatin nanopartikül örneğinde de saptanmıştır.

Şekil 3.10’ de jelatin, magnetit ve manyetik jelatin nanopartikül örneklerinin TGA analizleri verilmiştir. Tüm örneklerde $70-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ye kadar olan eğri örneklerde adsorplanmış su moleküllerinden kaynaklanmaktadır. Jelatin için Tg analizine bakıldığında, $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ de yapıda %25,39 oranında yapının korunduğu gözlenirken jelatin nanopartikülde aynı sıcaklıkta %83,07 oranında yapının korunduğu saptanmıştır. Nanopartikül oluşumunun termal kararlılığı arttırdığı görülmektedir. Manyetik jelatin nanopartiküllerinde ise 500°C ’de magnetite bağlı olarak termal kararlılığın % 86,91’e yükseldiği ve jelatin nanopartiküllerine kıyasla termal kararlılığın arttığı görülmüştür. Manyetik jelatin nanopartiküllerinde maksimum kaybın $200 - 400^{\circ}\text{C}$ ’de olduğu görüldü. Gaihre ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada manyetik nanopartiküllerin yapısını % 51 oranında koruduğu görülmüştür ancak bu çalışmada manyetik jelatin nanopartiküllerin kararlılığı % 86 olarak kaydedilmiştir. Gaihre ve arkadaşlarının

yaptıkları çalışmaya kıyasla termal kararlılık bu çalışma ile artırılmıştır (Gaihre et al., 2008).



Şekil 3.10 Jelatin Tip B, magnetit, GNP ve MGNP'ye ait TG analizi.



Şekil 3.11 Manyetik jelatin nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri.

Şekil 3.11'de manyetik jelatin nanopartiküllerine ait TEM görüntüleri görülmektedir. Skaladan da anlaşılacağı gibi boyutu yaklaşık 300 nm olan nanopartiküllerin içerisinde magnetit enkapsüle edilmiştir.

3.3 Manyetik Jelatin Nanopartiküllerine Cisplatin Adsorpsiyonu

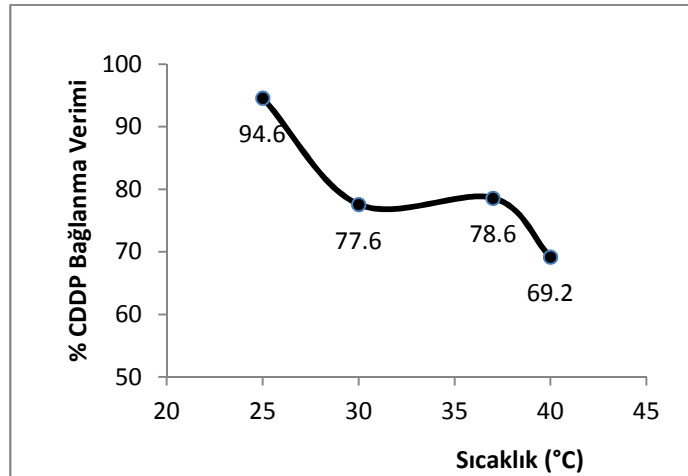
Hazırlanan manyetik jelatin nanopartiküllerine cisplatinin yüklenmesi adsorpsiyon tekniği ile gerçekleştirildi. Bu tekniğe göre hazırlanan manyetik jelatin nanopartiküllerine cisplatin yüklenmesi amacıyla adsorpsiyon süresi, cisplatin yükleme konsantrasyonu ve adsorpsiyon sıcaklığı optimizasyonu gerçekleştirildi. Adsorpsiyon izotermi belirlendi ve adsorpsiyon türüne karar verildi.

3.3.1 Cisplatin Tayini

Cisplatinin, sentezlenen manyetik jelatin nanopartiküllerine yüklenme verimini belirleyebilmek adına cisplatin standart grafiği çizildi (Şekil 3.13). Kullanılan yöntem oldukça duyarlıdır, 1-8 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon aralığında oldukça doğru tayin yapmak mümkündür. Yöntem OPDA ile cisplatinin amino gruplarının yer değiştirme reaksiyonu sonucu oluşan renk oluşumunun spektrofotometrik olarak tayinine dayanmaktadır.

3.3.2 Optimum Adsorplanma Sıcaklığının Belirlenmesi

Cisplatinin adsorpsiyon tekniği ile yüklenmesine sıcaklığın etkisi incelenerek belli sıcaklıklarda yüklenme verimi hesaplanarak Şekil 3.12’ de verilmiştir.

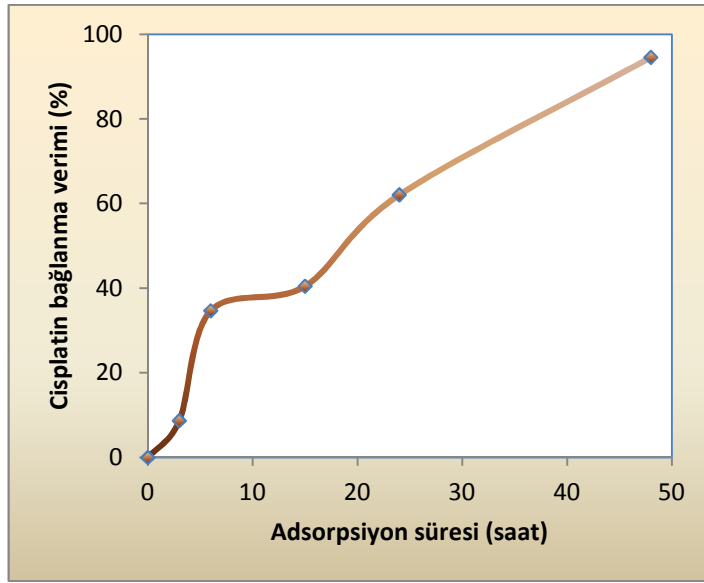


Şekil 3.12 CDDP’nin adsorpsiyonu üzerine sıcaklık etkisi.

En yüksek cisplatin yükleme veriminin 25°C’de olduğu belirlendi. Adsorpsiyon verimliliği adsorplanacak maddenin ortamda bulunan adsorban madde ile etkileşim miktarı ile artmaktadır. Bu etkileşimi artırmanın yollarından biri ise adsorban maddenin yüzey alanını küçülterek daha çok molekül ile etkileşmesini sağlamaktır. Denememizde bu sıcaklıktan yukarıdaki sıcaklıklarda manyetik jelatin nanopartiküllerin yapısının açılmasıyla nanopartiküllerin yüzey alanlarının azalmasından dolayı adsorpsiyonun giderek azaldığı düşünülmektedir.

3.3.3 Adsorpsiyon Süresi

Adsorplama ile etken madde yüklenmesinde etkin olan bir diğer parametre adsorpsiyon süresidir. Etken maddenin hazırlanan manyetik nanopartiküllere adsorpsiyonunda optimum sürenin belirlenmesi amacıyla, hazırlanan nanopartiküller 3 – 72 saat süre ile cisplatin çözeltisi içerisinde 25°C’de inkübe edildi (Şekil 3.13).

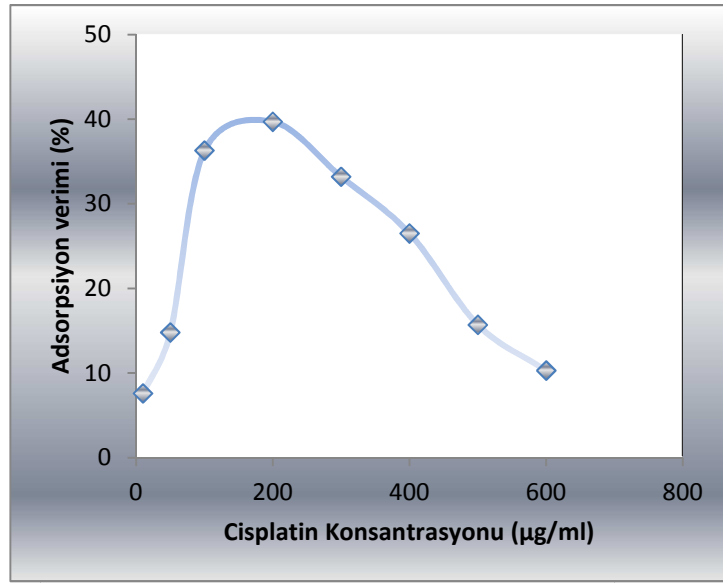


Şekil 3.13 Adsorpsiyon süresinin ilaç yüklenmesi üzerine etkisi.

Etken maddenin en iyi adsorplandığı sürenin Şekil 3.13’ te görüldüğü gibi 48 saat olduğu saptandı. 72 saat süre ile yapılan adsorpsiyon sonunda üst fazda adsorplanmayan cisplatinin tayini sırasında hazırlanan nanopartikül formülasyonunda kullanılan polimerin protein olmasından dolayı ortamın kontamine olduğu saptandı.

3.3.4 Cisplatin Yükleme Konsantrasyonu

Adsorplama tekniği ile etken madde yüklenmesinde ortamda bulunan etken maddenin konsantrasyonu adsorbant maddenin yapısı sebebiyle önem taşımaktadır. Adsorbant maddenin yüzeyinin yapısının gözenekli oluşu, boyutu gibi parametreler sebebiyle adsorplanma verimi değişmektedir. Adsorplanma verimi üzerine cisplatin konsantrasyonunun etkisinin incelenmesi amacıyla adsorpsiyon ortamına 10 -600 $\mu\text{g/ml}$ arasında değişen konsantrasyonlarda ilaç eklenerek 25°C’de 48 saat inkübe edildi.



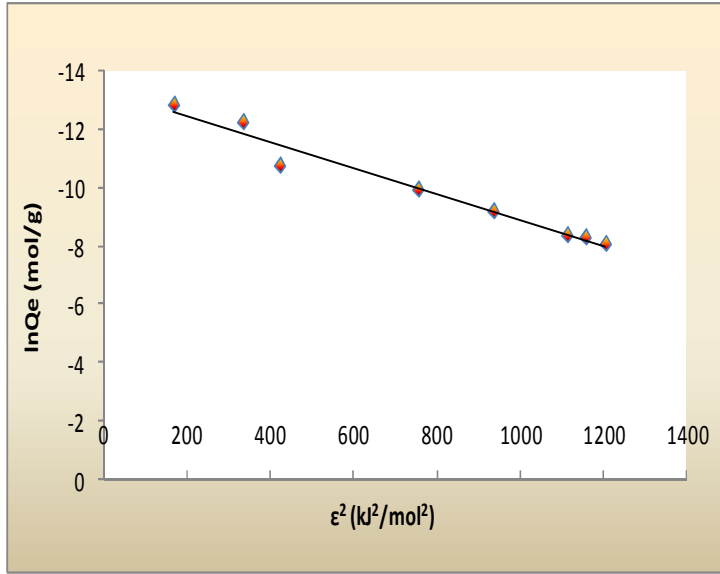
Şekil 3.14 Adsorpsiyon verimi üzerine optimum cisplatin konsantrasyonunun belirlenmesi.

Adsorplanma ortamdaki etken madde konsantrasyonu ile adsorplanan madde konsantrasyonu arasında bir denge oluşuncaya dek devam etmektedir. Şekil 3.14’ te görüldüğü gibi bu dengenin en kolay 50 mg jelatinden yola çıkılarak hazırlanan manyetik nanopartiküllere ilaç yüklenmesinde 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda kurulduğu görüldü. Bu konsantrasyonun üstündeki konsantrasyonlarda nanopartiküllerin agregatlaştığı gözlemlendi.

3.3.4.1 Adsorpsiyon izoterminin belirlenmesi

Adsorpsiyon prosesi fiziksel ve kimyasal adsorplanma olmak üzere iki yol ile gerçekleşmektedir. Fiziksel adsorplanmada enerji (E) -8,4 kJ/mol’den düşük olmakta ve adsorplanma ile yüklenen madde kolaylıkla adsorbanttan ayrılabilir. Öte yandan kimyasal adsorplanmada enerji değeri -8,4 kJ/mol’den daha yüksektir. Bu enerji değeri ve üstünde adsorplanmanın non-

kovalent etkileşimlerle gerçekleşen kemisorpsiyon olduğu, adsorblanan maddenin adsorbant yüzeyinden kolaylıkla ayrılmadığı söylenebilmektedir.



Şekil 3.15 Dubinin – Radushkevich izotermi.

Çalışmada Şekil 3.15’te görülen Dubinin-Radushkevich izotermine göre hesaplanan enerji değeri -11,2 kJ/mol ve $Q_{\max}$ değeri 13,4 mol/g olup R^2 değeri 0,97’dir. Elde edilen değerlere göre adsorplanmanın kemisorpsiyon şeklinde gerçekleştiği ve istemli olduğu saptanmıştır.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Nanopartiküler taşıyıcı ve kontrollü salım sistemleri kullanılarak kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ajanlarının yan etkilerinin azaltılması ve sadece istenilen bölgeye ilacın hedeflendirilmesi amacıyla pek çok çalışma gerçekleştirilmektedir. Hazırlanan nanopartiküler sistemlerin ise biyobozunur, biyouyumlu olmaları ve düşük antijenik özellik taşımaları da aranan özellikler arasındadır. Eczanelerde farklı tedaviler ve görüntüleme sistemleri için üretilmiş nanopartiküler ilaç formülasyonları mevcuttur.

Akciğer kanseri tedavisinde alkileyici ajanlar sınıfından cisplatin tercih edilen bir kemoterapi ajanıdır ancak yan etkileri oldukça fazladır. Bilindiği gibi boyutu 200 nm ve üstü olan nanopartiküller doğal olarak akciğer hücrelerinde birikim yapmaktadır. Ayrıca hedeflendirme amacıyla kullanılan manyetik nanopartiküller de benzer şekilde çoğunlukla akciğer ve karaciğerde birikim yapmaktadırlar.

Yapılan çalışmada vücutta doğal olarak bulunan ve biyouyumluluğu ile biyobozunurluğu yüksek olan jelatin proteini polimer olarak kullanılmıştır. FT-IR analizinde görülen jelatinden jelatin nanopartiküllerine geçişteki amid I ve II bağlarındaki düşüş nanopartikül oluşumunu ve H bağlarındaki azalma da magnetit ile jelatin arasındaki kemisorpsiyonunu ifade etmektedir, bu verilerle manyetik jelatin nanopartikül sentezi doğrulanmıştır. Elde edilen veriler literatür ile uygunluk göstermektedir (Gaihre et al, 2008). Bunun yanı sıra TGA analizi de jelatinin 500°C’de %25,39 oranında yapısını koruyabilirken jelatin nanopartiküllerin aynı sıcaklıkta yapısını %83,07 oranında koruduğunu böylelikle bu sentez yolu ile de termal kararlılığın artırıldığı gösterilmiştir. Gaihre ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hazırladıkları sistem 450°C’ de kararlılığını % 51 düzeyinde korurken bu çalışmada termal kararlılığın % 86,91 olması ile elde edilen nanopartiküllerin kararlılığının diğer çalışmaya kıyasla daha yüksek olduğu saptandı (Gaihre et al., 2008). Desolvasyon yöntemiyle sentezlenen nanopartiküllerin boyutu 301 nm olarak saptanmıştır. Bu haliyle sentezlenen nanopartiküller doğal olarak kendiliğinden akciğerde birikeceklerdir. Hedeflendirme amacıyla kullanılan magnetit ise vücutta RES tarafından demir iyonlarına ayrıştırılarak kullanılmaktadır (Shubayev, Pisanic II and Jin, 2009). Bu sebeple toksik etkisinin olmadığı görülmüştür. Faz I veII çalışmalarına dayanarak magnetitin lethal dozunun 4 - 5 g/kg düzeyinde olmasından ve çalışmada 4 mg/ml gibi oldukça düşük konsantrasyonunun kullanılması sebebiyle yan etkisinin olmayacağı düşünülmüştür (Mederios et al., 2011). Bunun yanı sıra çalışmada

kullanılan magnetit yaklaşık 20 emu/g düzeyinde 0,1 T'lık manyetik alanda yanıt vermiştir ve günümüzde MRI cihazlarında kullanılan 1,5 – 3 T'lık manyetik alanda da yanıtının yüksek olacağından ve yarım saat gibi kısa bir sürede hedef dokuya taşınabileceğinden dolayı dışarıdan hedeflendirmeye olanak tanıyacağı düşünülmüştür. Diğer yandan faz I ve II çalışmalarında tümörlü dokunun derinliğine bağlı olarak 0,5 T ile 0,8 T arasında uygulanan manyetik alanlarda olumlu sonuçlar alınmıştır (Lubbe et al., 2001). Dung ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada manyetik kitosan nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin 10 T'lık alanda 15 emu/g cevap verdiği gözlemlenmiştir. Bu tez kapsamında yapılan çalışma sonucunda elde edilen veriler Dung ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayla kıyaslandığında 100 kat daha az bir manyetik alanda çok daha yüksek bir manyetik cevap alındığı görülmektedir (Dung et al., 2009).

Manyetik jelatin nanopartiküllerine ilaç adsorpsiyonunun izotermi, adsorpsiyon işleminin enerjisi -11,2 kJ/mol'dür ve bu bize adsorpsiyonun hem kimyasal yolla gerçekleştiğini hem de adsorpsiyon istemli olarak gerçekleştiğini göstermiştir. Hazırlanan manyetik jelatin nanopartikül formülasyonuna yine yaklaşık 700 µg cisplatin ilacı yüklenebilmektedir. Yine bilindiği gibi serbest ilaç formu olan cisplatinin tek dozda sadece 100 µg kadarı hedef dokuya ulaşmaktadır (Mederios et al., 2011). Buna karşın çalışmada hazırlanan formülasyonda ilaç oldukça deriştirilerek hedef dokuya daha yüksek dozda ve sağlıklı dokulara zarar vermeden uygulanması olanağını tanımaktadır.

Hazırlanan cisplatin yüklü manyetik jelatin nanopartiküllerin kemoterapi ajanı olarak kullanılma potansiyeli vardır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ak, G.**, 2010, Folat-PEG-Doxorubicin türevinin sentezlenerek teknesyumla işaretlenmesi ve kanser görüntüleme ajanı olarak kullanım olanaklarının Araştırılması, *Yüksek lisans tezi*, İzmir, 98s.
- Alderden, R.A., Hall, M.D. and Hambley, H.W.**, 2006, The discovery and development of cisplatin, *Journal of Chemical Education*, 83(5), Australia, 7p.
- Almedia, C.A. and Barry, S.A.**, 2010, Cancer: Basic Science and Clinical Aspects, *Wiley-Blackwell*, UK, 389p.
- Anılanmert, B., Yalçın, G., Arıöz, F. and Dölen, E.**, The spectrophotometric determination of cisplatin in urine, using o-phenylenediamine as derivatizing agent, *Analytical Letters*, 34(1), Turkey, 10p.
- Boulikas T., Alevizopoulos N., Ladopoulou A., Belimezi M., Pantos A., Chistofis P. and Roberts M.**, 2007, The Cancer Clock, *Wiley*, UK, 289p.
- Cho, M., Kwak, K.S., Park, D.C., Gu, Y.S., Ji, C.I., Jang, D.H., Lee, Y.B. and Kim, S.B.**, 2004, Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage, *Food Hydrocolloids*, 18, South Korea, 6p.
- Coester, C.J., Langer, K., Von Briesen, H. and Kreuter, J.**, 2000, Gelatin nanoparticles by two step desolvation a new preparation method surface modification and cell uptake, *Journal of Microencapsulation*, 17(2), Germany, 6p.
- Duclaior, C. and Nakache, E.**, 2002, Polymer Nanoparticle Characterization in Aqueous Suspensions, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 7, France, 29p.
- Dung, D.K.T., Hai, T.H., Phuc, L.H., Long, D.B., Vinh, L.K. and Truc P.N.**, 2009, Preparation and characterization of magnetic nanoparticles with chitosan coating, *Journal of Physics: Conference Series*, 187, Vietnam, 6p.
- Gaihre, B., Aryal S., Khil M.S. and Kim H.Y.**, 2008, Encapsulation of Fe₃O₄ in gelatin nanoparticles: Effect of different parameters on size and stability of the colloidal dispersion, *Journal of Microencapsulation*, 25(1), London, 9p.

KAYNAKLAR (devam)

- Gaihre, B., Khil, S.M., Lee, D.R. and Kim, H.Y.**, 2009, Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and *in vitro* drug release study, *International Journal of Pharmaceutics*, 365, Republic of Korea, 9p.
- Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwala, A. and Amiji, M.**, 2008, A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 126, Boston, 17p.
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.E. and Montero, M.P.**, 2011, Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review, *Food Hydrocolloids*, 25(8), Madrid, 14p.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R. and Delie, F.**, 2008, Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), Switzerland, 8p.
- Haley, B., and Frenkel, E.**, 2008, Nanoparticles For Drug Delivery in Cancer Treatment, *Urologic Oncology*, 26, USA, 7p.
- Jahanshahi, M., and Babaei, Z.**, 2008, Protein nanoparticle: a unique system as drug delivery vehicles, *African Journal of Biotechnology*, 7(25), Iran, 8p.
- Jana, C., Jana, D., Dalibor, H., Vojtech, A., Rene, K. And Jaromir, H.**, 2010, Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering, *Pharmacological Research*, 62, Çek Cumhuriyeti, 5p.
- Jurgons, R., Seliger, C., Hilpert, A., Trahms, L., Odenbach, S. and Alexiou, C.**, 2006, Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18, Germany, 8p.
- Kalevi, K., Paola, E., Kim B. and Ernest, K.J.P.**, 2008, Nanoparticles in Cancer, *Current Radiopharmaceuticals*, 1, Helsinki, 6p.
- Karaboyacı, M.**, 2010, *Modifiye Edilmiş Lignoselülozikler ile Ağır Metal Adsorpsiyonu*, Süleyman Demirel Üniv. Fen bilimleri Enst. Doktora Tezi.
- Kaş, S.H.**, 2002, Kontollü Salım Sistemleri, *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayınları*, 1, İstanbul, 397s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Komsa-Penkova, R., Spirova, R. and Bechev, B.**, 1996, Modification of Lowry's method for collagen concentration measurement, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 32, Sofia, 10p.
- Kreuter, J. and Hartmann, H.R.**, 1983, Comparative study on the cytostatic effects and the tissue distribution of 5-fluorouracil in a free form and bound to polybutylcyanoacrylate nanoparticles in sarcoma 180-bearing mice, *International Journal for Cancer Research and Treatment*, 40(5), Basel, 4p.
- Lübbe, A.S., Alexiou, C. and Bergemann C.**, Clinical applications of magnetic drug targeting, 2001, *Journal of Surgical Research*, 95, Germany, 6p.
- Mederios, S.H., Santos, A.M., Fessi, H. and Ellaissari A.**, 2011, Stimuli – responsive magnetic particles for biomedical applications, *International Journal of Pharmaceutics*, 403, France, 22p.
- Mohanraj, V.J., and Chen, Y.**, 2006, Nanoparticles – A review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), Australia, 12p.
- Ofokansi, K., Winter, G., Fricker, G. and Coester, C.**, 2010, Matrix-loaded biodegradable gelatin nanoparticles as new approach to improve drug loading and delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76(1), Germany, 8p.
- Pehlivan, E.**, 2010, *Tabii Adsorbanlar ile Ağır Metallerin Sulu Çözeltilerden Soprsiyonu*, Kimya -1 Çalıştay.
- Perez, R.P.**, 1998, Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance, *European Journal of Cancer*, 34(10), USA, 7p.
- Pınarbaşı, O.**, 2010, Alfa-fenil-N-tert-bütil Nitron (PBN) Yüklü Nanopartiküler Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması ve İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi, farmasötik teknoloji programı yüksek lisans tezi.
- Raz'em, D. And Katus'in-Raz'em, B.**, 2008, The effects of irradiation on controlled drug delivery/controlled drug release systems, *Radiation Physics and Chemistry*, 77(3), Croatia, 56p .
- Reedijk, J. and Lohman, P.H.M.**, 1985, Cisplatin: Synthesis, Antitumor Activity and Mechanism of Action, *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition*, 7(5), Netherlands, 7p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singh, R. and Lillard, J.W.**, 2009, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and Molecular Pathology*, 86, USA, 8p.
- Sinha, R., Kim, J.G., Shuming, N., and Shin, M.D.**, 2006, Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery, *Molecular Cancer Ther.*, 5(8), Atlanta, 8p.
- Shruti, G., Banerjee, R.**, 2010, Intravesical drug delivery: challenges, current status, opportunities and novel strategies, *Journal of Controlled Release*, India, 148(2), 12p.
- Shubayev, V.I., Pisanic II, T.R. and Jin S.**, 2009, Magnetic nanoparticles for theragnostics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, U.S.A, 10p.
- Wang, X., Yang, L., Chen, Z.G. and Shin, M.D.**, 2008, Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging, *A Cancer Journal for Clinicians*, 58, Atlanta, 13p.
- Zillies, J.C., Zwioerek, K., Hoffmann, F., Vollmar, A., Anchordoquy, T.J., Winter, G. and Coester, C.**, 2008, Formulation development of freeze-dried oligonucleotide-loaded gelatin nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(2), Germany, 7p.
- Zwioerek, K.**, 2006, Gelatin nanoparticles as delivery system for nucleotide-based drugs, published by Verlag Dr. Hut, Munich, 226p.

ÖZGEÇMİŞ

Ad : Habibe
 Soyad : YILMAZ
 Doğum Yeri : Kırcaali
 Doğum Tarihi : 31.10.1986
 Uyruk : T.C./B.G.
 Medeni Durum: Bekar
 Adres : 5546 sok. No:11 D:3 Çamdibi/İZMİR
 e-posta adresi : yilmaz.habibe@hotmail.com
 Cep Telefonu : 0541 234 40 13

EĞİTİM BİLGİLERİ

Halil Atilla İlköğretim Okulu (1993-1995)
 Çamdibi Kordon Birlik İlköğretim Okulu (1995-2000)
 Şehitler İlköğretim Okulu (2000-2001)
 Konak Anadolu Lisesi (2001-2005)
 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü (2006-2010) (2,77/4,00)
 Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı (2010-)

SEMİNER VE KONGRELER

1. Kanser Biyolojisinde Güncel Konular Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi, 31.05 – 03.06.2011.
2. Kök Hücre Sempozyumu, Ege Üniversitesi, Ebiltem, 16.03.2009.
3. ISO 22000:2005 Gıda Güvenliği Yönetimi Sistemi Sertifikalı Eğitimi, Ege Üniversitesi, Egasan, 07.03 – 08.03.2009.
4. Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu, Ege Üniversitesi, Ebiltem, 07.03.2008.
5. Kanser Biyokimyası Sempozyumu, Ege Üniversitesi, Ebiltem, 02.03.2007.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :

Ak. G., Yılmaz H., Hamarat Şanlıer Ş., “Synthesis of Doxorubicin Incorporated Magnetic Albumin Nanospheres with a Simple Method and In Vitro Doxorubicin Release Studies”, International Symposium on Drug Research And Development “From Chemistry to Medicine”, 27-29 Mayıs Antalya, 2011

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

Yılmaz H., Ak G., Hamarat Şanlıer Ş., “Removal Of Hazardous Food Dye Brilliant Blue FCF From Aqueous Solution By Magnetic Crosslinked Chitosan Beads”, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, (baskıda).

Bilimsel kuruluş üyelikleri:

Moleküler Kanser Araştırma Derneği üyesi.