

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEDEFLİ KANSER TEDAVİSİNE YÖNELİK KİL KATKILI
NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ VE MODELLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Deniz KARATAŞ

Cevher Hazırlama Mühendisliği Anabilim Dalı

Cevher Hazırlama Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Sabri ÇELİK

EKİM 2017

**HEDEFLİ KANSER TEDAVİSİNE YÖNELİK KİL KATKILI
NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ VE MODELLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Deniz KARATAŞ
(505112003)**

Cevher Hazırlama Mühendisliği Anabilim Dalı

Cevher Hazırlama Mühendisliği Programı

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Sabri ÇELİK
Eş Danışman: Doç. Dr. Adem TEKİN**

EKİM 2017

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 505112003 numaralı Doktora Öğrencisi Deniz KARATAŞ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “HEDEFLİ KANSER TEDAVİSİNE YÖNELİK KİL KATKILI NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ VE MODELLENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Mehmet Sabri ÇELİK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Eş Danışman : **Doç. Dr. Adem TEKİN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Gülay BULUT**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Alimet Sema ÖZEN
Piri Reis Üniversitesi

Doç. Dr. Yasemin YÜKSEL DURMAZ
İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç. Dr. Birgül BENLİ
İstanbul Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : 22 Eylül 2017
Savunma Tarihi : 06 Ekim 2017





Aileme,



ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet Sabri ÇELİK olmak üzere Endüstriyel hammadde olarak bilinen kilin, salınımlı ilaç teknolojisi bünyesinde farmakolojik kullanımında, ekonomik değer olarak yer almasını sağlayacak bu çalışmanın, konusunu öneren ve çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübesini esirgemedi, akademik çalışma sistematiklerini dikte eden, yapıcı eleştirileri ile yönlendiren, her türlü imkanı sağlayarak desteğini esirgemeyen ve sabırla bana yardımcı olan danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet Sabri ÇELİK hocama sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan ayrıca, tez izleme komitemde yer alarak, çalışmamda değerlendirmeleri ve yönlendirmeleri ile bana destek veren eş danışmanım Sayın Doç. Dr. Adem TEKİN hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimimden başlayarak lisansüstü eğitimimin sonuna kadar maddi ve manevi olarak bana destek olan İstanbul Teknik Üniversitesi kurumuna ve tez çalışmam süresince teknik imkanlarından yararlandığım Cevher Hazırlama Mühendisliği Bölümünde görev yapan saygıdeğer bütün hocalarıma teşekkür ederim.

İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü müdürü Prof. Dr. İsmail Koyuncu ve değerli çalışanlarına, İTÜ Ulusal Membran Teknolojileri Uy-Gar Merkezi (MEM-TEK) kıymetli uzman ve çalışanlarına çok teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Ulusal Yüksek Başarımlı Hesaplama Merkezi (UHEM) uzmanlarına ve özellikle Dr. Cem Ahmet Mercan'a minnettarım. İTÜ Kimya bölümü değerli öğretim elemanları Prof. Dr. Ahmet GÜL ve Prof. Dr. Yusuf YAĞCI hocalarıma ve uzman Dr. Barbaros AKKURT ve Dr. Mustafa ARSLAN beyefendilere şükranlarımı sunarım. Prof. Dr. Işık ECE hocamın şahsında, İTÜ Jeoloji Mühendisliği Bölümüne ve Jeokimya Araştırma Laboratuvarı değerli uzman ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleşmesinde, gerek yurtiçi gerekse de yurtdışında maddi ve manevi yardımını esirgemeyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkürü bir borç bilirim. Özellikle, TÜBİTAK proje yürütücümüz Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ ve şahsında Bezmialem Vakıf Üniversitesine, Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU hocama ve değerli öğretim üyelerine çok teşekkür ederim. Tezimin bir kısmını gerçekleştirdiğim Kanada'daki Alberta Üniversitesinde beni ağırlayan ve bölümünün tüm imkanlarını bana sunan değerli hocam Prof. Dr. Zhenghe XU'ya ve Kimya ve Malzeme Mühendisliği bölüm üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım süresince, haftalık bölüm toplantılarında ve özel olarak karşılaştığım sorunları paylaştığım ve olumlu eleştirileri ile çalışmama ve bana pozitif enerji katan, yardımlarını esirgemeyen Dr. İbrahim Ethem KARAAĞAÇLIOĞLU'na özellikle çok teşekkür ederim. Ayrıca yapılan bu çalışmada bana hizmetini ve yardımını esirgemeyen tüm saygıdeğer bilim insanlarına ve ismini sayamadığım dostlarıma da çok çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatımda, hiçbir zaman yalnız bırakmayan değerli aileme ve sabırla beni bekleyen sevgili nişanlım Av. Öznur KARDAŞ hanımefendiye de sağladıkları manevi destekten dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekim 2017

Deniz Karataş
(Yüksek Maden Mühendisi)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ....	1
2. TEMEL KAVRAMLAR	3
2.1 Kil Mineralleri.....	3
2.2 Polimer Kimyası.....	6
2.2.1 PLGA polimeri.....	8
2.3 İlaç Salımı	9
2.4 Hedefli İlaç Salımı	11
2.5 Curcumin ve 5-FU İlaçları ve Önemi.....	14
2.6 Teorik Çalışmalar	16
2.6.1 Yoğunluk fonksiyoneli teorisi.....	21
2.6.2 Baz setleri.....	24
2.6.3 Moleküler dinamik simülasyonları	28
2.7 Literatür Çalışması	32
3. DENEYSEL VE TEORİK YÖNTEMLER	37
3.1 Deneysel Çalışmalar.....	37
3.1.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan araç ve gereçler	38
3.1.2 Deneysel yöntemler.....	39
3.2 Teorik çalışma ve yöntemler	41
3.2.1 Yoğunluk fonksiyoneli teorisi çalışmaları	44
3.2.2 Moleküler dinamik simülasyon çalışmaları	45
4. ÇALIŞMALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	47
4.1 Nanokil üretim teknikleri	47
4.1.1 Saflaştırma yöntemi	47
4.1.2 Attritor ile boyut küçültme yöntemi.....	50
4.2 Nanopartikül üretimi	57
4.2.1 Mekanik karıştırıcı ile NP üretimi	58
4.2.2 DM yöntemi ile NP üretim deneyi.....	62
4.2.3 DM yöntemi ile Curcumin miktarının optimizasyonu.....	65
4.3 Nanokil ve nanopartikülün karakterizasyonları	66
4.3.1 XRF ve XRD analizleri.....	66
4.3.2 FT-IR analizleri.....	70
4.3.3 E-SEM analizleri.....	74
4.3.4 DSC analizleri	79
4.3.5 HPLC analizi ve salım deneyleri	81

4.3.6 Optimize edilen formülasyonun ilaç taşıma kapasitesinin ölçülmesi	83
4.3.7 İn-vitro anti-kanser ve toksisite deneyleri	84
4.3.8 5-FU ile yapılan çalışmalar	86
4.4 YFT çalışmaları	92
4.4.1 Küme modeller için YFT çalışmaları.....	92
4.4.2 PLGA/Curcumin ve kil etkileşimlerinin YFT ile modellenmesi	97
4.4.3 Periyodik YFT hesapları	102
4.4.4 5-FU ile yapılan YFT hesaplamaları.....	104
4.5 Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları.....	105
4.5.1 Na-MMT yüzeylerinde Curcumin/PLGA kompozitinin MD simülasyonları	106
4.5.2 Na-MMT yüzeylerinde 5-FU/PLGA kompozitinin MD simülasyonları	112
4.5.3 Geleneksel kompozit ile yapılan MD çalışmaları	117
4.5.4 İnterkale kompozit ile yapılan MD çalışmaları.....	120
4.5.5 Eksfoliye kompozit ile yapılan MD çalışmaları.....	122
4.5.6 Modellere ait analiz sonuçları	123
4.5.7 Asidik ve nötr pH ortamlarında MD simülasyonları.....	129
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	139
KAYNAKLAR.....	145
EKLER.....	159
ÖZGEÇMİŞ.....	163

KISALTMALAR

BSSE	:Baz setten kaynaklı süperpozisyon hatası
CC	:Birleştirilmiş küme teorisi
CI	:Yapılandırma-Etkileşim teorisi
CMC	:kritik misel konsantrasyonu
CP	:Karşıt duruş düzeltmesi
DCM	:Diklorometan
DLS	:Dinamik ışın taraması
DM	:Diyaliz membranı
DM3	:DM kullanılarak üretilen nanopartikülün 3.cü deney kodu
DSC	:Diferansiyel taramalı kalorimetri
EPR	:Geçirgenlik ve alıkonma etkisi
E-SEM	:Çevresel taramalı elektron mikroskobu
FT-IR	:Fourier transform infrared
GEA	:Gradyent genişleme yaklaşımı
GGA	:Genelleştirilmiş gradyan yaklaşımı
GTO	:Gaussian tip orbitaller
HF	:Hartree Fock metodu
IV	:Damar yolu ile enjeksiyon
KDK	:Kasyon değiştirme kapasitesi
L-929	:Adipoz sağlıklı fibroblast hücre hattı
LCAO	:Atomik orbitallerin lineer kombinasyonu
LDA	:Yerel yoğunluk yaklaşımı
LDH	:Çift tabakalı hidroksi
LOI	:Kızdırma kaybı
LSD	:Yerel çevirme yoğunluğu
MCF-7	:Göğüs kanseri epitel hücre hattı
MD	:Moleküler dinamik

MET	:Çoklu elektron teorisi
MPN	:Moeller-Plesset pertürbasyon teorisi
MSD	:Ortalama kare yöntemi
Na-MMT	:Sodyum montmorillonit
NP	:Nano partikül
NPT	:İzotermal izobarik topluluk
PBE	:Perdew, Burke ve Ernzerhof fonksiyoneli
PES	:Potansiyel enerji yüzeyleri
PLGA	:Poli laktik koglikolik asit
PVA	:Polivinil alkol
RES	:Retikulo endotelyal sistem
RDF	:Radyal dağılım fonksiyonları
RI	:İntegral yaklaşım çözünürlüğü
SCS	:Spin bileşen ölçekleme
STO	:Slatter tip orbital
UB	:Ultrasonik banyo
UP	:Ultrasonik prob
XRD	:X-ışını kırınımı
XRF	:X-ışını floresans (xrf) spektrometresi
YFT	:Yoğunluk fonksiyoneli teorisi

SEMBOLLER

ψ	:Dalga fonksiyonu
H	:Hamiltonyen operatörü
V	:Potansiyel enerji
∇^2	:Laplasian diferansiyel operatörü
$\vec{p}$	:Momentum operatörü
h	:Planck sabiti
$\hbar$	:İndirgenmiş Planck sabiti
c	:Işığın boşluktaki hızı
m	:Parçacığın kütlesi
i	:“-1” sayısının karekökünün sanal (imajinel) birimi
t	:Zaman
D_t	:Zamana bağlı değişim
s_σ	:Yerel homojensizlik parametresi



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Montmorillonit kilinin genel özellikleri.	4
Çizelge 4.1 : Sodyum montmorillonit kiline ait fiziksel ve kimyasal özellikler.	47
Çizelge 4.2 : Saflaştırılmış kilin boyut analiz sonuçları.	49
Çizelge 4.3 : Mekanik karıştırıcıyla hazırlanmış partiküllerin boyut dağılımı.	59
Çizelge 4.4 : DM kullanarak üretilen nanopartiküllere ait boyut dağılımları.	62
Çizelge 4.5 : Nanopartiküllerin rehidrasyon sonrası boyut dağılımları.	64
Çizelge 4.6 : Blender ile elde edilmiş kile ait kimyasal analiz sonuçları.	67
Çizelge 4.7 : Attritorle üretilmiş kil numunesine ait kimyasal analiz sonuçları.	68
Çizelge 4.8 : Monomerlere ait yapılan bağlanma enerjileri [kJ/mol].	93
Çizelge 4.9 : Curcumin/PLGA etkileşimlerinin enerjileri [kJ/mol].	96
Çizelge 4.10 : Curcumin ve PLGA'nın MMT ile etkileşim enerjileri [kJ/mol].	101
Çizelge 4.11 : Kil-Curcumin ve Kil-PLGA sistemlerinin bağlanma enerjileri.	103
Çizelge 4.12 : 5-FU içeren modellere ait bağlanma enerjileri [kJ/mol].	105
Çizelge 4.13 : Curcumin içeren modellerin BE enerji değerleri [kcal/mol].	128
Çizelge 4.14 : 5-FU içeren modellerin BE enerji değerleri [kcal/mol].	128
Çizelge 4.15 : Asidik ve nötr pH ortamlarındaki çiftlere ait H-bağ sayıları.	135
Çizelge 4.16 : Modellere ait Curcumin moleküllerinin difüzyon katsayıları.	136
Çizelge A.1 : Kil süspansiyonunun tekrarlanmış boyut analiz sonuçları.	162



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Sodyum montmorillonitin (Na-MMT) birim hücresinin yandan ve üstten görünümü. Mor, kırmızı, sarı, beyaz ve pembe sırasıyla sodyum (Na), oksijen (O), silisyum (Si), hidrojen (H) ve alimünyum (Al) atomlarını temsil etmektedir.	5
Şekil 2.2 : Polimerizasyon yöntemlerinin genel akım şeması.	7
Şekil 2.3 : PLGA ko-polimerinin sırasıyla LA ve GA monomerleri (üstte), iki pentamerden oluşan dekameri (altta). Gri, kırmızı ve beyaz renkler sırasıyla karbon (C), oksijen (O) ve hidrojen (H) atomlarını temsil etmektedir.	8
Şekil 2.4 : İlaç salım sistemlerinin genel görünümü.	9
Şekil 2.5 : Bazı ilaç taşıyıcı sistemler.	10
Şekil 2.6 : İdeal kil-ilâç karışımı ve in-vivo ilâç salım mekanizması. (Kil mineralinin yüzey yükü (-); yük dengeleyici katyonlar (a+); katyonik ilâç (X+); ilaca bağlı anyonlar (Y-); in vivodaki karşıt iyonlar (A+); biyolojik ortamdaki dengeleyici karşıt iyonlar (B-)) (Aguzzi ve ark, 2007).	14
Şekil 2.7 : Curcumin ilacının en sık rastlanan keto (üstte) ve enol (altta) formları. Gri, beyaz ve kırmızı renkler sırasıyla karbon (C), hidrojen (H) ve oksijen (O) atomlarını temsil etmektedir.	15
Şekil 2.8 : 5-Fluorourasil. Gri, beyaz, kırmızı, mavi ve mavimsiye renklerle sırasıyla karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N) ve flor (F) atomlarını temsil etmektedir.	15
Şekil 2.9 : Hesaplamalı kimya yöntemleri.	19
Şekil 2.10 : Tipik teorik çalışma ve deneysel çalışma aşamaları.	20
Şekil 2.11 : Bağlanma enerjilerinin bileşenlerinin gösterimi.	30
Şekil 2.12 : MD simülasyonunun hazırlık, ilerleme ve sonuçlandırma aşamaları. ...	31
Şekil 3.1 : Deneysel çalışmaların genel akım şeması.	37
Şekil 3.2 : Yapılan tüm hesaplamalı çalışmalar.	42
Şekil 3.3 : Polimer ve kil etkileşimleri sonucu oluşan olası senaryoları.	43
Şekil 4.1 : 750 cc besleme tankı ve elektronik paneli ile birlikte 01-HD marka Attritor cihazı.	51
Şekil 4.2 : Attritörden alınan numunelerin ilk (sol) ve santrifüj sonrası (sağ) görünüşleri.	52
Şekil 4.3 : Hacimce %1 seyreltilmiş olan Attritor dispersiyonlarının tane boyutları.	53
Şekil 4.4 : Süreye bağlı kil süspansiyonlarının tane boyut sonuçları.	54
Şekil 4.5 : 10 saatlik attritor öğütme işlemi sonucunda elde edilmiş olan kil süspansiyonlarına ait yoğunluk (üstte) ve numerik (altta) boyut dağılımları.	56
Şekil 4.6 : Ependorf santrifüj kullanılarak üretilen nanopartiküle ait boyut dağılımı.	61
Şekil 4.7 : Artan Curcumin miktarına bağlı boyut dağılım sonuçları.	65

Şekil 4.8 : Nanokil ve nanopartiküle ait XRD paternleri.....	69
Şekil 4.9 : Geliştirilen tekniklerle üretilmiş olan kil numunelerine ait spektrumlar..	71
Şekil 4.10 : NP ve bileşenlerinin spektrumları.	72
Şekil 4.11 : Cam ve mika yüzeylerindeki nanokil partiküllerine ait SEM imajları..	75
Şekil 4.12 : Açık havada kurutulmuş çöken kil partiküllerine ait SEM imajları.	76
Şekil 4.13 : Nanopartiküle ait E-SEM imajları.....	77
Şekil 4.14 : Nanopartikülün E-SEM/EDAX sonuçları.	78
Şekil 4.15 : Nanopartiküldeki Al ve Si elementlerine ait mikrograflar.	79
Şekil 4.16 : DSC termogram eğrileri.	80
Şekil 4.17 : Curcumin'in HPLC kromatogramı.	82
Şekil 4.18 : Kil içeren ve içermeyen nanopartikülün salım davranışı.	82
Şekil 4.19 : PLGA-Kil nano kompozitinin L-929 fibroblast hücreleri üzerinde 24, 48 ve 72. saatlerde gösterdiği toksisite profili.....	85
Şekil 4.20 : PLGA-Kil-Curcumin nano kompozitinin MCF-7 hücre hattı üzerinde 24, 48 ve 72. saatlerde gösterdiği sitotoksik etki profili.	85
Şekil 4.21 : 5-FU ile hazırlanmış nanopartiküle ait DLS sonuçları.	87
Şekil 4.22 : 5-FU ilacı içeren nanopartiküle ait E-SEM/EDAX sonuçları.	87
Şekil 4.23 : 5-FU içeren nanopartiküle ait E-SEM imajları.	88
Şekil 4.24 : 5-FU içeren nanopartikül ve bileşenlerine ait FT-IR spektrumları.	89
Şekil 4.25 : 5-FU içeren nanopartiküle ait termogramlar.	89
Şekil 4.26 : 5-FU içeren PLGA-Kil nano kompozitinin MCF-7 hücre hattı üzerinde 24, 48 ve 72. saatlerde gösterdiği sitotoksik etki profili.	91
Şekil 4.27 : Farklı LA ve GA monomer dizilimlerine ait final geometrileri. Beyaz, gri ve kırmızı renkler sırasıyla hidrojen (H), karbon (C) ve oksijen (O) atomlarını temsil etmektedir.....	92
Şekil 4.28 : Beşer GA (üstteki) ve LA (alttaki) monomerinden oluşan optimize iki PLGA polimeri.	94
Şekil 4.29 : Curcuminin formları arasındaki B97-D/TZVP seviyesinde modellenmiş final geometrileri.	95
Şekil 4.30 : Curcumin-PLGA yapıları. a) curcumin (keto) – LA ₁ GA ₁ b) curcumin (enol) – LA ₁ GA ₁ c) curcumin (keto) – LA ₂ GA ₂ d) curcumin (enol) – LA ₂ GA ₂ e) curcumin (keto) – LA ₃ GA ₃ and f) curcumin (enol) – LA ₃ GA ₃	96
Şekil 4.31 : PLGA/TOT soldan sağa gaz ve su ortamındaki optimize geometrileri. Gri, beyaz, kırmızı, kavuniçi sarısı, mor ve yeşil renkler sırası ile karbon, hidrojen, oksijen, silisyum, alüminyum ve magnezyum atomlarını temsil etmektedir.....	98
Şekil 4.32 : PLGA-enol/TOT soldan sağa gaz ve su ortamındaki optimize geometrileri.	98
Şekil 4.33 : Soldan sağa ketonol/TOT gaz ve su ortamındaki optimize geometrileri.	99
Şekil 4.34 : Sırasıyla (Sol üst) MMT-Curcumin (enol), (Sağ üst) MMT-Curcumin (keto) ve (Sol alt) MMT- LA ₂ GA ₂ , (sağ alt) MMT- LA ₃ GA ₃ optimize modelleri.....	100
Şekil 4.35 : Soldan sağa doğru sırasıyla MMT-curcumin (enol), MMT-curcumin (keto)ve MMT/LA ₃ GA ₃ sistemleri.	102
Şekil 4.36 : 5-FU molekülü ile elde edilmiş modellere ait en kararlı konfigürasyonlar.	104

Şekil 4.37 : MMT kilinin üstten (sol) ve yandan (sağ) polihedron stilindeki görünümü. Kırmızı, beyaz, sarı, yeşil ve pembe renkleri sırasıyla oksijen, hidrojen, silisyum, magnezyum ve alüminyum.....	107
Şekil 4.38 : Enol (üstte), keto (ortada), PLGA (altta) modellerinin ayrı ayrı tabakaları arasındaki 1 ns sonraki görüntüleri.	108
Şekil 4.39 : PLGA/enol (üstte) ve PLGA/keto (altta) kompozitlerinin Na-MMT tabakaları arasındaki final geometrisi.	109
Şekil 4.40 : Tüm modellerin XRD paternleri.	110
Şekil 4.41 : Simüle edilen modellerin 0.5-1 ns arasındaki MSD eğrileri.	111
Şekil 4.42 : Bazal ve tabakalar arası 5-FU ilacının konumlanması ile oluşturulan 4x4x2 büyüklüğündeki Na-MMT kili ve su moleküllerini de içeren başlangıç geometrileri.	112
Şekil 4.43 : Na-MMT kili ve 5-FU ilacının 300 ps sonunda oluşan final geometrileri.	113
Şekil 4.44 : PLGA dekameri varlığında Na-MMT kili ve 5-FU ilacının 300 ps sonunda oluşan final geometrisi.	113
Şekil 4.45 : Tüm modellerin XRD paternleri.	114
Şekil 4.46 : Simüle edilen modellerin MSD eğrileri.	115
Şekil 4.47 : Simüle edilen modellerin RDF eğrileri.	116
Şekil 4.48 : 20x15x4 büyütme ile elde edilmiş MMT tabakası.....	117
Şekil 4.49 : MD çalışmalarında kullanılan PLGA zinciri.....	118
Şekil 4.50 : Curcumin (sol) ve 5-FU (sağ) ilaç molekülleri içeren PLGA kaplı 001 MMT yüzeyi.....	118
Şekil 4.51 : MD simülasyonlarının son yapıları.	119
Şekil 4.52 : MD simülasyonlar sonucu elde edilen konfigürasyonlar.	120
Şekil 4.53 : PLGA polimeri (sol), Curcumin (orta) ve 5-FU (sağ) ilaç moleküllerini içeren interkale nanokil partikülleri.	121
Şekil 4.54 : MD simülasyonlar sonucu elde edilen konfigürasyonlar.	122
Şekil 4.55 : PLGA polimeri (sol) ve Curcumin (orta) ve 5-FU (sağ) ilaç moleküllerini içeren eksfoliye kil nano partikülleri.....	122
Şekil 4.56 : MD simülasyonlar sonucu elde edilen konfigürasyonlar.	123
Şekil 4.57 : Sırasıyla Curcumin (üst) ve 5-FU (alt) moleküllerine ait MSD eğrileri.	125
Şekil 4.58 : Sırasıyla Curcumin/kil (üst) ve 5-FU/kil (alt) bileşenlerine ait RDF eğrileri.	126
Şekil 4.59 : Sırasıyla nötr (üst) ve asidik (alt) ortamda MMT içermeyen kompozitlerin başlangıç ve sonuç konumları. Yeşil Curcumin, mavi PLGA ve kırmızı-beyaz renkler su molekülleri.	129
Şekil 4.60 : 2,5 ns simülasyondan sonra nötr pH'da geleneksel (üst), interkale (sol alt) ve eksfoliye (sağ alt) kompozitlerinin sonuç görüntüleri.....	130
Şekil 4.61 : Sırasıyla geleneksel, interkale ve eksfoliye modellerine ait radyal dağılım fonksiyonları.....	131
Şekil 4.62 : 2,5 ns simülasyondan sonra geleneksel (sol) ve eksfoliyasyonlu (sağ) kompozitlerin asidik pH'taki sonuç görüntüleri.	132
Şekil 4.63 : Sırasıyla PLGA-Curcumin (üst), Curcumin-MMT (orta) ve PLGA-MMT ikililerinin farklı pH ortamlarında van der Waals, elektrostatik ve toplam etkileşim enerjileri.	133
Şekil 4.64 : Her model için MSD eğrileri.....	136
Şekil A 1: DSC termogramları: (a) 5-FU, (b) 5-FU_NP, (c) AT1.....	160
Şekil A 2: DSC termogramları: (a) Curcumin, (b) PLGA ve (c) DM3 kodlu NP...161	



HEDEFLİ KANSER TEDAVİSİNE YÖNELİK KİL KATKILI NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ VE MODELLENMESİ

ÖZET

İnsanın çevresel ve biyolojik etmenler nedeni ile yaşamı boyunca sağlığı bozulmakta, çeşitli hastalıklara maruz kalmaktadır. Günümüzde insanları en çok tedirgin eden ve tıp/ farmakoloji bilimi çevrelerince de en çok araştırma konusunu oluşturan, kanser hastalığı ve türlerinin tedavi yöntemleri çalışmalarıdır. İnsanlar bu hastalıkların tedavisi için doktor tavsiyesinde ilaçlı/ilaçsız farklı terapilere başvurmaktadır. Çoğunluğu ilaç ile olan bu tedavilerde, ilacın yan etkileri ve hasta-uyumlu olması çok önem arz etmektedir. Bilim insanları da sürekli, hem deneysel hem klinik olarak daha etkili; doğru ilacı, uygulama dozajını ve şeklini bulmanın araştırmalarını sürdürmektedir. Ancak, kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçların hem kimyasal yapıları hem de uygulama sıklığı hastada kemik erimesi, saç dökülmesi gibi yan etkilere sebebiyet vermekte ve iyileşme süresini de uzatabilmektedir.

Son yıllarda ilaç taşıma sistemleri konulu birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu araştırmalarda temel amaç, tedavide kullanılan etken maddelerin daha az yan etkili ve biyo uyumlu kompozitlerle hastaya verilmesi ve tedavi süresinin kısaltılması yönünde olmaktadır. Bu ilaç taşıma sistemleri ağız yoluyla (oral) gerçekleştirildiği gibi özellikle kanser tedavileri için uygun olan damar yolu (i.v.) ile de yapılabilmektedir.

Günümüzde yetkili merciler tarafından klinikte kullanımı onaylanan nano-ilac taşıma sistemlerinin çoğu amfifilik malzemelerden oluşan ve kendiliğinden birleşme (Self Assembly; SA) özelliğine sahip olan küreciklerden ibarettir. Bu amfifilik malzemeler arasında Poli laktik ko-glikolik asit (PLGA) günümüzde iyi profili ile en bilinen polimerik yapılardan biridir. PLGA ve benzeri malzemelerden oluşan ilaç taşıma sistemleri, birçok avantaja sahip iken, “kendiliğinden birleşme” davranışının bir dezavantajı olarak, hızlı kan akışında dağılarak, taşıdıkları ilacı tümör bölgesine varmadan serbest bırakırlar. Bu sorunu en aza indirmek ve daha kararlı bir formülasyon geliştirmek için doğal kil mineralinin tabakalı yapısından birleştirici klips gibi yararlanılabilir. Sodyum-Montmorillonit (Na-MMT) biyo-uyumlu, kolay elde edilebilir ve amfifilik materyallerle etkileşebilen tabakalı bir yapıdır. Hedefli kanser tedavisi için nanopartikül boyutunun 200 nm civarında olması gerektiği açıklanmıştır. Ancak bugüne kadar yapılmış olan çalışmalarda genelde 300 nm civarında partiküller üretilmiştir. Dolayısıyla bu ihtiyacı karşılamak için bu çalışma gerçekleştirilmiştir.

Pasif hedeflendirme, ilgili dokunun fizyolojik özellikleri dikkate alınarak gerçekleştirilmektedir. Hastalıklı olan bölgedeki kan damarlarının çeperini oluşturan endotelial hücrelerinin arasındaki mesafenin normalinden daha büyük olması nanotaşıyıcının pasif olarak bu bölgeye sızmasını ve birikmesini sağlamaktadır. Böylece etkin madde gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma etkisi (EPR) sayesinde pasif hedeflendirilmiştir. Bu çalışmadaki hedefimiz de kil katkılı olarak 200 nm altında üretilen nanopartikülün doğal akışı içerisinde pasif olarak kanserli bölgeye hedeflendirmektir.

Bu hedef doğrultusunda bu tez çalışması deneysel ve teorik olarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalar öncelikle 122nm boyuta sahip olan PLGA/Na-MMT kompoziti elde edilerek başlanmıştır. Daha sonra bu nanokompozitin ilaç taşıma davranışını incelemek üzere, anti-kanser özelliği ve spektrofotometrik ölçümlerdeki kolay kullanımı ile bilinen, Curcumin, bu kompozitlere yüklenmiştir. Bu kapsamda boş kürecik elde etmek için öncelikle Na-MMT' in boyutu mekano-fiziksel yollarla nanometre ölçeğine indirgenmiştir. İlaç taşıyan partiküllerin üretiminde ise önce Curcumin PLGA' ya aseton ortamında yüklenip daha sonra saf su ortamında hazırlanmış olan kil ile Diyaliz Membranı (DM) kullanılarak misel formunda sağlam yapılı bir nanokompozit elde edilmiştir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda bu nanokompozitin 1ml'de 1250 µg Curcumin taşıma kapasitesi olduğu, bu miktardan 812 µg'ın efektif olarak nano taşıyıcının içinde olduğu sonuçları elde edilmiştir. Bu formülasyonun MCF-7 hücre soyu üzerinde gösterdiği IC₅₀ değeri 100µg olarak tespit edilmiş ve boş nano taşıyıcının L-929 fibroblast hücreleri üzerinde dikkat çekici toksik etkisi gözlenmemiştir. Benzer çalışmalar 5-Flourourasil ilacı ile de tekrarlanmış ve bu ilacın da hazırlanan kompozit ile taşınabildiği ve toksik etkisinin olmadığı ortaya konmuştur.

Tez kapsamındaki teorik çalışmaların ana hedefi ise deneysel olarak üretilmiş olan bu kompozitin bileşenlerinin atomik ölçekte birbiri ile olan ilişkisini ortaya koymaktır. İlk olarak kuantum mekanik hesaplamalar ile PLGA polimerinin yapı taşları arasındaki dizilimin ne şeklinde olduğu açıklanmaya çalışılmış daha sonra sırasıyla Curcumin ve MMT ile olan moleküler arası etkileşimleri hesaplanmıştır. Bu hesaplar neticesinde elde edilen bağlanma enerjileri her üç bileşenin de birbiri ile etkileştiğini ortaya konmuştur. Ancak daha kesin ve doğru sonuç vermesine karşın deneysel kurguya daha çok yaklaşmak ve etkin mekanizmayı açıklamak amacıyla Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları da gerçekleştirilmiştir. Curcumin ile yapılmış kuantum hesaplamaları ve moleküler dinamik benzetimleri birlikte değerlendirildiğinde, kilin Curcuminle daha güçlü bir etkileşim halinde olduğunu ve PLGA' nın ise Curcuminle yakın temasta olan kil tabakasını sarmalamaya çalıştığı sonucuna varılmaktadır. Aynı zamanda, Curcumin moleküllerinin tümünün kil yüzeyine yerleşmediği bir kısmının PLGA sarmalı içerisinde de yer aldığı da gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar 5-FU ilacı için de gözlenmiştir. Bu teorik çalışmalarda H-bağları, van der Waals ve Coulomb etkileşimleri gözlenmiş ancak en etkili elektrostatik etkileşimler olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, tez çalışması boyunca yapmış olduğumuz deneysel çalışmalarımızda ilk olarak tamamen fiziksel yollarla kil minerali nano boyuta indirgenmiştir. Bu partiküller vasıtasıyla hazırlanan nano kompozitin hedefli kanser tedavisinde kullanılabilecek formda olduğu ortaya çıkarılmıştır. Öte yandan yapılmış olan atomistik modellerden de kilin ilaç ve PLGA için uygun bir yüzey olduğu ve ilaç taşımanın yanında salımına da katkı sağladığı belirlenmiştir.

PRODUCTION AND MODELING OF CLAY ADDITIVE NANOPARTICLE FOR TARGETED CANCER TREATMENT

SUMMARY

Human health is the most important value we have. Starting from the individual, any kind of material and psychological problems that will occur in the society will also affect the backwardness of the nations. The development and promotion of societies and nations is through having a collection of healthy individuals knowing this value.

Throughout life, the health of people is deteriorated due to the reasons of environmental and biological factors and they are exposed to various diseases. Today, the most disconcerting people and medicine / pharmacology is the study of the treatment methods of cancer. People refer to different therapies with medication on the recommendation of a doctor for the treatment of these diseases. In these treatments with the majority of medications, side effects of the medication and patient compliance are very important. The details related to the investigations are also more effective, both experimentally and clinically, such as the right medicine, the dosing of the application and the shape of the drug. However, both the chemistry and the application frequency of drugs used in cancer chemotherapy cause side effects such as bone erosion and hair loss in the patient and can prolong the healing period.

In recent years, many studies have been carried out on drug delivery systems. In these investigations, the main idea is to give the active ingredients with biocompatible composites used in the treatment with fewer side effects and to shorten the duration of the treatment. These drug delivery systems can be made by the oral route or intravenous (i.v.), which is especially suitable for cancer treatments.

In this dissertation, an experimental and theoretical study was carried out on the targeted drug release of curcumin and 5-Fluorouracil (5-FU) drugs used in cancer chemotherapy using modified montmorillonite cages with ore preparation methods. Curcumin is a fluorophore compound derived from rhizomes of *Curcuma longa* (Turmeric) plant, known for its antioxidant, anti-Alzheimer, anti-cancer and similar biological activities. In many studies up to date, compounds with high fluorescence emissions such as pyrene, curcumin have been used to study the drug transport capacity of nano-drug delivery systems, followed by other studies with cytotoxic effects to investigate in-vitro anti-cancer. The substance such as paclitaxel and 5-FU has been loaded into these systems. In this study, Curcumin and 5-FU were used at all stages to make all the physico-chemical and biological activities of the PLGA-clay nanocomposite we created as a new product and to illuminate the unexplained points in detail with quantum chemical calculations and Molecular Dynamics (MD) studies.

5-FU undergoes liver when used orally. When used intravenously, it is distributed throughout the body and the brain blood barrier, as well. 5-FU circulating throughout our body in about 1 hour and thus some side effects are caused such as hair loss, liver

failure, anemia and bone marrow depression. A clay and polymer-based nanoparticle has been produced throughout our work to reduce these side effects.

As is known, materials, physical chemistry and surface chemistry are the main disciplines that Mineral Processing Engineering works together. Today, clay-based hybrid materials such as sepiolite, kaolin and montmorillonite are produced using mineral preparation and chemical techniques. These materials are frequently used in advanced technological fields. One of the most important of these uses is the health sector. The purpose of use is to reduce the side effects that may occur in classical drug treatments, by using the drug in lesser amounts and in the correct formulation. Because of the transport and release of medicines, in recent years, different disciplines have been working intensively jointly. Drug release in the human body can also be done by irradiation, such as via oral, nasal or skin routes. However, in the transport and release of drugs, it is important that the side effects of the carrier material are reduced and that the drug delivery to the targeted cell is more active and effective, and drug release is controllable.

Rapid developments in nanotechnology have shown that nanoparticles used in cancer treatment can also be formulated with inorganic materials other than organic materials. Clay minerals such as atapulgite, double-layered hydroxides (LDH) and halloysite are widely used inorganic materials. These clay minerals, which are generally aluminum-magnesium hydrosilicate ($\text{Al, Mg-SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), are being used extensively in medical and pharmacological applications due to their layered structure, large surface area and high amount of variable cation capacity. Prior art has been used for oral or topical applications in the preparation of formulations such as capsules, tablets, suspensions, emulsions using rheological and sorptive properties of the clay minerals. In recent years, crystal of kaolinite, sepiolite and montmorillonite has been used as a direct or auxiliary material in the formation of nanoparticles. Natural, hydrophilic and non-toxic inorganic minerals are also used for drug release.

By means of a cation exchange mechanism, a cationic drug was loaded onto a negatively charged surface clay and released in vivo. However, in order to realize this loading at the nano size, the clay must be able to be reduced to the nano size. Therefore, there is a need for a clay that can be easily layered by physical methods such as decantation, mechanical mixing and centrifugation. This clay can be montmorillonite (MMT) mineral which has great reserves in Tokat province in Reşadiye region in Turkey (commercial name is bentonite). Clay will play a reinforcing role in the nanoparticle to be prepared and is thought to help create a global grain. The MMT clay is soft, plastic, porous and light colored. MMT, which has a very large surface area, can be characterized by acid activation. Due to its properties such as colloidal properties when mixed with water, its swelling in water, its high plasticity and its ion exchange capacity, it can be used for drilling mud elation, bleaching of edible oils, water-solvent rheological additive, waste water cleaning, animal feed additives, nuclear waste disposal, nanocomposite production.

In pharmacology, drug transport and release experiments are carried out mainly with polymer in the in-vitro and in-vivo (living cell) environments. However, the side effects of these dosage systems, their chemical content and their high costs, encourage the search for alternative carrier systems. In this study, a nanoparticle formulation was developed for use in targeted cancer treatment using Poly lactic co-glycolic acid (PLGA) polymer, sodium montmorillonite (Na-MMT), a natural raw clay mineral,

curcumin and 5-FU drugs and this nanoparticle theoretically modeled with the density function theory (DFT) and by Molecular Dynamics (MD) simulation techniques.

Most of the nano-drug delivery systems currently approved for use in clinical practice by competent authorities are spheres composed of amphiphilic materials due to the self-assembly (SA) properties. Among these amphiphilic materials, Poly lactic co-glycolic acid (PLGA) is one of the most famous polymeric structures known today with good profile. However, drug delivery systems composed of PLGA and similar materials have many advantages, but due to the disadvantage of "self-assembly" behavior, they are dispersed in the rapid blood flow and released without reaching the tumor site of the drug they are carrying. To minimize this problem and develop a more stable formulation, the stratified structure of the natural clay mineral can be utilized like a joining clip. Sodium-Montmorillonite (Na-MMT) is a biocompatible, easily obtainable, layered structure that can interact with amphiphilic materials. It has been demonstrated that the nanoparticle size should be around 200 nm for targeted cancer treatment. However, in the studies carried out so far, particles of around 300 nm were produced in general. Therefore, this work has been done to solve this main problem.

As it is well-known, passive targeting is performed by taking into account the physiological characteristics of the respective tissue. The fact that the distance between the endothelial cells forming the wall of the blood vessels in the diseased area is greater than the normal, allows the nano drug carrier to passively infiltrate and accumulate in this region. Thus, the active substance is passively targeted by enhanced permeability and retention effect (EPR). Our aim in this study was to passively target the cancerous region in the natural flow of the clay additive nanoparticle to be produced under 200 nm.

This study was conducted experimentally and theoretically in two stages. Experimental studies were initiated by obtaining a PLGA / Na-MMT composite having a size of 122 nm. Curcumin, which is known for its easy-to-use anti-cancer properties and spectrophotometric measurements to examine the drug transport behavior of this nanocomposite, is then loaded into these composites. In this context, the size of Na-MMT was first reduced to nanometer size by mechano-physical means to obtain empty spheroids. In the production of drug-bearing particles, a nano-composite was first obtained in Curcumin/PLGA in acetic acid and then in a micelle form using a dialysis membrane (DM) with clay prepared in pure water. As a result of the characterization studies carried out, it was found that this nanocomposite had 1250 µg Curcumin transport capacity in 1 ml, 812 µg from this amount was effectively contained in the nanocarrier. The IC₅₀ value of this formulation on the MCF-7 cell line was determined to be 100 µg, and no remarkable toxic effect was observed on the L-929 fibroblast cells of the empty nano-carrier. Similar studies have also been repeated with 5-Fluorouracil and it has been demonstrated that this drug can be transported with the prepared composite and carries no toxic effect. The IC₅₀ value of the PLGA-Clay-5-FU nanocomposite was calculated as 21,30 µg/ml. This value has been found in the literature to be approximately twice that of the chitosan-MMT nanoparticle containing 5-FU compared to the A549 cell line (11,49 µg / ml) and it has been found that 5-FU molecules can be loaded more with the particle we prepared.

As a result of experimental studies, this nano drug carrier produced by this method for the first time in the world and able to be used in cancer treatment. It is a combination with polymeric material without the need for clay exfoliation. It is produced as nanocomposite acquisition without centrifugation. Nanoparticle obtains higher drug

loading capacity and less toxic nanocomposite formation and it is produced for nano drug delivery system with ideal release behavior for targeted cancer treatment.

In all the experimental studies carried out in summary, the relationship between clay, PLGA and drug trio has been revealed on a macro scale, but interaction mechanisms and formation at the atomic level are a big question. Therefore, this nanoparticle has been investigated theoretically in this study.

The main objective of the theoretical studies in the thesis is to reveal the relation of these experimentally produced composite components to each other at atomic scale. Initially, quantum mechanical calculations revealed that interaction between chains related to PLGA polymer was observed, and then interactions between molecules with Curcumin and MMT were calculated, respectively. The binding energies obtained from these calculations show that all three components are compatible with each other and interact. However, Molecular Dynamics (MD) simulations have been carried out in order to explain interactions, although quantum mechanics studies are more accurate. When we evaluate the quantum calculations and molecular dynamics simulations made with Curcumin together, we conclude that MMT is in stronger interaction with curcumin and that PLGA is trying to wrap some clay layer, which is close to curcumin. It has also been observed that a portion of the curcumin molecules, not all of which are deposited on the clay surface, are also located within the PLGA cohesive. Similar results were observed for the 5-FU drug.

In addition to the experimental work, the theoretical studies revealed the interaction between the particle components produced. In the quantum chemical models, it was seen that the PLGA chain formed coil. In these expanded models, it has been found that the drug / PLGA / clay triple is associated with electrostatic interactions. When models are observed with dynamic simulations at the molecular level, it has been shown that drug molecules can be attached to both clay and PLGA spins, and all these model analyzes reveal that clay can be a suitable surface and drug carrier mineral for this particle. In brief, in these theoretical studies, H-bonds as well as van der Waals and Coulomb interactions were observed, but the most interaction was electrostatic interactions.

As a result, in our experimental studies that we have conducted throughout our thesis work, the clay mineral was first reduced to nano size in pure physical ways. It has been discovered that the nanocomposite prepared by these particles is in a form that can be used for targeted cancer treatment. On the other hand, it has been stated that the atomic models built are suitable for delivering and releasing drug molecules from the PLGA/MMT composites and contributing to a better understanding of experimental studies.

1. GİRİŞ

Kanuni Sultan Süleyman'ın; "Olmaya devlet cihanda, bir nefes sıhhat gibi" öz deyişiyile tarih sayfalarında da yer bulan insan sağlığı, sahip olduğumuz en önemli değerdir. Bireyden başlayarak, toplumda oluşacak her türlü maddi ve manevi hastalık milletlerin geri kalmışlığına da etki edecektir. Toplumların ve milletlerin gelişmesi ve yükselmesi bu değerın kıymetini bilerek sağlıklı bireylerin oluşturduğu bir topluma sahip olmaktan geçer.

İnsanın çevresel ve biyolojik etmenler nedeni ile yaşamı boyunca sağlığı bozulmakta, çeşitli hastalıklara maruz kalmaktadır. Günümüzde insanları en çok tedirgin eden ve tıp/ farmakoloji bilimi çevrelerince de en çok araştırma konusunu oluşturan, kanser hastalığı ve türlerinin tedavi yöntemleri çalışmalarıdır. İnsanlar bu hastalıkların tedavisi için doktor tavsiyesinde ilaçlı/ilaçsız farklı terapilere başvurmaktadır. Çoğunluğu ilaç ile olan bu tedavilerde, ilacın yan etkileri ve hasta-uyumlu olması çok önem arz etmektedir. Bilim insanları da sürekli, hem deneysel hem klinik olarak daha etkili; doğru ilacı, uygulama dozajını ve şeklini bulmanın araştırmalarını sürdürmektedir. Ancak, kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçların hem kimyasal yapıları hem de uygulama sıklığı hastada kemik erimesi, saç dökülmesi gibi yan etkilere sebebiyet vermekte ve iyileşme süresini de uzatabilmektedir.

Son yıllarda ilaç taşıma sistemleri konulu birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (Oliveira ve ark, 2010; Park ve ark, 2005; Rostamizadeh ve ark. 2012; Rungnim ve ark, 2013; Singh ve Chauhan, 2008). Yapılan bu araştırmalarda temel amaç, tedavide kullanılan etken maddelerin daha az yan etkili ve biyo uyumlu kompozitlerle hastaya verilmesi ve tedavi süresinin kısaltılması yönünde olmaktadır.

Bu doktora tezi çalışmasında da bu amaçla, cevher hazırlama yöntemleri ile modifiye edilmiş montmorillonit kili kullanılarak, kanser kemoterapisinde kullanılan Curcumin ve 5-Fluorourasil (5-FU) ilacının hedefli ilaç salımı üzerine deneysel ve teorik bir çalışma gerçekleştirilmiştir. 5-FU oral olarak kullanıldığında karaciğere uğramaktadır. İntravenöz olarak kullanıldığında ise tüm vücuda dağılır ve beyin kan bariyerini geçer.

Böylece yaklaşık 1 saat içinde tüm vücudumuzu dolaşan 5-FU; saç dökülmesi, karaciğer tahribi, anemi ve kemik iliği depresyonu gibi ciddi yan etkilere sahiptir. Bu yan etkilerin azaltılması için çalışmamız boyunca polimer bazlı ve kil katkılı bir partikül üretilmiştir.

Cevher Hazırlama Mühendisliği'nin birlikte çalıştığı disiplinlerin başında malzeme, fiziksel kimya ve yüzey kimyası gelmektedir. Günümüzde, cevher hazırlama ve kimya teknikleri kullanılarak organokil ve mezoporoz yapıdaki silikalar üretilmektedir. Sepiyolit, kaolen ve montmorillonit gibi killer kullanım alanı ve amacına yönelik olarak çeşitli yüzey aktif maddelerle modifiye edilebilmektedir (Sabah ve Çelik, 2002).

İlaç taşınımı ve salımı, son yıllarda farklı disiplinlerin ortak olarak yoğun bir şekilde çalıştığı konulardandır. İnsan vücuduna ilaç salımı oral, nasal veya deri yolu ile olduğu gibi ışınlama yolu ile de yapılabilmektedir. Ancak ilacın, taşınımı ve salımında, taşıyıcı malzemenin yan etkilerinin azaltılması ve hedeflenen hücreye daha aktif ve etkin ulaştırılması, ilaç salımının kontrol edilebilir olması önem taşımaktadır. Farmakolojide başta sentetik ve doğal polimerlerle olmak üzere in-vitro (sanal ortam) ve in-vivo (canlı hücre) ortamlarda ilaç taşınımı ve salımı deneyleri gerçekleştirilmektedir. Ancak kullanılan bu taşıyıcı sistemlerin gerek dozajının yan etkisi, gerekse kimyasal içerikleri ve yüksek maliyetleri, alternatif taşıyıcı sistem arayışlarını teşvik etmektedir. Bu çalışmada da, Poli laktik ko-glikolik asit (PLGA) polimeri, Tokat Reşadiye bölgesinden alınmış olan sodyum montmorillonit (Na-MMT), Curcumin ve 5-FU ilaçları kullanılarak hedefli kanser tedavisinde kullanılmak üzere nanopartikül formülasyonu geliştirilmiş ve bu nanopartikül Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (YFT) ve Moleküler Dinamik (MD) simülasyon teknikleri ile teorik olarak da incelenmiştir.

Özetle, Pasif hedeflendirme, ilgili dokunun fizyolojik özellikleri dikkate alınarak gerçekleştirilmektedir. Hastalıklı olan bölgedeki kan damarlarının çeperini oluşturan endotelial hücrelerinin arasındaki mesafenin normalinden daha büyük olması nanotaşıyıcının pasif olarak bu bölgeye sızmasını ve birikmesini sağlamaktadır. Böylece etkin madde gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma etkisi (EPR) sayesinde pasif hedeflendirilmiştir. Bu çalışmadaki hedefimiz de kil katkılı olarak 200 nm altında üretilen nanopartikülün doğal akışı içerisinde pasif olarak kanserli bölgeye hedeflendirmektir.

2. TEMEL KAVRAMLAR

2.1 Kil Mineralleri

Kil, mineralojide tane boyutu 2 µm den daha küçük olan inorganik ve kristalin doğal malzemelere verilen genel addır. Bazı kil mineralleri yapısı itibari ile nem tutma özelliğine sahiptirler ve bu yüzden sürekli olarak yaklaşık %10 oranında bünye nemi içermektedir. Bu özelliğinden dolayı, tetrahedral ve oktahedral tabakalardan oluşan bu mineraller plastisite, tiksotropi, renk, hacim büzülmesi (rötre) ve kohezyon özellik göstermektedirler. Killer ikincil oluşumlar olup, silikat grubu içerisinde fillosilikatler içerisinde bulunurlar. Genel kimyasal formülleri $x(\text{Al}_m, \text{Mg}_n) \cdot y(\text{SiO}_2) \cdot z(\text{H}_2\text{O})$ olan bu minerallerin, farklı bileşim ve tabakalarının istiflenme şekline bağlı olarak kaolinit, smektit, illit, ve klorit olmak üzere 4 ana grupta incelenmektedir (Wilson, 1999). Doğada saf bir şekilde bulunmayan kilin içerisinde alüminyum silikatlarla beraber demir, magnezyum, potasyum, kalsiyum, sodyum, kuvars gibi safsızlıklar da bulunmaktadır (Malayoğlu, 1995).

Montmorillonit volkanik kil veya tuf gibi camsı volkanik materyalin kimyasal ayrışmasıyla ve smektit grubu minerallerden oluşan montmorillonit, kısmen kolloidal silisten ibaret, yumuşak, şekillenebilir, açık renkli bir kil taşıdır. İlk kez ABD’de Wyoming bölgesine ait Ford - Benton yakınlarında bulunmuş ve tanımlanmıştır. Kolloidal özellik gösteren, bir kil çeşididir. Amerika’da bulunduğu yere atfen Bentonit adı altında tanınmıştır. Daha sonra Fransa’nın Montmorillon bölgesinde de benzer kil minerali bulunmuş ve buna da Montmorillonit (MMT) adı verilmiştir. Montmorillonit ile birlikte kuvars, mika, feldspat, pirit ve diğer bazı mineraller bulunur. Kil mineralinin bir çeşidi olan montmorillonitin genel kimyasal formülü; $(\text{Na}, \text{Ca}) (\text{Al}, \text{Mg})_6(\text{Si}_4\text{O}_{10}) 3(\text{OH})_6 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ’dur. Genel olarak doğada sodyum (Na^+ -MMT) ve kalsiyum (Ca^{+2} -MMT) montmorillonit olmak üzere iki farklı formda bulunurlar. Mineralin genel özellikleri Çizelge 2.1’de verilmektedir. Çizelge 2.1’de genel özellikleri verilen, montmorillonit minerali birbirlerine iyonik bağlarla bağlı olan iki tetrahedral ve bir tane oktahedral tabakadan (T-O-T) oluşmaktadır. En önemli

özelliklerinden biri de zaman içerisinde TETRAHEDRAL tabakadaki Si^{4+} yerine Al^{3+} ve OKTAHEDRAL tabakadaki Al^{3+} yerine Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} veya Li^{+} iyonik yer değiştirme ile gelebilmesidir.

Çizelge 2.1 : Montmorillonit kilinin genel özellikleri.

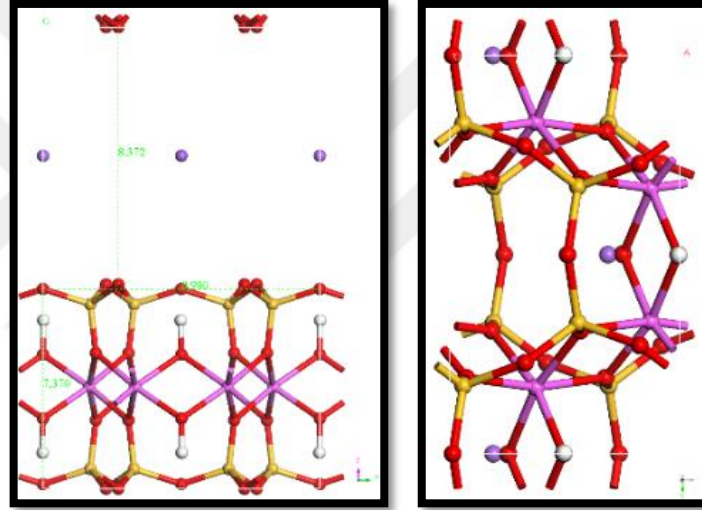
Ailesi	Smektit
Sınıfı	Silikat
Alt-sınıfı	Fillosilikat
Kristal sistemi	Monoklinik C2/m
Renk	Beyaz, sarı
Klivaj düzlemi	Tek yönde mükemmel, bazal
Kırınım	Lameller boyunca düzensiz
Parlaklık	Toprağımsı, mat
Teorik spesifik yüzey alanı	800 m ² /g
Parçacık boyutu	Uzunluğu 0,1-1 µm; tabaka kalınlığı 0,9 nm
Mohs sertliği, 20 °C	1,5-2,0
Ortalama özgül ağırlığı	2,3-3,0 g/cc
Ortalama yoğunluk	2,35 g/cm ³
Moleküler ağırlığı	540,46 g/mol
Belirgin özellikleri	Yumuşaklık ve sabunsu kayganlık
Karakteristik özelliği	Su ekledikçe çok fazla oranda şişmesi

İyon değişimleri, yapının elektriksel dengesinin bozulmasına ve pozitif yük eksikliğine neden olmaktadır ki bu pozitif yük eksikliği birim tabakalar arasına alkali veya toprak alkali iyonların girmesi ile giderilmektedir.

Negatif yüklü durumda olan kil mineralleri, yapılarını elektriksel bakımdan yüksüz duruma getirebilmek amacıyla; Fe^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} gibi katyonları adsorblarlar (Otto ve Haydel, 2013; Keren ve Oconnor, 1982; Carroll, 1959). Bu katyonlar kilin temel Si-Al yapı ünitesinin dışında bulunurlar, zayıf elektriksel kuvvetlerle (hidrojen ve Van Der Waals bağ) tutulurlar ve kil mineralinin bir çözelti

içerisinde bulunması durumunda, çözeltideki diğer bazı katyonlarla yer değiştirebilirler. Yapılan çalışmalarda montmorillonitin katyon değişim kapasitesi (KDK) 85 -150 (meq/100g) mili eşdeğer olarak bulunmuştur (Meier ve Nuesch, 1999; Helmy ve ark, 1994).

Montmorillonit içerdiği değişebilen katyona göre, sodyum, kalsiyum veya her iki iyonu da bulunduran ara tip olarak üçe ayrılmaktadır. Rengi beyaz, gri, sarı, pembe, yeşil, olabilir. Yoğunluğu ortalama 2,5 g/cm³ dür. Şekil 2.1’de birim hücre sine (Viani ve ark, 2002) ait teorik görünümü verilen 2:1 yapılı olan Na-MMT kilinin boyutları; a = 5,18, b = 8,90, c = 7,37 (TOT mesafesi) ve 8.37 Å (tabakalar arası boşluk) olarak ölçülmüştür.



Şekil 2.1 : Sodyum montmorillonitin (Na-MMT) birim hücre sine yandan ve üstten görünümü. Mor, kırmızı, sarı, beyaz ve pembe sırasıyla sodyum (Na), oksijen (O), silisyum (Si), hidrojen (H) ve alimünyum (Al) atomlarını temsil etmektedir.

Şekil 2.1’de verilen MMT kili yumuşak, plastik, poroz ve açık renkli bir yapıdadır. Çok geniş yüzey alanına sahip olan montmorillonit, asit aktivasyonu ile karakterize edilebilmektedir. Montmorillonit su ile karıştırıldığında kolloidal özellik göstermesi, su içerisinde şişmesi, yüksek plastisite ve iyon değiştirme kapasitesine sahip olması gibi özellikleri nedeni ile sondaj çamuru eldesi, yemeklik yağların ağartılması, su-solvent bazlı reolojik katkı maddesi eldesi, atık suların temizlenmesi, kedi althığı ve nem alıcı kil üretimi, hayvan yemi katkısı, nükleer atıkların depolanması, nanokompozit üretimine kadar uzanan geniş bir yelpazede kullanılmaktadır (Motokura ve ark, 2007; Hocine ve ark, 2004; Essawy ve El-Nashar, 2004).

2.2 Polimer Kimyası

Polimer, Yunanca çok anlamına gelen “poly” ve yapı taşı anlamına gelen “mer” kelimeleri ile türetilmiştir. Polimer kimyasal olarak, monomerlerin kovalent bağları ile birbirine bağlanarak oluşan çok büyük moleküler yapılarıdır. Genel olarak kimyasal yapıları karbon ve hidrojen atomlarından oluşmaktadır ve basitçe $n(-CH_m)$ formülü ile gösterilirler. Polimerlerin oluşmasında rol alan en önemli özellik; tekrarlanabilir birimlerinin (monomer) sırası, zincir uzunlukları ve istiflenme şekli, morfolojisi ve kristallenme düzenleridir. Genelde polimerler; hafif, ucuz, mekanik özellikleri çoğu kez yeterli, kolay şekillendirilebilen, değişik amaçlarda kullanıma uygun, dekoratif, kimyasal açıdan inert ve korozyona uğramayan maddelerdir (Bilici, 2009). Bu nedenle kullanım alan ve amacına uygun olarak hazırlanabilen bu makromoleküller, biyofizik, biyokimya ve moleküler biyoloji gibi alanların dışında nanobilim ve mühendislik uygulamalarında, tıp ve farmakoloji biliminde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Polimerler, amaca uygun kullanılması ve detaylı özelliklerini incelemek için polimer kimyası bilimi baz alınarak sınıflandırılmaktadır (Erol, 2002):

- a. Molekül ağırlıklarına göre (oligomer, makromolekül)
- b. Doğada bulunup bulunmamasına göre (doğal, sentetik ve yarı-sentetik)

Doğal polimerler: Kauçuk, nişasta, proteinler, selüloz ve Deoksiribonükleik asit (DNA)

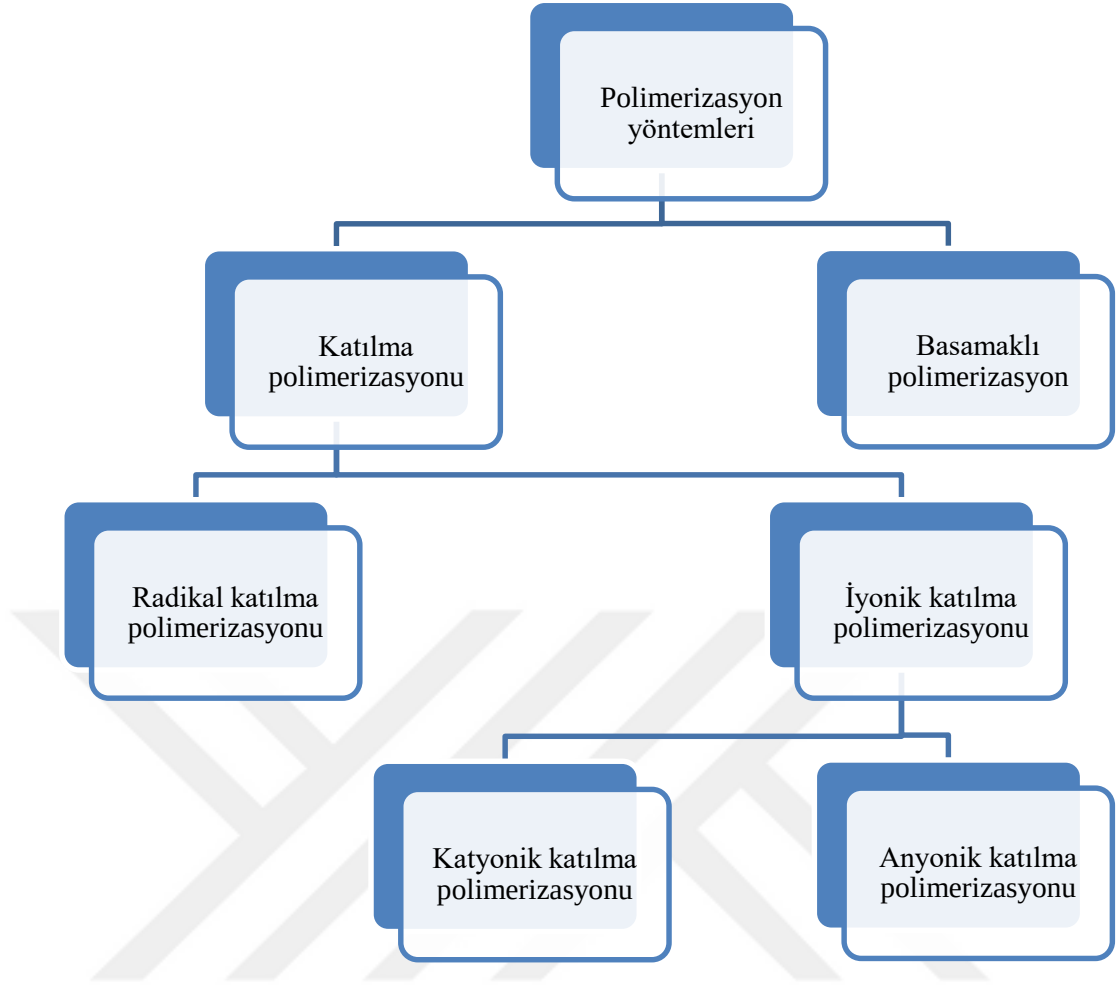
Sentetik polimerler: Polietilen, polipropilen, poliamidler

- c. Organik ya da anorganik olmalarına göre (organik, anorganik)

Organik polimerler: Poliesterler,

- d. Isıya karşı gösterdikleri davranışa göre (termoplastik, termosetting)
- e. Zincirin kimyasal ve fiziksel yapısına göre (düz, dallanmış, çapraz bağlı)
- f. Zincir yapısına göre (homopolimer, kopolimer)
- g. Sentezlenme şekillerine göre (kondenzasyon, katılma)

Polimerlerin sentezlenmesini ilk defa Carothers 1929 yılında (Carothers, 1929) katılma polimerlerizasyonu ve basamaklı (kondenzasyon) polimerlerizasyonu olmak üzere iki şekilde genelleştirmiştir (Şekil 2.2).

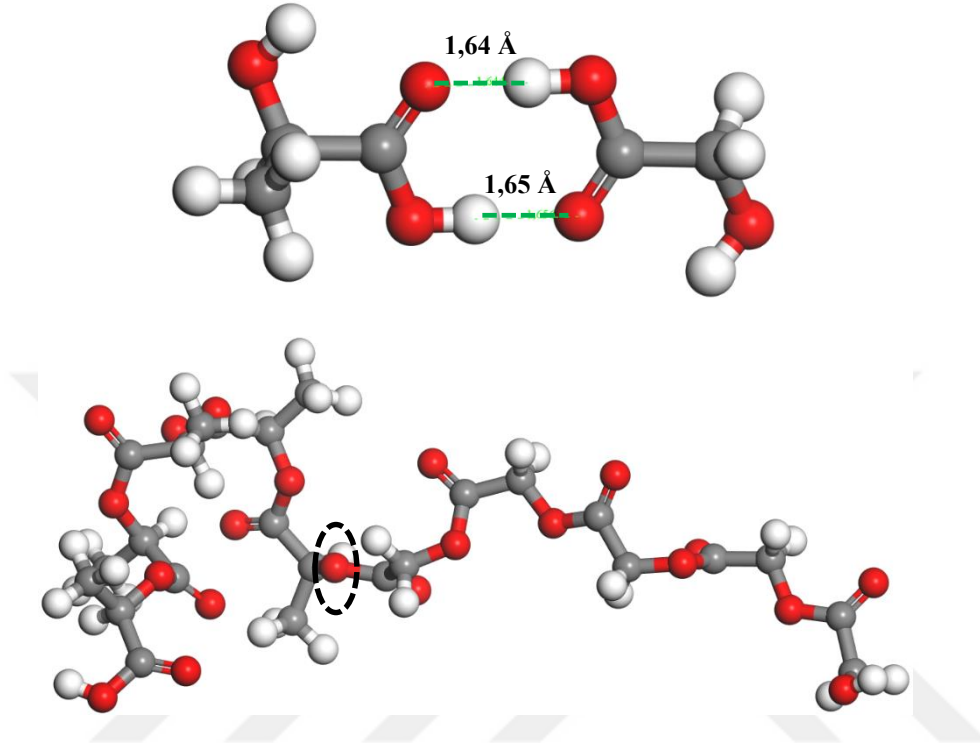


Şekil 2.2 : Polimerizasyon yöntemlerinin genel akım şeması.

Basamaklı polimerizasyon, kondenzasyon tepkimeleri ile meydana gelen bir yöntemdir. Bu polimerizasyon yönteminde $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$ gibi fonksiyonel grupları içeren monomerler tepkimeye girerek dimerleri onlar da tetramerleri oluşturmak suretiyle zamanla uzun zincir uzunluklu ve düşük veya yüksek molar kütleli polimerler oluşturulur. Katılma polimerizasyonu ise, Diels-Alder ve Friedel-Crafts tepkimeleri gibi organik tepkimelerle gerçekleşmektedir. Şekil 2.2’de de görüldüğü üzere radikal ve iyonik katılma polimerizasyonu olarak iki gruba ayrılmışlardır. Radikal katılma yönteminde polimerizasyon radikaller üzerinden başlar ve zincir büyümesi yine radikaller üzerinde başlayıp, büyüme ve sonlanma adımları ile ilerlemektedir (Staudinger, 1920; Flory, 1937). İyonik katılma yönteminde ise anyonik (karbonyon) ve katyonik (karbonyum) karakterli olan karbon iyonu üzerinde polimerizasyon gerçekleşmektedir. İki katılma polimerizasyonu arasındaki temel farklardan biri, iyonik polimerizasyon seçimli iken radikal polimerizasyonun seçiciliği yoktur.

2.2.1 PLGA polimeri

Poli laktik ko-glikolik asit (PLGA), laktik (LA) $[\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}]$ ve glikolik asit (GA) $[\text{HOCH}_2\text{COOH}]$ polimerlerinin birbiri ile reaksiyonu sonucu üretilen bir kopolimerdir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 : PLGA kopolimerinin sırasıyla LA ve GA monomerleri (üstte), iki pentamerden oluşan dekameri (altta). Gri, kırmızı ve beyaz renkler sırasıyla karbon (C), oksijen (O) ve hidrojen (H) atomlarını temsil etmektedir.

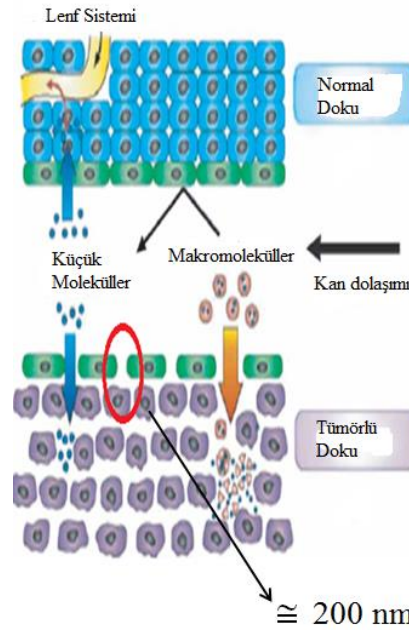
Şekil 2.3'te LA ve GA monomerlerinin birbirlerine güçlü H-bağı ile bağlanabileceğini göstermektedir. Kesikli siyah çizgi ile belirtilen çemberdeki bölge ise zincirler arasındaki bağlantı noktasıdır. Bilindiği üzere, PLGA polimeri, LALALA-GAGAGA gibi bloklardan oluşan bir kopolimer istifleri ile sentezlenebileceği gibi, ...LAGALALAGALAGAGA... gibi rastgele olarak çeşitli blokların bir araya gelmesi şeklinde de üretilmektedir. Laboratuvar ortamında blok kopolimer olarak üretilen bu polimer, ticari olarak genelde altere şekilde ve rastgele olarak üretilmektedir.

Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA), Sigma #P2191 kodlu ve formülü $[\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2]_x[\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2]_y$ olan bu polimerin LA/GA oranı (50:50) olmaktadır. Ayrıca polimerin moleküler ağırlığı 30,000-50,000 g/mol aralığında değişmektedir. -20 °C de saklanmaktadır. Bu polimer, son yıllarda ilaç salımı ve doku mühendisliği

uygulamalarında kullanılan polimerlerden birisidir (Makadia ve Siegel, 2011). Polimerlerin en önemli seçim özellikleri arasında biyouyumluluk ve biyoçözünürlük baz alınmaktadır. PLGA polimeri bu özelliklerinin yanında klinik olarak kullanılması, bozunumun istenen düzeyde olması ve ilaç salımına imkan sağlaması gibi özelliklerinden dolayı da tercih edilmektedir. Ayrıca Amerika'daki Federal ilaç ajansı (FDA) tarafından kabul almış olan PLGA polimeri ilaç salımının yanında, proteinlerin ve DNA, RNA ve peptit gibi makromoleküllerin de taşınabilirliği yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Samadi ve ark, 2013; Pavot ve ark, 2014; Astete ve Sabliov, 2006).

2.3 İlaç Salımı

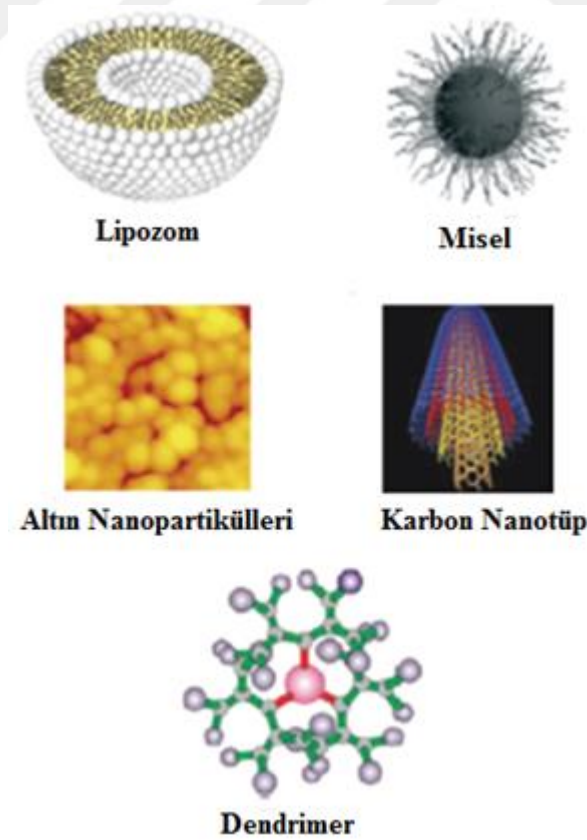
Geleneksel ilaç tedavileri, ilacın ve etken maddenin vücuda direk olarak verilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Ancak olumsuz yan etkilerinin azaltılması ve mümkünse tamamen giderilmesi için son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte ilacın hedef organa ulaştırılması için çeşitli sistemler geliştirilmektedir. Bu sistemler ile ilaç vücuda nasal, oral, deri yolu ile olduğu gibi ışınlama yolu ile de verilebilmektedir. Buradaki amaç, ilacın bir kompozit içerisinde veya üzerinde tutundurulularak, daha aktif ve etkin olarak hedeflenen bölgeye ulaştırılıp, yan etkilerin azaltılmasıdır. Günümüzde, başta polimer ve kitosan olmak üzere in-vitro (sanal ortam) ve in-vivo (canlı hücre) ortamlarda ilaç taşınımı ve salımı deneyleri gerçekleştirilmektedir. Şekil 2.4'te (Değim, 2011) ilaç salım sistemlerinin genel görünümü verilmiştir.



Şekil 2.4 : İlaç salım sistemlerinin genel görünümü.

Şekil 2.4'ten de görüleceği üzere, normal dokuda epitelyal hücreleri sıkı bir dizilim gösterirler. Yeşil renk ile temsil edilen epitelyal hücrelerin aralarındaki mesafe ortalama 10 nm'dir. Kanserli ve iltihaplı bölgelerde, şişlikten dolayı bu mesafe 200 nm'ye kadar çıkmaktadır. Geleneksel ilaç, Şekil 2.4'teki gibi küçük boyutlu moleküller kullanıldığı zaman hem tümörlü bölge hem de sağlıklı dokulara geçerek lenf sistemine karışabilmektedir. Böylece ilacın yan etkilerinin ortaya çıkmasına sebep olurlar (saç dökülmesi, kemik erimesi, kansızlık gibi). Ancak, ilaç nano taşıyıcının içine yerleştirildiği zaman, sadece kanserli bölgedeki hücrelerin arasından geçebilecek ve yan etkileri büyük ölçüde azaltılmış olacaktır.

Etken madde miktarının azaltılması ve etkinliğinin artırılması yanında, olumsuz yan etkileri azaltmak ve biyoyararlanımı arttırmak için birçok nano taşıyıcı sistem geliştirilmektedir (Sezgin ve ark, 2003). Bunlar polimerik veya yağ tabanlı miseller olduğu gibi, lipozomlar, karbon nanotüpler, altın nanopartikülleri, dendrimerler, cucurbituril ve son yıllarda kil bazlı partikül ve kompozitlerdir (Şekil 2.5). Son yıllarda özellikle polimerik miseller üzerinde artan bir ilgi söz konusudur (Jones ve Leroux, 1999).



Şekil 2.5 : Bazı ilaç taşıyıcı sistemler.

İlaç taşıyıcı sistemler olarak miseller şu avantajları sağlamaktadırlar (Torchilin, 2001; Sezgin ve ark, 2003):

- ❖ Çözünürlüğü düşük etkin maddeleri çözünür hale getirmekte ve böylece biyoyararlanımlarını artırmaktadırlar.
- ❖ Gerekli bölgede etkin maddenin toplanabilmesini sağlamak için vücutta yeterli derecede uzun bir süre kalabilmektedirler.
- ❖ Nanometre boyutlarında büyüklüğe sahip olmaları, onların zayıf damarlanmanın olduğu bölgelerde birikmelerine olanak sağlamaktadır.
- ❖ Spesifik ligandlar bağlanarak hedeflendirilebilmektedirler.
- ❖ Büyük miktarlarda, kolaylıkla ve tekrarlanabilir bir şekilde üretilmektedirler.
- ❖ İçlerindeki etkin maddeyi biyolojik ortamda inaktivasyondan koruyabilmektedirler ve istenmeyen yan etkiler gözlenmemektedir.

Şekil 2.5'teki taşıyıcı sistemler ile klinik olarak, sistemin ve etken maddenin kimyasal formülasyonu, içeriği ve boyutu göz önünde bulundurularak ağız, deri veya burun yoluyla ilaç verilebilmektedir. Ancak kan dolaşımı sırasında bu sistemlerin gevşekliğinden kaynaklanan sızmaları veya sertliğinden kaynaklanan salım problemlerini gidermek için ilacı doğrudan dokuya hedeflendirmek son yıllarda yoğun olarak çalışılmaktadır.

2.4 Hedefli İlaç Salımı

Hedefli kanser tedavisine yönelik geliştirilecek olan kil bazlı nanotaşıyıcının MD simülasyonları ile desteklenmesi son yılların güncel konularından birisidir. Bilineceği üzere nanotaşıyıcılar, ilaç veya tanı ajanını etkinin beklendiği hasta bölgeye götüren ve/veya kontrollü salımını sağlayan, ideal olarak 10-100 nm boyutlarında olan, vücuda zarar vermeyen materyallerden (fosfolipit ya da vücutta parçalanabilir polimerler gibi) hazırlanan partiküllerdir (Zırh-Gürsoy, 2014). İlaç hedeflendirmesi ise, etkin maddenin etki veya absorpsiyon bölgesine seçici olarak yönlendirilmesi ile ilaç konsantrasyonunun bir bölgede diğer bölgelere oranla artırılması yöntemidir (Patel, 2010). Hedeflendirme aktif olabileceği gibi pasif olarak da gerçekleşebilmektedir. Aktif hedeflendirme, kimyasal (pH, reaktif oksijen türleri, proteazlar), fiziksel (ısı,

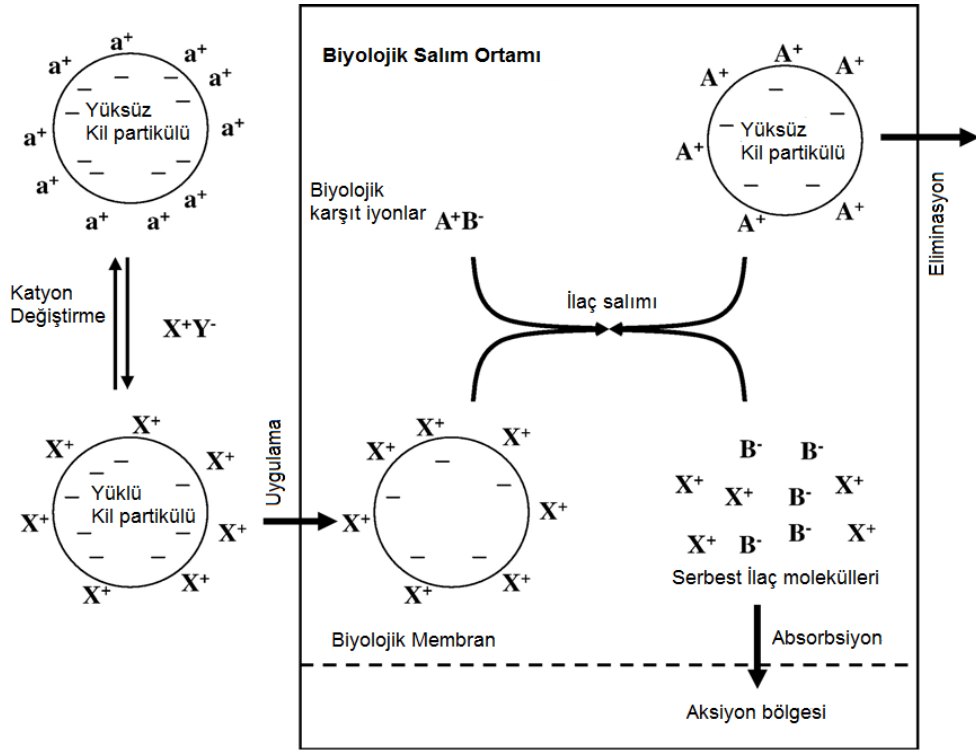
manyetik alan) faktörlerden ve peptitlerin hücre penetrasyonu veya spesifik bağlanmalarından yararlanarak artmış doğrudan hedeflenmiş doku veya hücreye yönlendirilmesidir. Bu hedeflendirme, kandaki bariyerleri geçebilmek için genellikle nanotaşıyıcıya biyouyumlu ve biyoçözünür poli etilen glikol (PEG) polimeri takılarak gerçekleştirilmektedir (Önyüksel ve Çomoğlu, 2014). Pasif hedeflendirme ise, ilgili dokunun fizyolojik özellikleri dikkate alınarak gerçekleştirilmektedir. Hastalıklı olan bölgedeki kan damarlarının çeperini oluşturan endotelial hücrelerinin arasındaki mesafenin normalinden daha büyük olması nanotaşıyıcının pasif olarak bu bölgeye sızmasını ve birikmesini sağlamaktadır. Böylece etkin madde gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma etkisi (EPR) sayesinde pasif hedeflendirilmiştir. Bunların dışında şeker polimerleri veya lipid mikroemülsiyonları ile retikulo endotelial sistem (RES) ve makrofaj-monosit sistemlerinin bloke edilmesi ile yapılan ters (invers) hedeflendirme ve pasif ve aktif hedeflendirmelerinin birlikte yapıldığı kombine hedeflendirme de gerçekleştirilmektedir. Bu hedeflendirmelerde partikül boyutu da önemli parametrelerden biridir (Onyüksel ve Banerjee, 2011).

İlaç hedeflendirmesi, çeşitli şekillerde hazırlanmış olan nanopartiküllerle gerçekleştirilmektedir. Bunlar genelde sentetik olarak üretilen amfifilik materyallerden oluşan polimer bazlı nano-partiküllerdir. Örneğin lipozomlar, amfifilik materyalin Brownian hareketleri sonucu hidrofik kısımların suya yönelmesi ve hidrofob kısımların ise sudan kaçması sonucu çift tabakalı yapıdan oluşturulan bir nanotaşıyıcıdır. Kolay üretiminden dolayı piyasada en çok bulunan sistemler olmasına karşın taşıdıkları sudan dolayı gevşek ve sızdırması kolay bir taşıyıcı olmaktadır. Bunlara alternatif olarak tek tabakadan oluşturulan miseller verilebilmekte ancak, bunların da bulundukları sıvı ortam ile sürekli alış veriş yaptıkları için ilaç ve etken madde kaybı gibi dezavantajları olmaktadır. Bunların dışında birbirini tekrarlayan monomerlerin basamaklar şeklinde eklenmesi ile sentezlenen makromolekül olarak bilinen dendrimerlerin en üstün yönü kalbin pompalaması sırasında bozulup dağılmaması ve dolayısı ile daha az ilaç kaybına neden olmasıdır. Ancak bu nanotaşıyıcıların ise hidrofob yapılarından dolayı kolaylıkla kümeleşmeler yapması ve dolayısı ile boyutunun (>300 nm), tümörlü endotelial hücre mesafesinden (<200 nm) büyük olması ve de es ek yapıda olmaması dolayısı ile es ek alyuvar hücrelerinden geçememesi gibi dezavantajları vardır. Bunların dışında, siklodekstrinler de hedefli kanser tedavisinde kullanılan nanotaşıyıcılardandır. Ancak bu taşıyıcılar ile üretilen

nano-partikülün boyutları 219-263 nm (Bilensoy ve ark, 2008) olmasına karşın üretim sırasında kullanılacak ilacın miktarı ve hidrofobisitesi siklodekstrinin yapısından dolayı önem kazanmakta ve salımı hedefe varmadan kan dolaşımı esasında kolayca olabilmektedir. Görüleceği üzere mevcut nanotaşıyıcılara alternatif olabilecek, EPR etkisinden daha verimli olarak yararlanmayı sağlayacak, biyouyumlu, ilaç kanda dolaşırken daha az kayıp sağlayacak ve toksik olmayan doğal bir materyale ihtiyaç duyulmaktadır.

Nanoteknolojideki hızlı gelişmeler kanser tedavisinde kullanılan nanopartikülün organik materyal dışında inorganik malzemeler ile de formüle edilebileceğini ortaya koymuştur. Atapulgit, çift tabakalı hidroksiler (LDH) ve halloysit gibi kil mineralleri çokça kullanılan inorganik materyallerdir (Viseras ve ark, 2010). Genel olarak alüminyum-magnezyum hidrosilikati ($Al,Mg-SiO_2.nH_2O$) olan bu kil mineralleri tabakalı yapısı, geniş yüzey alanı ve yüksek miktarda değişebilen katyon kapasitesinden (Karataş ve ark, 2013) dolayı tıp ve farmakoloji uygulamalarında yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. Önceleri killerin reolojik ve sorptif özelliklerinden yararlanarak kapsül, tablet, süspansiyon, emülsiyon gibi formülasyonların hazırlanmasında oral ya da topikal uygulamalarda kullanılmıştır (López-Galindo ve Viseras, 2004). Son yıllarda ise kristal yapısı ortaya konan kaolinit, sepiyolit ve montmorillonit gibi killer nanopartikül oluşumunda doğrudan veya yardımcı madde olarak kullanılmaktadır. Doğal hidrofil olan ancak toksik olmayan bu inorganik mineraller ilaç salımında da kullanılmaktadır (Aguzzi ve ark, 2007) (Şekil 2.6).

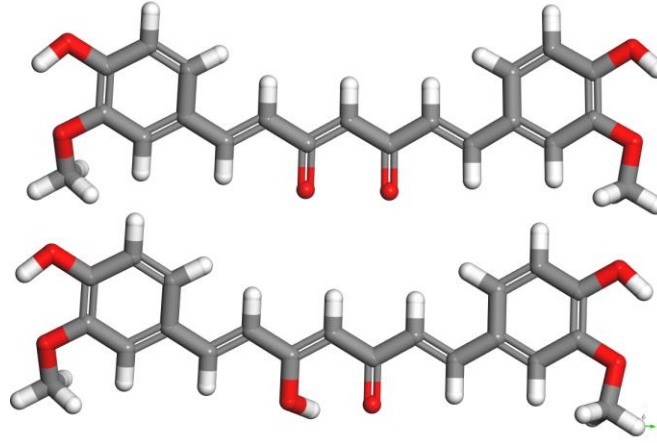
Şekil 2.6'da görüleceği üzere; negatif yüzey yüklü bir kile katyon değiştirme mekanizması vasıtası ile katyonik karakterli bir ilaç yüklenmiş ve in-vivo ortamda salımı gerçekleşmiştir. Ancak bu yüklenmenin nano boyutta gerçekleşmesi için kilin nano boyuta indirgenebilecek özellikte olması gerekmektedir. Dolayısı ile dekantasyon, mekanik karıştırma ve santrifüjleme gibi fiziksel yöntemler ile kolayca tabakalaşabilen bir kile ihtiyaç vardır. Bu kil, Türkiye'de Tokat ili Reşadiye bölgesinde büyük rezervlere sahip ve ticari ismi bentonit olan montmorillonit (MMT) minerali olabilmektedir. Nanopartiküle entegre edilecek kilin de sağlamlaştırıcı bir rol oynayacağı ve küresel bir tane oluşturmaya yardım edeceği düşünülmektedir.



Şekil 2.6 : İdeal kil-ilaç karışımı ve in-vivo ilaç salım mekanizması. (Kil mineralinin yüzey yükü (-); yük dengeleyici katyonlar (a+); katyonik ilaç (X+); ilaca bağlı anyonlar (Y-); in vivodaki karşıt iyonlar (A+); biyolojik ortamdaki dengeleyici karşıt iyonlar (B-)) (Aguzzi ve ark, 2007).

2.5 Curcumin ve 5-FU İlaçları ve Önemi

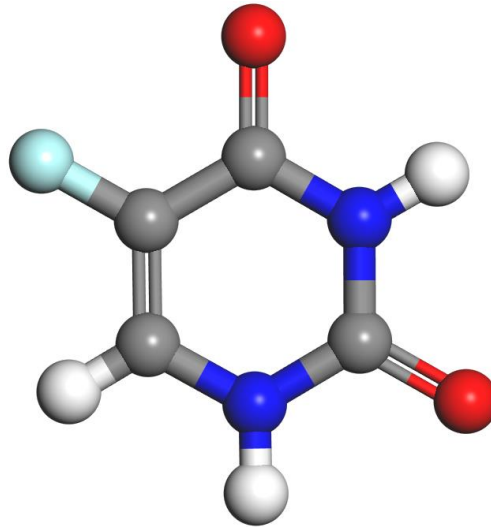
Curcumin *Curcuma longa* (Turmerik veya Zerdeçal) bitkisinin rizomlarından elde edilen, antioksidan, anti-Alzheimer, anti-kanser ve benzeri biyolojik aktiviteleri ile bilinen florofor bir bileşiktir (Anand ve ark, 2010; Mohammadi ve ark, 2009; Sahu ve ark, 2008). Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada nano-ilaç taşıma sistemlerinin ilaç taşıma kapasitesini incelemek için pyrene gibi yüksek floresans emisyonuna sahip bileşikler kullanılmış ve bunu takiben bu yapıların in-vitro anti-kanser aktivitesini incelemek için paclitaxel gibi sitotoksik etkisi olan başka bir madde daha bu sistemlere yüklenmiştir (Kedar ve ark, 2010; Zhang ve ark, 2004). İki farklı bileşik ile yapılan araştırmaların tutarlılığı şüphe uyandırıcıdır. Örneğin piren ile ölçülen maksimum ilaç taşıma kapasitesi, paclitaxel için geçerli olmayabilir. Bu çalışmada oluşturacağımız PLGA-Kil nano kompozitinin tüm fiziko-kimyasal ve biyolojik aktivitelerini kıyaslanabilir hale getirmek ve aydınlatılamayan noktaları YFT ve MD çalışmaları ile detaylı bir şekilde aydınlatabilmek için Curcumin kullanılmıştır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 : Curcumin ilacının en sık rastlanan keto (üstte) ve enol (altta) formları. Gri, beyaz ve kırmızı renklerle sırasıyla karbon (C), hidrojen (H) ve oksijen (O) atomlarını temsil etmektedir.

Şekil 2.7’de ketonol formu görünen, Curcumin, [# C1386 (sigma)] ilacının kimyasal formülü $C_{21}H_{20}O_6$ ’dır. Florofor ve hidroforik (suda çözünürlüğü 6 ng/ml) bir bileşik olan organik molekülün ağırlığı 368,38 g/mol, ergime ısısı 183 °C’dir. IUPAC kodu ise (1E,6E)-1,7-bis (4-hydroxy- 3-methoxyphenyl) -1,6-heptadiene-3,5-dione olan bir ilaçtır.

Curcumin ilacının yanısıra elde edeceğimiz nano formülasyon, hedefli kanser tedavisine uygulanabilecek niteliklere sahip olduğu ortaya konduktan sonra 5-Fluorourasil (5-FU) (Şekil 2.8) ilacının hedefli ilaç salımı üzerine deneysel ve teorik çalışmalar gerçekleştirilecektir.



Şekil 2.8 : 5-Fluorourasil. Gri, beyaz, kırmızı, mavi ve mavimsi renklerle sırasıyla karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N) ve flor (F) atomlarını temsil etmektedir.

Şekil 2.8’de görünen 5-FU (5-Fluoro-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione) ilacı Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır. Formülü $C_4H_3FN_2O_2$ olan bu ilacın moleküler ağırlığı 130,08 g/mol olarak hesaplanmıştır. Curcumin ilacına göre daha hidrofil olan bu ilacın suda çözünürlüğü ise 20 °C derecede 12.2 g/L olarak ölçülmüştür. Klinik uygulamalarda son 40 yılda yoğun olarak kullanılan 5-FU oral olarak kullanıldığında karaciğere uğramaktadır. İntravenöz olarak kullanıldığında ise tüm vücuda dağılır ve beyin kan bariyerini geçer. Böylece yaklaşık 1 saat içinde tüm vücudumuzda dolaşan 5-FU saç dökülmesi, karaciğer tahribi, anemi ve kemik iliği depresyonu gibi ciddi yan etkilere sahiptir. Bu yan etkilerin azaltılması için PLGA bazlı ve kil katkılı nano kompozite bu küçük yapıli molekül ele alınacaktır. Ayrıca 5-FU ilacının en önemli tercih sebeplerinden biri de; yarılanma ömrü çok kısa -5-10 dakika- olduğu için gerekli ve yeterli miktarda etki gösterebilmesi için hastaya defalarca enjekte edilme zorunluluğudur. Bizim bu tez kapsamında hazırlayacağımız nanoformulasyonun hastaya haftada 1 defa enjekte edilmesi ve hedefli olarak kanda dolaşımını uzun süre etkin olarak devam ettireceği öngörülmektedir.

2.6 Teorik Çalışmalar

Hesaplamalı kimya, “Sepiyolit Kiline Kuvaterner Amin Sürfaktanlarının Adsorbsiyonunun Deneysel ve Teorik Olarak İncelenmesi” konulu master tezimde (Karataş, 2011) de anlatıldığı şekilde; kimyasal problemlerin, matematik ve sayısal metotlar yardımıyla bilgisayar ortamında çözümlendirilmesi olarak adlandırılır. Burada, incelenen sistemin toplam enerjisi genelde zamandan bağımsız, Schrödinger denkleminin yaklaşık olarak çözümü ile elde edilmektedir.

Schrödinger denklemi kapalı formda şöyle ifade edilebilir:

$$H\psi = E\psi \quad (2.1)$$

Denklem 2.1’deki, ψ Dalga fonksiyonu, H parçacığın toplam enerjisini veren Hamiltonyen operatörünü gösterir ve aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$H = \frac{p^2}{2m} + V \quad (2.2)$$

Denklem 2.1’deki ilk terim kinetik enerjiyi, ikinci terim ise potansiyel enerjiyi temsil etmektedir. Momentum operatörü olan:

$$\vec{p} = -i \hbar \vec{\nabla} \quad (2.3)$$

eşitliği denklemde yerine konursa Schrödinger denkleminin sol tarafı denklem 2.4'teki gibi elde edilir:

$$\left(-\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 + V\right)\psi = -i\hbar\frac{\partial\psi}{\partial t} \quad (2.4)$$

Denklem 2.4, zamana bağlı Schrödinger eşitliğidir. Denklemin sağ tarafı sıfıra eşit olması durumunda zamandan bağımsız Schrödinger denklemi elde edilmiş olur. Burada $\hbar = 1.01 \times 10^{-34} Js$ değerinde indirgenmiş Planck sabiti, m ; parçacığın kütlesi, V ; potansiyel enerji, ∇^2 laplasiyen operatörü, i “-1” sayısının karekökününün sanal birimi ve ψ ; parçacığa eşlik eden dalga fonksiyonudur. Parçacığın kinetik enerjisinin hareket etmezken sahip olduğu iç enerjisinden oldukça büyük olması durumunda enerjisi görelilik olarak denklem 2.5'teki gibi ifade edilebilmektedir:

$$E^2 = p^2c^2 + m_0^2c^4 \quad (2.5)$$

Relativistik (görelilik) Schrödinger denklemi olarak da bilinen denklem 2.5'e zaman operatörü olan $D_t = \frac{\partial}{\partial t}$ eklendiğinde denklem 2.6 elde edilir:

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{c^2}D_t^2\right)\psi = \left(\frac{[mc]^2}{\hbar^2}\right)\psi \quad (2.6)$$

Denklemin çözümü için uygulanan ilk yaklaşıma, elektronik ve nükleer (çekirdek) hareketlerin birbirinden ayrılmasıyla (nükleer pozisyonları sabit tutarak), Schrödinger denkleminin sadece elektronik dalga fonksiyonu için çözümü olarak bilinen Born-Oppenheimer yaklaşımıdır. Böylece, sistemin toplam elektronik enerjisi, elektronların birbirini itmesi, elektron-nükleer etkileşimleri ve elektronların kinetik enerjilerinin bir toplamı şeklinde hesaplanabilmektedir.

Nükleer pozisyonların sabit tutulduğu durumda, sistemin toplam enerjisi, yukarıda hesaplanan elektronik enerjiye, çekirdeklerin birbirini itmesinden kaynaklanan itme teriminin eklenmesiyle bulunur.

Genellikle bu metotlarla, yapıların temel haldeki (ground state) optimize hali (bileşen atomların beklenen pozisyonlarının koordinatları), kesin ve göreceli (yakın) etkileşim enerjileri, elektronik yük dağılımları, dipol ve multipol momentleri, vibrasyonel (titreşimsel) frekansları, reaktivite ya da diğer ışınal (tayf) miktarları ve diğer partiküllerle kesitlerin çarpışmaları hesaplanabilmektedir.

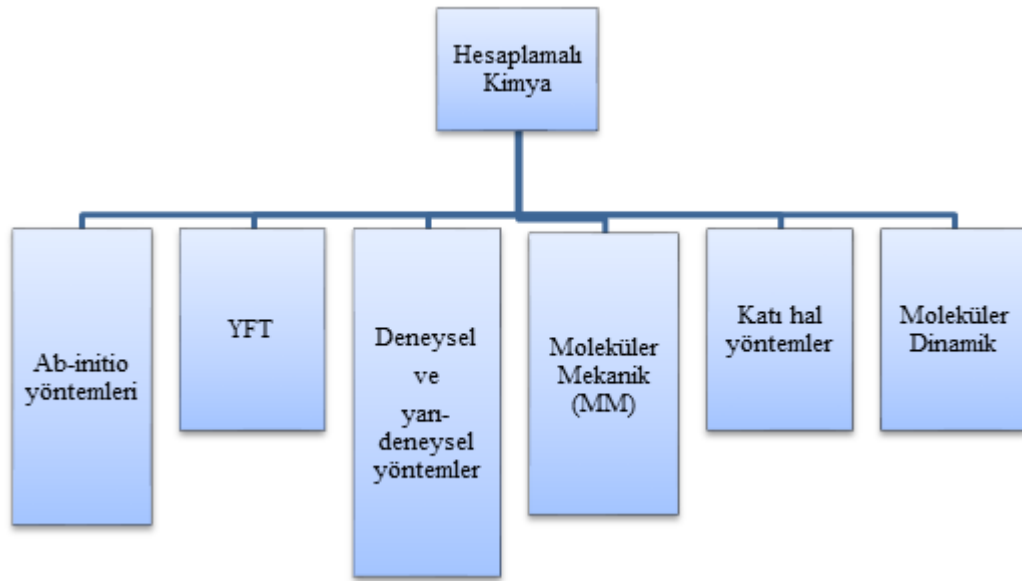
Bu hesaplamaların en önemlilerinden birisi moleküler sistemleri oluşturan atomların pozisyonlarını bulmaktır. Ancak, moleküler sistemler çok fazla sayıda izomerler

halinde temsil edilebilirler ve her bir izomer potansiyel enerji yüzeyinde (PES) bir noktaya tekabül etmektedir. Bu da en düşük enerjili yapıyı bulmayı güçleştirmektedir, çünkü mevcut izomer sayısı moleküldeki toplam atom sayısına bağlı olarak üstel şekilde artmaktadır. PES’ de ki en düşük enerjili yapı, küresel (global) minimum olarak ve diğer minimumlarda yerel (local) minimum şeklinde adlandırılmaktadır. Bu tüm minimumlarda, PES’ in tüm atomik pozisyonlara göre birinci dereceden türevlerin sıfıra eşit olduğu yerlerdir. Bu noktalar iki yerel minimumu birbirine bağlayan bir geçiş (saddle) noktası da olabilirler. Bir izomerin yerel mi yoksa geçiş noktası mı olduğu, PES’in atom pozisyonlarına göre ikinci dereceden türevlerinin alınmasıyla anlaşılabilir. Bu ikinci dereceden türevler Hessian matriksini de oluşturmaktadır. Hessian matriksinin elemanları atom pozisyonlarının sonlu olarak yer değiştirilmesiyle üretilebilir.

İlk olarak, her bir atom koordinatı için, bu koordinat küçük bir miktarda arttırılır ve bu yeni koordinatta birinci dereceden türev hesaplanır. Sonrasında, ilk koordinat küçük bir miktarda düşürülerek tekrar birinci dereceden türev hesaplanır. İkinci dereceden türev de, bu iki birinci dereceden türevlerin farkı ve ilk koordinattaki artış ve azalışın miktarı kullanılarak (adım büyüklüğü) elde edilir. Daha doğrusu, Hessian matrisinin elemanları, bu iki birinci dereceden türevlerinin farkının adım büyüklüklerine bölünmesi ile elde edilir. Hessian matrisinin köşegenleştirilmesi sisteme ait kuvvet sabitlerinin (Hessian matrisinin özdeğerleri) elde edilmesini sağlamaktadır. Bu özdeğerlerden de titreşim frekansları kolayca elde edilebilir.

Tüm özdeğerlerin pozitif olması, tüm frekansların reel (gerçek) ve sabit noktanın yerel minimum olmasını sağlamaktadır. Bir tek özdeğerin negatif (hayali bir frekans; imaginary frequency) olması ise, bu sabit noktanın geçiş yapısı olduğunu göstermektedir. Birden çok özdeğerin negatif olması ise, o zaman sabit nokta, daha karmaşık ve çok az ilgili bir yapıdır.

Hesaplamalı kimya sistemin içerdiği atom sayısı ve büyüklüğüne bağlı olarak çeşitli teorik metotlar şeklinde gelişmektedir. Temelde bu teorik metotlar arasındaki en önemli fark hesaplamaların doğruluk derecesi ya da hata oranıdır. Bu yöntemler, Şekil 2.9’da verilmektedir. Yüksek doğruluk dereceli yöntemler (*ab-initio*) tipik olarak sadece küçük sistemler için uygulanabilmektedir. Bunlar tamamen temel kanunlara (first principles) dayanmaktadır. En temel *ab-initio* metot Hartree-Fock (HF) teorisine dayanmaktadır.



Şekil 2.9 : Hesaplamalı kimya yöntemleri.

HF teorisinin daha da geliştirilmesiyle Post-HF olarak da adlandırılan Møller-Plesset (MPn), coupled cluster ve konfigürasyon etkileşimi (CI) gibi daha doğru sonuçlar üreten teoriler de mevcuttur. HF ve Post-HF metotlarının hepsinde, sistemi $3N$ değişkene sahip (N sistemdeki toplam electron sayısıdır) dalga fonksiyonu temsil etmektedir. Bu metotların yanında sadece sistemin elektron yoğunluğunun kullanıldığı Yoğunluk Fonksiyonel Teorisi (YFT) de mevcuttur.

Doğruluk derecesi daha düşük olan yöntemler ampirik ya da yarı-ampirik olarak adlandırılmaktadır. Bunun nedeni ise teorisinin bazı kısımlarını yaklaşık bir şekilde hesaplayabilmek için, atom veya moleküllerin kabul edilebilir modellerinden elde edilen deneysel sonuçların kullanılmasıdır. MM ise doğruluğu en düşük olan metottur. Burada, sistemin toplam enerjisi, kovalent (bağ yapma, bağ açısı ve dihedral) ve kovalent olmayan (van der Waals etkileşimleri, H-bağları) elemanların bir toplamı şeklinde tamamen ampirik olarak hesaplanmaktadır.

Bu yöntemler dışında, YFT yöntemleri katı hal için de kullanılmaktadır. Böylece, bant yapıları vasıtasıyla bir kristalin elektronik yapıları saptanır ve Brillouin bölgesindeki her bir noktada tanımlanan bu elektron orbitallerinin enerjisi tanımlanmış olur.

Moleküler Dinamik (MD) yöntemler ise YFT gibi sonraki kısımlarda detaylı olarak anlatılacaktır.

Teorik çalışmaların deneyler ile ilişkisi ise Şekil 2.10'da verilmektedir (Boyd, 1990).



Şekil 2.10 : Tipik teorik çalışma ve deneysel çalışma aşamaları.

Şekil 2.10’da da görüleceği üzere, atomik seviyedeki yapıların moleküler geometrileri temel prensipler göz önünde bulundurularak modellenebilir, daha sonra fiziksel bir deney de yapılabilmektedir. Teorik çalışmalar vasıtasıyla aşağıdaki uygulamalar gerçekleştirilmektedir.

1. Bu çalışmalar ile elde edilen bulgular ile deneysel bir çalışma sonucu elde edilmiş bir spektroskopik grafik veya eğrinin anlaşılmasına yardımcı olabilmektedir.
2. Teorik çalışmalar ile deneysel çalışmalarla yapısı ortaya konamayacak kompozitin yapısının saptanması ve yeni bir moleküler formülasyon bilinebilmektedir.
3. Modelleme çalışmaları sonucunda elde edilmiş olan kuvvetler ve enerji parametreleri sayesinde moleküler yapı hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir.
4. Hesaplamalı kimya yöntemleri kullanılarak, enerji yüzeylerinin semer noktaları (stationary points) bulunabilmektedir.
5. Teorik sonuçlar, deneysel çalışmaların açıklanması için kullanılabilir.
6. Bu çalışmalar, kimyasal yapılar ve özellikleri arasındaki reaksiyonları tanımlarlar.

7. Bu yöntemler, bileşiklerin sentezlenmesi ve ilişkilerini saptamada yardımcı olmaktadır.
8. Bu yaklaşımlar kullanılarak ilaç molekülleri ve katalistlerin dizayn edilmesine yardımcı olunmaktadır.

2.6.1 Yoğunluk fonksiyoneli teorisi

Hesaplamalı kimya, “Sepiyolit Kiline Kuvaterner Amin Sürfaktanlarının Adsorbsiyonunun Deneysel ve Teorik Olarak İncelenmesi” konulu master tezimde (Karataş, 2011) de anlatıldığı gibi, Yoğunluk fonksiyoneli teorisi (YFT) özellikle son yıllarda popüler hale gelmiştir. Bunun nedeni, hesaplama süresi olarak Hartree-Fock, Møller–Plesset Pertürbasyon ve Eşleşmiş Grup (CC) gibi diğer dalga fonksiyonu metotlarına göre daha hızlı olmasına rağmen o metotlara yakın doğrulukta sonuçlar üretebilmesidir. YFT yi diğer ab-initio metotlarından ayıran en önemli özelliği moleküllerin enerjisinin, dalga fonksiyonunun yerine elektron yoğunluğunun kullanılmasıyla bulunmasıdır. Bu teori 1964’te Hohenberg ve Kohn (Hohenberg ve Kohn, 1964) tarafından geliştirilerek ortaya atılmıştır. Bu çalışmalarında, Hohenberg ve Kohn ilk olarak şunu ispatlamaktadırlar: “dış potansiyel (V_{ext}), yoğunluğun (ρ) bir fonksiyoneli; V_{ext} ’i de toplam Hamiltonian’ı tanımladığından çok parçacıklı sistemin temel hali ρ ’ nun bir fonksiyoneli”. Temel halin enerjisi de ($E_0[\rho_0]$), temel halin elektron yoğunluğunun (ρ_0) fonksiyoneli olarak hesaplanmaktadır.

$$E_0[\rho_0] = T[\rho_0] + E_{ee}[\rho_0] + E_{Ne}[\rho_0] \quad (2.7)$$

Burada, $T[\rho_0]$ elektronların kinetik enerjisini, $E_{ee}[\rho_0]$ elektronlar arası Coulomb etkileşimini (elektronların birbirlerini itmesi) ve $E_{Ne}[\rho_0]$ de çekirdek elektron etkileşimini ifade etmektedir. Bu terimlerden sadece $E_{Ne}[\rho_0]$ sisteme bağımlıdır diğer ikisi ise sistemden bağımsızdır (hesaplama için atom numarası atom yarıçapı gibi bilgiye ihtiyaç yoktur). Bu iki terim birlikte Hohenberg-Kohn fonksiyoneli ($F_{HK}[\rho_0]$) olarak isimlendirilmektedir. Ne yazık ki, bu iki teriminde açık halleri bilinmemektedir. Bilinmiş olsaydı, bu iki terim sisteme bağımlı olmadığı için en küçük moleküllerden DNA gibi çok büyük moleküllere kadar rahatlıkla uygulanabilirdi. Fakat en azından, $E_{ee}[\rho_0]$ için klasik Coulomb kısmını ($J[\rho]$) açık bir şekilde bilmekteyiz. Böylece, $E_{ee}[\rho_0]$ ’yi aşağıdaki gibi tekrar yazabiliriz:

$$E_{ee}[\rho] = J[\rho] + E_{ncl}[\rho] \quad (2.8)$$

Bu denklemde, $E_{ncl}[\rho]$ elektron-elektron etkileşimdeki klasik olmayan kendi-kendine etkileşim düzeltmesi (self-interaction correction), yer değiştirme (exchange) ve Coulomb korelasyonları gibi katkıları içermektedir. Görüldüğü gibi, $T[\rho]$ ve $E_{ncl}[\rho]$ 'yi tam olarak ifade edebilen fonksiyoneller bulmak YFT'de ki en önemli eksikliği ortadan kaldıracaktır.

Hohenberg-Kohn teorisinin bir uygulaması Kohn ve Sham (Kohnve Sham, 1965) tarafından HF metoduna benzer bir şekilde formüle edilmiştir. Burada, elektron yoğunluğu, HF orbitallerinde olduğu gibi baz fonksiyonlarının lineer birleşimi şeklinde ifade edilmektedir. Kohn-Sham orbitalleri de denen bu baz fonksiyonlarından bir determinant elde edilir. Bu determinanttaki orbitaller enerjiyi hesaplamakta kullanılır.

Kohn-Sham formülasyonunun temelinde incelenen sistemin etkileşmeyen (non-interacting) ve etkileşen olarak ikiye ayrılması yatmaktadır. Etkileşmeyen referans sistem için gerçek kinetik enerjinin büyük bir kısmı doğru bir şekilde hesaplanmaktadır. Yukarıda da değinilen klasik olmayan etkiler etkileşmeyen faktörlerdir. Büyüklükleri az olan faktörler de yaklaşık fonksiyoneller yardımıyla hesaplanabilir. $F_{HK}[\rho_0]$ 'a benzer bu fonksiyonel denklem aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$F\left[\rho\left(\vec{r}\right)\right] = T_S\left[\rho\left(\vec{r}\right)\right] + J\left[\rho\left(\vec{r}\right)\right] + E_{XC}\left[\rho\left(\vec{r}\right)\right] \quad (2.9)$$

Burada, $T_S[\rho]$ etkileşmeyen sistemdeki kinetik enerjidir ve $E_{XC}[\rho]$ da yer değiştirme-korelasyon (exchange-correlation) enerjisidir ve aşağıdaki gibi tanımlanmaktadır:

$$E_{XC}[\rho] \equiv T[\rho] - T_S[\rho] + (E_{ee}[\rho] - J[\rho]) = T_C[\rho] + E_{ncl}[\rho] \quad (2.10)$$

Görüldüğü gibi, $E_{XC}[\rho]$, etkileşmeyen sistem için hesaplanan kinetik enerji ($T_S[\rho]$) ve elektron-elektron etkileşiminin ($J[\rho]$) sistemin gerçek kinetik enerjisi ($T[\rho]$) ve elektron-elektron etkileşimden ($E_{ee}[\rho]$) çıkarılmasıyla bulunmaktadır. Burada, $T_C[\rho]$, T_S tarafından açıklanamayan kinetik enerjidir. Böylelikle, E_{XC} bilinmeyen tüm terimleri içeren bir fonksiyonel haline gelmektedir. Bu nedenle, daha doğru sonuçların elde edilmesi, seçilen E_{XC} 'ye bağlıdır.

E_{XC} için önerilen ilk form elektronların tekdüze elektron gazı (uniform electron gas) (elektronlar pozitif bir arka plan üzerinde hareket etmektedirler ki böylece toplam sistem nötraldir) içerisinde hareket ettiklerinin kabul edilmesiyle türetilmiştir. Bu forma yerel yoğunluk yaklaşımı (local density approximation (LDA)) denmektedir ve

çok doğru sonuçlar üretmemektedir. LDA fonksiyoneli daha doğru bir hale getirmek için, herhangi bir noktada yoğunluğun yanı sıra, yoğunluğun türevi de kullanılmıştır. Türevli bölüm gerçek elektron yoğunluğundaki homojensizliği ifade etmektedir. Bu fonksiyonel formuna türev açılımlı yaklaşım (gradient expansion approximation (GEA)) denmektedir ve elektron yoğunluğunun tekdüze olmadığı ve yavaşça değiştiği sistemlerde kullanılmaktadır. Fakat tahminlerin aksine GEA yeterince doğru sonuçlar vermemekte hatta bazı durumlarda LDA' den daha kötü davranmaktadır. Bunun nedeni yer değiştirme-korelasyon boşluğunun (hole) LDA' e nazaran çoğu özelliğini kaybetmesidir. Bu özelliklerin bozulmadan kalması için GEA' e çeşitli kısıtlamalar eklenebilir.

Elde edilen fonksiyoneller genelleştirilmiş türev yaklaşımı (Generalized Gradient Approximation (GGA)) olarak isimlendirilmektedir. GGA fonksiyonelleri genellikle yer değiştirme ve korelasyon katkıları halinde ikiye ayrılırlar. Yer değiştirme kısmı, LDA yer değiştirmesinden bir ampirik terimin çıkarılmasıyla elde edilir. Bu terim için iki farklı yaklaşım vardır. Birincisi, Becke' nin fonksiyoneli (Becke, 2009) ve kısaca B ile ya da B88 olarak kısaltılmaktadır. Becke' nin formuna benzer diğerleri de FT97, PW91 ve CAM(A) ve CAM(B)' dir. İkinci formdakiler ise B86, P, LG ve PBE' dir. Örneğin, yarı-deneysel parametre içermeyen PBE' nin açık hali aşağıda verilmiştir.

$$F^{P86} = (1 + 1.296(\frac{s_\sigma}{(24\pi^2)^{1/3}})^2 + 14(\frac{s_\sigma}{(24\pi^2)^{1/3}})^4 + 0.2(\frac{s_\sigma}{(24\pi^2)^{1/3}})^6)^{1/15} \quad (2.11)$$

Burada s_σ yerel homojensizlik parametresidir ve yukarıda bahsedilen tüm GGA fonksiyonelleri s_σ 'nın bir fonksiyonudur. Aynı zamanda bazı yarı-deneysel parametrelerde içermektedirler. Genellikle GGA korelasyon terimleri daha karmaşık analitik formlara sahiptir ve fiziksel bir anlam içermemektedirler.

Kohn-Sham orbitalleri matematiksel olarak HF orbitallerine denk değildir ama bir moleküldeki elektronların hareketini tanımlayabilmektedir. YFT orbital özdeğerleri, HF orbitalleriyle uyumlu olan deneysel olarak fotoelektron spektroskopisi metodundan elde edilen enerjilerle uyuşmamaktadırlar.

YFT' de bir yoğunluk fonksiyoneli, elektron yoğunluğunun enerjisini hesaplamakta kullanılır. Bir fonksiyonel, bir fonksiyonun fonksiyonudur. Burada, yoğunluk fonksiyoneli, elektron yoğunluğunun bir fonksiyonudur. Ne yazık ki, yoğunluk fonksiyonelin gerçek formu bilinmemektedir. Bundan dolayı, avantajları ve

dezavantajları olan birçok fonksiyonel geliştirilmiştir. Bu alan hala YFT' nin aktif konularından biridir. Bu fonksiyonellerden bazıları kuantum mekanik hesaplamaları yardımıyla bazıları da deneysel sonuçları en iyi şekilde tekrar üretebilen fonksiyon formlarının parametreleştirilmesiyle üretilmektedir.

Elektron yoğunluğunu kullanmanın en büyük avantajı üç-boyutlu Coulomb itmesi integrallerinin hesaplanmasında ortaya çıkmaktadır. Böylece, elektron korelasyonunun bir kısmı da bu terim ile hesaplanmaktadır. Bu hesaplamalar HF'e göre daha hızlı ve daha doğrudur. Daha iyi YFT fonksiyonelleri kullanıldığında MP2' ya yakın doğrulukta sonuçlar elde edilebilir.

2.6.2 Baz setleri

Hesaplamalı kimya, “Sepiyolit Kiline Kuvaterner Amin Sürfaktanlarının Adsorbsiyonunun Deneysel Ve Teorik Olarak İncelenmesi” konulu master tezinde (Karataş, 2011) bahsedildiği gibi, baz setleri atomlardaki orbitallerin şeklini tanımlayan fonksiyon setleridir. Moleküler orbitaller ve sistemin dalga fonksiyonu baz fonksiyonlarının lineer bir kombinasyonu (LCAO) alınarak elde edilirler. Hesaplamalarda kullanılan baz setleri hesaplamaların kalitesini doğrudan etkilemektedir. Bu yüzden olabildiğince geniş baz setleri seçilmelidir fakat bu da hesaplama süresini oldukça artırmaktadır.

Elektronik yapı hesaplamalarında yaygın olarak iki tip baz fonksiyonu kullanılmaktadır. Bunlar gaussian (GTO) ve slater tip orbitaller (STO) olarak bilinmektedir. Başlarda bu atomik orbitaller (AOs) sadece STO olarak kullanılırken, daha sonra F. Boys (Boys, 1950), STO' lardan hesaplama açısından daha tasarruflu olan, GTO' ları geliştirmiştir. GTO' ların diğer bir avantajı ise, dört merkezli integralleri iki merkezli integrallere indirgeyebilmektedir. Aynı zamanda GTO' lar lineer olarak birleştirilerek STO' lara yakın fonksiyonlar elde edilebilir.

En küçük baz seti, minimum baz seti (minimal basis set) olarak adlandırılır. Bunlardan en popüler olanı STO-3G setidir. Bu isimlendirme, bir STO orbitalinin üç GTO orbitalinin birleştirilmesiyle yaklaşık olarak elde edilebileceğini göstermektedir. Böyle bir birleştirme işlemi her bir orbital için kullanılabilir. Genellikle bu setler büyük moleküller için kullanılmaktadır.

Diğer bir baz seti de, çoğunlukla Pople baz seti olarak bilinmektedir, 6-31G şeklinde gösterilmektedir. Burada her bir nüvedeki (core) orbital altı GTO' un birleştirilmesiyle

ve herbir valans orbitali de 3 ve 1 tane GTO' dan oluşan iki fonksiyonun birleştirmeye elde edilmektedir. Bu baz setleri özellikle organik moleküller için kullanılmaktadır. Diğer Pople baz setleri de 3-21G, 4-31G, 4-22G, 6-21G, 6311G ve 7-41G' dir.

Pople baz setleri bir yada tane yıldız işareti eklenerek değiştirilebilir, örneğin 6-31G* yada 6-31G**. Bir yıldız hidrojen dışındaki tüm atomlara bir d orbitalinin eklendiğini göstermektedir. İki yıldız ise hidrojen atomuna p fonksiyonlarının eklendiğini göstermektedir. Bunlar kutuplaşma (polarization) fonksiyonları olarak adlandırılmaktadır ve dalga fonksiyonu şeklinde değiştirmek için daha rahat hareket edebilmektedir. Kutuplaşma fonksiyonları daha doğru geometri ve titreşim frekansların elde edilmesi için kullanılırlar.

Pople baz setlerine aynı zamanda bir ya da iki tane artı işareti de eklenebilir, örneğin 6-31+G* ya da 6-31++G** gibi. Tek bir artı işareti hidrojen dışındaki tüm atomlara bir yayılmış (diffuse) fonksiyonun eklendiğini göstermektedir. İkinci artı işareti ise tüm atomlara bir yayılmış fonksiyonun eklendiğini göstermektedir.

Yayılmış fonksiyonlar küçük katsayılı GTO'lardır ve dalga fonksiyonunun, çekirdekten uzak olduğu durumlardaki şeklini ifade ederler. Daha çok elektron yoğunluk dağılımının büyük olduğu anyonlar için kullanılırlar. Aynı zamanda van der Waals etkileşimlerinde olduğu gibi uzun mesafeli etkileşimleri tanımlamak için de kullanılırlar. Yayılmış fonksiyon ihtiva eden baz setlerine genişletilmiş (augmented) baz setleride denmektedir. Diğer bir baz seti isimlendirmesi de kaç tane birleştirme olduğunu göstermektedir. Örneğin, TZV üçlü zeta valensi (triple zeta valence) simgelemektedir ve 6-311G baz seti gibi üç tane valens birleştirmesi ihtiva ettiğini göstermektedir. SZ ve DZ de tek bir zeta ve ikili zeta birleştirmeleri olduğunu ifade etmektedir. Bu baz setlerinde ki P harfi ise kutuplaşma fonksiyonlarının içerildiğini göstermektedir. Bu baz setleri Ahlrichs (Schäfer ve ark, 1994) tarafından geliştirilmiştir ve yine Ahlrichs (Ahlrichs ve ark, 1989) tarafından geliştirilen Turbomole programında kullanılması önerilmektedir. Bu baz setleri de genişletilebilir, örneğin aug-cc-pVDZ gibi. Burada "aug" bu baz setinin genişletilmiş olduğunu göstermektedir. "cc" de bu baz setinin korelasyon – tutarlı (corelation - consistent) olduğunu ifade etmektedir. Bu da bu baz setlerinin korelasyon içeren hesaplamalar için performanslarının optimize edildiğini göstermektedir. "p" ise kutuplaşma fonksiyonlarının tüm atomlar için içerildiğini ifade etmektedir.

Son olarak “VDZ” (ikili zeta) valens orbitallerinin iki birleştirmeyle elde edildiğini göstermektedir. Korelasyon – tutarlı baz setleri Dunning ve çalışma arkadaşları (Dunning, 1989) tarafından geliştirilmiştir. Dunning baz setleriyle çok doğru sonuçlar elde edilir ve yaygın olarak etkileşim enerji hesaplamalarında kullanılmaktadırlar.

Yukarıda bahsi geçen YFT alışmaları periyodik olmayan modellere ait genel açıklamalıdır. Bu tez kapsamı boyunca CASTEP (Clark ve ark, 2005) programı kullanarak periyodik modellere ait de YFT alışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu programda düzlemsel dalga baz setleri (Plane wave basis set) geliştirilmiştir. Bu baz setleri Bloch teoremine göre geliştirilmiştir. Bloch teoremi, her k -noktasındaki elektronik dalga işlevlerinin ayrıık düzlem-dalga taban kümesi olarak genişletilebileceğini belirtmektedir. Prensip olarak, genişleme için sonsuz sayıda düzlem dalgası gerekir. Bununla birlikte, küçük kinetik enerjileri olan düzlem dalgalar için katsayılar, bk kinetik enerjilere sahip olanlardan daha önemlidir. Böylece, düzlem dalga baz seti, belirli kesme enerjisinden daha küçük olan kinetik enerjileri olan sadece düzlem dalgaları içerecek şekilde kesilebilir.

Sınırlı bir kesme enerjisindeki baz setin kesilmesi, hesaplanan toplam enerji ve türevlerinde bir hataya yol açacaktır. Kesme enerjisinin değerini arttırarak hatanın bklğn sistematik bir şekilde azaltmak mümkündür. İlke olarak, kesilen enerji, hesaplanan toplam enerji istenen toleransa yaklaşana kadar arttırılmalıdır. Örneğin, bu prosedürü, farklı yapıların toplam enerjilerinin mutlak değerlerinin karşılaştırıldığı bir faz kararlılığı çalışması için kullanabilirsiniz. Bununla birlikte, aynı yapı için enerji farklılıkları, toplam enerjiden çok daha düşük kesme enerjileriyle birleşir. Bunun nedeni hataların iptal edilmesidir ve güvenilir geometri optimizasyonu veya moleküler dinamik çalışmaları için ılımlı baz setleri kullanmasına izin verir. Bu argümanlar, Brillouin bölgesi rneklemeinin yakınsama testi için de geçerlidir. Düzlem dalga taban kümelerinin kullanımı ile ilgili zorluklardan bir tanesi, temel durumların sayısının kesilme enerjisi ile süreksiz olarak değişmesidir.

Genel olarak, bu süreksizlikler, k -nokta kümesindeki farklı k -noktaları için farklı kesimlerde cereyan edecektir. Buna ek olarak, sabit bir kesme enerjisiyle, birim hücrenin boyut veya biçiminde bir değişiklik, düzlem dalga baz setinde süreksizliklere neden olacaktır. Bu problem daha yoğun bir k -noktası seti kullanarak azaltılabilir, böylece herhangi bir belirli düzlem dalgası temel durumuna bağlı ağırlık azaltılır. Bununla birlikte, problem oldukça yoğun k -noktası örneklemelerinde bile halen

mevcuttur. Yaklaşık olarak, sonsuz sayıda k-noktası ile belirlenmiş bir bazda bir durum sayısı arasındaki farkı ve hesaplamada fiilen kullanılan taban durumlarının sayısını hesaplayan bir düzeltme faktörü uygulayarak yaklaşık olarak ele alınabilir (Francis ve Payne, 1990).

Milman ve ark. (Milman ve ark, 1994) 1994 yılında yaptıkları detaylı çalışmada da belirtildiği gibi, sonlu temele göre düzeltme, hücre optimizasyonu kesinlikle bir araya gelmeyen bir temel kümesiyle yapıldığında son derece önemlidir. Örneğin, norm muhafaza eden silikon pseudopotansiyel yeterince yumuşaktır ve düzlem dalgalar için yaklaşık 200 eV'lık bir kesme enerjisi ile doğru sonuçlar verir. Bununla birlikte, eğer bu kesme (yani, toplam enerjinin ve basıncın hacim bağımlılığı) kullanarak durum denklemini hesaplırsa, toplam enerjinin minimuma karşılık gelen hacim, sıfır basınç veren hacim ile çakışmaz. Bu tür durum denklemi (EOS) hesaplamaları kademeli olarak daha yüksek kesme enerjilerinde ve daha iyi k-nokta örneklemeyle tekrarlandığında, iki hacim değeri arasındaki fark daha küçük olur. Buna ek olarak, düşük kesme enerjisinde hesaplanan E - V eğrisi pürüzlüdür, ancak kesme enerjisi arttıkça giderek daha pürüzsüz hale gelir. E - V eğrisinin pürüzlü görünümüne neden olan sebep, aynı kesme enerjisinde kullanılan düzlem dalgalarının sayısındaki süresiz değişikliklerdir, ancak farklı kafes sabitleri için. Toplam enerjiye eklendiğinde, sonlu durum seti düzeltmesi sabit bir enerji sınırının daha fazla fiziksel durumu kullanılmış gibi sabit bir sayıdaki temel durumla hesaplamalar yapmasını ve sonuçları enterpole etmesini sağlar.

Bu düzeltme teriminin değerlendirilebilmesi için bilinmesi gereken tek parametre $d_{E_{tot}}/d\ln E_{cut}$ türevidir. Burada, E_{tot} , sistemin toplam enerjisi ve E_{cut} kesme enerjisidir. CASTEP bu terimi otomatik olarak hesaplayabilir veya bu parametreyi manuel olarak girebilirsiniz. $d_{E_{tot}}/d\ln E_{cut}$ değeri, enerji kesilmesi ve k-noktası örneklemesine göre hesaplamının yakınsamasının iyi bir gösterimini verir. Atom başına değeri (yani CASTEP çıktı dosyasında atom sayısına bölünen değer) 0.01 eV/atom'dan küçük olduğunda, hesaplama çok iyi bir şekilde bir araya getirilmiş sayılabilir. Çoğu hesaplama için 0.1 eV/atom değeri yeterlidir.

Genelleştirilmiş Gradyan Yaklaşımına (GGA) göre atomlar, moleküller, katılar ve yüzeyler için geliştirilmiş, değişim ve korelasyon genelleştirilmiş gradyan fonksiyonelleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada fonksiyonel olarak, GGA fonksiyonel sınıfına ait olan ve değişim-korelasyon enerjisi için kullanılan PW91 fonksiyoneli

(Perdew ve ark, 1992) alınmıştır. PW91 fonksiyoneli, Lieb-Oxford sınırı da dahil olmak üzere daha kesin koşullara saygı göstermek için tasarlanmış analitik bir uyumdur. PW91, yavaşça değişen yoğunluklar için Gradient Genişleme Yaklaşımını (GEA) geri yüklemek ve Lieb-Oxford sınırı ile çeşitli düzensiz ölçeklendirme koşullarını karşılamak için, Becke formunu hafifçe değiştiren bir fonksiyoneldir. Daha rafine edilmiş bir korelasyon deliği kullanıldığında, orijinal PW91 parametrelerini ayarlar. PW91 GGA, değerlik elektron yoğunlukları aralığında exchange ve korelasyonun yerel olmayan alanları arasında güçlü bir iptale işaret eder. GGA'ların "en yerel" olarak, PW91, katılar için Yerel Çevirme Yoğunluğu'nun (LSD) ince hatalarını aşırı derecede düzeltme olasılığı düşük olanıdır.

2.6.3 Moleküler dinamik simülasyonları

Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları, Newton'un hareket denklemleri ile zamana bağlı olarak moleküler bir sistemin yapısal, dinamik ve termodinamik özelliklerini hesaplayan bir araçtır. Sistemin davranışını ortaya koyarken Brownian hareketlerini baz almaktadır. Dolayısıyla MD yöntemi, diğer yöntemlere göre çok daha fazla atomlu sulu sistemlerin, katıların, minerallerin ve diğer biyolojik moleküllerin zamana bağlı modellerini ortaya koyduğu için önemlidir (Yıldırım, 2012). Newton'un 2. Hareket yasası olarak bilinen ve bir cisim üzerindeki net kuvvet, cismin kütlesi ile ivmesinin çarpımına eşit olduğunu içeren eşitlik 2.12'de verilmiştir.

$$F_i = m_i \times a_i \quad (2.12)$$

Bu eşitlikte, F sisteminin kuvvetini, m kütlesini ve a ise ivmesini temsil etmektedir. Bu bağlamda, eğer sistemdeki her atomun kuvveti bilinebilirse, her bir atomun ivmesi de tespit edilebilir. Dolayısıyla bu kuvveti sistemin var olan potansiyel enerjisinin bir gradienti olarak yazarsak istenen ivme de bulunabilir. Şöyle ki:

$$F_i = -\nabla_i V \quad (2.13)$$

Yukarıdaki her iki eşitlikte kuvvetin integrali alınarak zamana bağlı olarak sistemdeki tüm parçacıkların pozisyonları, hızları ve ivmeleri hesaplanabilmektedir (2.14).

$$-\frac{dV}{dr_i} = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (2.14)$$

Burada V sistemin potansiyel enerjisini, r pozisyonunu ve t zamanı temsil etmektedir. 2.14 eşitliğinde de görüldüğü üzere zamana bağlı olan bu sistemlerin mikroskobik

yapısı (atomistik modelleri) oluşturulduğunda, herhangi bir zamanda, sistem hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Dolayısıyla MD simülasyonları gerçekleştirilirken, model sistem, makroskobik sisteme (deneysel sistem) göre hazırlanırsa her iki sistem hakkında da doğru ve uyumlu bilgiler elde edilebilir. Bunun için başlangıç modellerinde sistemin hangi atomlardan oluştuğu, bu atomların başlangıç konum ve momentumları ve etkileşim potansiyelleri çok iyi tanımlanmış olmalıdır (Yıldırım, 2012). Aksi takdirde elde edilmiş olan hesaplanmış modelin gerçeklikle bir ilişkisi ve uygunluğu olmayabilir. Bu sorunla karşılaşılması ve bahsi geçen hareket eşitliklerinin çözümü için birçok numerik algoritma geliştirilmiştir. Bunların en popüler olanları; Verlet, Leap-frog, Velocity Verlet ve Beeman's algoritmalarıdır. Bu algoritmaların hepsinin hedefi sistemin zamana bağlı hızını en doğru şekilde hesaplamaktır. Ayrıca bu algoritmaların hepsi enerji ve momentum parametrelerini içerdiği gibi, hesaplama açısından efektif ve zaman adımı (time step integrating) integral hesabı uygundur. Ancak birbirinden ayrılan yönü ise sahip oldukları denklemlerin kompleks ve içerdikleri parametre sayısına göre hesaplama zamanının kısa veya uzun olmasıdır (Atılhan, 2007; Greathouse ve ark, 2014). Beeman'ın algoritması diferansiyel denklemleri, Newton'un hareket denklemlerine sayısal olarak entegre etmek için geliştirilmiş özel bir yöntemdir. Moleküler dinamik simülasyonlarında çok sayıda parçacığa izin vermek için tasarlanmıştır. Metodun doğrudan veya açık ve örtük varyantları vardır. Doğrudan varyant Schofield tarafından 1973'te yayınlandı (Schofield, 1973). Verlet algoritmasının bir varyantı olan Beeman algoritması aynı konumları üretir, ancak hızlar için farklı bir formül kullanır. Beeman 1976'da (Beeman, 1976), bir dizi örtük (öngörücü-düzeltilici) çok aşamalı yöntem yayınladı. Bu yöntem, bu sınıftaki üçüncü dereceden yöntemin doğrudan varyantı olarak kayıtlara geçti. En önemli avantajları hızlar için daha doğru denklemlere sahip ve enerjinin korunumu daha iyidir. En önemli dezavantajı ise daha karmaşık denklemlere sahip olduğu için daha uzun süren hesaplamalar yapmaktadır.

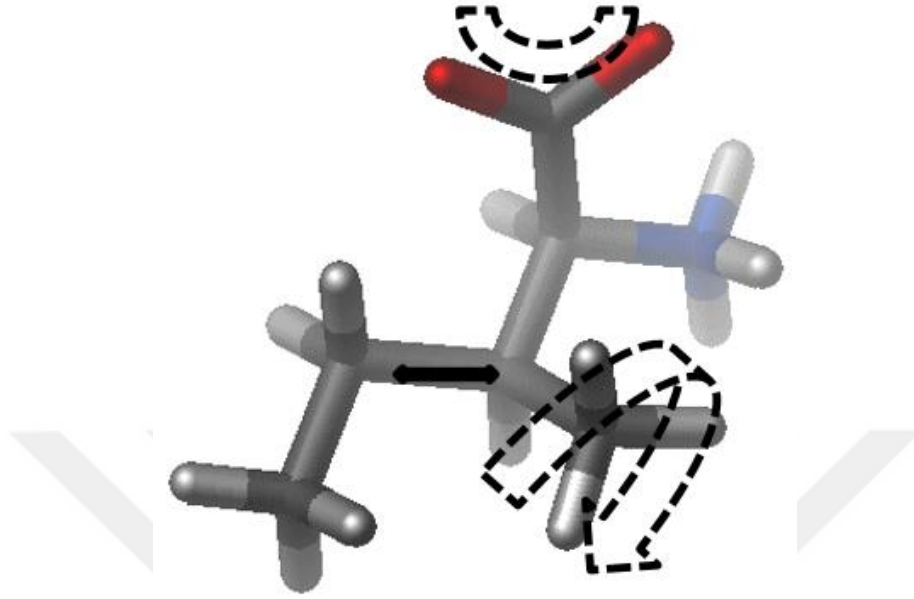
Yukarıda bahsi geçen potansiyel enerji sistemdeki tüm atomların pozisyonlarının (3N) bir fonksiyonudur. Dolayısıyla hem moleküler arası hem de moleküllerdeki atomlar arası enerjinin bir fonksiyonu olarak aşağıdaki gibi verilmektedir:

$$V(R) = E_{bağlanma} + E_{bağlanmamış} \quad (2.15)$$

Molekül içi bağlar arası enerji ($E_{bağlanma}$) aşağıdaki terimleri içermektedir:

$$E_{bağlanma} = E_{germe} + E_{bükme} + E_{döndürme} \quad (2.16)$$

Şekil 2.11’de molekül içi bağ enerjileri temsilen verilmektedir.



Şekil 2.11 : Bağlanma enerjilerinin bileşenlerinin gösterimi.

Bağlanma enerjisi dışında bir de van der Waals (vdW) ve elektrostatik enerjileri içeren moleküler arası etkileşimler mevcuttur.

$$E_{bağlanmamış} = E_{vdW} + E_{elektrostatik} \quad (2.17)$$

vdW enerjisi moleküller arası iki atomun etkileşimi sonucu ortaya çıkan zayıf itme ve çekme kuvvetleri sonucu oluşurken, elektrostatik enerji ise birbirine göre hareketsiz olan iki noktasal yükün itme ve çekme kuvvetleri yani Coulomb potansiyeli sonucu oluşmaktadır. Böylelikle sistemin toplam potansiyel enerjisi molekül içi ve arası atomların enerjilerinin toplamı şeklinde hesap edilmektedir.

Sistemdeki tüm atomların enerjilerini hesaplamak için bir MD simülasyonu Şekil 2.12’deki gibi aşamalardan oluşmaktadır. Şekil 2.12’de de görüleceği üzere, klasik bir MD simülasyonu; geometri optimizasyonu ile başlayıp, hız ve konum parametrelerinin dengelenmesinden sonra nihai simülasyon ve trajektorilerin analizi ile son bulmaktadır. Tüm bu simülasyon adımları yukarıda da belirtildiği gibi Newton’nun hareket denklemleri ile ifade edilmektedir. Dolayısıyla bir modeldeki her bir atomun yeri ve hızı tanımlı ve biliniyorsa modelin önceki ve sonraki adımları ve pozisyonu hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (Koçoğlu, 2006; Yıldırım, 2012).



Şekil 2.12 : MD simülasyonunun hazırlık, ilerleme ve sonuçlandırma aşamaları.

2.7 Literatür Çalışması

Hedefli kanser tedavisi ilk olarak 1986 yılında Freeman ve ark. tarafından tüm teknikleri içeren bir genel çalışma (Freeman ve Mayhew, 1986) ile ortaya atılmış ve hedefli ilaç salımı tekniklerinin kanserli hücrelerle daha etkin mücadele ettiği ve toksiteyi de azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak kil bazlı olmayan ve tedavide kullanılan diğer polimerik (Albumin-Taxol (Abraxane)) (Gradishar ve ark, 2005), ve lipozomal (Liposomal daunorubicin (DaunoXome)) (Rosenthal ve ark, 2002) nanopartiküllerin genel dezavantajları kan dolaşımı sırasında sızmaların ve ilaç kaybının yaşanması ve dolayısıyla yan etkilerin artmasıdır. Bu problemleri giderecek olan ise biyouyumlu olabilecek ve hazırlanan partikülün fiziksel özelliklerini iyileştirecek ve bu sızmaların azalmasıyla yüklenen ilacın etkinliğini artıracak bir materyalin seçimidir. Literatürde yapılan çalışmalardan anlaşılabileceği üzere montmorillonit kili bu problemi aşacak özelliklere sahiptir. Örneğin, ilk olarak Lin ve ark. 2002’de yaptıkları çalışmada (Lin ve ark, 2002) saflaştırılmış MMT, kitosan ve 5-Fluorourasil ile kontrollü oral ilaç salımı gerçekleştirmişlerdir.

Dong ve Feng’in 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada (Dong ve Feng, 2005), Polilaktik ko-glikolik asit (PLGA) polimeri ve MMT kili ile hazırlanan nanopartiküle antikanser ilacı olan paclitaxel yüklenmiş ve oral olarak salımı gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, kilin eksfoliyasyonu için Poli vinil alkol (PVA) polimeri kullanılmıştır ve ortalama boyut 305 nm olarak ölçülmüştür. Dong ve Feng gibi Sun ve ark. 2007 yılında (Sun ve ark, 2008) MMT ile hedefli kanser tedavisine uygun boyut ve karakteristikte kompozit üretmişlerdir. Bu çalışmada, multi fonksiyonel ve amfifilik olan PLGA polimerini tercih etmişler. Çözünmüş eksfoliyasyon için kilin üzerine diklorometanda (DCM) çözünmüş PLGA/Paclitaxel ilave edilmiş ve organik çözücü karıştırılmak suretiyle uçurulmuş ve kalan kompozit dondurarak kurutulmuştur (freeze-dry). Sonuçta, 293 nm boyutlu partikül elde edilmiştir. Bu partiküle, kanser hücresi üzerinde reseptörü bulunan büyüme faktörü ligandı (HER) fiziksel bağla bağlanmış ve 312 nm civarında bir partikül elde edilmiştir. Çalışmada aynı partiküllere, aynı yöntemle ilaç yerine floresans özelliği olan coumarin-6 yüklenmiş ve konfokal mikroskop kullanılarak nanokompozitin kanser hücrelerinin içine girdiği tespit edilmiştir. Monoklinal antibodi olarak ise Trastuzumab seçilmiştir. Göğüs kanserine hedefli olarak, 300 nm ortalama boyutlu PLGA/MMT nanokompozitine Paclitaxel ilacı yükleyerek, salım

gerçekleştirmiştir. Ancak her iki çalışmada da nanokompozit boyutu tümörlü endotelial hücre mesafesine göre oldukça fazladır.

Wang ve ark. 2008’de (Wang ve ark, 2008) TEM analizleri sonucu ortalama 200 nm boyutlu tek tip quaternize kitosan partikülleri ile montmorilloniti (MMT) 60 °C sıcaklıkta karıştırarak modifiye etmişler ve boyutların büyüdüğünü ve bozulduğunu ortaya çıkarmışlar. Bu kil katkılı nanopartiküller dondurarak kurutup elde edilen kompozite model ilaç olarak albümin yüklenmiş, salımı incelenmiş ve bağırsak hücreleri üzerinde toksik olup olmadığı test edilmiştir.

Joshi ve ark. 2009 yılında (Joshi ve ark, 2009) MMT’yi sedimantasyon ile saflaştırıp, amonyum asetat yöntemi ile katyon değiştirme kapasitesini (KDK) ölçmüşlerdir. Saf kili sabit pH, sıcaklık ve zaman kriterlerinde Timolol Maleatın (TM) değişik konsantrasyonları ile suda karıştırarak yüklenen maksimum miktarı hesaplamışlar. Daha sonra bu maksimum konsantrasyonun değişik pH’larda nasıl yüklendiğini incelemişlerdir. İn-vitro çalışmalar TM ilacının kilin tabakaları arasında oral olarak taşınabileceği ortaya çıkarılmıştır.

Parida ve ark. 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada (Parida ve ark, 2011) Cloisite 30B ticari isimli MMT kili ve kitosan kompozitine Curcumin ilavesi sonucu kontrollü ilaç salımı gerçekleştirmiş ve harmanlanmış kitosanın karıştırılmamış düzgün yüzeyli kitosandan daha iyi bir taşıyıcı olduğu FTIR, SEM, XRD gibi birçok karakterizasyon testi ile ortaya konmuştur.

Mohanty ve ark.’da 2012 yılında (Mohanty, 2012) Parida ve ark gibi benzer çalışmayı gerçekleştirmişlerdir.

Datt, 2012 de yaptığı doktora çalışmasında (Datt, 2012) deneysel ve teorik olarak aspirin ve 5-FU ilaçlarının mezopoz silikalar ile salımı üzerine çalışmıştır.

Datta ve Kaur, 2013’te (Kaur ve Datta, 2013) diklofenak sodyum (romatizma ilacı) ve polimeri (PLGA) Pluronic (F-68) ile modifiye etmiş ve MMT’ye yüklemişler ve küresel taneler ile birlikte bu ilaç için kontrollü salım sağlamışlardır.

Basak ve ark. 2014 yılındaki çalışmada (Basak, 2014) soya protein izolatını kil ile karıştırmış ve kontrollü ilaç salımı yapmıştır. Elde ettiği ürün ile pH 7,4 ve 1,2 noktalarında testler yapmışlar. Kinetik hesaplamalar sonucu şişen kil tabakaları arasındaki su ve Curcumin moleküllerinin düzensiz bir şekilde ve dengeye ulaşmadan taşındığı yani Fickian yolundan (şişen kil tabakaları arasındaki ilaç ve su

moleküllerinin düzeni ve denge durumunda izlediği yol) ziyade anormal bir yol izlediği ortaya konmuştur.

Son olarak ise, Reddy ve ark. 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada (Reddy ve ark, 2016) 5-FU ilacını, sodyum katyonu içeren PVA/MMT kompozitine kitosan varlığında yüklemiş ve film oluşturduktan sonra ilaç salım performansı ve antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir.

Yukarıda yapılan deneysel çalışmalardan da anlaşılacağı üzere montmorillonit kili varlığında hedefli ve/veya diğer kanser tedavilerinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak üretilen partikülün bileşenlerinin ne oranda ve formasyonda bir araya geldiği henüz tam olarak açıklanamamıştır. Dolayısıyla, deneysel olarak geliştirilen bu nanopartikülü oluşturan bileşenlerinin birbiri ile olan etkileşimleri ortaya konmalıdır. Dolayısıyla bahsi geçen nanopartikülün atomik seviyede modellenmesi gerekmektedir. Böylece deneysel çalışmalar ışığında, hazırlanan bir moleküler model ile deneysel çalışmalara ışık tutulabilir. Bu yüzden bu tez boyunca, deneysel çalışmaları destekleyen teorik çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. Öncelikle kuantum seviyede ilaç ve polimer ilişkisi ortaya konmuş ve daha sonra ise ilaç/polimer ikilisinin kil tabakaları yüzeyindeki etkileşimleri modellenmiştir. Son olarak ise Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları ile deneysel çalışmalarda üretilen nanopartikülün en olası modeli ortaya konmuştur.

Yukarıda da anlatıldığı üzere MD simülasyonları nano seviyede bu deneysel çalışmaları destekleyebilecek önemli bir tekniktir. MD, Newton'un hareket yasaları baz alınarak atom ve moleküllerin belirli bir süre de belirli bir sistemde birbirleri ile olan ilişkilerini nümerik olarak hesaplayan bir simülasyon yöntemidir. MD ile ilaç molekülünün MMT kili ve PLGA polimerinin hangi bölgelerine ve vdW, elektrostatik, H-bağ gibi mekanizmalardan hangisi ile tercih edip yüklendiği ortaya konmuştur. Literatürde ise Toth ve ark. (Toth ve ark, 2006) antiinflamatuvar ilaçlarını hidrotalksit/polimer kompozitlerine yüklenme mekanizmalarını bağlanma enerjilerini hesaplayarak simüle etmiştir. Bu çalışmada, MD hesaplamalar ile polimere yüklü kil modeli üzerinde ilaç yüklenme mekanizması açıklanmıştır.

Hedefli kanser tedavisine yönelik yapılmış olan çalışmalar genel olarak oral ya da kontrollü salım olarak sonuçlandırılmıştır. Bunun nedeni ise, ilk olarak üretilen nanopartikülün boyutunun 200 nm altına indirgenememesidir. Bizim yaptığımız

deneysel çalışmalarda mekano-fiziksel yöntemlerle 200 nm altı nanopartikül üretebileceğimiz öngörülmüştür. Bunun dışında bu çalışmanın yapılmasının en önemli gerekçelerinden biri de son yıllarda kil gibi inorganik bir materyal ile çalışmaların oldukça rağbet görmesidir. Ancak kil çalışmalarında kilin tabakalarından ayrılması için genelde Poli vinil alkol (PVA) gibi yüksek hidrofilisiteye sahip polimerler kullanılarak nihai üründen uzaklaştırmak için fazladan maliyeti arttırıcı liyofilizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Deneysel çalışmalar ile geliştirilen nanokompozitlerin ve ilaç salımına yönelik geliştirilen nanopartikülün MD simülasyonları ile desteklenmesi literatürdeki çalışmalara ışık tutacaktır.

Daha önce de belirttiğimiz gibi, yapılan tüm deneysel çalışmalarda kil-polimer-ilaç bileşenleri arasındaki ilişkinin mekanizması yani nanopartikülün moleküler modeli ortaya konması gerekmektedir. Bunun için MD teknikleri kullanılarak, üç bileşenin bir arada olduğu bir modelleme gerçekleştirildi. Bu teknikler aracılığıyla muhtemel istiflenmeler simüle edilerek, birbiri ile olan etkileşimleri incelenmiştir. Örneğin, Heinz, 2012 yılında çeşitli killerin modifikasyonunun simülasyonu üzerine bir çalışma (Heinz, 2012) yapmıştır. Bu çalışma ile Na-MMT kilinin nanokompozit ve biyoteknolojide kullanım yapısını ve MD modellerinin başlangıç parametrelerini nasıl seçeceğimiz konusunda ışık tutmuştur. Kilin polimer varlığında ilaç etkileşimlerinde muhtemel yapıları ve etkileşimleri ortaya koymamıza yardım eden iki çalışmadan ilki; Davis ve ark. 2008 yılında yaptıkları, lisin molekülünün montmorillonit kilinin tabakaları arasında oluşan etkileşimlerini anlatan moleküler modelleme çalışmasıdır (Davis ve ark, 2008). Diğeri ise, Toth ve ark. (Toth ve ark, 2006) yapmış oldukları ve olası tüm konformasyonları içeren detaylı bir MD çalışmasıdır. Bu çalışmada, yedi farklı ilacın hidrotalksit minerali üzerine su ve polimer varlığında bağlanma enerjileri hesapsal olarak ortaya konmuştur. Ancak bu çalışmada kilin sadece bazal yüzeyi ele alınmış ve kırıklı yüzey ve bazal boşluklarından bahsedilmemiştir. Halbuki deneysel çalışmalarda kilin mukavemet arttırıcı ve polimer sarmalına düzenleyici ve de yardımcı eleman olarak katılabileceği bilinmektedir. Bunun dışında heparin ve anti-inflamatuar ilaçlar olan ibuprofen, diklofenak ve indometasin gibi ilaçların sentetik olarak üretilen çift tabakalı hidroksiler (LDHs) denilen killerin tabakalarının arasındaki etkileşimi ve istiflenmesinin MD çalışmaları sırası ile Zhang ve ark., (2010) (Zhang ve ark, 2010) ve Mohanambe ve ark., (2005) (Mohanambe ve Vasudevan,

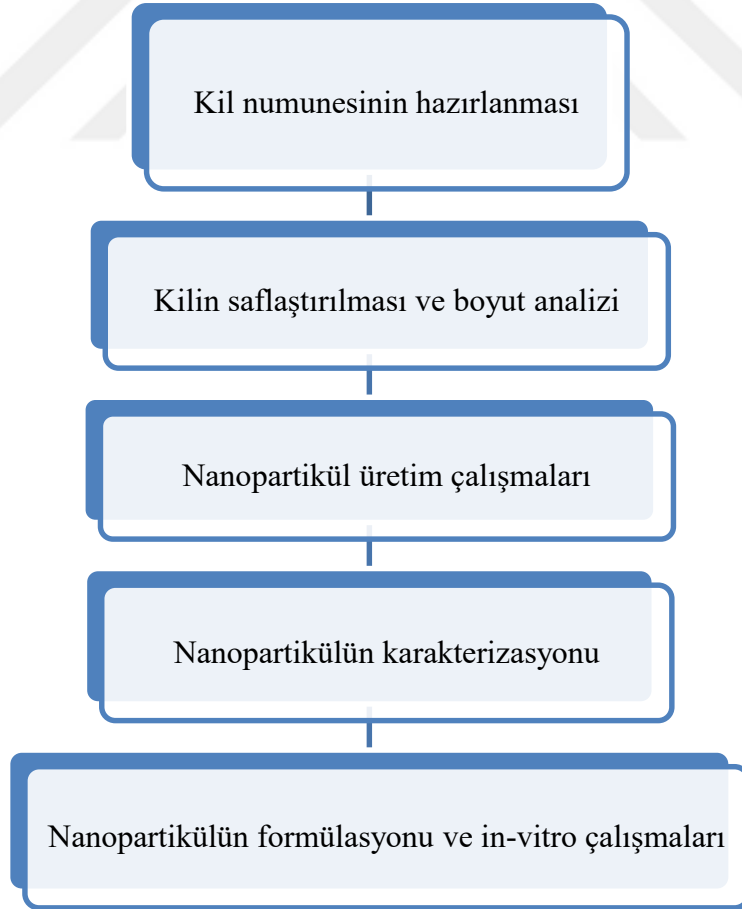
2005) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmalarla da anyonik olarak elde edilmiş bir kilin ilaçları yükleyebileceği açıklanmıştır.

Yukarıdaki tüm bu deneysel ve teorik çalışmalar da göstermektedir ki, son yıllarda geleneksel ilaç terapilerine alternatif araştırmalar artmaktadır. Ayrıca kanser tedavisinde uygulanan ilaç salım sistemlerinin genel olarak üretilen partikül boyutuna ve uygulama şekline bağlı olarak kontrollü veya oral olarak gerçekleştirildiği de ortadadır. Dolayısı ile deneysel olarak yapılacak çalışmalarımızda daha az çalışılmış ve daha az yüzde ile başarılı olmuş olan genelde boyutu ortalama 200nm partiküllerle ve damardan enjeksiyon şeklinde uygulanan hedefli ilaç salımı çok büyük önem arz etmekte ve MD simülasyonları ile desteklenmesiyle birlikte detaylı ve kapsamlı bir çalışma olacaktır. Nihai olarak üretilmiş ve MD ile modeli modellenmiş hedefli ilaç sisteminin endüstriyel olarak da üretilbildiği takdirde ekonomik fayda sağlayacağı öngörülmektedir.

3. DENEYSEL VE TEORİK YÖNTEMLER

3.1 Deneysel Çalışmalar

Tez kapsamında, deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler sırasıyla, kil olarak sodyum montmorillonit (Na-MMT); polimer olarak poli laktik ko-glikolik asit (PLGA); ilaç olarak ise Curcumin ve 5-Fluorourasil (5-FU) kullanılmıştır. Tez kapsamı boyunca ilk olarak detaylı bir şekilde Curcumin ile nanopartikül üretimi ve formülasyonu ortaya konduktan sonra 5-FU ile deneyler tekrarlanmıştır. Hedefli kanser tedavisine yönelik kil katkılı nanopartikül üretimi konulu doktora tezinde yapılan tüm deneysel çalışmaların genel akım şeması Şekil 3.1’de verilmektedir.



Şekil 3.1 : Deneysel çalışmaların genel akım şeması.

Şekil 3.1’de de görüleceği üzere, ortalama %10 nem içeren Reşadiye yöresine ait bentonit numunesi bünyesindeki Na-MMT mineralini safsızlıklarından ayırmak üzere ilk olarak, cevher hazırlama teknikleri kullanılarak mikron altı seviyeye getirilmiştir. Bentonit numunesi konileme–dörtleme yöntemi ile deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere bölünmüş ve 4 kg’lık temsili kısmı üzerinde çalışılmak amacıyla ayrılmıştır. Geri kalan numune ise, “şahit numune” olarak depolanmıştır. Deneylerde, tüm boyut grubundaki numuneler etüvde 4 saat boyunca yaklaşık 80 °C sıcaklıkta yüzey nemi giderilene kadar kurutularak kullanılmıştır. 5 cm boyutunun altındaki tüvenan numune çeneli kırıcıya beslenmiş ve kırıcı çıkışı 5 mm’lik elek ile boyut kontrolü uygulanmıştır. Daha sonra basma, ezme ve kesme kuvvetlerini birlikte uygulayan bilezikli değirmende, kuru haldeki bentonit numunesi ortalama 150 µm altına öğütülmüştür. Tez süresince, tüm deneysel çalışmalarda bu numune kullanılmıştır. Boyut küçültme işlemi uygulanarak hazırlanan numune sıvı ortamda safsızlıklarından arındırıldıktan sonra nanopartikül üretimi için kullanılmıştır. Nanopartikül üretimi gerçekleştirildikten sonra nihai formülasyon ortaya konularak in-vitro çalışmalara geçilmiştir. Tüm aşamalarda elde edilen ürünlere, birçok fiziko-kimyasal karakterizasyon testleri uygulanmıştır. Numunelerin özelliklerinin tespiti için sırasıyla, boyut ölçümü (DLS), liyofilizasyon (freeze-dryer), X-ışınımı kırınım (XRD), X-ışınımı floresans (XRF), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), çevresel taramalı elektron mikroskobu (E-SEM), diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) testleri uygulanmıştır.

3.1.1 Deneysel çalışmalarda kullanılan araç ve gereçler

Na-MMT kili, PLGA polimeri ve Curcumin ve 5-FU ilaçları dışında deneysel çalışmalarımız boyunca sıvı ortam olarak, deiyonize su, aseton gibi çözücüler de kullanılmıştır. Su dışındaki sıvılarda Merck markası ve analitik grade olması tercih edilmiştir. Ölçüm ve şartlandırma için, beş haneye kadar duyarlı olan PRECISA marka Hassas Terazî (es 225SM-DR) ve Ultrasonik Banyo (Bandrlin, Sonorex) kullanılmıştır. Ayrıca, kullanılan hücre hattı MCF7 (ATCC® HTB22™), -85 °C derin dondurucu (U410 premium, new Brunswick), Liyofilizatör (Labconco, Freezone 2.5 plus), Santrifüj (Hermle, Z 326K), Boyut Ölçüm Cihazı (Zetasizer Nano-zs) ve HPLC Perkin-Elmer Flexar gibi cihazlar kullanılmıştır. Membran olarak doğal selülozdan üretilen Spectra/Por marka, sıcaklığa ve pH 2-12’ye duyarlı, organik çözücü toleranslı

ve moleküler poroz yapıda Diyaliz Mebranı (DM) kullanılmıştır. Hidrofilik olmasının yanında, simetrik ve standart geçirgenlik özelliğine sahip olan bu membranın moleküler eşik (cut-off) ağırlığı (MWCO) 6-8 kD arasındadır. Yatay genişlikleri (flat width) 10-120 mm ve 6,4-76 mm arasında değişen por çaplarına sahiptir.

3.1.2 Deneysel yöntemler

Tez çalışmasında kil, polimer ve ilaç üçlüsünün hedefli kanser tedavisinde kullanımına yönelik nanopartikül (NP) üretilmiştir. Asetonun difüzyon etkisi ile çok yoğun ortamdan az yoğun ortama geçerken su ile yerdeğiştirmesini sağlamak için, DM ile misel filtrasyonuna benzer şekilde bir üretim tekniği geliştirilmiştir. Ortaya konan nihai ürünün formülasyonu belirlendikten sonra hücre kültür deneylerine devam edilmiştir. Elde edilen biyo uyumlu nano partikülün damara enjeksiyon ile (intravenous İ.V.) ilaç taşıma potansiyelini incelemek için aşağıdaki deneysel yöntemler gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak kullanılan kilin tanımını yapmak için Na-MMT kilinin XRD ve XRF analizleri yapılmıştır. XRD analizleri İTÜ Jeoloji Mühendisliği X-Işınları laboratuvarında bulunan Bruker 8D Advance model XRD cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda, bentonitin yapısındaki kil mineralinin kristal bilgilerine erişilmiştir. Daha sonra, kil numunelerinin majör ve iz elementlerinin oranı ortaya konması için XRF ve kızdırma kaybı (LOI) analizleri de İTÜ Jeokimya Araştırma Laboratuvarlarında bulunan Bruker marka S8 Tiger model XRF cihaz ile yapılmıştır.

Safsızlıklardan uzaklaştırılan kil numunesinin ve nanopartikülün boyut analizleri sıvı ortamda nano boyutta ölçüm yapabilen DLS (Dynamic Light Scattering) yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu ölçümler İTÜ Ulusal Membran Teknolojileri Araştırma Merkezi (MEMTEK) laboratuvarlarında bulunan “Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı (0,6-6 nm)” isimli ve Malver nanosizer cihazı ile ölçülmüştür. Ölçüm sırasında başlangıç parametreleri olarak, kil mineraline ait refraktif indeks (1,57) ve absorpsiyon değeri (0,10) (Greene-Kelly, 1970) kullanılmıştır. Dispersant olarak su seçilmiş ve fiziksel özellikleri ise 25 °C derecede 1,33933 milipaskal-saniye (mPa.s) ve refraktif indeksi 1,33 (Baxter ve ark, 1911) olarak belirlenmiştir. Refraktif indeksin ölçümünde kullanılan küvetler, kuvarstan yapılmış olup tek kullanımlıktır. Boyut ölçümü yapılmadan önce yüksek çözünürlüklü piklerin alınması için çoklu darlaştırılmış

modları içeren Gaussian eğrileri tercih edilmiştir. Tüm veriler iki defa ard arda okunup ortalaması alındıktan sonra kaydedilmiştir.

Elde edilen biyo uyumlu MMT ve nanopartikülün küresel yapıya sahip olduğu çevresel taramalı elektron mikroskobu (E-SEM) tespit edilmiştir. İTÜ MEMTEK laboratuvarlarında bulunan FEI-Quanta FEG 250 cihazı kullanılarak düşük vakum ortamında ve açık konumlu E-SEM modunda tüm numunelerin görüntü analizleri yapılmıştır. Ayrıca, nanopartikülün içerisinde bulunan kile ait Na, Ca, Mg, Al, Si atomlarına ait EDAX modu ile datalar haritalanmıştır.

Üretilen nanopartikülde kilin, ilacın ve polimerin varlığını ispatlamak için FT-IR ve DSC analizleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikli olarak MMT, Curcumin ve PLGA için belirgin olan piklerin ortaya konması ve birbirleri ile olan ilişkilerin analizi açısından nanopartikülün FT-IR spektraları çekilmiştir. Böylece kilin PLGA ve Curcumin sarmalındaki yeri ve formasyonu hakkında açıklayıcı bilgiler edinilmiştir. Bu analizler İTÜ Kimya Bölümü Laboratuvarların'daki Perkin-Elmer Spectrum One modeli FT-IR cihazı ile yapılmıştır.

DSC kontrollü bir atmosfer ortamında sıcaklığın ve zamanın fonksiyonu olarak malzemedeki geçişleri ölçer. Bu geçişler gözlemlenen sıcaklık ve ısı akışlarına bağlıdır. Endotermik, ekzotermik ve ısı kapasitesindeki değişiklikleri içeren bu ölçümler fiziksel ve kimyasal değişimler hakkında kantitatif ve kalitatif bilgi verir. Genel olarak camsı geçiş, entalpi sıcaklıkları, faz değişimi ve ergime uygulamaları ölçülebilir. Öte yandan inorganik olarak kil içeren nanopartikülde ayrıca çözünme, hidrojen çıkarma, yükseltgenme, indirgenme, adsorbsiyon, bozunma ve katı-hal reaksiyonları da incelenebilmektedir (Gabbott 2008; Verdonck ve ark, 1999). Tüm numuneler için DSC analizleri İTÜ Kimya bölümü “Polimer Kimyası laboratuvarındaki” Perkin-Elmer Diamond DSC modeli cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Benzer şekilde Curcumin varlığının ortaya çıkarılması için, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz Bezmialem Vakıf Üniversitesindeki Eczacılık Fakültesi laboratuvarlarında yapılmıştır. Yapılan bu karakterizasyonların sonucunda nanopartiküle ait enkapsülasyon ve ilaç verimleri denklem 3.1 ve 3.2'deki gibi hesaplanmış ve formülasyon ortaya konmuştur. Bu denklemlerde sırasıyla; $E.V.$ ve $İ.Y.V.$ enkapsülasyon ve ilaç yükleme verimlerini, $İLAC_{NP_s}$ ve $İLAC_{NP_b}$ ise PLGA-Kil kompozitinde santrifüj tüpünde kalan veya ilk

yarım saatte salımı gerçekleşmemiş ve başlangıçtaki ilaç miktarını temsil etmektedir.

$$E.V.(\%) = \frac{ILAÇ_{NPS}}{ILAÇ_{NPb}} * 100 \quad (3.1)$$

$$İ.Y.V.(\%) = \frac{ILAÇ_{NPS}}{ILAÇ_{NPS} + ILAÇ_{NPb}} * 100 \quad (3.2)$$

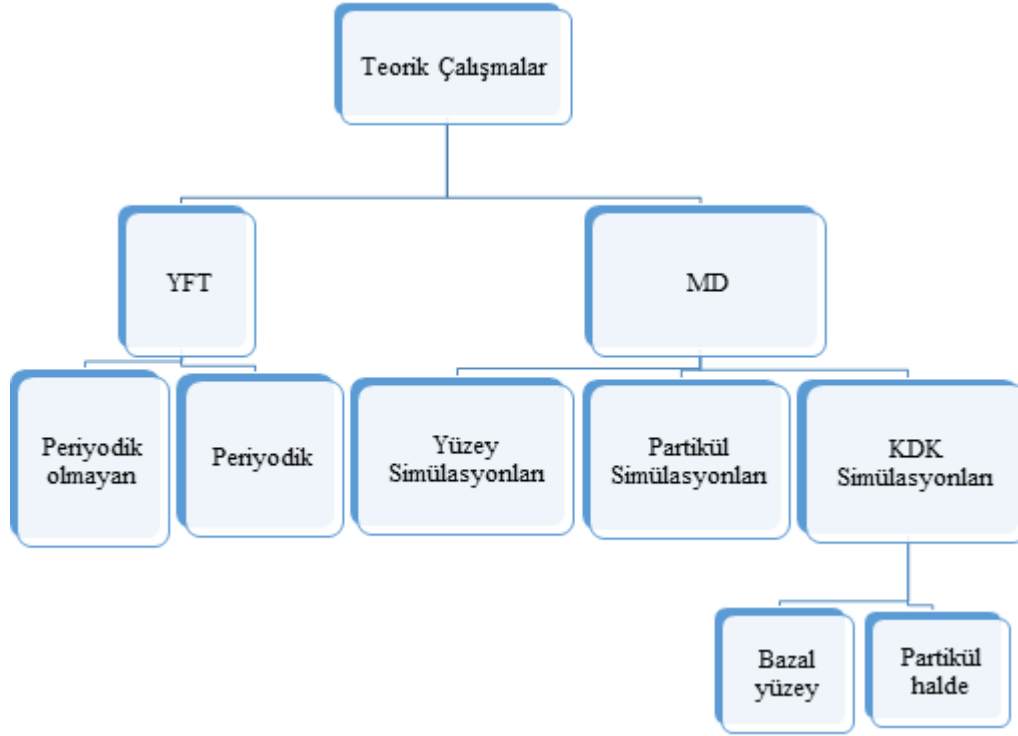
Son olarak, maksimum salım ile hazırlanmış olan nanopartikülün in-vitro ortamda anti-kanser ve toksisite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Nihayi formülasyonun MCF-7 meme kanseri hücre soyuna karşı etkisi incelenmiştir. Toksik etki için, Curcumin kullanılmadan hazırlanan nanokompozitin L-929 fibroblast hücre soyuna karşı etkisi incelenmiştir. Ayrıca sadece PLGA ile hazırlanmış partikülün toksisitesi de incelenmiştir. Böylece hazırlanmış olan NP'in toksik etkisinin olup olmadığını göstererek malzemenin biyo-uyumlu olduğu ortaya konmuştur. Bu bağlamda malzeme ve malzemeyi oluşturan bileşenler canlı hücreler ile temas ettiği ortamda 24, 48 ve 72 saat boyunca tutulmuş ve bu süreler boyunca ölen hücre sayıları hesaplanarak nanopartikülün IC₅₀ (=antilog) yani hücrelerin yarısını öldüren konsantrasyonu hesaben bulunmuştur.

Deneyisel çalışmalarda curcumin ile hazırlanan metaryale Curcumin yerine 5-FU ilacı ile üretilen nanopartikülün göğüs veya beyin kanseri hastalığının oral veya intravenous tedavisi için kullanım potansiyelini incelenmiştir. Öncelikle 5-FU ilacı için spektroskopik analiz yöntemi ile konsantrasyon-absorbans eğrisi tespit edilmiştir. Her ikisi için de koşullar uygun olduğu için tercih edilen yöntem Elisa Reader ile floresans ölçümü ve UV absorpsiyonu olmuştur. Yüklenmenin gerçekten gerçekleşip gerçekleşmediğine ilacın ve kompleksin IR spektrumları kıyaslanarak karar verilmiştir. Curcumin içeren NP için yapılan diğer analiz yöntemleri 5-FU ile üretilen NP için de yapılmıştır.

3.2 Teorik çalışma ve yöntemler

Deneyisel çalışmalar sonucunda elde edilen nanopartikülün formülasyonu açıklanmıştır. Ancak en önemli dezavantaj, sistemde bulunan kil, Curcumin partiküllerinin PLGA sarmalının hangi bölgelerinde ve hangi formda yüklendiğinin, tutunduğunun veya adsorblandığının bilinmemesidir. Henüz kimyasal olarak hangi mekanizma ve bölgelerin etkin olduğu açıklanamamıştır. Dolayısıyla tezin bu bölümünde kil-Curcumin-PLGA üçlüsü arasındaki iyonik bağ ve kovalent bağ gibi

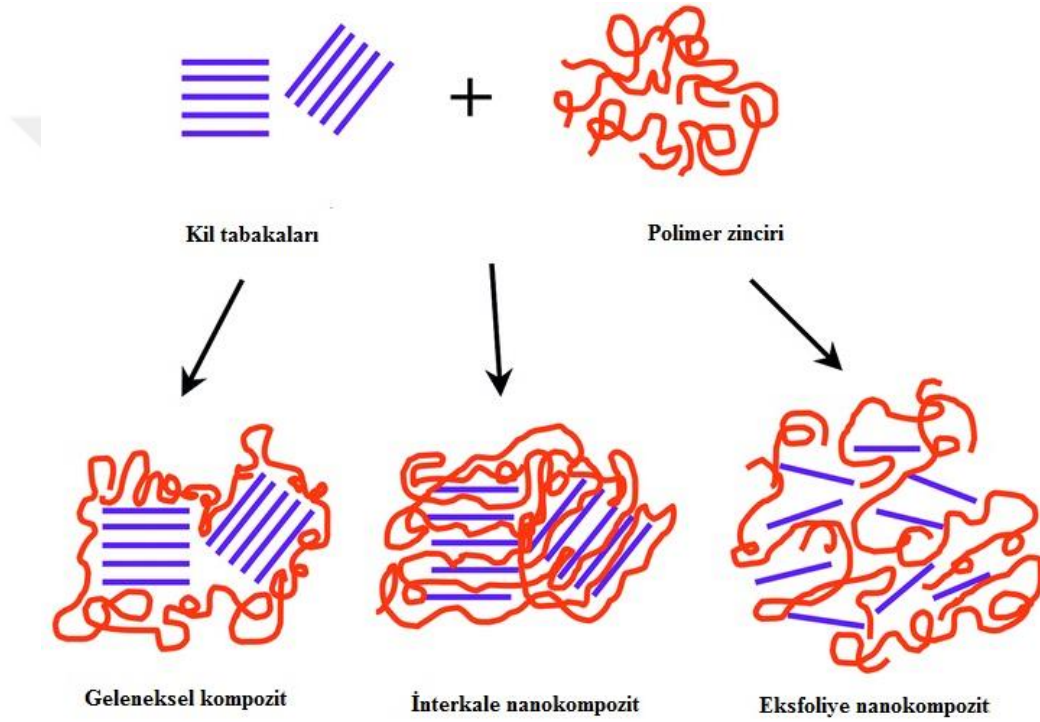
moleküller içi, vdW ve H-bağ gibi moleküller arası tüm etkileşimler de detaylı olarak araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda Şekil 3.2'deki şemada belirtilen tüm modelleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 : Yapılan tüm hesaplamalı çalışmalar.

Şekil 3.2'de de görüleceği üzere yapılan teorik çalışmalar iki ana bölümde gerçekleştirilmiştir. YFT çalışmaları ile ilaç/polimer, ilaç/kil ve polimer/kil modelleri arasındaki etkileşimler daha yüksek doğrulukta ortaya çıkarılması için tercih edilmiştir. Bunlardaki model yapılar baz alınarak kilin rolü daha detaylı olarak açıklanması için MD çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.2'deki Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (YFT) ile yapılmış olan kuantum mekanik çalışmalardır. Bu çalışmalar, boyutu sınırlandırılmış olan veya XYZ boyunca belli bir atom sayısında yapılan periyodik olmayan ve boyutları veya XYZ boyunca simetrisi olan periyodik hesaplamalar olarak iki şekilde incelenmiştir. Nedeni ise periyodik olmayan sistemlerde modeller hazırlanırken boş kalan veya sallantıdaki bağların hidrojen ile doyurulmasından kaynaklı tüm beklenmeyen etkileşimlerin minimum seviyeye indirilmesidir. Aksi takdirde kil-Curcumin ve PLGA üçlüsünün birbiri ile olan etkileşimleri tam olarak açıklanmamış olacaktır. Dolayısıyla periyodik sistemler de YFT ile çalışılarak kısa zincir uzunluklu PLGA polimeri ile bir ve/veya iki adet Curcumin formunun MMT kil yüzeylerine etkileşimleri etraflıca araştırılmıştır. Ancak, bahsi geçen YFT

hesaplamaları, her ne kadar moleküller arası ve içi etkileşimlerde daha fazla ve açıklayıcı bilgi veriyorsa da en önemli dezavantajı, sınırlı ve az sayıda atom ile çalışılması olmuştur. Dolayısıyla Şekil 3.2’den de görüleceği üzere deneysel çalışmaları daha iyi simüle edebilmek için MD hesaplamaları da gerçekleştirilmiştir. MD çalışmaları yapılırken sorulması gereken en önemli soru nano boyuta indirgenmiş olan kil partikülleri ile polimer-ilaç kompozitinin su ortamında birbiri ile hangi pozisyonda ve ne şekilde etkileştiğidir. Bu sorunun açıklanması için Şekil 3.3’te de verilen ve literatüre de konu olmuş üç farklı senaryo (Jafarbeglou ve ark, 2016) öne çıkmaktadır.



Şekil 3.3 : Polimer ve kil etkileşimleri sonucu oluşan olası senaryoları.

Şekil 3.3’te de görüleceği üzere, dağıtılmış olan kil tabakaları polimer sarmalı içerisine olduğu gibi yerleşeceği gibi polimer sarmalı tabakalar arasına girerek de kompozit oluşturabilmektedir. Polimer zinciri, kil tabakalarının şişme ve iyon değiştirme gibi özelliklerinden yararlanarak tabakaların interkale olmasını sağlamaktadır. Yeterli konsantrasyonda polimer olması durumunda ise kil tabakaları birbirinden tamamen ayrılarak eksfoliye olabilmektedir. Böylece nanometre seviyelerinde kompozitler üretilmiş olmaktadır. Deneysel olarak ortaya konmuş olan bu senaryolar MD simülasyonları tarafından doğrulanmaktadır. Şekil 3.2’de de verildiği üzere ilk olarak bir adet kil tabakasının bazal yüzeyinde (001) su ortamında PLGA, Curcumin ve 5-FU

ilaçları varlığında simülasyonlar gerçekleştirilmiştir. Daha sonra da, MMT kili Şekil 3.3'teki gibi 3 senaryo halinde PLGA ve ilaç molekülleri arasında partikül halinde simüle edilmiştir. En son olarak, katyon değiştirme kapasitesi 85 meq/100gr olacak şekilde, doğal kil numunesinde bulunan ve sistemi nötralize eden sodyum iyonları varlığında bu iki simülasyon tekrarlanmıştır.

3.2.1 Yoğunluk fonksiyoneli teorisi çalışmaları

Periyodik olmayan yoğunluk fonksiyoneli teorisi (YFT) çalışmaları TURBOMOLE V6.1 (Ahlrichs ve ark, 1989) programı kullanılarak yapılmıştır. Geometri optimizasyonları Perdew, Burke and Ernzerhof (PBE) fonksiyoneli (Perdew ve ark, 1996) TZVP baz seti ile birlikte kullanılarak yapılmıştır. Modellerin büyük olmasından dolayı “resolution of identity” (RI) yaklaşımı da kullanılmıştır. Dispersiyon katkısı da hesaba katılmış ve etkileşim enerjileri B97-D baz seti ile elde edilmiş optimize yapılar kullanılarak denklem 3.3 ile bulunmuştur.

$$E_{BE} = E_{TOPLAM} - (E_{MOLEKÜL1} + E_{MOLEKÜL2}) \quad (3.3)$$

Burada, E_{BE} iki moleküle ait optimize yapının bağlanma enerjisini, E_{TOPLAM} modele ait toplam enerjiyi, $E_{MOLEKÜL1}$ ve $E_{MOLEKÜL2}$ ise sırasıyla moleküllerin ayrı ayrı enerjilerini temsil etmektedir. B97-D fonksiyoneli yüksek mertebeli türevleri ihmal ettiğinden sadece enerji ve eğim hesaplamaları yapılabilmektedir. En önemli avantajı diğer fonksiyonellerden hızlı olması ve dispersiyon katkısını hesaplamasıdır. Ayrıca baz setinden kaynaklanan hataları düzeltmek için “counterpoise” (CP) tekniği kullanılmıştır. Bunun dışında organik olan PLGA ve Curcumin için vakum ortamın dışında, %100 olarak ilacın çözündüğü diklorometan ve aseton gibi organik çözücü ortamlarında da kuantum hesaplar TURBOMOLE programına ait COSMO modülü ile gerçekleştirilmiştir.

Periyodik olmayan bu YFT çalışmaları için, öncelikle deneysel olarak sentezlenmiş olan PLGA zincirinin istiflenmesinin nasıl olabileceği ile ilgili olarak hesaplar yapılmıştır. Çünkü PLGA zinciri sentezlenirken istifler ardışık mı (-LA-GA-LA-GA-), rastgele mi (-GA-LA-GA-GA-LA-), yoksa blok ko-polimer (-LA-LA-LA-GA-GA-GA-) şeklinde mi sıralandığı kesin olarak bilinmemektedir. Bu nedenle ilk olarak olası PLGA zincir formunun ortaya konması için laktik ve glikolik asit monomerlerinin birbiri ile olan etkileşimleri modellenmiştir. İkinci olarak ise PLGA (Şekil 2.3) ve Curcumin ilacının ketonol formları (Şekil 2.7) arasındaki etkileşimler hesaplanmıştır. Daha sonra bu moleküller alınıp küme kil modelleri ile olan

etkileşimleri de modellenmiştir. Periyodik olmayan YFT çalışmalarda ele alınan modellerin yukarıda da bahsi geçen hidrojenle doyurmadan kaynaklı kısıtlamaları olmaktadır. Bunları ortadan kaldırmak ve daha gerçekçi hesaplamalar yapabilmek için kil temsili periyodik bir hücre içine alınarak 001 bazal yüzeyi boyunca bir ve iki adet tabaka yüzeyleri ve arasında YFT hesaplamaları da yapılmıştır. Bu hesaplamalar Dassault Systèmes Biovia şirketine ait Materials Studio 8.0 programı içerisinde yer alan CASTEP (Clark ve ark, 2005) modülü ile gerçekleştirilmiştir. Periyodik YFT hesaplamalarında genelleştirilmiş gradyent yaklaşımı (GGA) olan PBE (Perdew ve ark, 1996) fonksiyoneli kullanılmıştır. “Cut-off” enerji değeri 340 eV olarak seçilmiştir. Geometri optimizasyonlarında BFGS yöntemi kullanılmıştır. Enerji ve kuvvet yaklaşım değerleri sırasıyla 0.2000E-04 eV/atom ve 0.5000E-01 eV/Å olarak alınmıştır. Bu başlangıç koşulları ışığında MMT-Curcumin ve MMT-PLGA arasındaki ilişki etkileşim enerjileri hesaplanarak aydınlatılmıştır.

3.2.2 Moleküler dinamik simülasyon çalışmaları

YFT çalışmalarının az sayıda atomla çalışılması gibi kısıtlamalarını ortadan kaldırmak için moleküler dinamik simülasyonlar da yapılmıştır. MD çalışmaları da aynı şekilde Materials Studio 8.0 programı içerisindeki FORCITE modülü ile gerçekleştirilmiştir. İlk olarak sistemdeki yapısal bozukluklardan kurtulmak için geometri optimizasyonu Smart algoritması yardımıyla yapılmıştır. Bu optimizasyonlarda enerji ve kuvvet eşik değerleri sırasıyla 0.001 kcal/mol ve 0.5 kcal/Å olarak seçilmiştir. Atomlar arasındaki etkileşimler tutarlı değerlik kuvvet alanı anlamına gelen CVFF (Dauber-Osguthorpe ve ark, 1988) kuvvet alanı ile ifade edilmiştir. Uzak menzilli (long-range) Coulombik etkileşimler “Ewald summation” yöntemiyle hesaplanmıştır. Simülasyonlar NPT (sabit basınç ve sıcaklık) takımı (ensemble) kullanılarak yapılmış olup basınç Berendsen barostatı (Berendsen ve ark, 1984) ve sıcaklık ise Nose termostadı (Nosé, 1984) ile kontrol edilmiştir. Simülasyonun adım aralığı 1 femtosaniye (fs) olarak alınırken, genel olarak simülasyon 1 nanosaniye (ns) sürdürülmüştür. Simülasyonların tamamı hem Curcumin hem de 5-FU molekülleri için yapılmış ve bu moleküllerin yüzey ile olan etkileşimleri detaylıca incelenmiştir. Bunun için MSD ve RDF analizleri ile ilaç moleküllerinin PLGA varlığında kil ile olan etkileşim mekanizması ortaya konmuştur.

Hesapsal çalışmaların bir kısmı Kanada'daki Alberta Üniversitesi Kimya ve Malzeme Mühendisliğindeki laboratuvarlarda ve geri kalan kısmı ise Ulusal Yüksek Başarımlı Hesaplama Merkezindeki (UYBHM) süper bilgisayarlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modelleme ve simülasyonlar sonucu elde edilmiş olan çıktı dosyaları animasyonlar ve grafiklerle sonuçlandırılmıştır. Bu grafikler ile ilaç-kil-polimer üçlüsü arasındaki moleküller arası etkileşimler açıklanmış, ilaç moleküllerinin aktif sitelerinin diğer bileşenler ile olan difüzyonu ve bağ sayıları ortaya konmuştur. Radyal dağılım fonsksiyonları (RDF) ve ortalama karesel alan teknikleri ile her bir bileşenin hidrofobisitesi ve difüzyonu hakkında bilgiler elde edilmiştir. Simülasyon sonucunda Curcuminin enol ve keto formlarının kil yüzeyine ne kadar yaklaşabildikleri de açıklanmıştır.



4. ÇALIŞMALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.1 Nanokil üretim teknikleri

4.1.1 Saflaştırma yöntemi

Nanokil üretiminde Tokat Reşadiye Bölgesine ait sodyum montmorillonit (Na-MMT) kili kullanılmıştır. Bentonit olarak da bilinen Na-MMT killeri genelde bünyesine su alarak fiziksel değişim gösterir. Na-MMT killeri bu şişme özelliği ile diğer minerallerden ayırt edilmektedir. Ayrıca, yapısındaki serbest atomların bir başka atom veya grup ile yerdeğiştirmesi ile oluşan katyon değiştirme özelliği, az miktarda su ile temas ettiğinde katılaşma veya çok sulu ortamda kayganlaşma olarak bilinen plastiklik en önemli özellikleridir. Diğer minerallere göre teorik olarak 800 m²/g gibi çok daha büyük bir yüzey alanına sahip olmasından dolayı adsorplanma, bulunduğu sulu ortamda zamanla sahip oldukları katyonlar ve katkı maddelerinden dolayı farklı reolojik (vizkozite ve tiksotropi) özellik göstermektedir (Erkan, 2008). Na-MMT kili alkali özellikte olmasından dolayı tüm bu özellikleri göstermektedir. Na-MMT kiline ait fiziksel ve kimyasal özellikler Çizelge 4.1’de verilmiştir (Boylu, 2013).

Çizelge 4.1 : Sodyum montmorillonit kiline ait fiziksel ve kimyasal özellikler.

Özellik	Değer
KDK, meq/100g	77,4
Şişme indeksi, ml	18,5
pH	9,7
Yağ adsorbsiyon kapasitesi, mg/l	0,38
Su adsorbsiyon kapasitesi, %	156,8
Sıvı limit oranı, %	500
Filtrasyon kaybı, ml	12,8
Zeta potansiyel, mV	-57,6
Ortalama boyut (d ₉₀), µm	-121,9

Çizelge 4.1’de, Boylu ve ark. 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada (Boylu ve ark, 2010) kullanılan doğal Na-MMT kilinin katyon değiştirme kapasitesi (KDK) metilen mavisi testi ile 77,4 meq/100 gr bulunurken, saflaştırma sonucunda elde edilen kilin KDK sı ise 85,5 meq/100gr olarak tespit edilmiştir.

Oruçoğlu (2011) doktora tezi (Oruçoğlu, 2011) kapsamında aynı kili, hidrosiklon kullanarak saflaştırmış ve elde edilen numunenin KDK'sını 103,0 meq/100 gr olarak bulmuştur. Çizelge 4.1'deki karakteristik özellikleri temel alarak kullandığımız Na-MMT mineraline saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Başlangıç numunesinin katı fazda ve kuru olarak boyutu, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü "Partikül Malzemeler Laboratuvarında" bulunan "Lazer Partikül Boyutu Ölçüm Cihazı" isimli ve modeli Malvern 2000 S olan cihaz ile $-121.9 \mu\text{m}$ (d_{90}) olarak ölçülmüştür. Buradaki amaç, ilaç salım deneylerinde sıvı ortamda kullanılmak istenmesi ve boyutunun nano seviyelere çekilip hedefli kanser tedavisine uygun boyuta indirgenmesidir. Dolayısıyla su molekülleri ile %100 doyurulmuş ve tabakalı yapısı açılmış bir kil süspansiyonu hazırlamak için Arçelik blendere önce 1 L saf su konulmuş ve pülpte katı oranı %4 olacak şekilde 43,5 g kuru bazda ham kil ilave edilmiştir. Tartılan kil 1000 rpm'de (1. Devirde) çalışan Arçelik blendere yavaş yavaş beslenmiş ve tamamı beslendikten sonra 7. devire alınarak 15 dk karıştırılmıştır. Bu işlem sırasında blender 7. devirde karıştırılırken, iki tane spatül süspansiyonun kenarlarına karşılıklı daldırılarak dış çepere savrulan partiküllerin su ile teması artırılıp tam karışım ve dış çeperden içe doğru suyun hareket etmesi sağlanmıştır. Blenderda karıştırma işi bittikten sonra da, aglomere/agregat oluşturmuş olan veya kendiliğinden tamamen açılmamış olan kil partikülleri olabilmektedir. Dolayısı ile bu karıştırmaya ilave olarak süspansiyon behere alınmış ve 2 saat boyunca manyetik karıştırıcıda 30 °C sıcaklık ile kilin açılması sağlamıştır. Bu aşamadan sonra pülp 1 saat boyunca bekletilmek suretiyle dekantasyon gerçekleştirilerek, askıda kalmış olan partiküllerin, çökmesi sağlanmıştır.

Dekante edilerek hazırlanan süspansiyon, 50 ml lik 20 adet falkon tüpüne bölüştürülerek 4000 rpm hızda 25 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Tüplerin en alt kısmında kalan empüriteler göz önünde bulundurularak, temiz bir behere üstteki süspansiyon süzülerek aktarılmıştır. Kalan solusyondan 50 ml alınıp süreye bağlı hem pülpün stabilitesi çökmeye bağlı olarak gözlenlenmiş hem de boyut analizine bakılmıştır; geri kalan numune 55 °C de 10 gün boyunca etüvde kurutulmuştur. Kurutma sonucunda elde edilen saflaştırılmış bu kil numunesi çeşitli sürelerde ve maximum güç kullanılarak ultrasonik prob (UP) tekniği ile saf suda dağılımı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen numunelerin boyutu ölçüm sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelge 4.2'de çeşitli kil oranlarında saf suda ve çeşitli sürelerde ultrasonik prob (UP) tekniği ile hazırlanmış olan numunelerin hacimsel ve numerik çap boyutları

ve yüzdeleri verilmiştir. Bu çalışmada, kil partikülleri uniform ve nanometre boyutlarına getirilememiş ve hatta aglomerasyonu önleyeceği düşünülen UP tekniği ile kilin daha da aglomere olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4.2 : Saflaştırılmış kilin boyut analiz sonuçları.

Numune kodlandırılması	Pik sayısı	Hacimsel oran, %	Hacimsel boyut, nm	Nümerik oran, %	Nümerik boyut, nm
Saf kil	1	27,7	403,5	100	168,0
	2	72,3	3438		
Saf kil 1 dak, UP	1	45,1	233,1	100	142,1
	2	54,9	5470		
%0,1 seyreltme 0 dak, UP	1	3,7	39,66	100	50,1
	2	72,6	398,0		
%0,1 seyreltme 0,5 dak, UP	3	23,70	4951	100	150,8
	1	62,7	309,4		
%0,1 seyreltme 1,5 dak, UP	2	37,3	5151	100	108,0
	1	17,5	105,9		
%0,1 seyreltme 3 dak, UP	2	50,5	351,7	100	78,0
	3	32,0	5289		
%0,01 seyreltme 0 dak, UP	1	21,3	77,2	100	100,3
	2	78,7	309,0		
%0,01 seyreltme 0,5 dak, UP	1	5,9	84,2	100	183,3
	2	94,1	513,3		
%0,01 seyreltme 1,5 dak, UP	1	57,7	303,9	100	92,48
	2	42,3	5455		
%0,01 seyreltme 3 dak, UP	1	41,1	249,4	100	140,3
	2	58,9	5344		
%0,005 seyreltme 0 dak, UP	1	33,2	187,5	100	181,7
	2	66,8	5428		
%0,005 seyreltme 0,5 dak, UP	1	55,3	688,0	100	187,0
	2	44,7	4934		
%0,005 seyreltme 1,5 dak, UP	1	100	286,7	100	144,6
%0,005 seyreltme 3 dak, UP	1	100	1038	100	126,7
	2	34,0	204,2		
	2	66,0	5409		

Nümerik boyutlara baktığımızda hemen hemen tüm yöntemler başarılı görünse de hacim olarak bir tanenin boyutu 4-5 μm civarında ölçülmüştür. Örneğin; “saf kil” kodlu süspansiyonun nümerik boyutu %100 oranında 168,0 nm iken hacimsel olarak %72,3 oranı 3438 nm olarak ölçülmüştür. Benzer şekilde seyreltme olmaksızın 1 dk UP uygulanmış olan solüsyonun nümerik boyutu %100 oranında 142,1 nm iken hacimsel olarak %54,9 oranında 5470 nm olarak saptanmıştır. Sonuçta, mikrometre

boyutundaki kil partikülünden, nanopartikül oluşturma da başarısız olabileceğimiz öngörüsü hakim olmuştur. Bu şüpheyi gidermek için 50 ml'lik behere %1 oranında seyreltilmiş kil alınarak 24 saat boyunca açılması sağlanmış ardından da %0,1, %0,01 ve %0,005 olmak üzere seyreltilerek maksimum güçte ve 0,5, 1,5 ve 5 dk sürelerde UP ile kil taneleri dağıtılıp tane boyut dağılımları belirlenmiştir. Buna rağmen halen sistemde mikrometre mertebelerindeki partiküllerin varlığı görülmüştür. Bu sorunu aşabilmek için tüm solüsyonlar tekrar tekrar hazırlanmış ve ölçümler tekrarlanmıştır. Tanelerin yine de istenen boyutta olmadığı görülünce Boylu ve ark.'nın (Boylu ve ark, 2012) önerdiği ve MMT kili için en uygun merkezkaç kuvveti olan 6000 rpm de santrifüj yapılarak tüm ölçümler tekrarlanmıştır. Bu sonuçlar ekler kısmındaki Çizelge A.1'de verilmiştir. Uygulanan yöntemlerde kilin hacimsel olarak tek, düzenli ve 200 nm altına indirgenemediği gözlenmektedir. Ancak, numunenin hemen hemen %100'ünün boyutu sayısal olarak ortalama 150 nm altına indirgenmiştir. Bu değer, her ne kadar hedefli kanser tedavisine yönelik elde edilecek toplam partikül boyutunun maksimum 200 nm olması yaklaşımına uygun olsa da, hacimsel olarak da uygunluğunu sağlayabilmek için, yüksek karıştırma hızına sahip olan Attritor cihazı kullanılarak Na-MMT kilinin dağıtılması ve öğütülmesi gerçekleştirilmiştir.

4.1.2 Attritor ile boyut küçültme yöntemi

İTÜ Cevher Hazırlama Mühendisliği Bölümü bünyesindeki “Boya Teknolojisi Laboratuvarında” bulunan “Union Process 01-HD” modelli attritör cihazı (Şekil 4.1) kullanılarak Na-MMT kili sulu ortamda mikrometre altı olarak elde edilmiştir. Attritör ile boyut küçültme işleminde; ilk olarak öğütülecek kil numunesinin boyutuna ve indirgenmek istenen malzeme boyutuna göre cihaz kataloğundan öğütücü ortam olarak 200 µm lik zirkonyum bilyaları seçildi. İki adet kas ağı bulunan cihazın yaş öğütme yapılabilmesi için kayış aparatı büyük kas ağına geçirildi. Böylece devir sayısı kolaylıkla arttırıldı. Katalog bilgileri ışığında besleme tankının ¼ ü öğütücü ortam ile dolacak şekilde beslendi. Daha sonra öğütücü ortamın konduğu hazne şafta paralel olacak şekilde yerleştirildi ve haznenin ¼ ü kadar deiyonize su ilave edildi. Cihazın aşırı ısınıp beslenen malzemenin bozulmasını engellemek için soğutma suyu cihazın musluklarına bağlanıp devreye sokuldu. Tankın kapağı doğru bir şekilde oturtuldu ve 4 adet olan vidaları iyice sıkıştırıldı. Cihaz düşük devirde (150-450 rpm) de çalıştırılmaya başlandı. Öğütücü ve sıvı ortam iyice karıştırıldıktan sonra haznenin ¼ ü oranında numune ilavesi kapağın üstündeki küçük delikten beslendi. Daha sonra

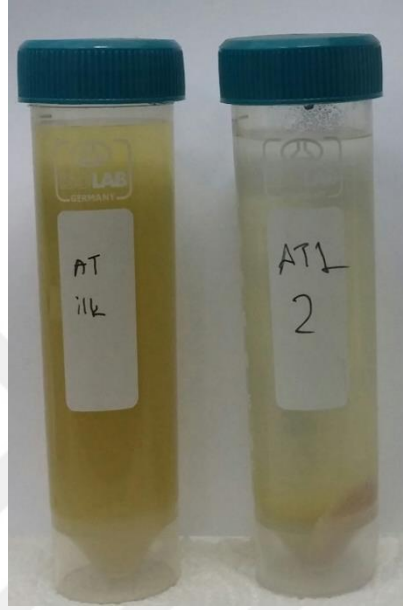
delik, tıpası ile kapatıldı ve sonra 2400 rpm devire getirilip çalıştırıldı. Cihazın deneye göre belirlenen çalışma süresi tamamlandıktan sonra, cihaz tamamen kapatılıp durduruldu. Bu aşamada, ilk olarak soğutma suyu devreden çıkarıldıktan sonra tank şafttan açılarak alındı. Üst kısımda dağıtılmış ve öğütülmüş olan kil solüsyonu öğütücü ortamdan falkon tüplerine aktarılarak ayrıldı ve geri kalan öğütücü ortam yıkanıp etüv fırında kurutulmaya bırakıldı.



Şekil 4.1 : 750 cc besleme tankı ve elektronik paneli ile birlikte 01-HD marka Attritor cihazı.

Tez çalışması boyunca bu deneyler 1, 2,5 ve 5 ve 10 saatlik periyotlar olarak gerçekleştirildi. 5 ve 10 saatlik öğütme deneyleri ikişer defa tekrarlandı. Öğütmelerde, cihazın katalogda belirtilen 250-500 cc çalışma kapasitesi göz önünde bulundurularak, 300 cc ortam seçilmiş ve tanka kuru bazda %20 oranında olacak şekilde 60 g kil numunesi (%10 nemli) beslenmiştir. Cihaz, dağıtma ve öğütme proseslerinin yanında parçalama ve ufalama işlemlerini de yapmaktadır. Doğal olarak negatif yüzeylere sahip olan kil numunesi işlem gördükçe ufalanıp kırılarak özellikle köşe uçlarında pozitif yük fazlalığı oluşturabilir. Bu bölgeler su moleküllerinin oksijeni ve kendisine

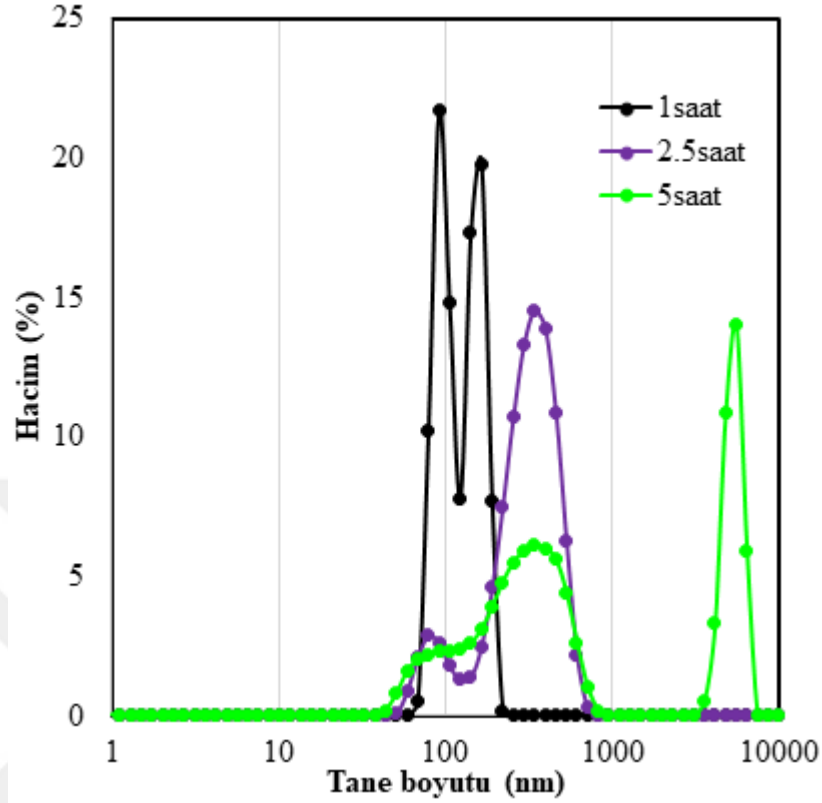
ait olan diğer negatif sitelerle etkileşime elektrostatik kuvvetlerin etkisi ile girmiş olacaktır. Nitekim Tombacz ve Szekeres (Tombác ve Szekeres, 2006) bu kırıklı bölgelerin yüzey yük dengesini ele almış ve iyonik kuvvetlerin etkisi ile montmorillonit yüzeylerinde elektriksel çift kuvvetin (EDL) oluştuğunu ortaya çıkarmıştır. Attritörde öğütme işlemi sonucunda elde edilmiş olan numunelerin attritör çıkışı ve santrifüj edilmiş hali Şekil 4.2’de verilmektedir.



Şekil 4.2 : Attritörden alınan numunelerin ilk (sol) ve santrifüj sonrası (sağ) görünüşleri.

Şekil 4.2’de de görüleceği üzere, attritörde öğütme işlemi sonunda alınmış olan süspansiyonda (sol), partikül sayısının fazlalığından ve homojen dağılımından dolayı renk daha koyu ve yoğun olarak görünmektedir. Ancak santrifüj edildikten sonra bu solüsyon sağdaki hale dönüşmekte ve askıda kalan tüm partiküller çökerek tüpün sağ alt köşesinde katı bir faz oluşturmaktadır. Santrifüj sonrası, kil numunesindeki istenmeyen safsızlıklar minimuma indirgenmiş ve berrak çözeltide dağıtılmış halde temiz kil partikülleri kalmıştır. Soldaki numunelerden 1 ve 2,5 ve 5 saatlik attritor numuneleri alınarak santrifüj edilmeden hacimce %1 seyreltilip DLS tekniği ile boyut ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ölçülen ortalama boyut dağılımları Şekil 4.3’te verilmiştir. DLS tekniği ile son yıllarda boyut ölçümü sıklıkla yapılmakta ve güvenilir sonuçlar elde edilmektedir (Alin ve ark, 2015; Furukawa ve ark, 2009; Poli ve ark, 2008; Svagan ve ark, 2012; Tombác ve Szekeres, 2006). Şekil 4.3’te 1, 2,5 ve 5 saatlik attritor cihazı ile yapılan yaş öğütme sonucu elde edilmiş olan dispersiyonlarının

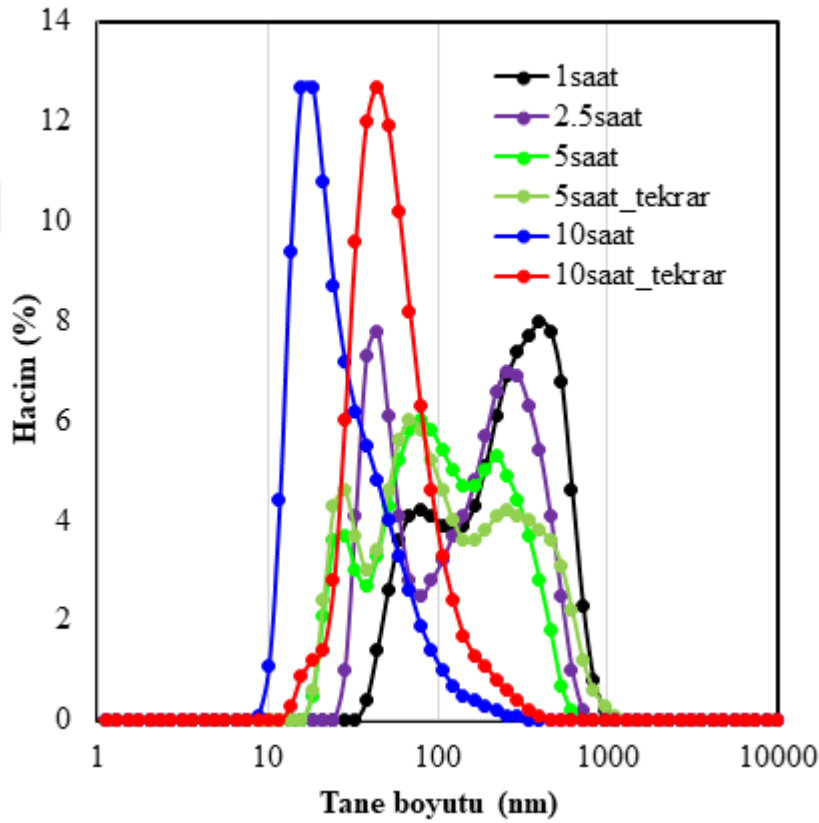
ortalama boyut dağılımı verilmiştir. Amacımız, en kısa sürede nano boyutta ve mümkünse 100 nm civarında partikül elde etmektir.



Şekil 4.3 : Hacimce %1 seyreltilmiş olan Attritor dispersiyonlarının tane boyutları.

Üretilen nanopartikülde ilaç moleküllerinin yanısıra 50 mg PLGA da bulunmaktadır. Bu üç bileşenle birlikte ortalama boyutun 200 nm yi aşmaması hedeflenmektedir. Çünkü hedefli kanser tedavisi ortalama 200 nm civarında nanopartikül ile gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle ilk olarak, en kısa sürede nano boyuta indirgenmiş kil partikülleri elde edilmiştir. Bunun için cihaz 1 saat boyunca 2400 rpm devirde çalışırken numune alınmış ve Şekil 4.3'teki siyah renk ile gösterilen eğri kaydedilmiştir. Bu eğride, ilki 90 nm diğeri ise 160 nm civarında iki adet pik elde edilmiştir. Tüm istenmeyen safsızlıkların giderildiği ve birbirinden tamamen ayrılmamış olma ihtimaline işaret eden tabakaların varlığı ancak santrifüj işlemi sonunda yapılan DLS analizi ile açıklanmıştır. Şekil 4.3'te görüleceği üzere, 1 saatlik öğütme ve dağıtma işleminin yeterli olduğu izlenimi alınmıştır. Bu işlemlerin ardından 30 dk süreli 5500 rpm devirde yapılan santrifüj işlemi sonucunda Şekil 4.4'teki sonuçlar elde edilmiştir. Burada santrifüj sonucunda birbirine yakın olan partiküller tekrar birleşme eğiliminde ve hacimce yaklaşık 450 nm civarında belirgin bir pik

vermiştir. Bu nedenle, 1 saatlik öğütme süresi 2,5 saate çıkarılıp deney tekrarlanmıştır. Süre arttıkça tabakalar üzerindeki merkezkaç kuvveti de artmış ve 90 nm civarındaki pikin belirginliği azalırken 390 nm civarında belirgin başka bir pik meydana gelmiştir (Şekil 4.3). 30 dk ve 5500 rpm devirde santrifüj işlemi sonucunda ise, bu iki pikten birincisinin belirginliği çarpıcı bir biçimde artmış ve pik değeri 50 nm civarında okunmuşken diğeri ise hacimce %50 düşerek %14,5’den %7’lere düşerek 340 nm civarında ölçülmüştür (Şekil 4.4).



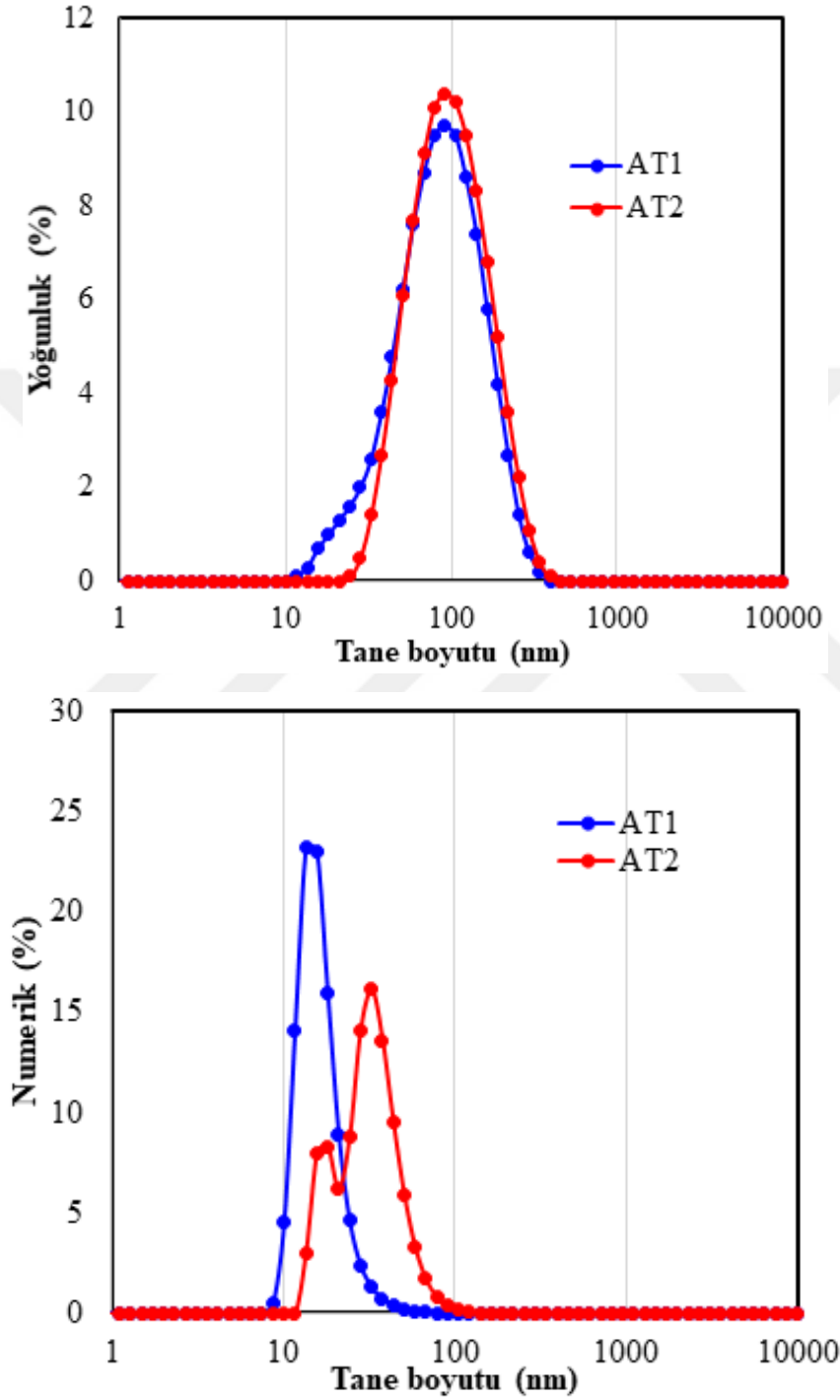
Şekil 4.4 : Süreye bağlı kil süspansiyonlarının tane boyut sonuçları.

Bunun nedeni ise; berrak çözeltide kalan partiküllerin sayısının hacimce 100 nm altında daha fazla olduğu ve 350 nm civarındaki partiküllerin yüksek “G” kuvvetlerinde stabil olmadığı şeklinde düşünülmektedir. Öte yandan hem 1 saatlik hem de 2 saatlik numunedeki oluşan bu supramolekül veya agregat kilin kırıklı bölgelerinden dolayı oluşan pozitif sitelerin negatif siteler ile elektrostatik çekme kuvvetinden de kaynaklanabilmektedir (Furukawa ve ark, 2009). Sonuç olarak her iki saatin sonundaki numunede de hala 100 nm boyutundan büyük ve “istenmeyen” bir pik gözlenmiş ve dolayısıyla süre 2 katına çıkarılarak deney tekrarlanmıştır. Ancak bu sefer iki olan pik sayısı üçe çıkmanın yanında 5,5 µm civarında maksimum bir pik

daha vermiştir. 5500 rpm ve 30 dk lık santrifüj işleminden sonra bu pik tamamen kaybolmuş ve 220 nm civarında başka bir pik oluşmuştur. Buradan 5 saatlik attritor işlemi kilin elektrostatik yapısı ve de tabakalar arasındaki diğer kuvvetleri zayıflattığı anlaşılmaktadır. Ayrıca 75 nm ve 340 nm civarındaki pikler ise santrifüjleme sonucunda belirginleşerek 75 nm olanı değişmezken, diğeri 250 nm civarına kaymıştır. Öte yandan 30 nm civarında yeni bir pik de belirmiştir. Solüsyonda 50 nm altı pikler de görülmektedir. Maksimum iyileştirme şartları araştırılmış, santrifüj işlemi 6000 rpm de ve 1 saat ile tekrarlanmıştır. Elde edilen boyut dağılım sonuçları da Şekil 4.4'te verilmiştir. Bu işlem sonucunda da özellikle 100 nm altı piklerde kısmen iyileşme gözlemlense de hala 300 nm civarlarında pik bulunmaktadır. Dolayısıyla süre artımı tekrar iki katına çıkarılarak deney tekrarlanmıştır. Bu 10 saatlik deney de en baştan iki defa yinelenmiştir. Şekil 4.4'te, santrifüj işlemi sonucu artan süreye bağlı olarak elde edilmiş olan kil süspansiyonlarının çaplarına ait boyut dağılım eğrileri verilmiştir. 1, 2,5 ve 5 saat sonucunda elde edilmiş olan DLS sonuçlarına bakıldığında hala sistemde 250-350 nm civarında pik elde edilmiştir. Ancak süre 2 katına çıkarılıp 6000 rpm de ve 1 saat boyunca santrifüj edilmiş olan süspansiyonların boyutları sırasıyla mavi olanı 21 ve kırmızı olan eğri ise 50 nm olarak ölçülmüştür. Öte yandan nanosizer cihazı ayrıca solüsyondaki partiküllerin sayıca miktarını ve yoğunlukça değerini de vermektedir. Dolayısıyla hacimce olarak ölçülen bu iki nanokil süspansiyonunun yüzde oran olarak numerik ve yoğunluk grafikleri de alınmıştır (Şekil 4.5).

Şekil 4.5'teki AT1 ve AT2 kodları sırasıyla 10 saatlik 1 ve 2 no'lu attritor öğütme işlemi sonucu elde edilmiş olan süspansiyonları temsil etmektedir. 10 saat sonucunda elde edilmiş kil süspansiyonunun %100 ü yoğunlukça 105 nm ve sayıca 50 nm altında pik vermektedir. Dolayısıyla 10 saat boyunca attritor cihazı ile mekano-fiziksel olarak öğütülen ve dağıtılan kil süspansiyonu nanopartikül üretimine uygundur. Attritor ile su ortamında disperse edilmiş olan kil partikülleri yüksek şişme, katyon değiştirme, yüzey alanı gibi özelliklerinin yanında reolojik olarak da boyutu nm altına indirgenmiş ve tabakalar birbirlerinden ayrılmıştır. Bunun temel nedeni Furukawa ve ark. da yaptıkları çalışmada (Furukawa ve ark, 2009) belirttikleri gibi kırıklı bölgelerdeki pozitif yük fazlası ile netatif siteler arasındaki elektriksel itme ve van der Waals çekme kuvvetleridir. Attritor ile yaptığımız sulu öğütme deneyleri sonucunda kilin dağıldığı ve 100 nm altına indirgendiği ortaya konmuştur. Ancak biz çalışmamız boyunca sadece süreyi değiştirerek uygun boyutu araştırdık. Yukarıda özellikleri verilen attritor

cihazına ait çalışma kapasitesi, öğütücü çeşidi ve ortamı, buna bağlı uç seçimi, devir sayısı, beslenen kil miktarı ve santrifüj süre ve devir sayısı gibi parametreler sabit alınmış ve optimize edilmemiştir. Dolayısıyla daha uygun koşullarda daha uygun kil süspansiyonu elde edilebilir.



Şekil 4.5 : 10 saatlik attritor öğütme işlemi sonucunda elde edilmiş olan kil süspansiyonlarına ait yoğunluk (üstte) ve nümerik (altta) boyut dağılımları.

Öte yandan Arçelik blender kullanılarak yapılan saflaştırma işleminden elde edilen süspansiyonların boyut dağılımına bakıldığında mikronmetre ölçüsündeki partikül sürekli gözlenmiş ve santrifüj, ultrasonik prob gibi iyileştirme teknikleri de sonuç vermemiştir. Attritor kullanılarak hazırlanmış olan Na-MMT kilinin boyut dağılımı saflaştırma tekniği ile hazırlanmış olan kilden hem çok daha belirgin ve düzgün hem de çok daha küçük boyuttadır. Ayrıca UP kullanılmamış olması da enerji tasarrufu açısından oldukça katkı vericidir. Sonuç olarak, nanopartikül üretimi Attritor ile elde edilmiş olan kil süspansiyonu ile gerçekleştirilmiştir.

4.2 Nanopartikül üretimi

Literatürde yapılmış olan çalışmalarda (Baek ve ark, 2012; Datta, 2013; Depan ve ark, 2009; Dong ve Feng, 2005; Farshi ve ark, 2014; Hou ve ark, 2015; Iliescu ve ark, 2014; Kevadiya ve ark, 2012; Lin ve ark, 2002; Reddy ve ark, 2016; Salcedo ve ark, 2012; Sun ve ark, 2008) genel olarak nanopartikül üretimi, kilin poli vinil alkol (PVA) gibi çok yüksek bir hidrofilisteye sahip biyoyumlu polimerle interkale ve/veya eksfoliye edilmesi daha sonra da organik çözücüde (aseton, diklorometan) hazırlanmış olan ve kanser tedavisinde klinik olarak kullanılan 5-FU, paxlitaxel gibi ilaçlar ve amfifilik bir polimer (PLGA, kitosan) üzerine mekanik karıştırıcı vasıtasıyla organik çözücünün uçurulması ve bunu takiben santrifüj işlemi sonrasında da liyofilizasyon ile gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda Curcumin ilacı kullanılarak da çalışmalar yapılmaktadır (Bakre ve ark, 2016; Madusanka ve ark, 2015; Malesu, 2011). Bu çalışmalardan birinde Bakre ve ark. (Bakre ve ark, 2016) setil trimetil amonyum bromür (CTAB) ile montmorillonit kilini modifiye ederek Curcumin ilacının enkapsülasyon ve yükleme verimlerinde sırasıyla %60-70 ve %18-19 gibi yüksek oranda iyileşme olduğunu ortaya koymuştur. Ancak bu ve bahsi geçen diğer tüm çalışmalarda kilin modifiye edilmesi için polimer veya surfaktan kullanımı kilin nanokompozitteki önemini ve etkinliğini azaltabileceği gibi canlı hücreler üzerinde de toksik etki yapabileceğini düşünmekteyiz. Bu nedenle, biz de literatür kısmında çalışmaları özetlenmiş ve bu konuda patent sahibi olan Dong ve Feng'in çalışma yöntemini modifiye ederek kullandık. Dispersiyon tekniğine göre iki şekilde nanopartikül üretildi ilkinde mekanik karıştırıcı ve santrifüj kullanılarak misel şeklinde nanopartikül, ikinci olarak ise Diyaliz Membran (DM) kullanılarak difüzyon ile misel üretilmiştir.

4.2.1 Mekanik karıştırıcı ile NP üretimi

İlaç salımı için kullandığımız polimer olan PLGA amfifilik karakterli olduğu için hem hidrofob hem de hidrofil bölgelere sahiptir. Ancak, ilk etapta kullandığımız ilaç olan Curcumin suda çözünmeyen ve dolayısıyla hidrofobdur ve sodyum montmorillonit (Na-MMT) kili ise negatif yüzeyle sahip ve hidrofil bir mineraldir. Dolayısıyla, misel için şöyle bir formülasyon optimize edilmiştir: ilk olarak çözücü ortam ayarlanmıştır, literatürde diklorometan çözücü ortamında hazırlanmış olan ilaç/polimer kompoziti bizim denemelerimizde başarısız olunca, tüm deneysel çalışmaların aseton ile gerçekleştirilmesine karar verildi. Daha sonra Curcumin miktarı ayarlandı. Curcumin aşırı hidrofob olduğu için, 5 mg ile çalışmalara başlandı, buradaki amaç sulu ortamda maksimum miktarda Curcumin yüklenmesini sağlamaktır. İleriki bölümlerde Curcumin miktarının optimizasyonu daha detaylı anlatılacaktır. Bu optimizasyon sonucu geliştirilen formülasyon baz alınarak 5-Flourourasil (5-FU) ilaçları ile deneyler tekrarlanmıştır. Bu aşamada, suda davranışı gözlenerek, agregat oluşumunun en az olduğu ve kil/Curcumin kompozitini %100 sarmalayacak ve ayrıca zincir uzunluğu, istiflenmesi ve hidrofob karakteri düşünülerek PLGA polimeri 50 mg olarak kullanılmıştır. 3'er ml asetonu ayrı ayrı çözündürülen Curcumin ve 2 dk vorteks ile açılmış olan PLGA çözeltileri 1,5'er ml alınarak toplamda 3 ml olarak hazırlanmıştır.

3 ml'lik aseton içeren Curcumin/PLGA çözeltisinin hazırlanmasına bir örnek:

5 haneye duyarlı hassas terazi vasıtasıyla 0,00069 gr Curcumin ve 0,05771 gr PLGA tartıldı. 1,5 ml asetona sırasıyla 500 µg Curcumin ve 50 mg PLGA içermesi için 2,07 ve 1,7313 ml aseton hesaben bulundu. Mikropipet ve 1 ml'lik enjektörler kullanılarak her iki karışımdan 1,5'er ml alınıp 3 ml'ye tamamlandı. Tüm nanopartikül üretim aşamalarında bu hesaba göre 3 ml'lik çözelti hazırlandı.

Daha sonra bu çözelti 15 dakika boyunca Ultrasonik Banyo (UB) vasıtasıyla sonikasyon işlemine tabi tutularak iyice karıştırılması sağlanmıştır. Bu çözelti Attritor ile dağıtılmış, %1 seyreltilmiş ve 6000 rpm de santrifüj edilmiş olan 20 ml'lik kil çözeltisi üzerine 0,5 ml/dk olacak şekilde enjekte edilmiştir. Daha sonra bu kompozit alınarak ağzı açık halde 25 °C derece sıcaklıkta 8 saat boyunca mekanik karıştırıcı ile karıştırılmış ve misel oluşumu tamamlanana kadar asetonun uçması sağlanmıştır. Geriye kalan kompozit falkon tüplerine aktarılıp 6000 rpm de santrifüj edildikten sonra

3 defa ve 5'er dakika 6000 rpm santrifüjlenip saf su ile yıkandıktan sonra supernatant suda açılıp boyut analizi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj yapılmadan önce (SÖ) ve sonrası (SS) için hazırlanmış olan nanopartiküllerin (NP) boyut analiz sonuçları Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3 : Mekanik karıştırıcıyla hazırlanmış partiküllerin boyut dağılımı.

Partikül kodu	Pik sayısı	Hacimsel, %	Hacimsel boyut, nm	Numerik adedi, %	Numerik boyut, nm
AT1_NP_SÖ	1	20,1	168,4	100	118,8
	2	79,9	4188		
AT1_NP_SS	1	27,3	70,89	78,8	70,9
	2	72,2	354,2	21,2	354,2
	3	0,5	77,0		
AT2_NP_SÖ	1	21,2	92,3	100	80,6
	2	41,8	379,5		
	3	37,0	5037		
AT2_NP_SS	1	17,4	520,8	99,6	305,4
	2	82,6	4571	0,4	3753
AT1_PLGA_kil_SÖ	1	38,8	98,5	100	79,0
	2	61,2	414,4		
AT1_PLGA_kil_SS	1	100,0	230,1	100	164,6
	2	0	0		
AT1_Curcumin_kil_SÖ	1	100,0	488,3	100,0	481,3
	1	30,0	1157	35,0	798,5
AT1_Curcumin_kil_SS	2	68,8	5358	0,4	5249
	3	1,2	279,6	64,6	238,6

Çizelge 4.3'te görüleceği üzere üretilen NP'ler için pik adedi, hacimce ve sayıca olacak şekilde verilmiştir. Hacim sütununa bakıldığında pik sayısı birden fazla iken numerik sütunda tüm partiküller için santrifüj öncesi tek bir adet pik kaydedilmiştir. Aynı durum Çizelge 4.2'de verilen ve saflaştırma tekniği ile üretilen kil süspansiyonlarına ait boyut dağılım sonuçlarında da saptanmıştır. Dolayısıyla hedefli kanser tedavisi için önem arz eden partikül üretildiğinde DLS tekniğindeki hacim ölçeğine bakılması gerektiği aşikardır. Zira numerik skala hacimce ortaya çıkan özellikle mikrometre boyuttaki ikincil pikleri ihmal etmektedir. Bu yüzden tüm deneysel çalışma boyunca hacim ölçeği baz alınarak boyut optimize edilmiştir.

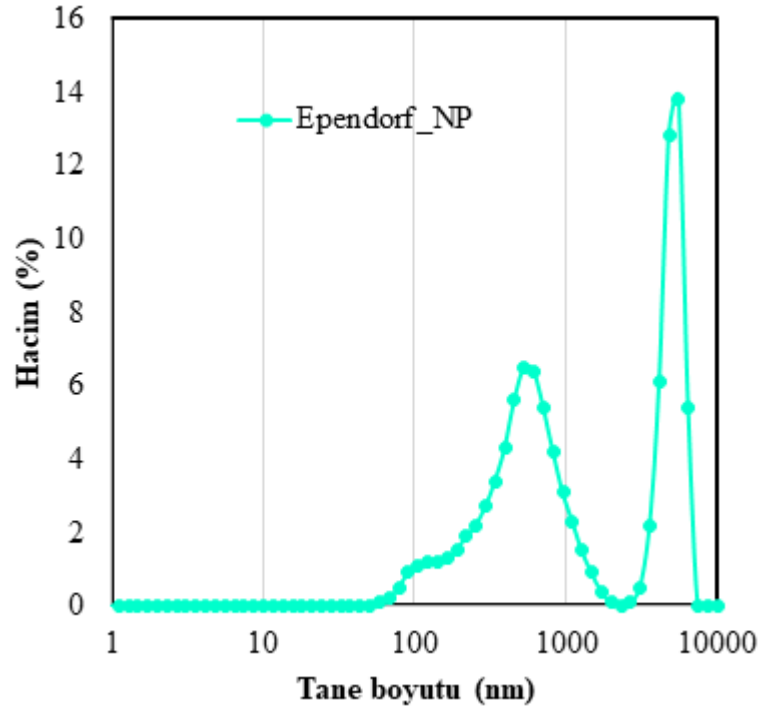
Genel olarak, Attritor 1 (AT1) süspansiyonu ile hazırlanmış olan NP, AT2 ile hazırlanmış olana nispeten daha küçük boyutta pikler vermiştir. Örneğin AT1 ile hazırlanmış NP'nin hacimce 168 ve 4188 nm boyutlarında 2 adet piki varken, santrifüj

sonrası 4188 nm lik pik kaybolmuş ancak 70 nm civarında 2 adet ve 354 nm civarında ise 1 adet olmak üzere toplam 3 adet pik gözlenmiştir. Öte yandan, AT2 ile elde edilen NP’de ise SÖ boyutları 92, 379 ve 5037 nm olmak üzere 3 adet pik varken, SS de bu pikler 520 ve 4571 nm olmak üzere 2 adet olarak ortaya çıkmıştır. Sonuçta AT1 numunesini bundan sonraki çalışmalarımızda kullanmaya karar verilmiştir. Diğer taraftan, AT ile üretilen kil süspansiyonlarının 100 nm civarında olduğu önceki bölümlerde etraflıca anlatılmıştır. Dolayısıyla yeni oluşan mikrometre mertebesindeki pikin nanopartiküldeki PLGA polimerinden mi, yoksa Curcumin ilacından mı olduğunu ortaya çıkarmak için aynı yöntemle Çizelge 4.3’te de görünen PLGA/kil ve Curcumin/kil partikülleri de üretilip boyut ölçümleri yapılmıştır. PLGA/kil partikülü santrifüj öncesinde 98 ve 414 nm civarında 2 adet pik verirken santrifüj sonunda 230 nm’lik tek pik elde edilmiştir. Öte yandan Curcumin/kil ise SÖ’de 488 nm’lik bir adet pik vermişken SS’da hacimce 279, 1157 ve 5358 nm olmak üzere 3 adet pik belirlemiştir. Santrifüj işlemi sonucunda Curcumin agregatı oluşmaktadır.

Buradan kil su ortamında beklenildiği gibi PLGA ile daha fazla etkileşim halinde iken Curcumin ile stabil bir partikül meydana getiremediği sonucuna varılmaktadır.

Öte yandan Yallapu ve ark. (Yallapu ve ark, 2010) yapmış olduğu bir çalışmada da kil veya herhangi bir inorganik madde olmadan sadece Curcumin ve PLGA içeren partikül boyutunu DLS yöntemi ile 560,4 nm olarak ölçmüş ancak partikülün form alması ve üniform bir boyut dağılımı için diğer çalışmalarda (Mathew ve ark, 2012; Mukerjee ve Vishwanatha, 2009; Potenza ve ark, 2015) olduğu gibi PVA polimerini hacimce %1 oranında kullanarak partikülü düzgün formda ve ortalama 76,2 nm boyutunda ölçmüşlerdir. Çalışmalarımızın hiçbir aşamasında PVA kullanmadık; daha da önemlisi PVA polimeri kullanmadan elde edilen partikülün boyutu hedefli kanser tedavisi için hem stabil değil hem de çok büyüktür. Dolayısıyla sorunun ilk kaynağı Curcumin ilacıdır. İkinci kaynağı ise santrifüj işlemi olduğu aşıkardır. Zira santrifüjün numunenin stabilitesini bozduğu Çizelge 4.3’teki numerik kolonların yüzdesel olarak 100 değerinden farklı olması ile gözlenmiştir. Ancak bunu daha iyi açıklamak için santrifüj işlemi yapılırken kullanılan 15 ml’lik falkon tüpleri yerine 1,5 ml’lik ependorf tüpleri kullanılarak santrifüjün olumsuz etki yapıp yapmayacağı tekrarlanmıştır. Mekanik karıştırıcı yöntemi ile agregat oluşumunu engellemek için 500 µg Curcumin alınarak bir adet nanopartikül üretilmiştir. Üretim sırasında klasik santrifüjlemenin aksine ependorf tüpleri ile 15000 rpm devirde ve 4 °C sıcaklıkta santrifüjlenme işlemi

gerçekleştirilmiş ve 3 defa yıkama suyu ile yıkanıp NP elde edilmiştir. Ependorf santrifüj adı verilen bu yöntem Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık bölümü laboratuvarlarında bulunan santrifüj cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Yöntem ile elde edilen NP ürününe ait DLS sonucu Şekil 4.6 da verilmiştir.



Şekil 4.6 : Ependorf santrifüj kullanılarak üretilen nanopartiküle ait boyut dağılımı.

Şekil 4.6 ependor santrifüj işlemi çok az Curcumin kullanılmasına rağmen, nanopartiküldeki agregat oluşumunu engelleyemediğimizi göstermektedir. 4801 nm civarında maksimum bir pik elde edilmiştir. Ayrıca 458 ve 90 nm civarında 2 adet daha pik gözlenmiştir. Özetle, buradan elde edilen partiküllerin boyut analizinde her türlü santrifüjün partikül şeklini ve stabilitesini bozduğu açıkça görülmektedir.

Genelleştirecek olursak, mekanik karıştırıcı kullanılarak üretilen tüm partiküllerde nanometre seviyelerinde ortalama %70 i 350-400 nm civarında olmasına rağmen hedefli kanser tedavisine yönelik kullanılması mümkün gözükmemektedir. Öte yandan, diğer ilaç salımlarına özellikle oral ilaç salım yöntemine uygun boyutta olduğu düşünülmektedir. Kısaca manyetik karıştırıcı ve de buna bağlı olarak kullanılan santrifüj işlemi hedefli kanser tedavisine yönelik partikül üretiminde başarılı bir yöntem olmadığı saptanmıştır. Dolayısıyla alternatif bir yol olarak Diyaliz Membranı (DM) kullanılarak nanopartikül üretilmiş ve sonuçları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

4.2.2 DM yöntemi ile NP üretim deneyi

Diyaliz Membranı (MWCO 3500) vasıtasıyla nanopartikül şu şekilde üretilmiştir: asetonda açılmış olan toplam 3 ml'lik 50 mg PLGA ve 500 µg Curcumin içeren organik çözeltisi, attritor ile dağıtılmış ve %1 seyreltilmiş olan 20 ml'lik kil süspansiyonu üzerine 0.25 ml/dk olacak şekilde damlatılmıştır. Daha sonra hazırlanmış olan ve ağzı kapalı tutulan bu 23 ml'lik kompozit 30 dk boyunca Ultrasonik banyoda (UB) oda sıcaklığında sonikasyona tabi tutuldu. Böylece PLGA/Curcumin kompozitinin su ortamında kil ile maksimum oranda etkileşmesi sağlanmış ve bu karışım 30 dk boyunca suda aktive edilmiş olan DM ye aktarılıp, suya karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz işlemi 3 L'lik behere saf su konduktan sonra 190 rpm de manyetik karıştırıcıda 24 saat karışımı yapılarak sağlandı. Beherdeki deiyonize su 0,5, 1, 3, 6, 12 ve 24 saatler de sürekli değiştirilmiştir. Bu aşamada difüzyon yolu ile asetonun ortamdaki uzaklaşması ve misellerin oluşması sağlanmıştır. Daha sonra cam viallere aktarılan nanokompozitin boyut dağılımı ölçülmüş ve kaydedilmiştir. Bu deney 7 defa tekrarlanmış ve tüm partiküllerin boyut dağılım sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 : DM kullanarak üretilen nanopartiküllere ait boyut dağılımları.

NP kodu	Hacimsel, nm	Nümerik, nm	Yoğunluk, nm
DM1	110,2	76,6	130,7
DM2	193,6	122,9	187,9
DM3	152,2	102,1	159,9
DM4	184,2	120,8	181,7
DM5	179,1	132,7	177,3
DM6	190,5	143,0	184,4
DM7	133,7	118,0	138,3

Çizelge 4.4'te de görüleceği üzere DM yöntemi ile üretilen ve bileşenleri 500 µg curcumin, 50 mg PLGA ve attritor vasıtasıyla hacimce %1 seyreltilmiş monodisperse kil süspansiyonu olan partikülün tüm boyut değerleri üniform ve 200 nm'nin altındadır. Bu değerlerin hepsi %100 oranında ve tek bir pike ait değerlerdir.

Dolayısıyla DM ile hazırlanmış olan partikülün şekli ve boyutu santrifüj kullanılarak elde edilen partiküle göre daha iyi sonuç vermektedir. Örneğin DM2 için hacimsel olarak %100'ü 193,6 nm olarak ölçülürken, DM3 ve DM4 için ise sırasıyla 152,2 ve 184,2 nm olarak ölçülmüştür. Numerik olarak bu değerler, sırasıyla %100'ü 122,9, 102,1 ve 120,8 nm olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlar da göstermektedir ki, DM yöntemi nanopartikül oluşturmak için santrifüj ile elde edilen partikülden daha iyi sonuç vermektedir. DM yöntemi ile deiyonize su ortamında geliştirilen partikül şu ana kadar boyut analizi sonuçları itibarıyla başarılı görülmektedir. Bir sonraki adım ise bu partikülün endüstrinin daha çok tercih edeceği şekilde yani kuru olarak, raf ömrü uzun ve taşınımı kolay halde üretilip piyasaya sürülmesi olacaktır. Bunun için de rehidrasyon işlemine gerek duyulmaktadır. Rehidrasyon işlemi şu şekilde yapıldı: DM yöntemi ile elde edilen tamamı 23 ml olan nanokompozitin 2 ml'lik kısmı DLS analizleri için kullanıldı. Geriye kalan 21 ml'lik kısım ise -85 °C ye konarak gece boyunca donduruldu.

Daha sonra bu sıcaklıkta vakum vasıtası ile kurutularak pamuğumsu bir numune elde edildi. Bu işleme liyofilizasyon denilmektedir. Liyofilizasyon işlemleri İTÜ ve Bezmialem Üniversitelerinin ilgili bölümlerinde gerçekleştirildi. Liyofilizasyon sonucu kuru halde elde edilen partiküllerin üzerine tamamı hacimce 23 ml olacak şekilde su ilave edildi ve 2 ml lik kısmı 2 dk vorteks edilip boyut analizi gerçekleştirildi. Sonuçlar Çizelge 4.5'te verilmektedir. Çizelge 4.5'ten de görüleceği üzere liyofilizasyon sonrası yapılan rehidrasyon partikülün boyutunda birden çok fraksiyona sebep olmaktadır. Ultrasonik banyo (UB) yapılmadan boyutu ölçülen DM1 kodlu partikülün sadece boyutu büyürken, UB sonrası boyutun büyümesi yanında bir de düzensiz bir dağılım sergilemektedir. Örneğin, DM1 kodlu partikül rehidrasyon sonucu tek bir pik ve fakat ortalama 850 nm olarak ölçülmüşken DM2 partikülü 3 adet pik olarak belirmiştir. Bu piklerden biri ortalama 250 nm civarında iken diğeri mikrometre mertebelerinde ve istenmeyen büyüklüktedir. Benzer durum DM3, DM4 ve DM5 kodlu partiküllerin rehidrasyonu sonucunda da gözlenmiştir. Dolayısıyla daha önce bahsi geçen Curcumin agregatı tekrar ortaya çıkmıştır. Bunu daha iyi açıklamak için Çizelge 4.5'in son satırında da görüleceği üzere bu partiküllerin üretiminde kullanılan kil süspansiyonun liyofilize edilip rehidrasyon işlemine tabi tutulduktan sonra boyutu ölçülmüş ve ortalama 70 nm civarında olan kil boyutu yaklaşık 4.5 katına çıkmış ancak üniform bir pik elde edilmiştir. Dolayısıyla stabilizeyi bozan en önemli

unsurun Curcumin olduğu anlaşılmaktadır. Çizelge 4.5'teki sonuçlara bakıldığında, liyofilizasyon sonucu boyutun bir miktar büyümesi beklenmişti ancak birden fazla pikin belireceği düşünülmemiştir. Endüstride daha kolay kullanılabilir olması için liyofilizasyon ve akabinde rehidrasyon gerçekleştirilmiş ancak sonuç başarısız olmuştur.

Çizelge 4.5 : Nanopartiküllerin rehidrasyon sonrası boyut dağılımları.

Partikül kodu	Pik sayısı	Hacimsel, %	Hacimsel boyut, nm	Nümerik, %	Nümerik boyut, nm	Yoğunluk, %	Yoğunluk boyut, nm
DM1	1	100	878,6	100	801,8	100	861,3
	1	11,1	278,5	99,9	218,4	61,3	260,6
DM2	2	29,6	1444	0,1	4447	31,4	1248
	3	59,4	4827	0	0	7,3	4616
	1	29,9	1202	11,8	771,5	59,8	1036
DM3	2	2,9	242,2	88,1	209,6	28,4	243,3
	3	67,3	5113	0,2	4874	11,8	4949
	1	7	535	32,4	368,5	54,7	463
DM4	2	92,7	4687	0,4	3989	39,9	4268
	3	0,3	124,9	67,1	116,7	5,3	103,7
	1	80	1039	27,8	829,7	86,8	975,6
DM5	2	2,5	213,3	72,2	198,6	12	207,9
	3	17,5	5590	0	5590	1,2	5560
AT1	1	100	319,4	100	315,6	100	313,3

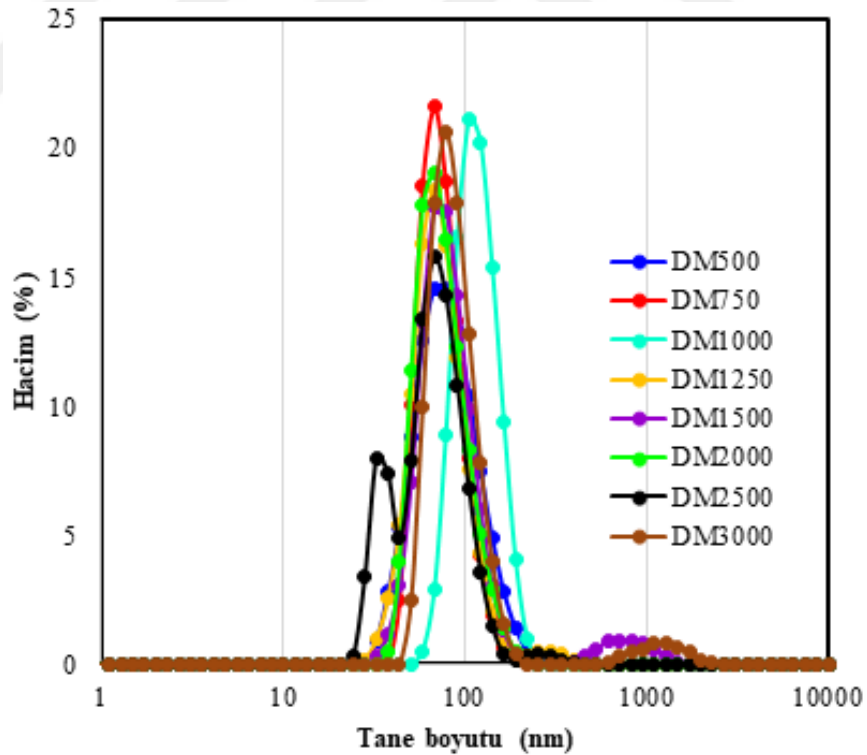
DM sonucu elde edilen numunelerin rehidrasyonu sonucu elde edilen partiküllerin stabil olmadığı, Curcuminin çöktüğü ve -özellikle UB yapılınc- boyutunun büyüdüğü gözlemlenmiştir. Dolayısıyla su ortamında Çizelge 4.4'te de görüleceği üzere elde edilebilen nanopartiküllerin özellikle eczacılık ve tıp alanlarında kullanılabilmesi için alternatif yollar da düşünülmektedir. İlk olarak -20 °C dondurmak -ki bu yöntem piyasanın çok istemediği bir yol- sureti ile piyasaya sürülebilecek ve daha sonra da uygun ortam ve koşullarda tekrar 25 °C dereceye getirerek kullanılabilir. Bu da başarısız olursa yukarıda bahsi geçen diğer literatür çalışmalarında yapıldığı gibi poli

etilen glikol (PEG), PVA ve tween 80 gibi polimerler vasıtasıyla stabilite ve boyut kontrol altına alınabilir. Bundan da istenen verim alınmazsa Dong ve Feng'in yaptığı gibi (Dong ve Feng 2005) oral yolla ilaç salımı gerçekleştirilebilir.

Başarılı olursak bu işlemler tekrarlanıp nihai hedefimiz olan 5-FU ile hedefli kanser tedavisine yönelik nanopartikül üretme işlemine geçilecektir.

4.2.3 DM yöntemi ile Curcumin miktarının optimizasyonu

DM tekniği ile önceki bölümlerde üretilen partikülün kimyasal içerikleri: %1'lik 20 ml attritör ile dağıtılmış MMT çözeltisi, 3 ml asetonda çözünmüş 500 µg Curcumin ve 50 mg PLGA polimeri idi. Dolayısıyla Curcumin miktarı optimize edilerek hem partikül formülasyonu hem de salım deneylerinde kullanılacak maksimum oran tespit edilip ilaç salım verimi hesaplanmıştır. Partiküle ne kadar Curcumin yüklenebileceğini ortaya koymak için sadece Curcumin miktarı 500, 750, 1000, 1250, 1500, 2000, 2500 ve 3000 µg a çıkarılarak DM yöntemi ile partikül üretilip DLS ölçümleri alınmış, ve sonuçları Şekil 4.7'de verilmektedir.



Şekil 4.7 : Artan Curcumin miktarına bağlı boyut dağılım sonuçları.

Şekil4.7'deki lejantlar DM yöntemi ile üretilen partiküldeki Curcumin miktarı baz alınarak yapılmış kodlamayı göstermektedir. Örneğin DM1500 1500 µg Curcumin

içeren bir partikülün kodlamasıdır. Öte yandan Şekil 4.7'deki sonuçlara bakıldığında ise hacimce maksimum pik ortalama 90 nm civarında gözlenmiştir. Ancak 1250 µg Curcumine kadar miktar arttırıldığında pik sayısı bir adet iken, Şekil 4.7'deki ortalama 1000 nm lik pikte de görüleceği üzere, bundan sonraki miktarlarda pik sayısı ve boyutu göreceli artmaktadır. Dolayısıyla 20' ml lik kil süspansiyonu baz alındığında yüklenen Curcumin miktarı 62,5 µg/ml olmaktadır.

Deneylerin hepsi en az bir defa tekrarlanmış ve zamana bağlı DLS ölçümleri tekrarlanarak çöken kil olup olmadığı saptanmıştır. Buna göre, DM yöntemi ile üretilen partiküllerde ortalama 2 hafta boyunca herhangi bir çökme gözlenmemiştir. Kısaca, artan Curcumin miktarına bağlı üretilen NP için 1500 µg'dan sonra nano-partikülün davranışında bozulma ve büyük agregatlar gözlenmiştir. Bu yüzden bu değerin bir alt değeri olan 1250 µg optimize değer olarak kabul edilmiştir.

Sonuç itibarıyla Attritor cihazı ve DM tekniği ile nano boyutta kil ve partikül üretilabilmektedir. Ancak burada asıl sorulması gereken soru elde edilen kil süspansiyonundaki disperse kil taneleri acaba kil minerali gibi özelliklere sahip bir yapıda mıdır, değilse ne ölçüde hedefli kanser tedavisine katkı sağlayacaktır. Dahası nano boyutta kil ve partikülün boyutları ve birbiri ile olan etkileşimleri ve mekanizmaları ne şekildedir gibi soruları açığa kavuşturmak için aşağıdaki bölümlerde, gerçekleştirilmiş olan XRF, XRD, E-SEM, FT-IR, DSC gibi karakterizasyon testleri ele alınmıştır. Bu karakterizasyon testlerin tümünde 500 µg Curcumin içeren NP ele alınmıştır.

4.3 Nanokil ve nanopartikülün karakterizasyonları

4.3.1 XRF ve XRD analizleri

Kilin kristal yapısı ve kimyasal bileşimi için öncelikle Saflaştırma öncesi ve sonrasındaki kil numunelerine XRF analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.6). Çizelge 4.6'dan da anlaşılacağı üzere, kullanılan kil numunesi sodyum montmorillonit (Na-MMT) mineralidir.

Yapısında majör olarak en çok Si, Al, Fe, Mg ve Na elementlerine ait bileşenler bulunmaktadır. Ayrıca Bulut ve ark. (Bulut ve ark, 2009) da aynı bölgeye ait olan bu kil numunesi için yapmış oldukları XRF analizleri sonucunda SiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃, MgO, CaO ve Na₂O içeriklerini Çizelge 4.6'da verilen değerlere çok yakın olarak

bulmuştur. Saflaştırma sonucunda alümina oranı %17,51'den %18,94'e çıkmışken demir oksit içeriği %3,87'den %5,13'e yükselmiştir. Bu da, numunede başlangıçta illitik yapıların olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.6 : Blender ile elde edilmiş kile ait kimyasal analiz sonuçları.

Saflaştırılmış olan Na-MMT Major		Saflaştırılmamış Na-MMT Major		Saflaştırılmamış Na-MMT İz Elementleri	
Kimyasal formül	İçerik	Kimyasal formül	İçerik	Kimyasal formül	İçerik
SiO ₂	60,41%	SiO ₂	60,34%	Sc	264 ppm
Al ₂ O ₃	18,94%	Al ₂ O ₃	17,51%	V	4178 ppm
Fe ₂ O ₃	5,13%	Fe ₂ O ₃	3,87%	Cr	34 ppm
MgO	2,33%	MgO	1,94%	Co	4 ppm
CaO	0,68%	CaO	3,42%	Ni	6 ppm
Na ₂ O	2,87%	Na ₂ O	2,35%	Cu	13 ppm
K ₂ O	0,30%	K ₂ O	0,99%	Zn	72 ppm
TiO ₂	0,17%	TiO ₂	0,35%	Ga	15 ppm
MnO	0,04%	P ₂ O ₅	0,10%	Rb	54 ppm
Cr ₂ O ₃	0,32%	MnO	0,10%	Sr	719 ppm
Cl	164 ppm	Ba	389 ppm	Y	22 ppm
Cu	31 ppm	Cl	133 ppm	Zr	241 ppm
Ga	15 ppm	S	364 ppm	Nb	13 ppm
Mo	12 ppm	LOI	8,70%	La	2779 ppm
Rb	34 ppm	TOPLAM	99,68%	Ce	7754 ppm
S	478 ppm			Pb	35 ppm
Sr	431 ppm				
V	94 ppm				
Zn	123 ppm				
Zr	296 ppm				
LOI	8,53%				
TOPLAM	99,73%				

Bir diğer önemli değişim ise CaO içeriğinde olmuştur. Başlangıçta %3,42 olan bu oran çarpıcı bir düşüşle %0,68'e kadar gerilemektedir. Buradan da başlangıç numunesinde dolomitik minerallerin de olabileceği ortaya çıkmaktadır. Attritor ile hazırlanmış olan saflaştırılmamış kil numunesine ait elementel analiz sonuçları ise Çizelge 4.7'de verilmektedir. Çizelge 4.7'deki elementel analiz sonuçları, Çizelge 4.6'daki saflaştırılmamış kil numunesinin attritore beslendikten sonra alınıp etüvde kurutulmuş olan numuneye aittir. Çizelge 4.7'den görüleceği üzere, attritor ile dağıtılan montmorillonit numunesinde Çizelge 4.6'da verilmiş olan saflaştırılmamış oranlara yakın oranlarda elementel içerik elde edilmiştir. Başlangıç numunesi kullanılarak elde edilen sonuçlara bakıldığında, Fe, Mg, Ca, Na ve diğer elementlere ait bileşenlerde kayda değer bir değişim gözlenmezken, SiO₂ oranında %2 ve Al₂O₃ içeriğinde ise

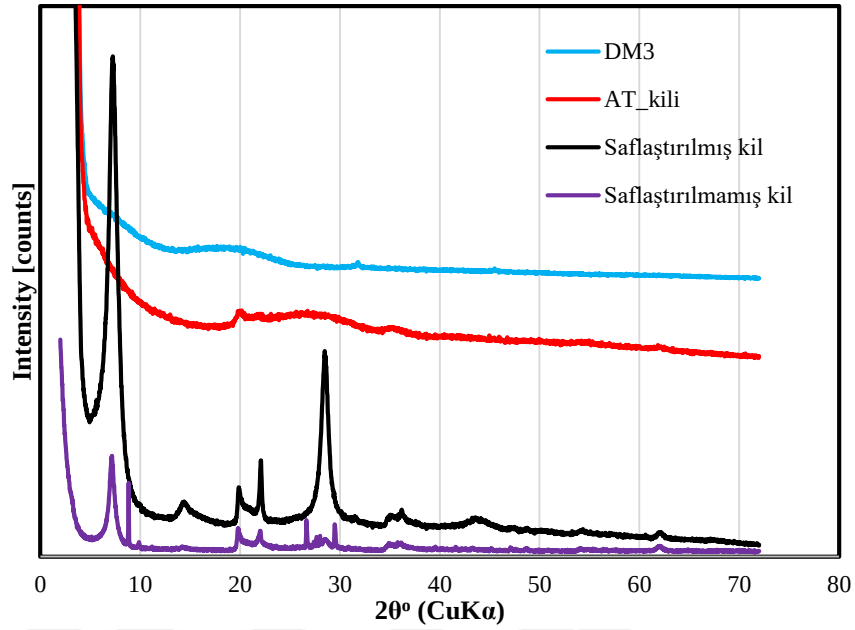
yaklaşık %2,5 gibi bir düşüş yaşanmıştır. Bununla birlikte, saflaştırma işlemi ile üretilen numune ile karşılaştırıldığında CaO miktarında ise kayda değer bir düşüş yaşanmamıştır. Saflaştırılmış olan kil numunesinde bu oranlar önemli ölçüde düşmekte ve Na-MMT kilinin oranı artmaktadır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.7 : Attritorle üretilmiş kil numunesine ait kimyasal analiz sonuçları.

Kimyasal Formül	İçerik
SiO ₂	58,36%
Al ₂ O ₃	14,95%
Fe ₂ O ₃	3,64%
MgO	1,60%
CaO	3,38%
Na ₂ O	2,02%
K ₂ O	0,90%
TiO ₂	0,32%
P ₂ O ₅	0,17%
MnO	0,10%
Cl	209 ppm
Cu	48 ppm
Ni	1 ppm
Pb	79 ppm
Rb	53 ppm
S	0,61%
Sr	0,07%
Y	0,20%
Zn	95 ppm
LOI	12,08%
TOPLAM	98,40%

Özetle attritor ile dağıtılan ham numune kullanılmadan önce santrifüj edilerek saflaştırıldıktan sonra attritor ile dağıtılıp kullanılması veya başka bir mekanofiziksel yolla saflık derecesi artırıldıktan sonra attritore beslenmesi tavsiye edilebilir. Zaten attritorde öğütme işlemi sonucu santrifüj edilip askıdan kalmış ve saflık derecesi yüksek olan kil süspansiyonu kullandığımızı daha önce belirtmiştik. Ancak Si ve Al elementlerine ait oranların düşüşü kilin tabaka formu olan 2:1 tetrahedran ve oktehedranlarının sıralamasının bozulmuş olabileceği ve kil yüzeylerinin aktif sitelerinin işlevsiz hale gelebileceği şüphesini uyandırmaktadır. Bu tezi açıklamak veya çürütmek için attritör cihazı ile üretilen (AT) ve diğer yöntemlerle elde edilen kil numunelerine ait kristal yapıyı ortaya koyan XRD analizleri de gerçekleştirilmiş ve üç kez tekrar edilerek üretilen DM3 kodlu nanopartiküle de ait sonuçlarla birlikte Şekil

4.8’de verilmiştir. Şekil 4.8’de saflaştırma öncesi, sonrası, attritor ile dağıtılmış ve bununla elde edilmiş olan nanokil ve nanopartikülün XRD paternleri verilmiştir.



Şekil 4.8 : Nanokil ve nanopartiküle ait XRD paternleri.

Yapılan XRD analizleri sonucunda mor renkli eğride de görüleceği üzere, belirgin montmorillonit piklerinin yanısıra, soldan sağa doğru 8,8 derece civarında illit, 10,2 derecede klinoptilolit ve sırasıyla 27, 28,5 ve 29,5 derece civarında kuvars, kalsit ve dolomit mineralleri de bulunmuştur. Bu aynı yöreye ait kil ile daha önce yapılmış olan Önal ve ark., Bulut ve ark. ve Oruçoğlu ve ark. nın çalışmaları (Bulut ve ark, 2009; Önal, 2001; Orucoglu ve Schroeder, 2016) da ortaya konmuştur. Bunun dışında feldspat mineralleri ve opal-CT ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) de gözlenmiştir. Saflaştırma sonrası ise siyah eğride görüldüğü üzere belirgin kil pikleri ortaya çıkmış ve safsızlıklar, numunedeki istenmeyen mineraller uzaklaştırılmıştır. Siyah pikte soldan itibaren (001) yüzeyine ait 7,34 derecedeki en büyük pik smektit tip mineralleri ve onun bir üyesi olan montmorilloniti temsil eden piktir. Bu pike karşılık gelen değer ise Bragg denklemleri (Bragg, 1913) ile 12,04 nm olarak hesap edilmiş bazal boşluğu veren ve iki tabaka arasındaki mesafeye aittir. Mor ve siyah pik karşılaştırıldığında ise, en belirgin değişim Oruçoğlu ve ark nın (Orucoglu ve Schroeder, 2016) da değiştiği gibi montmorillonitin (003) yüzeyine ait pikin 28,5 derece civarında ortaya çıkmasıdır. Diğer pikler ise kilin diğer yüzeylerine ait tekrarlı kil pikleridir. Özetle mor ve siyah paternlerden kilin kristal yapısı ve birlikte bulunduğu mineraller hakkında detaylı bilgiye ulaşılmıştır. Ancak attritor ile dağıtılmış ve öğütülmüş olan kil numunesine ait

XRD deseninden (kırmızı eğri) bu çıkarımları yapmak bir hayli zordur. Zira en belirgin pik olan 7,34 derecedeki pik tamamen kaybolmuş, sadece (002), (004) ve (060) yüzeylerine ait pikler çok zayıf olarak sırasıyla 19,5, 36,7 ve 62,4 derece civarında görülebilmektedir. Dahası kilin kristal yapısı hakkında yeterli bilgi alınamadığı gibi safsızlıkların varlığı da meçhuldür. Dolayısıyla attritorun kil tabakalarını, dağılmış lahana yaprakları gibi parçaladığı ve dağıttığı düşünülmektedir. Zira XRD deseninden kristal yapısı tamamen bozulmuş ve kaybolmuş amorf bir malzeme izlenimi vermektedir. Buna karşın tabakaları birbirinden bağımsız ve nano boyutta kil numunesi de elde edilmiş olabilir. Bu amorf yapıdaki kil numunesi kullanılarak üretilen DM3 kodlu ve içeriğinde 500 µg Curcumin, 50 mg PLGA olan nanopartikülün de XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.8'deki turkuvaz mavisi ile gösterilen eğride kile ait herhangi bir pik görülmemiş ve yeterli bilgi edinilememiştir. Öte yandan Ray ve Okamoto (Ray ve Okamoto, 2003) bu piklerin killerin tabakalarının eksofilasyonu sonucunda oluşabildiğini ispatlamışlar. Bu, "AT_kili" ve "DM3" kodlu partiküllere ait paterlerin yapraklanmış (eksfoliye olmuş) sonucu ile örtüşmektedir.

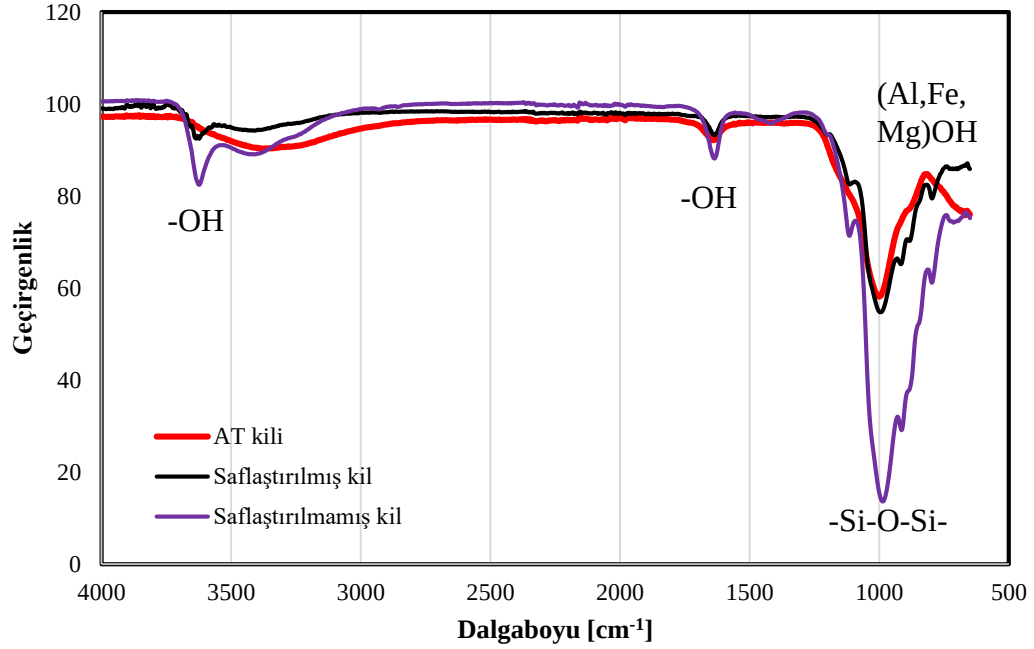
Sonuç itibarıyla yapılmış olan XRF analizlerinden kil varlığı ortaya çıkarılmış ancak XRD analizleri ile attritor numunesine ait kristal yapısı hakkında yeterli bilgi edinilememiştir. Genel görüşün kilin bazal yüzeyleri amorflaşmış olabileceği ancak tabakalarının da parçalanarak birbirinden ayrılmış olabileceğidir. Dolayısıyla kilin yapısı ve bileşenleri hakkında daha fazla bilgiye sahip olmak için FT-IR analizleri de gerçekleştirilmiştir.

4.3.2 FT-IR analizleri

FT-IR analizleri ilk olarak kilin belirgin bileşenlerine ait dalga boylarının ortaya çıkarılması ikincil olarak ise Curcumin ve PLGA kimyasallarının partikülün hangi bölgelerinde etkin rol aldığını ortaya çıkarmak için gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.9'da kullanılan tekniklerle üretilen killere ait spektrumlar verilmektedir.

FT-IR analizleri sonucu elde edilen spektrumlardaki karakteristik pikler -biri hariç- tüm ürünler için de görülmüştür (Şekil 4.9). Örneğin kile ait ve yapısal -OH hidroksil pikinden kaynaklı gerilme titreşimleri 3623 cm^{-1} dalgaboyunda ortaya çıkmıştır. Bu pik, attritor ile üretilen kil numunesinde belirmemiştir. Ayrıca yapısında yaklaşık %10 su içeren bir mineral olduğu için de yüzey ve bünye nemine ait geniş ve yayvan bir pik olan 3300-3450 piki de hidroksil titreşiminden kaynaklanmaktadır. Sevim ve ark.

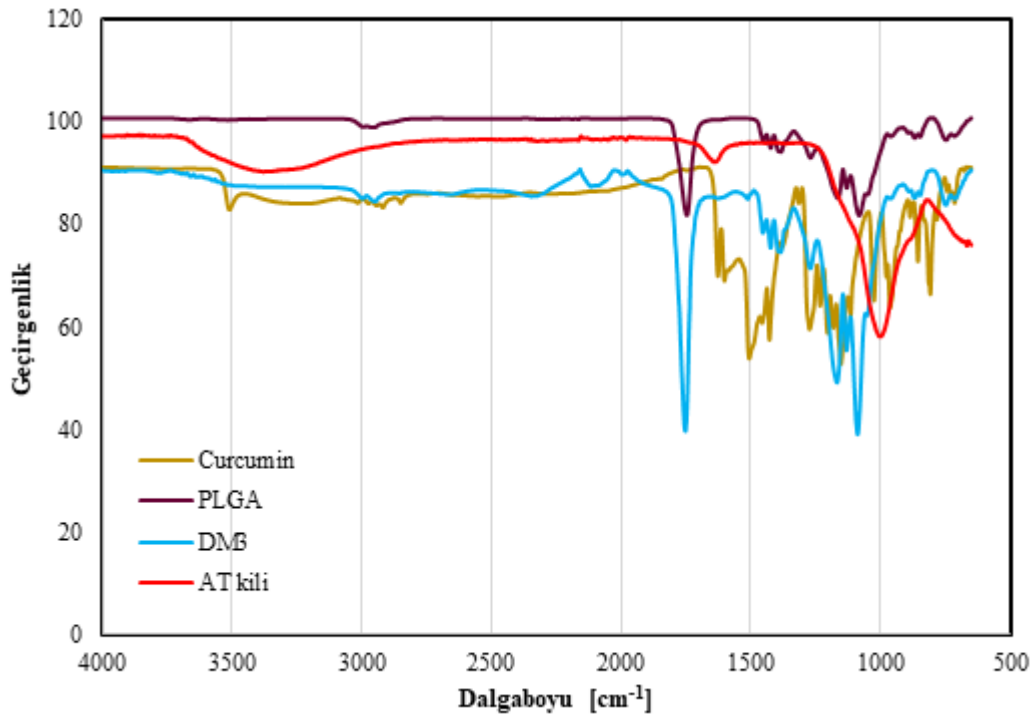
(Sevim ve ark, 2011) bu pikin nedeninin sadece yüzey nemi olmadığını ayrıca yapıdaki su moleküllerinin 1634 cm^{-1} deki bükülme titreşim bandının 3330 cm^{-1} dalgaboyundaki oluşturduğu titreşimden de kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.



Şekil 4.9 : Geliştirilen tekniklerle üretilmiş olan kil numunelerine ait spektrumlar.

Benzer şekilde 1639 cm^{-1} dalgaboyundaki spektrumda su moleküllerinin deformasyonu ve bükülmesi sonucu oluşan titreşimlerdir. Diğer belirgin spektrum ise silika tetrahedranından kaynaklanmaktadır. Sırasıyla 1115 , 909 ve 979 cm^{-1} dalgaboylarındaki gerilmeler yapıdaki $-\text{Si-O}$ ve $-\text{Si-O-Si}$ formlarından kaynaklanmaktadır. Son olarak ise yine literatürde (Demirbas ve ark, 2006; Sevim ve ark, 2011) de değinildiği üzere, 717 ve 791 cm^{-1} bölgelerinde kile ait Mg, Fe ve Al içeren bileşenlerden kaynaklı titreşimler sonucu hidroksil gruplarındaki deformasyonlar belirginleşmiştir. Sonuç itibari ile ister saflaştırma isterse de attritor vasıtasıyla üretilen kil numunelerinde karakteristik spektrumlar gözlenmiş ve attritor numunesi amorflaşmış olsa bile kil gibi davrandığı düşünülmektedir. Bu kil numunesi ile üretilen nanopartikülü de içeren spektrumlar Şekil 4.10'da verilmektedir. FT-IR spektrometre yapıya ait bileşenler hakkında bilgi vermesinin yanında adsorplanma mekanizması ve çeşidi hakkında da bilgi verebilmektedir. Dolayısıyla hazırlanmış olan nanopartikülün bileşenleri olan Curcumin, Na-MMT ve PLGA polimerinin birbiri ile olan etkileşimleri de Şekil 4.10'daki spektralarla ortaya konmuştur. Kile ait

karakteristik pikler yukarıda belirtilmişti. Curcumin e ait ilk pik ise 3512 cm^{-1} dalgaboyunda fenol gruplarına ait bağı olarak gelişen hidroksil (-OH) pikidir.



Şekil 4.10 : NP ve bileşenlerinin spektrumları.

$2800\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$ arasındaki bölgede meydana gelen pikler ise Curcuminin alkali kısımlarına ait simetrik ve asimetrik $-\text{CH}$ ve $-\text{CH}_3$ gerilmeleridir. Diğer iki pikten ilki 1627 cm^{-1} dalgaboyunda karbonil $-\text{C}=\text{O}$ ve $-\text{C}=\text{C}$ titreşimleri iken 1602 cm^{-1} deki ise aromatik $\text{C}=\text{C}$ piklerinin gerilmeleridir. 1506 ve 1427 cm^{-1} civarındaki pikler ise sırasıyla düzlem boyunca uzanan aromatik ve enolik bükülmelerden kaynaklı $-\text{CH}_2$, $\text{C}=\text{O}$, CCC gibi titreşimleridir. 1384 cm^{-1} dalgaboyundaki pik ise düzlemdeki $-\text{CH}$ titreşiminin yanısıra iskeleti oluşturan CCC pik gerilmeleridir. 1274 cm^{-1} deki pik ise aromatik $\text{C}-\text{O}$ gerilmesidir.

Literatürde (Kolev ve ark, 2005; Mohan ve ark, 2012) de bahsedildiği gibi 1023 cm^{-1} pik $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ gerilmesi iken, 959 cm^{-1} deki pik benzen halkasına ait trans-CH titreşimi ve 713 cm^{-1} deki ise aromatik halkaya ait cis-CH titreşimi olmuştur. Parmakizi bölgesine ait diğer tüm pikler ise enolik, aromatik ve diketonik iskelet yapısından kaynaklanan bükülme ve gerilmelerdir. Curcumin piklerinin yanısıra nanopartikül üretiminde PLGA kopolimeri de kullanılmıştır. Buna ait ilk karakteristik pik ise Şekil 4.10'daki $-\text{CH}$, CH_2 ve CH_3 içeren karbonil gruplara ait 2948 ve 2996 cm^{-1} dalgaboyundaki gerilmelerdir. Diğer pikler ise literatürde (D'Avila, 2012) de

değinildiği üzere, 1750 bandındaki pik ise C=O titreşimleridir. 1250-1450 bölgesindeki pikler CH₃ teki CH₂ deformasyonundan kaynaklanırken 1150-1350 bölgesinde ise CH₂'deki CH piklerinin sallanması sonucu oluşan titreşimlerdir. 1150 ve altındaki bölgede ise ester (C-O) bağlarından kaynaklı gerilmeler oluşmuştur. PLGA polimerinde 3000-3600 bandında pik olmaması nemsiz olduğunun göstergesidir. Şekil 4.10'da, kil ve nanopartiküle ait pikler de yer almaktadır. Nanopartiküle bakıldığında Curcumin ve PLGA polimerine ait az da olsa kaymış olan pikler sergilenmişken kile ait pik gözlenmemiştir. Sadece 2000-2200 cm⁻¹ bandında beklenmeyen bir pik ortaya çıkmıştır. Bu pik ya Ca gibi iyonlardan kaynaklı empirüte ya da küçük bir ihtimal de olsa deforme olmuş kil partikülüne ait yeni oluşan Si-H gerilmesine işaret etmektedir. Empirüte kaynaklı olması demek %100 saflaştırılamamış olan kilin kullanılıyor olması demektir.

Bunun dışında Curcumine ait 3500 bandındaki pik tamamen kaybolmuşken, 3000 bandındaki yaklaşık 20 cm⁻¹ pik sola kayarak PLGA polimerinde de olan pik ile birleşerek daha belirginleşmiştir. 1750 deki pikin 4 cm⁻¹ kayarak 1754 civarında belirmesi moleküllere ait karbon asitleri ve oksijenleri arasındaki esterleşmeden kaynaklandığı ortaya çıkmıştır (Waghela ve ark, 2015). Dahası alkali gruplara (CH₂ ve CH₃) ait piklerin yaklaşık 10-20 cm⁻¹ sola doğru kaymış olması ve geçirgenliğinin azalması Curcuminin PLGA polimerine yüklenebileceğini göstermektedir. Diğer bölgelerdeki dalga boylarındaki belirginleşme ve kaymalar Curcumin ilacının PLGA polimerine adsorbe olabileceğini göstermektedir. Nitekim Rachmawati ve ark. (2016) (Rachmawati ve ark, 2016) yılında yaptıkları çalışmada 1750 cm⁻¹ pikinin 1755 cm⁻¹ pikine kaymasının, curcumin moleküllerinin hidroksil grupları ile poli laktik asit (PLA) polimerinin karbonil grupları arasındaki zayıf hidrojen bağına işaret ettiğini ortaya koymuştur.

Curcuminin 3500 civarındaki pikinin kaybolması ve 1650 cm⁻¹ civarındaki aromatik piklerin ise belirginleşerek 2-3 cm⁻¹ sola kayması da bu bölgelerde meydana gelen kile ait su piklerinin tabakalar arasından uzaklaşıp Curcumin ile yer değiştirebileceği düşünülmüştür. 1400-1450 cm⁻¹ civarındaki fenol ve enol gruplarına ait piklerin belirginleşerek yaklaşık 30-40 cm⁻¹ sağa kayması da kilden çok, miktarca daha fazla olan PLGA polimerine yüklendiğine işarettir. Bununla birlikte, bu bölgede en etkin ve baskın olan tek pik Na-MMT kiline ait piktir. 1000 cm⁻¹ civarındaki C-O-C piki ise

Na-MMT ye ait karakteristik ve en büyük olan Si-O-Si piki içinde tamamen kaybolması da Curcuminin Na-MMT nin bazal yüzeylerinde de biriktiğini göstermektedir. Ayrıca, 800-900 cm^{-1} dalga boyundaki aromatik C-H piki de (Mg-Al) ye ait hidroksil piki ile etkileşime girmiş ve yaklaşık 15 cm^{-1} azalarak sola kayması ile de kile yüklendiğinin açık delilleridir. FT-IR analizleri Curcumin ilacının hem PLGA hem de kil ile etkileşime girdiğini göstermekle birlikte, kilin partikülün hangi bölgelerinde ve ne şekilde adsorplandığı ile ilgili çok fazla bilgi vermemektedir. Dolayısıyla elde edilen nanopartiküldeki kilin şekli ve formu hakkında daha fazla bilgi elde edebilmek için taramalı elektron mikroskobu (E-SEM) ile nanokil ve nanopartikülün vakum ortamda üç boyutlu olarak görüntüleri kaydedilmiştir.

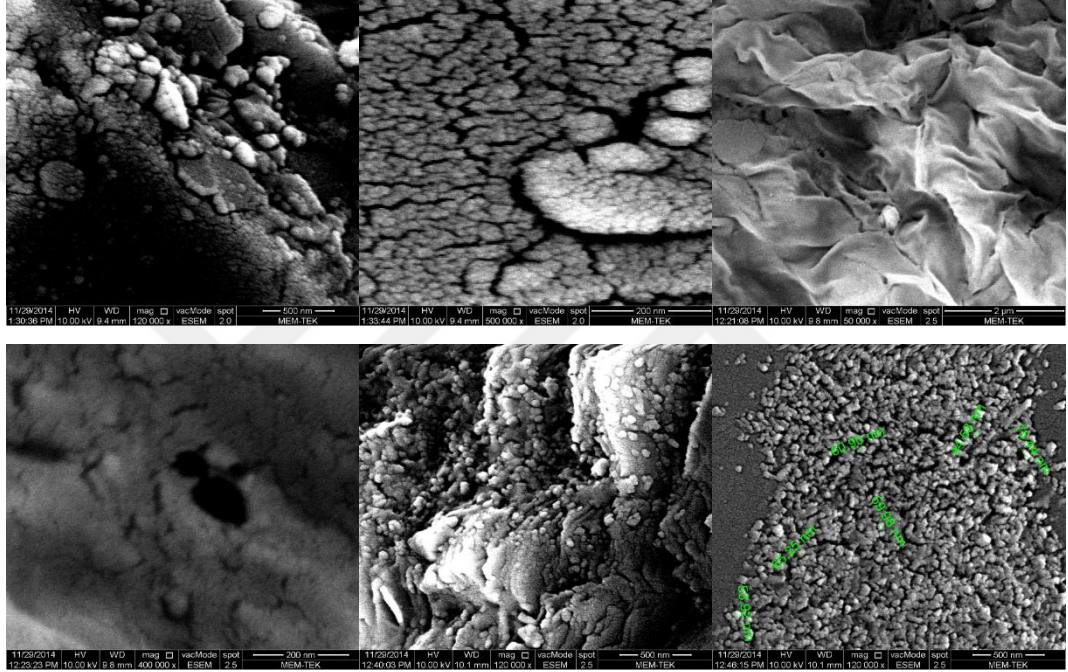
4.3.3 E-SEM analizleri

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) çok büyük büyütme oranları ile yüksek çözünürlüklü görüntü alma tekniğidir. Son teknoloji SEM cihazlarında büyütme oranları 500.000X e kadar ulaşmaktadır. Bu teknik sayesinde partikül veya diğer kompozitlerin morfolojisi, yapısı ve elementel olarak bilgiler de elde edilebilmektedir. Ayrıca, incelenen numuneler üzerinde X-ray elementel dağılım haritalaması (X-ray mapping) ile standartsız kalitatif elementel analizler (SEM-EDAX) yapılmaktadır.

Son yıllarda bu cihazların, haritalama özelliğinin yanında ürüne ve özellikle kristal bir malzemeye ait kristal bilgisi de alınan bir modülü (EBSD) de geliştirilmiştir. Bu modüllerle ortamsal SEM (E-SEM) tekniği ile malzemenin özelliğine göre düşük veya yüksek vakum ortamda da görüntüler alınabilmektedir. Yüksek vakum koşulları, ikincil elektron (SE) malzemelerin yüzey ve kesitleri için de kullanılmaktadır. Düşük ortam modülü ise daha çok kimyasal ve kristal yapısı bozulmayacak olan ürünlere uygulanmakta ve daha net görüntüler alınabilmektedir. Böylece E-SEM modunda düşük vakum ortamında kuru ve kaplanmamış olan nanokil ve nanopartiküle ait görüntüler alınmış ve enerji saçınım X-Ray tekniği (EDAX) modülüyle nokta ve haritalama özelliği kullanılarak nanopartiküle ait elementel analizde yapılmıştır. Attritorden alınan kil süspansiyonu yüzey ve kesit görüntüsü almak için cam ve mika yüzeylerine damlatılıp kurutulduktan sonra görüntü analizi yapılmış ve alınan sonuçlar Şekil 4.11’de verilmiştir.

Şekil 4.11’deki ilk 2 görüntü, cam yüzeylerinde birikmiş olan kil partiküllerine aittir. Diğer 4 resim, mika yüzeylerinde kurumuş olan paritküllere aittir. Literatürdeki aynı

bölgeye ait mineral için (Erkan ve ark, 2010) ve Güney Afrika (Masindi ve ark, 2015), Çin (Jagtap ve ark, 2013), Umman (Khalili ve ark, 2013) ve Wyoming (Xi ve ark, 2005) bentonitlerine ait morfolojiler ile karşılaştırıldığında aynı imajların elde edildiği görülmüştür. Bununla birlikte, Ray ve Okamoto (Ray ve Okamoto, 2003) yaptıkları detaylı analizde bu imajların eksfoliye olmuş kil partiküllerini temsil ettiğini ortaya koymuştur. Dolayısıyla, küresel taneler olmasa da attritorden alınan numunenin morfolojik olarak kil mineralini temsil ettiği söylenebilir. Şekil 4.11’de görüleceği üzere kilin boyutları DLS sonuçlarına yakın olarak ortalama 50 nm gözlenmiştir.

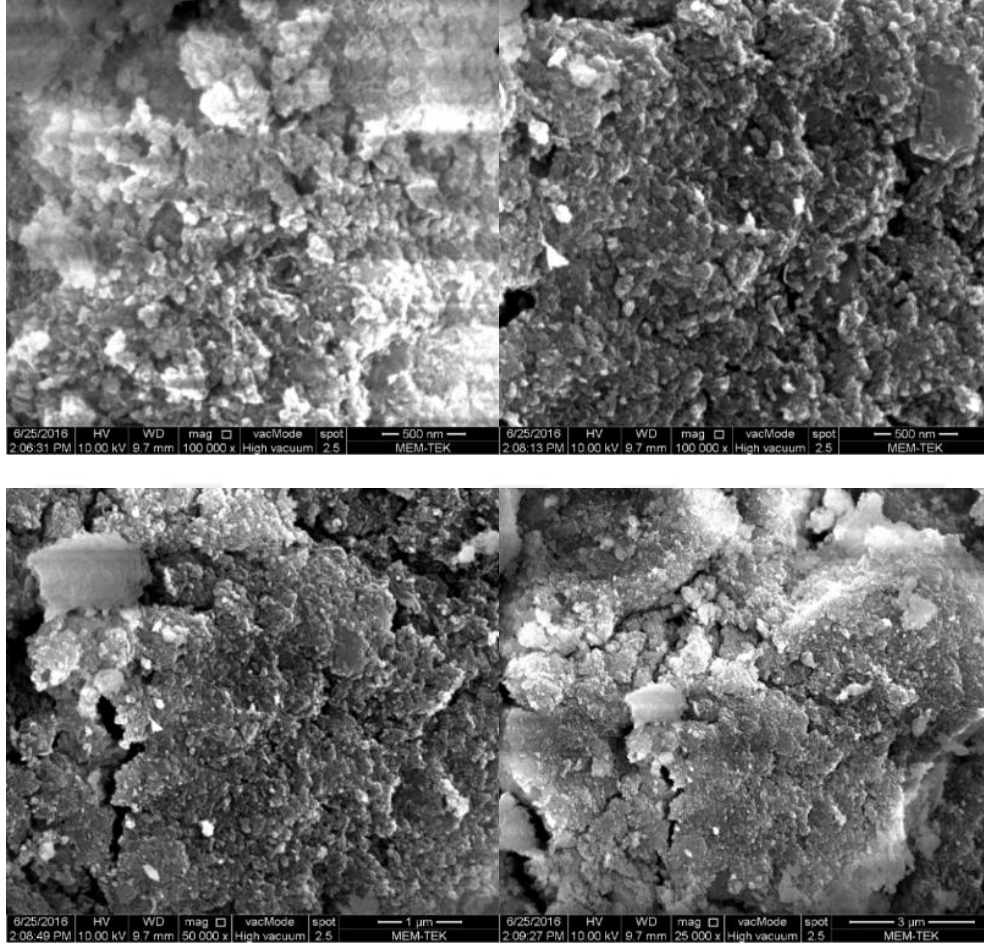


Şekil 4.11 : Cam (üst) ve mika (alt) yüzeylerindeki nanokil partiküllerine ait SEM imajları.

Attritor ile boyut küçültme işlemi sonucunda dekantasyonda çöken öğütülmüş ve safsızlıkları ile birlikte tüm numuneyi temsil eden kısım da açık havada ortam sıcaklığında kurutulduktan sonra tekrar SEM imajları alınmış ve Şekil 4.12’de verilmiştir.

Şekil 4.12’de, kil partikülleri nanometre mertebelerinde dağınık ve kabarık olarak bulunmuş ve Şekil 4.11’deki gibi kil yapısı literatürde bahsi geçen montmorillonit minerallerine benzer morfolojiler sergilemiştir. Yine Şekil 4.11’deki gibi kil tabakalı yapısını korurken pamuğumsu bir şekilde, masif ve agregat halinde birarada bulunmaktadır. Nitekim üstteki 500 nm ölçekli resimlere bakıldığında halen 200-300

nm civarında kil partikülleri gözlenebilmektedir. Ancak ölçek 1 ve 3 μm ye getirildiğinde tanelerden ziyade mikrometre boyutlarında kil tabakaları görülmüştür.

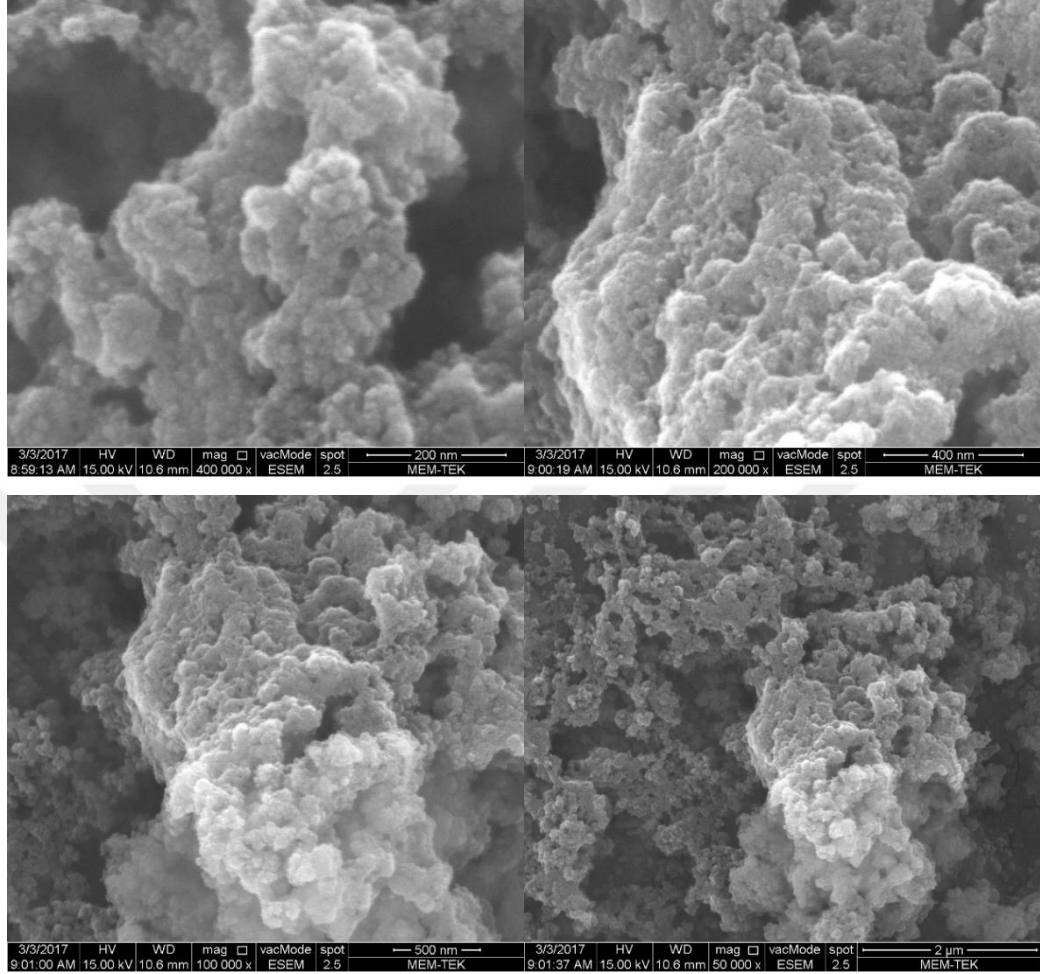


Şekil 4.12 : Açık havada kurutulmuş çöken kil partiküllerine ait SEM imajları.

Nanopartikül üretmeden önceki ilk sorumuz, kilin attritor ile nasıl ve ne şekilde üretileceği idi. Yukarıda yapılan tüm karakterizasyon test sonuçlarına göre kilin, genel olarak nano boyutta ve tabakalı formunu koruma eğiliminde olduğu düşünülmektedir. İkinci olarak, acaba kilin, üretilen nanopartiküldeki davranışı ve morfolojisi nasıldır, sorusuna cevap aramak olacaktır. Bunu anlayabilmek için, E-SEM modunda ve morfoloji bozulmasın diye düşük vakum ortamda nanopartiküle ait görüntü analizi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.13'te verilmiştir.

Şekil 4.13'deki nanopartikülün yüzey imajları DM tekniği ile üretilip freze-dryer ile liyofilize edilerek elde edilmiş olan partiküllere aittir. Şekil 4.11 ve 12'de daha dağınık ve küçük boyutlara sahip kil partikülleri PLGA ve Curcumin ile muamele edildikten

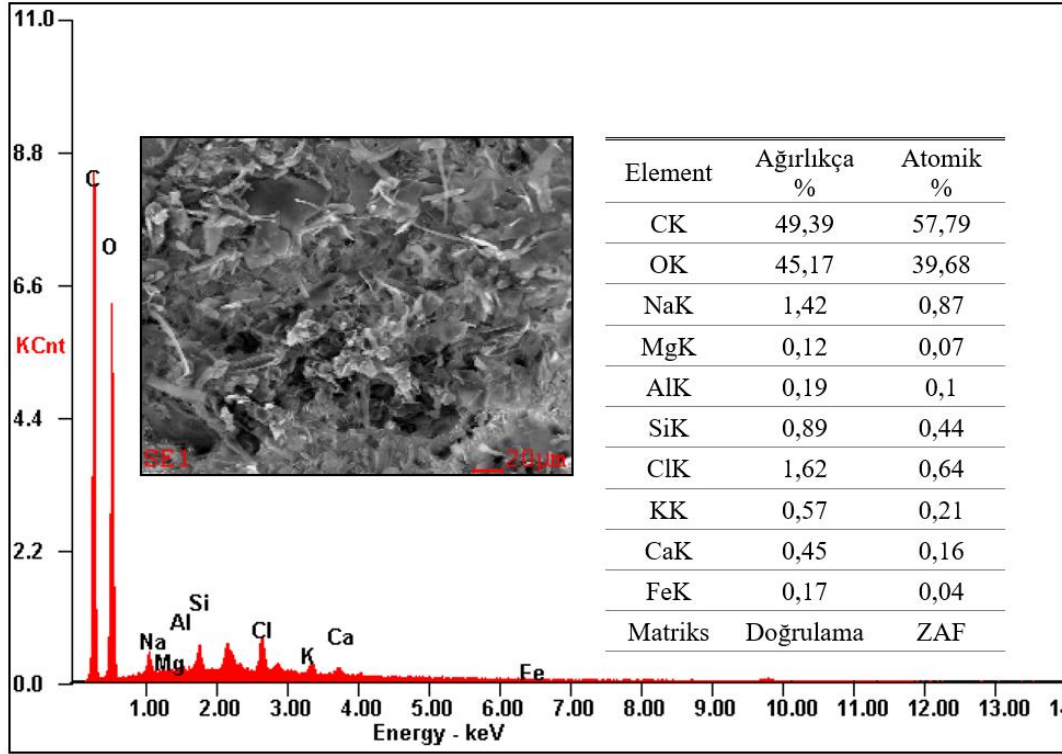
sonra, pürüzlü, aglomere ve kompakt bir forma bürünmüş ve boyutu da Çizelge 4.5'teki sonuçları teyit edecek biçimde oldukça büyümüştür.



Şekil 4.13 : Nanopartiküle ait E-SEM imajları.

Kevadiya ve ark. da (Kevadiya ve ark, 2010) VB1 ve VB6 ilaçları ile ürettikleri nanopartiküllere ait SEM imajlarından kilin partikülün boyutunu büyütmenin yanında, pürüzlülüğe sebep olduğunu açıklamış ancak kil sayesinde ilaçların kontrollü salımının gerçekleşebileceğini düşünmüşlerdir. Dong ve Feng (Dong ve Feng, 2005) de kil varlığında morfolojinin bozulduğunu ancak ortalama boyutların 300 nm civarında olduğunu açıklamışlar. Kil partikülleri birbirlerine daha çok yaklaşarak adeta agregat kümeleri şeklinde görünmektedir. Bu da düzgün ve geniş yüzey alanı ve tabakalı yapıya sahip kil mineralinin bazal boşluklarına da küçük ilaç molekülleri ve özellikle polimerin hidrofil sitelerinin girebileceğini göstermektedir. Bu savımızı bir adım daha öteye götürerek sistemde bulunan nanopartiküllerin elementel analizi ve haritalanması da E-SEM cihazının EDAX modu ile yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.14'te verilmiştir. Şekil 4.14'te üretilen nanopartiküldeki PLGA, kil ve Curcumine ait

elementlerden oluşan eğri, ve bu eğrinin baz alındığı SEM imajı ve elemetlerin bileşimleri yer almaktadır.

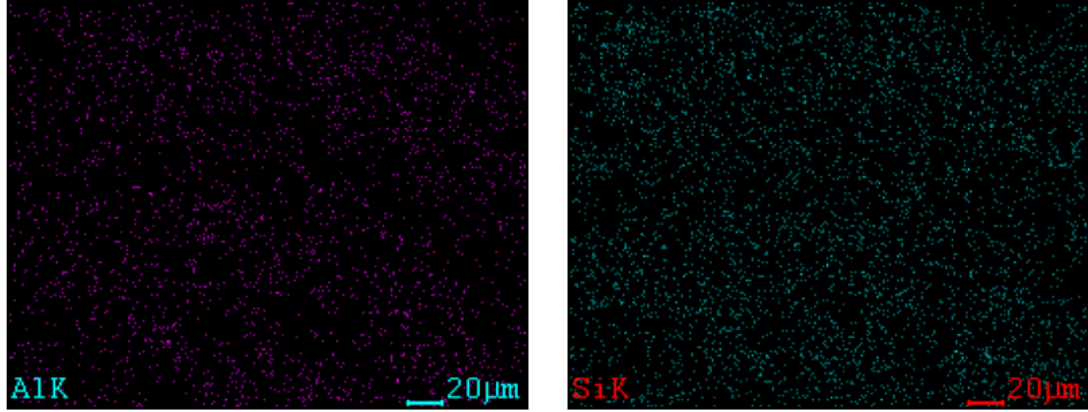


Şekil 4.14 : Nanopartikülün E-SEM/EDAX sonuçları.

Konsantrasyon çizelgesinde de görüleceği üzere, matriks ZAF (Atom münarası, absorbsiyon ve floresans) etkileri baz alınarak doğrulanmıştır. NP içeriğinde organik materyale ait PLGA polimerinden dolayı karbon (C) ve oksijen içerikleri hem ağırlıkça hem de atomik oranlarda çok yüksektir. Buna karşılık, kile ait Al, Si, Mg, Fe içerikleri ise nispeten çok daha küçüktür. Dolayısıyla karbon ve oksijen olmadan da bu analiz tekrarlanmış ve ağırlıkça Al ve Si oranları %29.58 ve %6.23'ye çıkarken atomik oranları ise %30.80 ve %6.76'ya yükselmiştir. Bu iki elemente ait kısa süreli toplanmış noktasal veri haritaları, Şekil 4.15'te verilmiştir.

Şekil 4.15'te de görüleceği üzere, Si elemetinin dağılım konsantrasyonu Al elemetinden daha çoktur. Bu sonuç Şekil 4.14'teki kompozisyon çizelgesinden de görülmektedir. Zira Si/Al oranı ağırlıkça yaklaşık olarak 4.7 olarak verilmiştir. Haritada silikon elementine ait daha yoğun nokta gözlenmiştir. Ancak her iki haritada da belli bölgelerde yoğunlaşma tespit edilmiştir. Daha uzun süreli toplanacak olan noktasal haritalarla, kile ait -SiO_2 , $\text{-Al}_2\text{O}_3$ gibi sitelerin yoğunlaştığı bölgeler ortaya çıkarılabilir ve PLGA/Curcumin kompozitinin kilin hangi bölgelerini tercih ettiği

saptanabilir. Bu sonuçlara göre; sistemde Na-MMT kiline ait tüm elementlere rastlanmıştır.



Şekil 4.15 : Nanopartiküldeki Al ve Si elemetlerine ait mikrograflar.

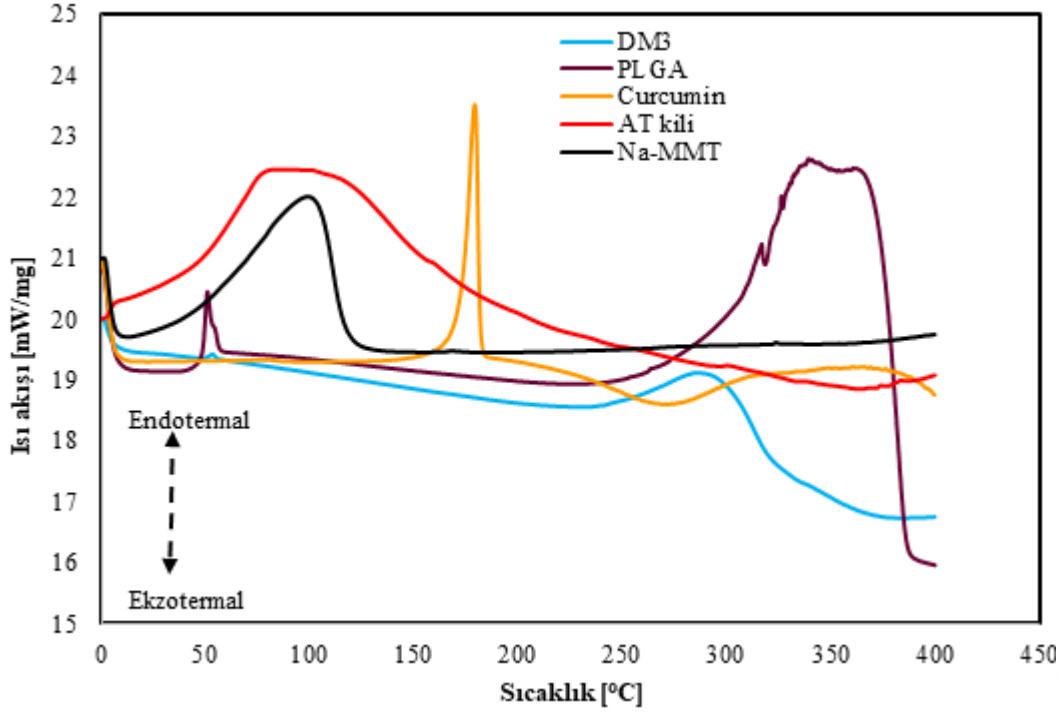
E-SEM analizlerinden sonra kil, Curcumin ve PLGA üçlüsünün nanopartikül üretim anında ısıtılan mı veren mi olduğunu saptamak için Difensiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) testleri gerçekleştirilmiştir.

4.3.4 DSC analizleri

DSC ölçümleri, kil-PLGA-Curcuminin birbiri ile olan etkileşimleri ve erime, camsı geçiş, kürlleme ve kristalizasyon özelliklerini tespit etmek için gerçekleştirildi. Böylece nanopartikülün termal davranışı ortaya konmuştur. DSC analizleri için temel koşullar şu şekilde belirlendi: cihaz 2 dk boyunca 0 °C derecede bekletildi. Daha sonra ısıtma işlemi 400 °C ye kadar 10 °C/dk. olacak şekilde arttırıldıktan sonra, tekrar 2 dk bekletilip sıcaklık düşüşü 5 °C/dk. olacak şekilde ayarlandıktan sonra 0 °C dereceye kadar soğutma gerçekleştirildi. Buradaki amaç çok büyük miktarda olan PLGA moleküllerinin kristalizasyonunu önlemektir. Bu şekilde hazırlanan tüm numunelere DSC analizi gerçekleştirildi. Tüm ürünlere ait termogram eğrileri Şekil 4.16’te verilmiştir.

Şekil 4.16’daki ilk pik 50 °C civarında ergime sonucu oluşan keskin endotermik PLGA pikidir. Sonrasında beliren küçük omuzlu 54 °C deki ise Mukerjee ve ark. da (Mukerjee ve Vishwanatha, 2009) değindiği gibi bu camsı geçişi takip eden bir gevşeme pikidir. Bunun dışında PLGA doğal olarak amorf olduğu için başka bir noktada erime noktası gözlemlenmemiştir. Sadece 300-400 °C alanında PLGA polimerine ait segmentlerin ısı aldıkça bozunmasına bağlı olarak yayvan ve geniş bir pik ortaya çıkmıştır (Mainardes, 2006). Öte yandan, hem saflaştırma işlemi hem de

atritör ile elde edilmiş olan montmorillonit kiline ait pik ise 100 °C civarında belirginleşmiştir (Cui ve ark, 2007). Bu pikin tabakalar arasındaki suyun kaybolması sonucu oluşan endotermik pik olduğu düşünülmektedir (del Hoyo ve ark, 1996). Attritör ile elde edilmiş numuneye ait pik diğerine nazaran da yayvan ve geniş bir camsı geçiş pikidir.



Şekil 4.16 : DSC termogram eğrileri.

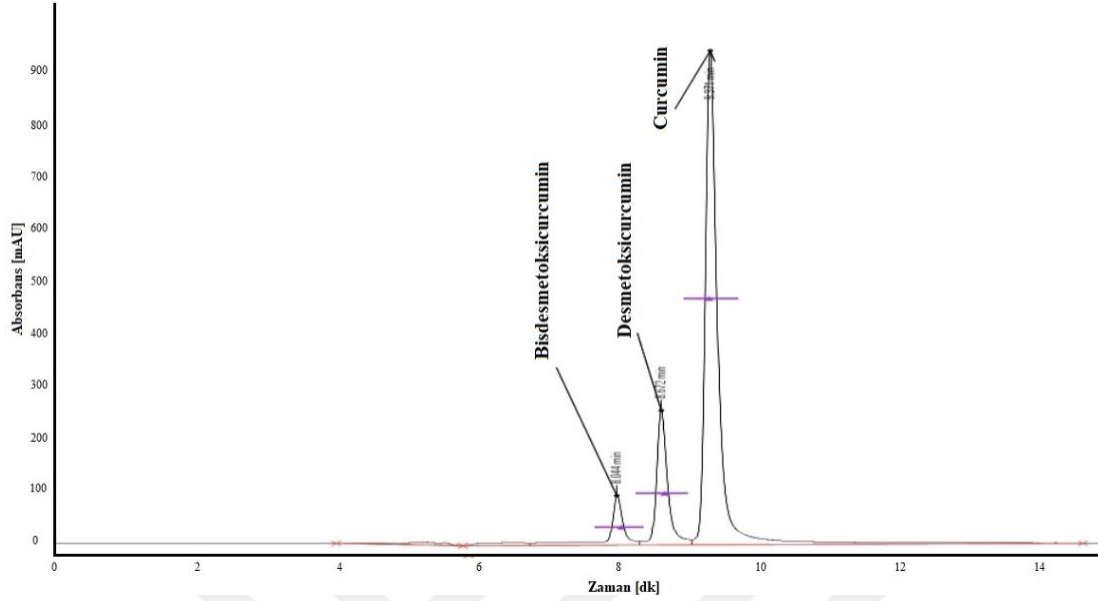
Ancak genel olarak ısısal işlem sonucunda kil mineralinin genel karakteristiğini sergilemektedir. Kil gibi davranış göstermiştir. Diğer bir karakteristik endotermik pik ise 175 °C civarında beliren Curcumin pikidir. Şekil 4.16'daki DM3 kodlu ve tukuvaz mavisi ile belirtilmiş olan eğri ise bu üç bileşen ile üretilen nanopartiküle ait piktir. Nanopartikülde beliren ilk pik beklenildiği gibi 50 °C civarındaki PLGA polimerine ait piktir. Ancak bu pikteki omuzlar azalarak küçülmüş ve hatta bir tanesi tamamen kaybolmuştur. PLGA polimerinin dekompozisyonu sonucu oluşan bozunma piki ise sola doğru yaklaşık 50 °C ötelenerek ortaya çıkmıştır. Bu pikin nedeni 275 °C civarında beliren ve bozunmadan kaynaklı ekzotermik Curcumin piki olabileceği düşünülmüştür. Bu sav doğru ise Curcumin ilacının partikül sarmalı tarafından tutunduğunu (Datta, 2013) ortaya çıkarmaktadır. Öte yandan, DSC analizleri nanopartikülde bulunan 175 °C civarındaki karakteristik Curcumin pikini ve kile ait herhangi bir iz veya belirti ortaya çıkaramadı. Bunun literatürde de anlaşılabileceği üzere üç sebebi olabilmektedir (Datta, 2013; Feng, 2006; Kaur ve Datta, 2013; Mukerjee ve

Vishwanatha, 2009): ilaç molekülleri polimer matriksi içerisinde ya amorf ya düzensiz, bozunmuş fazda ya da katı eriyik halde bulunmasındandır. PLGA polimerine nispeten çok az olan kil partikülleri ise tamamen sarmalın içerisine hapsolmuş ve eksofliye olduğu için pikler nanopartikülde belirmemiştir. Bunun yanısıra DSC eğrilerine ait ergime entalpileri ve diğer detaylar ekler kısmındaki Şekil A1’de yer almaktadır. Bir sonraki test çalışmasında nanopartiküldeki kilin ilaç salımında yaptığı katkıyı ortaya koymak için “HPLC Perkin-Elmer Flexar” cihazı vasıtasıyla salım deneyi gerçekleştirilmiştir.

4.3.5 HPLC analizi ve salım deneyleri

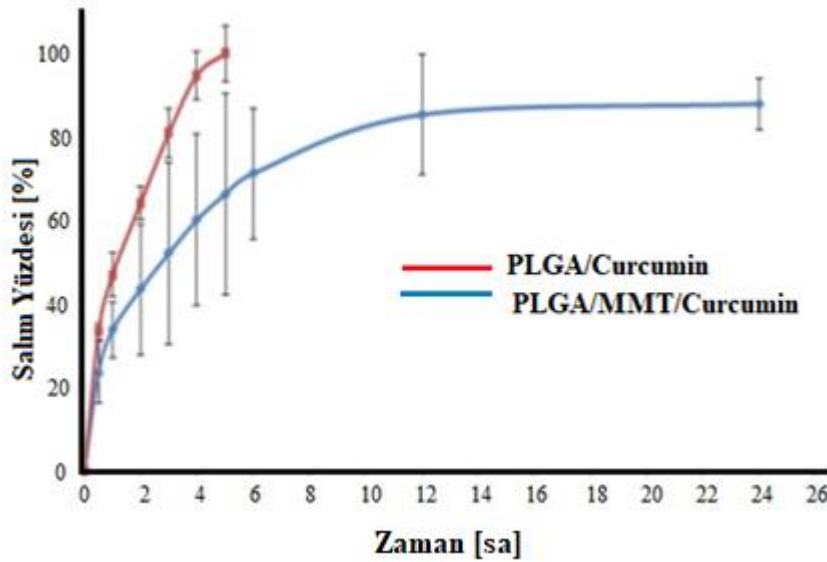
Bahadori ve ark.’nın (Bahadori ve ark, 2017) 2017 yılında yaptıkları Tübitak çalışmasında anlatıldığı gibi, PBS içinde hazırlanan formülasyondan salınan ilaç miktarı yine diyaliz yöntemi ile ölçülmüştür. Optimize edilmiş formülasyondan 3 ml’lik malzeme diyaliz membranında (bu deneyde MWCO 6000-8000) 300 ml PBS’e karşı diyaliz edilmiştir. Dış ortamdan 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 ve 24. saatlerde alınan 1 ml’lik numunelerin içindeki Curcumin miktarı daha önce elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için Curcuminin metanol içinde çeşitli konsantrasyonları hazırlanmıştır. Curcuminin metanol içindeki maksimum absorbansının 524 nm olduğu bilinmektedir. Konsantrasyonlar dizisi, nano ilaç taşıma sistemine yüklenen maksimum Curcumin miktarının alt ve üst konsantrasyonlarını içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonların 524 nm’deki absorbanslarının bir doğru grafiği olarak, HPLC’den yararlanarak çizilmiştir. Diyaliz ortamından alınan numuneler 1/10 oranında metanol ile yeniden seyreltilmiş ve içerdiği Curcuminin absorbansı UV spektrofotometresinde ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri konsantrasyon eğrisindeki doğru denklemine yerleştirilerek, karşılık gelen konsantrasyon hesaplanmıştır. HPLC’de kullanılan sistem: C-18 kolon 250x4.6mm, Çözücü sistemi: %2 asetik asit (%40)/Asetonitril (%60) izokratik, akış hızı 0.5 ml/min, Enjeksiyon hacmi 5 µl, sıcaklık: 35 °C dir. Aynı şekilde kil eklemeyen elde edilen optimize formülasyonun ilaç salım süresi PLGA-Kil nano kompoziti ile karşılaştırılmıştır (Bahadori ve ark, 2014). Curcuminin metot kısmında bahsedilen yöntemlerle elde edilen HPLC kromatogramında (Şekil 4.17) eğrilerin altında kalan alan (AUC) hesaplanmış ve çeşitli konsantrasyonlar kullanılarak konsantrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bilindiği üzere her Curcumin karışımında Curcuminoid olarak adlandırılan üç Curcumin türevi bulunmaktadır. Bunlar Curcumin,

desmetoksiCurcumin ve bisdesmetoksi Curcumin'den ibarettir. Bu çalışmada ana Curcumin piki konsantrasyon eğrisinin çiziminde kullanılmıştır.



Şekil 4.17 : Curcumin'in HPLC kromatogramı.

Curcuminin oluşturulan iki nanokompozitten salım süresi incelenmiş ve kilin kullanılmadığı sistemde çok daha hızlı bir salım gerçekleşirken, diğerinde kilin yapıya stabilite kazandırması sonucu Curcuminin salımının çok daha uzun sürede gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 : Kil içeren ve içermeyen nanopartikülün salım davranışı.

Şekil 4.18'den de anlaşılacağı üzere kil kullanılmadan üretilen miseldeki Curcuminin %100'ünün salımı 5 saat civarında gerçekleşirken kil katkılı olan nanomisellerin salım

süresi yaklaşık 5 katına kadar artmıştır. Dolayısıyla Curcuminin oluşturulan nanokompozitten kil kullanmadan çok daha hızlı bir salım gerçekleşirken, kilin yapıya stabilite kazandırması sonucu Curcuminin salımı çok daha uzun sürede gerçekleşmiştir.

4.3.6 Optimize edilen formülasyonun ilaç taşıma kapasitesinin ölçülmesi

Bahadori ve ark. nın (Bahadori ve ark, 2017) 2017 yılında yaptıkları Tübitak çalışmasında anlatıldığı gibi, yukarıda anlatılan şekilde optimize edilen formülasyonun salım grafiği elde edildikten sonra, maksimum ilaç taşıma kapasitesi de hesaplanmıştır. Bu doğrultuda ilaç salım grafiğinin ilk yarım saat içinde gösterdiği hızlı yükseliş ivmesinin karşılık geldiği Curcumin konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bu konsantrasyonun nano taşıyıcının içinde değil, PBS ortamında çözünmüş olan madde miktarına karşılık geldiği ve diyaliz sırasında hızla ortamı terk ettiği düşünülmektedir. Bu deneyden elde edilen sonucu onaylamak üzere, optimize edilmiş formülasyon ürünü, ortasında 3.5 MWCO'dan küçük gözeneklere sahip filtre bulunan santrifüj tüplerinde 6000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Ancak, santrifüj hızı istenenden çok yavaş olduğu için sadece dışarıda kalan madde miktarının filtrenin altına geçtiği düşünülmektedir. Yine de, bu miktar diyaliz sonucunda elde edilen hızlı ivme miktarı ile karşılaştırılmıştır. Bu iki sonuçtan, buffer ortamındaki malzeme miktarı hariç, PLGA-KİL formülasyonuna yüklenen madde miktarı tayin edilmiştir. Buradan; denklem 3.1 ve 3.2'deki formüllere göre hesaplanan Enkapsulasyon ve İlaç Yükleme verimleri için metot kısmında bahsedildiği gibi salım sonuçlarında ilk yarım saatte salınan Curcumin miktarına ve filtreli santrifüj tüplerinde, sıvıya geçen Curcumin miktarına ihtiyaç vardır. Her iki yöntemde de yakın sonuçlar elde edilmiş ve kil-PLGA nanokompozitinin dışında kalan Curcumin miktarı $437.5 \mu\text{g} \approx 438 \mu\text{g}$ olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.18'deki salım grafiğinde de görüldüğü gibi ilk yarım saatte yüklenen Curcuminin yaklaşık %30-%35'i salınmaktadır ki bu miktar yüklenen toplam $1250 \mu\text{g}$ içinde $438 \mu\text{g}$ 'a denk gelmektedir. Formülasyonun içinde kalan Curcumin miktarı ise: $812 \mu\text{g}$ 'dır. Buna göre:

Enkapsulasyon verimi (%) = (PLGA-Kil içindeki ilaç / Başlangıç ilaç Miktarı) $\times$ 100%

$$EV\% = (812/1250) \times 100 = \%64.96$$

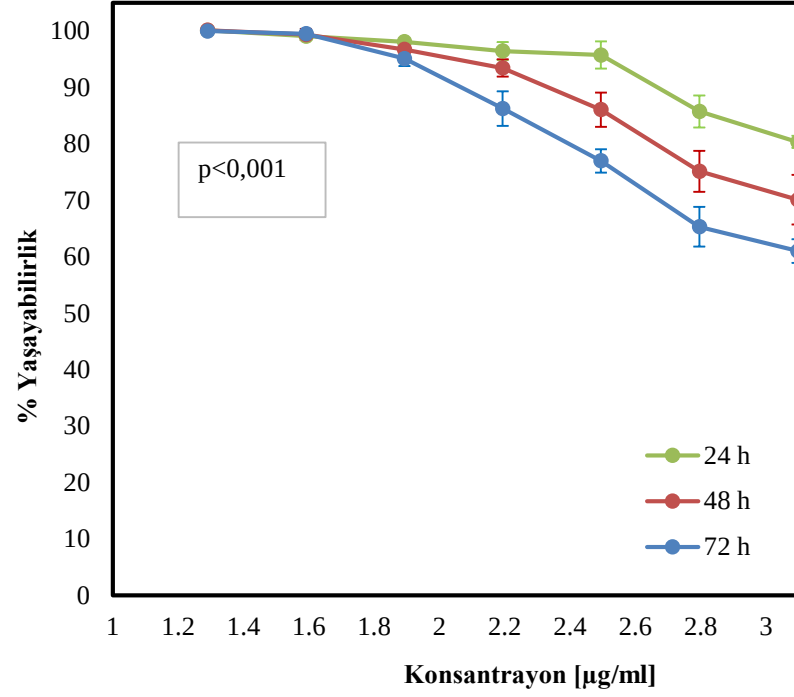
İlaç Yükleme verimi (%) = [PLGA-Kil içindeki ilaç / (PLGA-Kil içindeki ilaç + Başlangıç ilaç)] $\times$ 100

$\dot{I}YV\% = [812/(812+1250)] \times 100 = \%39.3$ olarak bulunmuştur.

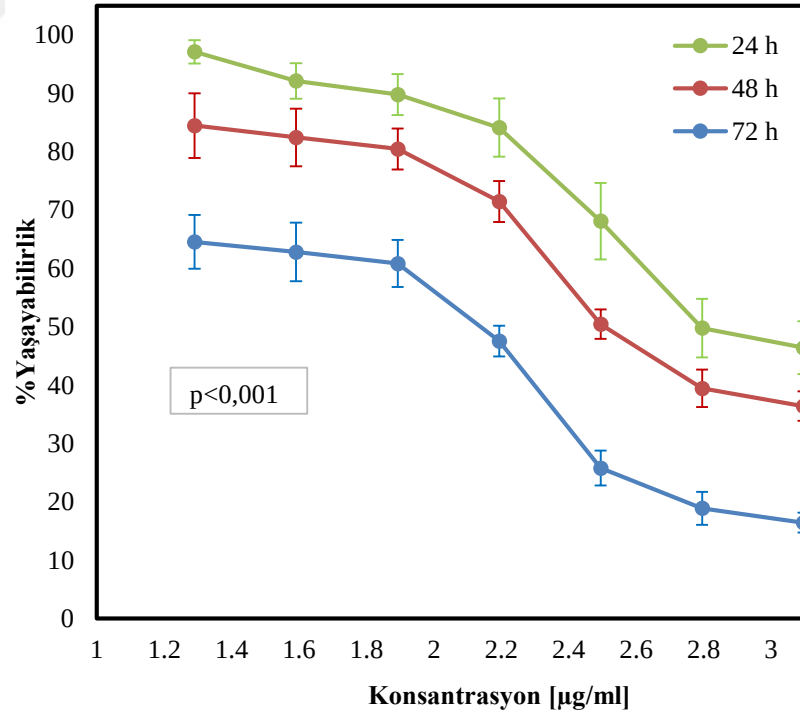
Sun ve ark.'nın (Sun ve ark, 2008) yapmış olduğu çalışmada paklitaksel ilacının PLGA/MMT nanopartikülüne enkapsülasyon verimi %51.6 bulunmuştur. Dong ve Feng (Dong ve Feng, 2005) ise ortalama %50 civarında hesap etmişlerdir. Bizim çalışmada ise bu değer %64.96 olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu da geliştirdiğimiz formülasyonun daha başarılı olduğunu ispatlamaktadır.

4.3.7 İn-vitro anti-kanser ve toksisite deneyleri

Bahadori ve ark. nın (Bahadori ve ark, 2017) 2017 yılında yaptıkları Tübitak çalışmasında anlatıldığı gibi, optimize edilmiş PLGA-Kil-Curcumin formülasyonunun anti-kanser etkisi MCF-7 meme kanseri hücre soyuna karşı incelenmiştir. Aynı zamanda Curcumin kullanmadan hazırlanan boş nanokompozitin toksisitesi L-929 fibroblast hücre soyuna karşı incelenmiştir. Bu aşamada, PLGA-Kil partiküllerinin yanı sıra sadece PLGA'dan oluşan partiküllerin toksisitesi de incelenmiştir. Sonuçta, 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda canlı hücrelerin sayısı WST-1 canlılık test kitinden yararlanarak sayılmıştır. Hazırlanan nano-formülasyonlardan 10 µl, 5x10³ hücre/kuyucuk ve 190 µl medyum içeren plate'lere ekilmiştir. Bu hacimlerin içinde kullanılan PBS DMSO içinde çözünmüş eş miktarda Curcumin ve DMSO pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Bahadori ve ark, 2014). *İn-vitro* çalışmalarında iki farklı çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmalardan ilkinde boş PLGA-MMT nano kompozitin toksik olup olmadığı sağlıklı L-929 fibroblast hücreleri üzerinde araştırılmıştır (Şekil 4.19). Bu deneylerde optimize formülasyon olan 1250µg Curcumini taşıyan nanokompozitin miktarı hesaplanıp kademeli olarak yarı yarıya PBS ile seyreltilmiştir. Bu deneyin sonucunda belirgin bir toksisite gözlenmemiştir (Şekil 4.19) (Bahadori ve ark, 2017). Şekil 4.19'dan da anlaşılabacağı üzere, elde edilen nano kompozitin sağlıklı hücreler üzerinde kayda değer toksik etkisi bulunmamakta ve en yüksek konsantrasyonda ve 72 saatin sonunda dahi maruz kalan hücrelerin yaklaşık %70'i yaşamaktadır. Bu oran ilaç taşıma sistemleri açısından önemli derece olumlu bir yaşam oranıdır. Bunu takiben yine 1250 µg Curcumin içeren formülasyon seçilip 6 kere yarı-yarıya peş-peşe seyreltilip, antikanser etkisinin incelenmesi için MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine uygulanmıştır (Şekil 4.20) (Bahadori ve ark, 2017).



Şekil 4.19 : PLGA-Kil nano kompozitinin L-929 fibroblast hücreleri üzerinde 24, 48 ve 72. saatlerde gösterdiği toksisite profili.

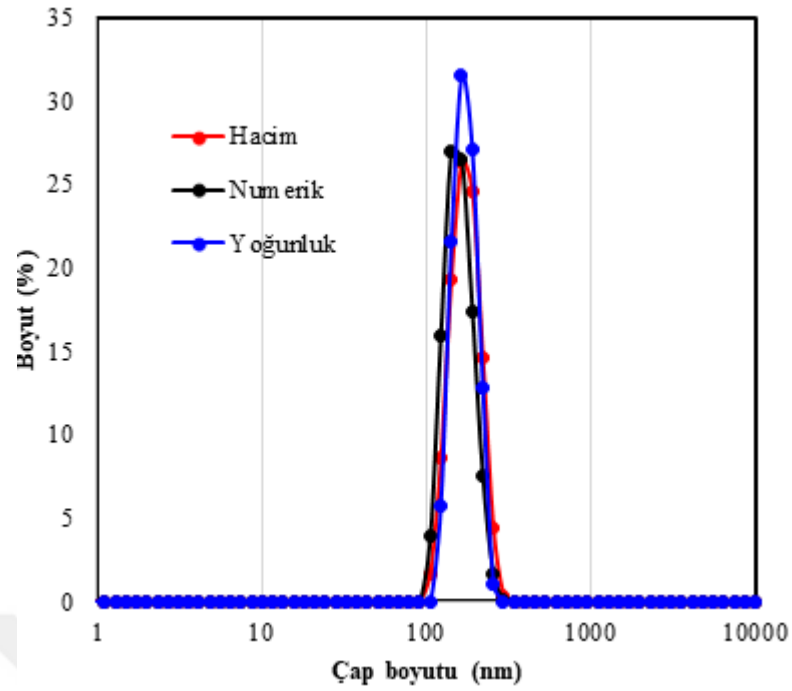


Şekil 4.20 : PLGA-Kil-Curcumin nano kompozitinin MCF-7 hücre hattı üzerinde 24, 48 ve 72. saatlerde gösterdiği sitotoksik etki profili.

Şekil 4.20’de görüldüğü gibi PLGA-MMT-Curcumin nano kompozitinin IC_{50} değeri anti-log 2 yani 100 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. Öte yandan, Şekil 4.20’den de görüleceği üzere, sağlıklı hücreler üzerinde toksisitesi bu denli düşük olan nanokompozit ilaç etken maddesi taşıdığına başarılı bir şekilde kanser hücrelerinin ölümüne sebebiyet vermektedir. Öyle ki 15 μg Curcumin (en düşük konsantrasyon) bile kanser hücrelerinin %40’ını öldürdü ve kullanılan en yüksek konsantrasyonda 72 saatin sonunda sadece kanser hücrelerinin %10’u canlı kalabildi. Deneysel çalışmalar, üretilen nanokil ve nanopartiküle ait yapılan tüm karakterizasyon çalışmaları kilin nanometre mertebelerinde dağıldığı ve nanopartikülün stabil bir biçimde üretildiğini ortaya koymuştur. Ancak bu çalışmalar, Curcumin ilacı ile gerçekleştirildi. Ortaya konan formülasyon baz alınarak, klinik olarak meme ve kolon kanseri tedavilerinde kullanılan 5-FU ilacı ile de bütün deney ve gözlemler tekrarlanmıştır. Böylece geliştirilen ilaç taşıma sisteminin etkinliği bir kez daha ve önemli bir ilaç ile ortaya çıkarılmıştır.

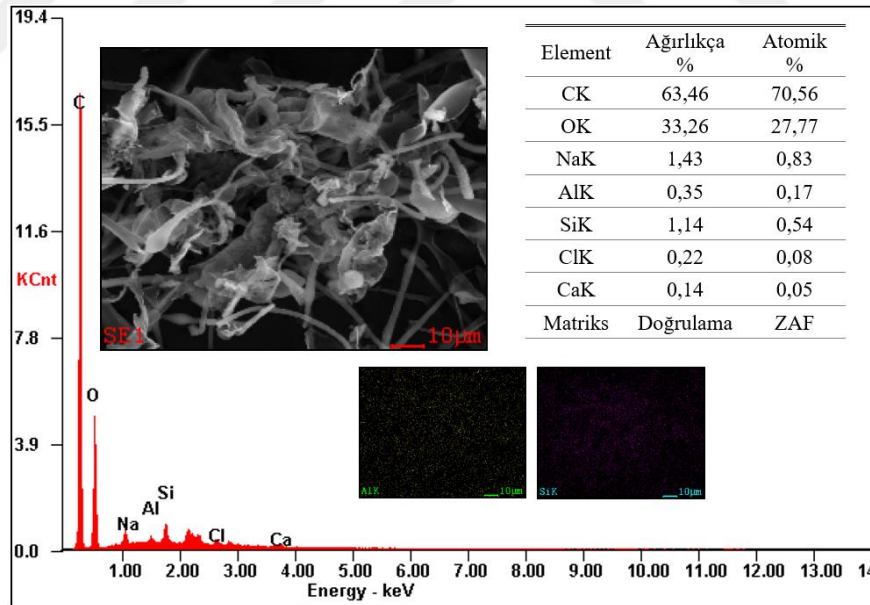
4.3.8 5-FU ile yapılan çalışmalar

İlk olarak deneysel kurgu olduğu gibi alınarak, Curcumine nazaran daha hidrofil olan 5-FU ilacı 500 mikrogram alınarak DM tekniği ile 2 adet partikül üretildi. Üretilen partiküllerden biri ile karakterizasyon testleri yapılırken diğer ile in-vitro anti-kanser deneyleri gerçekleştirildi. DLS, E-SEM, FT-IR, DSC ve diğer sonuçlar aşağıda verilmiştir. PLGA (50 mg) ve kil miktarları (10 mg) sabit kalmak koşulu ile 500 μg 5-FU ile hazırlanmış nanopartiküle ait boyut analiz sonuçları Şekil 4.21’de verilmiştir. Şekil 4.21’de Diyaliz Membran (DM) yöntemi kullanılarak üretilen ve 5-FU ilacını içeren nanopartiküle ait boyut analiz sonuçları görülmektedir. Buna göre partiküle ait maksimum boyut ortalama 160 nm olarak ölçülmüştür. Tek tip olan bu partikül geliştirilen nanoformülasyonun her türlü ilaç molekülü için ideal bir taşıyıcı model olduğunu da açıkça göstermektedir. Daha iyi anlaşılması için yapılan tekrar testi sonuçlarında da %100 ü numerik 91,53, hacimsel 105,7 ve yoğunlukça 115,1 nm olarak ölçülmüştür. Boyut profilinin ortaya çıkarılması içinse 5-FU miktarı 2 katına (1000 μg) çıkarılarak partikül üretimi tekrarlanmış ancak mikronmetre mertebelerinde ve tek tip olmayan pikler elde edilmiştir. Bu partiküle ait topaklanmaların cihaz hassasiyetinden kaynaklanabileceği düşünülerek ağırlıkça 1/10 oranında seyreltilerek tekrar sonuçları ise %100 ü numerik 398,2 nm, hacimsel 398,2 nm ve yoğunlukça 396,1 nm olarak ölçüldü.



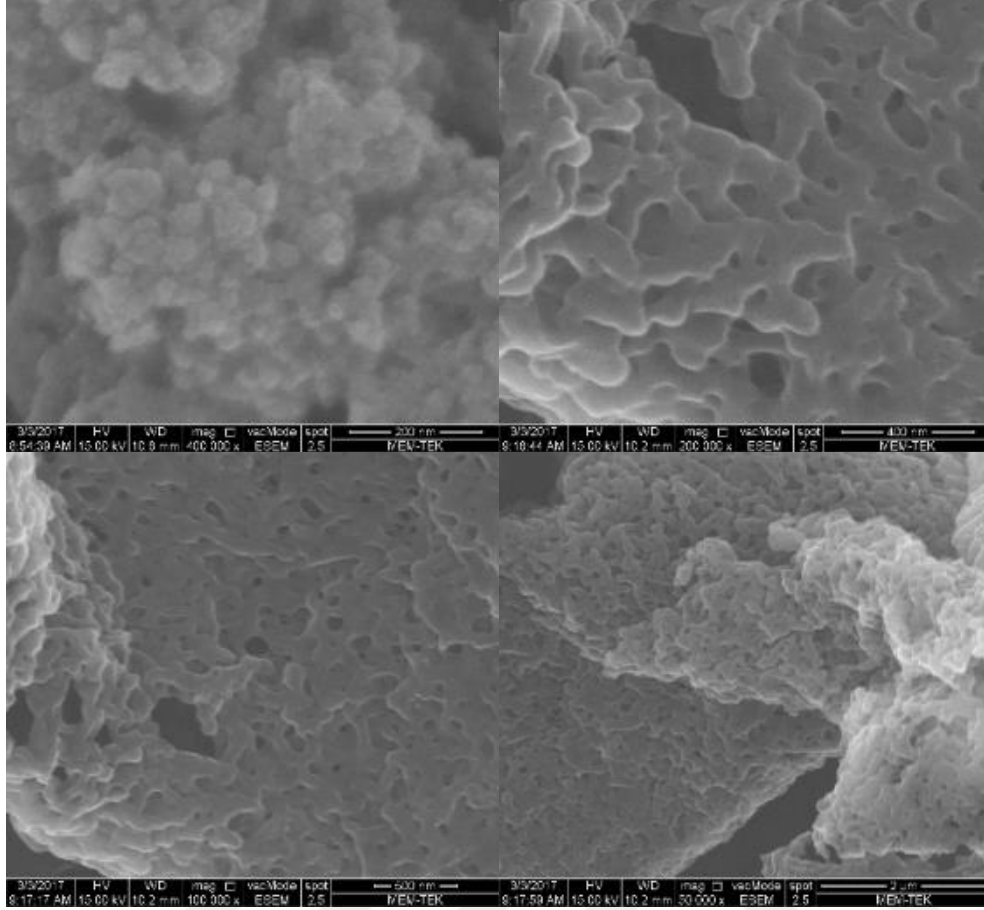
şekil 4.21 : 5-FU ile hazırlanmış nanopartiküle ait DLS sonuçları.

Hazırlanan ilk partiküllere ait E-SEM analizleri gerçekleştirilmiş ve grafikler şekil 4.22’de verilmiştir.



şekil 4.22 : 5-FU ilacı içeren nanopartiküle ait E-SEM/EDAX sonuçları.

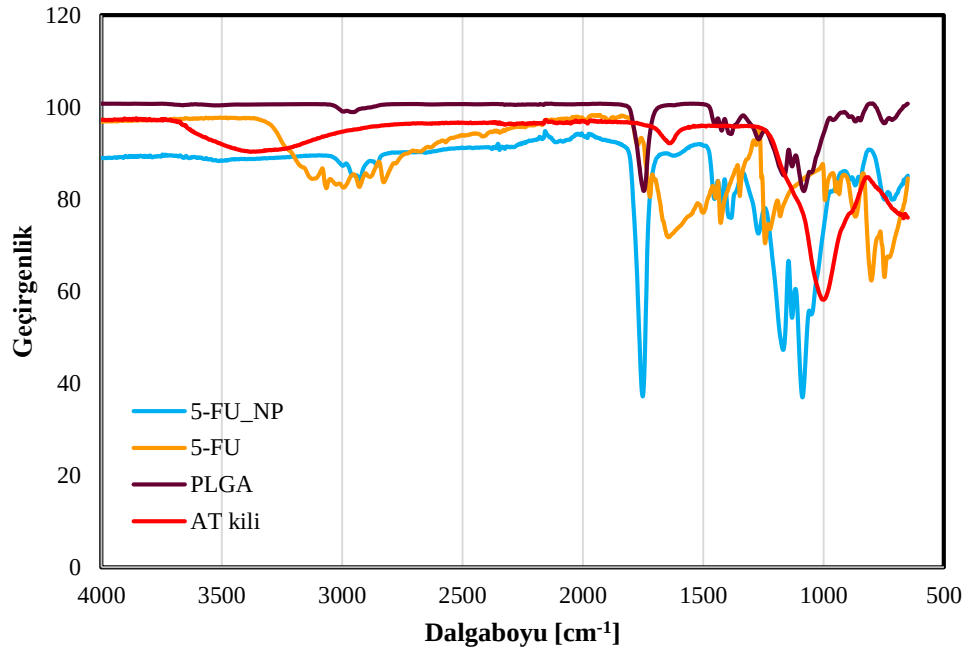
Öte yandan, şekil 4.14’teki Curcumin içeren EDAX imajında da tabakalaşma ve eksfoliyasyon daha kompakt olarak gözlenmektedir. Üretilen bu partiküle ait E-SEM imajları ise şekil 4.23’te verilmektedir.



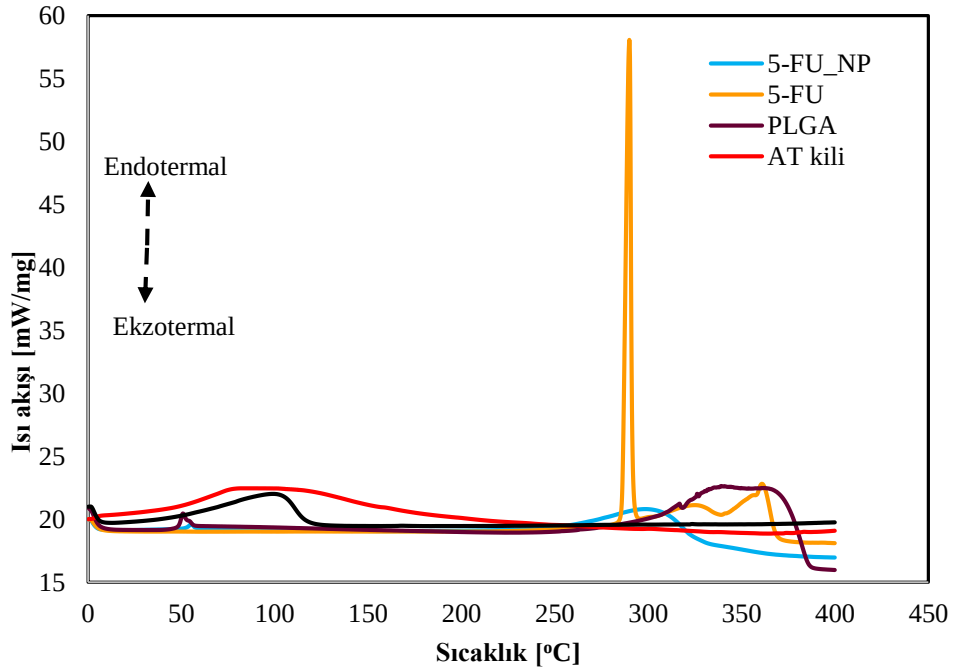
Şekil 4.23 : 5-FU içeren nanopartiküle ait E-SEM imajları.

Şekil 4.23'te Curcumin ile hazırlanan nanopartikülde olduğu gibi 200, 400, 500 ve 2000 nm ölçekli 5-FU ilacı içeren imajlar sergilenmektedir. Curcuminde olduğu gibi partiküle ait bileşenler hem hidrofobik hem de H-bağı etkileşimleri ile bir arada durduğu tahmin edilmektedir. Öte yandan, yüzey imajları verilen nanopartiküllerin yaprağımsı ve poroz yapıda olması da kilin varlığını ispatlamaktadır (Farshi ve ark, 2014; Kevadiya ve ark, 2010). Boyutlar ise DLS analizinde elde edilmiş olanlara yakın olarak görülmektedir. Bu üç bileşenin birbiri ile hangi bölgelerde etkileşebileceğini ortaya çıkarmak için de FT-IR analizleri gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.24'te sonuçları verilmiştir. Şekil 4.24'ten de görüleceği üzere, Curcumin içeren partikülde olduğu gibi, 5-FU ile hazırlanan partikülde de miktarca en fazla olan PLGA polimerinin genel karakteristiği sergilenmektedir. Dolayısıyla partikülün bileşenlerine ait spektrumlar nanopartikülde daha da belirginleşmiş ve sola kaymalar gerçekleştirilmiştir. Bu kaymalar ve değişimler ilaç moleküllerinin yanısıra kile ait partiküllerin de PLGA sarmalı içerisine adsorbe olmuş olabileceğini düşündürmektedir. Bu savımızı daha iyi

açıklamak adına partikül ve bileşenlerinin ısısal davranışı DSC analizi ile ortaya konmuş ve analize ait termogramlar Şekil 4.25'te verilmiştir.



Şekil 4.24 : 5-FU içeren nanopartikül ve bileşenlerine ait FT-IR spektrumları.

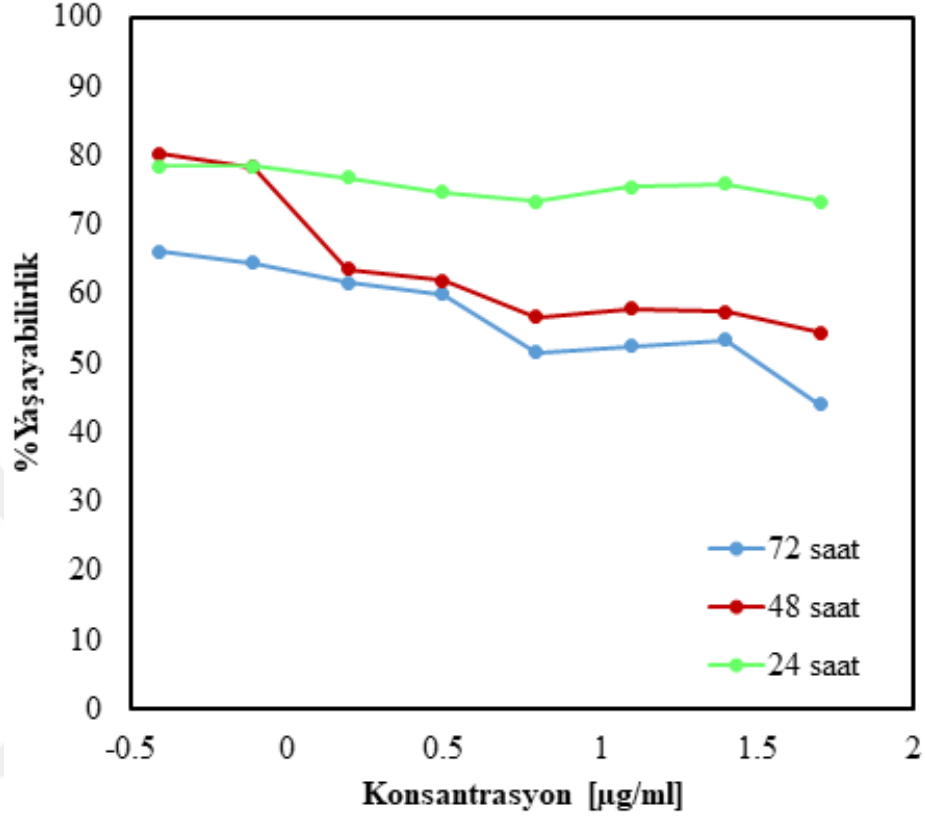


Şekil 4.25 : 5-FU içeren nanopartiküle ait termogramlar.

Şekil 4.25'teki en belirgin pik 290 $^{\circ}\text{C}$ civarındaki 5-FU ilacına ait endotermik piktir. Bu pik partikül içerisinde kaybolmuş ve dolayısıyla 5-FU moleküllerinin partikül

içerisine adsorbe olmuş olabileceğini bir kere daha ortaya çıkarmıştır. Öte yandan hem çalışmamızda kullanılan kile hem de atritör de öğütülmemiş olan kile (Na-MMT) ait pikler de kaybolmuş ve bu da partiküle özellikle de PLGA sarmalına haps olduğunu düşündürmektedir. Çünkü PLGA polimerine ait 50 ve 300 °C civarındaki piklerin ısı akışları azalmış ve kaymış olmasına rağmen belirgin olarak görülmektedir. Bu savımıza karşın Kevadiya ve ark.'nın (Kevadiya ve ark, 2012) 2012 yılında yapmış oldukları çalışma farklı sonuçlar elde etmişlerdir. Nitekim Onlar 5-FU ilacını kitosan/MMT kompozitine yüklemiş ve ilaç içermeyen kitosan/MMT termogramlarına benzer pikler olarak polimer ve ilaç moleküllerinin kil tabakalarının arasına girebileceğine işaret etmişlerdir. Hatta DSC sonuçlarına göre MMT kili kitosan ve kitosan/5-FU kompozitleri varlığında dahi belirgin pikler vermiştir. Son olarak ise hazırlamış olduğumuz 5-FU içeren ikinci nanopartiküle ait sitotoksikite deneyleri de gerçekleştirilmiş ve sonuçları Şekil 4.26'da gösterilmektedir. Optimize PLGA-Kil-5-FU formülasyonunun anti-kanser etkisi MCF-7 meme kanseri hücre soyuna karşı incelenmiştir. Aynı şekilde 5-FU kullanmadan hazırlanan boş nanokompozitin toksisitesi L-929 fibroblast hücre soyuna karşı incelenmiştir. Bu aşamada PLGA-Kil partiküllerinin yanı sıra sadece PLGA' dan oluşan partiküllerin de toksisitesi incelenmiştir. Sonuçlar 24, 48 ve 72. Saatlerin sonunda canlı hücrelerin sayısının WST-1 canlılık test kitinden yararlanarak sayılmıştır. Hazırlanan nano-formülasyonlardan 10µl, 5x10³ hücre/kuyucuk ve 190 µl medyum içeren plate'lere ekilmiştir. Bunun için hücre kültürüne eklenen nano taşıyıcının kritik misel konsantrasyonu (CMC)'nin altına düşmemesi için önce boş nano taşıyıcıdan 8µl 190µl besiyer üzerine eklenir ve daha sonra 8µl 5-FU içeren nano taşıyıcıdan bunun üstüne eklenir. L-929 hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda ise 10µl'nin tamamı boş nano-taşıyıcıdan oluşmaktadır. Materyal-metot kısmında optimize formun elde edilmesinden bahsedildiği gibi formülasyon üretilip, daha düşük konsantrasyonlar elde etmek için ise bu formülasyon tampon çözelti (PBS) ile belirli konsantrasyonlarda seyreltilmiştir. Bu hacimlerin içinde kullanılan PBS DMSO içinde çözünmüş eş miktarda 5-FU ve DMSO pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Bahadori ve ark, 2014). Şekil 4.26'da görüldüğü gibi PLGA-Kil-5-FU nano kompozitinin IC₅₀ değeri anti-log 1,33 yani 21,30 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu değer literatürde 5-FU içeren kitosan-MMT nanopartikülünün A549 hücre hattına karşı elde edilmiş olandan (11,49 µg/ml)

(Kevadiya ve ark, 2012) yaklaşık iki kat daha çok olduğu görülmüş ve 5-FU moleküllerinin bizim hazırladığımız partiküle daha fazla yüklenebildiği ortaya çıkarılmıştır.



Şekil 4.26 : 5-FU içeren PLGA-Kil nano kompozitinin MCF-7 hücre hattı üzerinde 24, 48 ve 72. saatlerde gösterdiği sitotoksik etki profili.

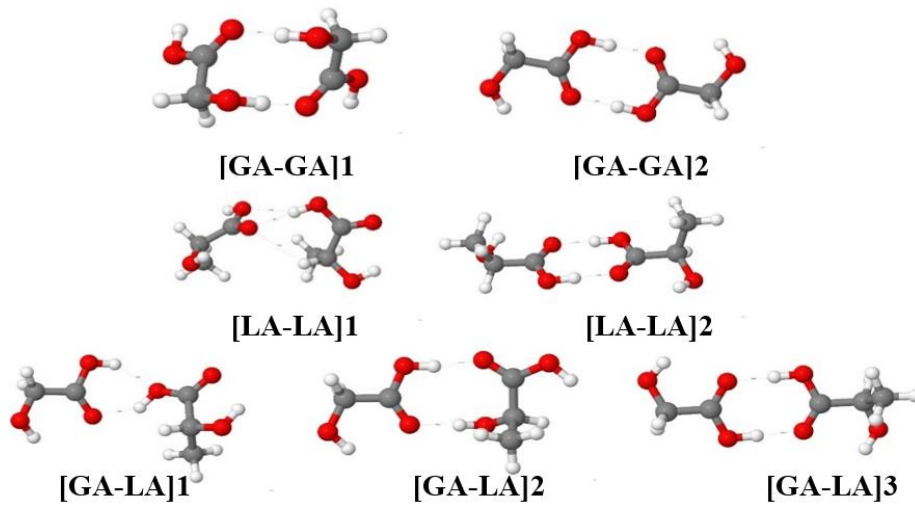
Öte yandan, Şekil 4.26'dan da görüleceği üzere, Curcumin ile hazırlanan nanopartikül ile karşılaştırıldığında, tamamen kanser hücrelerinin ölümüne sebebiyet verememektedir. Çünkü 15 µg Curcumin (en düşük konsantrasyon) bile kanser hücrelerinin %40'ını öldürebilirken 5-FU içeren partikülde bu oran %7 civarında kalmaktadır. Benzer olay, konsantrasyon arttırıldığında da görülmekte ve en yüksek konsantrasyonda 72 saatin sonunda sadece kanser hücrelerinin halen %40'ı canlı kalabilmiştir. Bunun iki nedeni olabilir: ya hazırlanan nanopartikül istenen duraylılıkta ve yeterince 5-FU adsorblanmamış ya da sitotoksite deneylerinde bir hata oluşmuş olabilir. Ancak üretilen her iki nanopartikül de kanserli hücrelerin ölmesine sebep olmuştur. Bu da hazırlanan formülasyonun kanser tedavisine yönelik olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Yapılan bu deneysel çalışmalar sonucunda kil, ilaç ve polimer üçlüsü arasındaki ilişki kısmen de olsa açıklığa kavuşturulmuştur. Ancak moleküler seviyede birbiriyle ne şekilde etkileştiği tam olarak açıklanamamıştır. Bu analizlerin ortak amacı kullanılan kilin kimyasal içeriklerinin yanında, ortaya konacak kil yapısının teorik çalışmalarımıza ışık tutmasıdır. Benzer şekilde PLGA sarmalının istiflenmesi ve Curcumin ilacının formunun da açıklığa kavuşturulmasıdır. Örneğin XRD ve XRF sonuçları neticesinde kilin kristal yapısında demir ve magnezyum gibi atomların olduğu ortaya çıkarılmışken. PLGA sarmalında kaybolan kilin hangi sitelerde ve ne şekilde adsorblandığı tamamen ortaya çıkarılamamış ve etkin mekanizma belirlenememiştir. Dolayısıyla deneysel çalışmalardan elde edilen ipuçları baz alınarak teorik olarak da birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Böylece ideal bir model ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

4.4 YFT çalışmaları

4.4.1 Küme modeller için YFT çalışmaları

PLGA kopolimeri hidroliz sonucunda monomerler halinde bozunur (Makadia ve Siegel, 2011). Dolayısıyla bu polimer su ortamı dışında tamamen çözünmediği, DCM ve aseton ortamlarında modellenmiştir. PLGA polimerine ait laktik (LA) ve glikolik asit (GA) monomerleri ile hazırlanmış ve periyodik olmayan modellerle hesaplamalı çalışmalar B97-D/TZVP baz seti ile gerçekleştirilmiş ve final geometrileri Şekil 4.27’de verilmiştir.



Şekil 4.27 : Farklı LA ve GA monomer dizilimlerine ait final geometrileri. Beyaz, gri ve kırmızı renkleri sırasıyla hidrojen (H), karbon (C) ve oksijen (O) atomlarını temsil etmektedir.

Şekil 4.27’de elde edilen her bir modelde 2 adet monomer bulunmaktadır. Örneğin GA1 modelinde 2 adet glikolik asit monomeri sergilenirken [LA-GA]1 modelinde ise laktik ve glikolik asit monomerlerinin birbiri ile olan etkileşimleri görülmektedir. Farklı konfigürasyonlar alınıp hesapsal çalışmalar da yapılmıştır. Önce, B97-D/TZVP baz seti kullanılarak vakum ortamında optimize edilmiş olan bu yapılar, daha sonra aynı baz seti COSMO modülü ile implisit olarak su, aseton ve diklorometan ortamda optimize edilip bağlanma enerjileri hesap edilmiştir. Bu yapıların birbiri ile olan etkileşimlerinin H-bağı sayesinde olduğu ve bağın yapılar ait hidroksil (–OH) gruplarındaki hidrojen ile diğer monomerdeki oksijen arasında oluştuğu tespit edilmiştir. Bu mesafeler, 3,0 Å mesafeden daha az olarak ölçülmüştür. Final geometrilerine ait aynı baz seti ile bağlanma enerjileri de hesaplanmış ve Çizelge 4.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 : Monomerlere ait yapılan bağlanma enerjileri [kJ/mol].

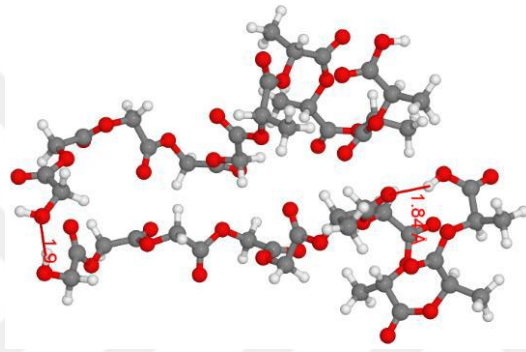
BE	[GA-GA]1	[GA-GA]2	[LA-LA]1	[LA-LA]2	[GA-LA]1	[GA-LA]2	[GA-LA]3
CP _{Vakum}	-56,53	-80,49	-37,87	-81,82	-44,37	-65,04	-81,37
non-CP	-61,35	-84,34	-40,27	-85,49	-47,18	-68,85	-85,15
CP _{Su}	-55,64	-81,77	-41,79	-82,62	-33,34	-66,53	-82,25
non-CP	-60,39	-85,44	-44,65	-86,16	-36,45	-70,29	-85,86
CP _{DCM}	-56,19	-81,46	-40,87	-82,37	-40,68	-66,43	-82,11
non-CP	-60,95	-85,18	-43,64	-85,94	-43,59	-70,20	-85,76
CP _{Aseton}	-55,85	-81,60	-41,38	-82,53	-34,00	-66,47	-82,25
non-CP	-60,6	-85,29	-44,20	-86,08	-37,03	-70,24	-85,87

Çizelge 4.8’de Şekil 4.27’deki final geometrilerine ait denklem 3.3’teki formül kullanılarak bulunmuş olan bağlanma enerji değerleri verilmiştir. non-CP satırındaki enerji değerleri, bağlanma enerjisi hesaplanırken baz seti esas alınmış, bir üstteki satırlar ise düzeltilmiş olanları (CP) temsil etmektedir.

Çizelge 4.8’de optimize olmuş polimer yapıların gaz ve su ortamında tüm modellerin birbirleri ile etkileşim sonuçları verilmiştir. Farklı konformasyonlarda çalışılmış olan modellemelerde, [GA-GA]2, [LA-LA]2 ve [GA-LA]3 yapılarının en olası ve kararlı yapılar olduğu ortaya konmuştur. Bu yapılar ait toplam enerji değerleri ve bağlanma enerjileri her ortamda diğer konformasyonlarından daha düşüktür. Örneğin; [GA-GA]2 modelinin aseton ortamında hesaplanmış BE enerji değeri -81,6 kJ/mol iken, [GA-GA]1 modeline ait BE enerji değeri -55,85 kJ/mol olarak bulunmuştur. Karşılaştırmalı olarak bakıldığında, LA monomerinin GA’ya nispeten -1 kJ/mol kadar

da olsa- daha çok bir arada bulunma eğilimindedir. Çözücü olarak da en uygun ortam aseton olarak saptanmıştır.

Bu modelde ele alınmış olan yapıtaşları, zincirlerin birbiri ile etkileşimde olduğunu göstermiştir. Ancak zincir sıralamasının bloklar mı yoksa rastgele mi olduğunu açıklamak için zincir uzunluğu 5'er adet LA ve GA olacak şekilde üretilen PLGA modellerinin kendi aralarında etkileşimi hesaplanmış ve sonuçlar Şekil 4.28'de verilmiştir. Şekil 4.28' de üst üste istiflenmiş beşer adet GA (glikolik asit) ve LA (laktik asit) monomerinin blok kopolimer şeklinde (5LA-5GA) bir araya getirilmesiyle oluşturulmuş bir PLGA zinciri görülmektedir.

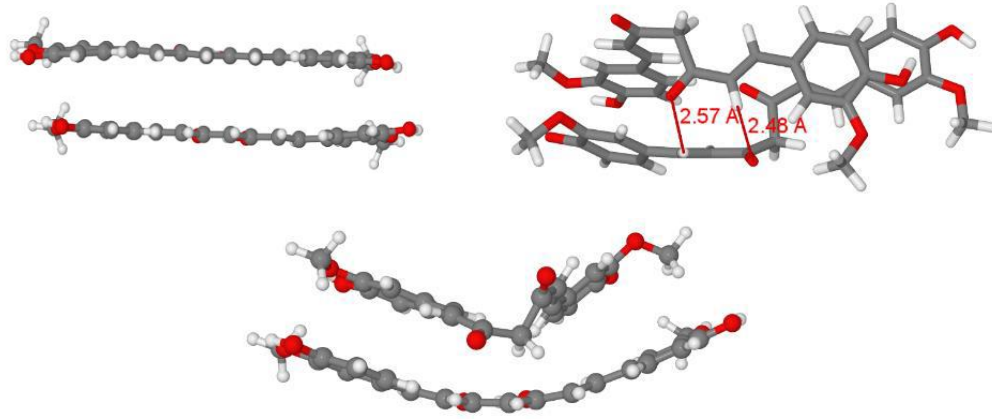


Şekil 4.28 : Beşer GA (üstteki) ve LA (alttaki) monomerinden oluşan optimize iki PLGA polimeri.

Aynı hesaplama yöntemiyle, bu PLGA zincirleri için de hem geometri optimizasyonu hem de optimize yapı kullanılarak bağlanma enerjisi hesaplanmıştır. Şekil 4.28'de PLGA polimerinin hem kendi içerisinde hem de diğer PLGA ile etkileşim halinde olduğu görülmektedir. Bu etkileşimler sırasıyla, 1,84 ve 1,90 Å hidrojen bağları olacak şekilde gösterilmiştir. PLGA zincirleri arasındaki etkileşim enerjisi de -131,90 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de görüldüğü üzere, PLGA polimeri zincir uzunluğundan bağımsız olarak birbiri ile etkileşim halindedir. Curcumin molekülleri ile olan etkileşimleri ortaya koymak için hem ilaç moleküllerine yakın uzunlukta hem de hesapsal işlemin hızlanması için PLGA polimeri en çok üçer adet GA ve LA blok kopolimeri şeklinde ele alınmış ve bundan sonraki bölümlerde bu yapı kullanılmıştır.

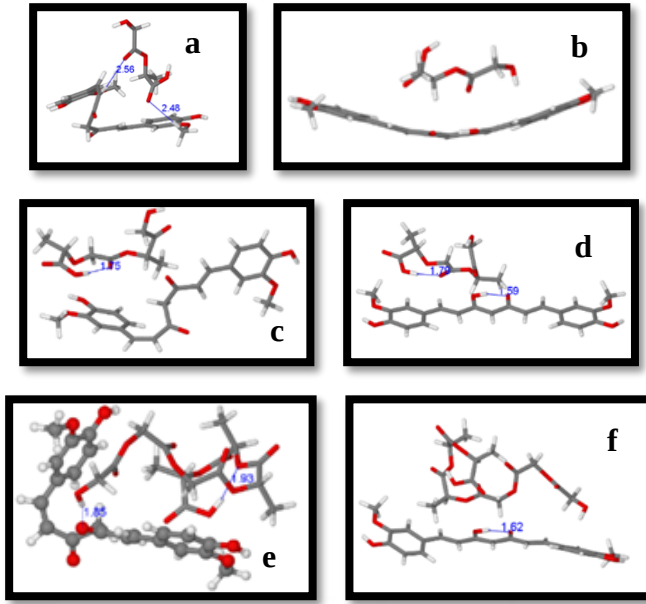
PLGA/Curcumin arasındaki etkileşimi modellemek için ilk olarak PLGA zincirlerinin birbiri ile olan etkileşimleri modellenmişti. Benzer şekilde, Curcumin ilacının enol ve keto formları ile olan etkileşimleri de aynı yöntemle modellenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 : Curcuminin formları arasındaki B97-D/TZVP seviyesinde modellenmiş final geometrileri.

Elde edilen bağlanma enerjileri, sırasıyla -76,8 (enol-enol), -123,12 (keto-keto) ve -97,55 kJ/mol (keto-enol) olarak hesap edilmiştir (Şekil 4.29). Curcuminin tautomerik formları arasında en güçlü etkileşim, keto-keto formu arasında elde edilmiştir. Bu sistemde, diğer formlarda da mevcut olan dispersiyon etkileşimine ilaveten zayıf hidrojen bağlarının (2,48 ve 2,57 Å) varlığı da mevcuttur. Enol-Enol dimeri paralel-kaymış (parallel-displaced) bir yapıya sahipken, keto-keto formu oldukça bozulmuş bir geometriye sahiptir. Enol-keto formunda da enol yapısının düzlemselliği bozulmuştur. PLGA zincirlerine ait BE enerjisi en kararlı olan keto-keto modelinin etkileşiminden yaklaşık 9 kJ/mol daha düşük elde edilmiştir.

Yaptığımız hesaplamalar hem ilaç monomerleri hem de PLGA zincirleri arasında bir etkileşim olduğunu ortaya koymuştur. Curcumin ve PLGA arasındaki etkileşimlerin nasıl gerçekleştiğini görebilmek için çeşitli konfigürasyonlar denenmiştir. Bu konfigürasyonlarda zincir büyüklüğünün artmasının bağlanma enerjisine olan etkisini ortaya çıkarmak için, PLGA zincirini meydana getiren asit monomerleri değişik miktarlarda kullanılmıştır. PLGA zinciri ve Curcumin konfigürasyonları (Şekil 4.30) yapılan geometri optimizasyonu sonucu hesaplanan bağlanma enerji verileri Çizelge 4.9’da verilmiştir. Çizelge 4.9’da da görüldüğü gibi, PLGA zincir uzunluğunun etkileşim enerjisine etkisini göstermek için PLGA zincirleri sistematik olarak arttırılmıştır. Bir LA ve GA monomerlerinden oluşan en basit PLGA zincirinde, Curcuminin keto biçimi oldukça bozulmuştur. PLGA’nın zincir uzunluğunun artması üzerine, molekül içi hidrojen bağları gelişmiş ve toplam bağlanma da artmıştır. Bu yüzden, Curcumin (keto) - LA₃GA₃ için curcumin ve PLGA arasındaki en güçlü etkileşim bulunmuştur (Şekil 4.30e).



Şekil 4.30 : Curcumin-PLGA yapıları. a) curcumin (keto) – LA₁GA₁ b) curcumin (enol) – LA₁GA₁ c) curcumin (keto) – LA₂GA₂ d) curcumin (enol) – LA₂GA₂ e) curcumin (keto) – LA₃GA₃ and f) curcumin (enol) – LA₃GA₃.

Göz önüne alınan sistemler arasında, yalnızca curcumin (keto) - LA₃GA₃'te, her iki solvent ortamında etkileşim enerjisini düşürerek daha güçlü bir hidrojen bağlanma (1.85 Å) etkileşimi gözlenmiştir. Bu sistem için hesaplanmış etkileşim enerjisi yaklaşık -110 kJ / mol, curcumin (enol) - curcumin (enol) ve curcumin (enol) - curcumin (keto) 'dan sırasıyla yaklaşık 32 ve 11 kJ / mol'den daha düşük olarak hesap edilmiştir. Bununla birlikte, curcumin (keto) - curcumin (keto) arasındaki etkileşim enerjisi, curcumin (keto) - LA₃GA₃'ten 14 kJ / mol daha düşük enerjide bulunmuştur. PLGA zincirinin uzunluğunun daha da artmasının, muhtemelen PLGA ve Curcumin arasındaki etkileşim enerjisini azaltabileceği de düşünülmektedir. Yine de, ilaç moleküllerinin kendiliğinden etkileşiminin, PLGA-ilâç etkileşimlerine kıyasla daha az elverişli olduğu sonucuna varılabilir.

Çizelge 4.9 : Curcumin/PLGA etkileşimlerinin enerjileri [kJ/mol].

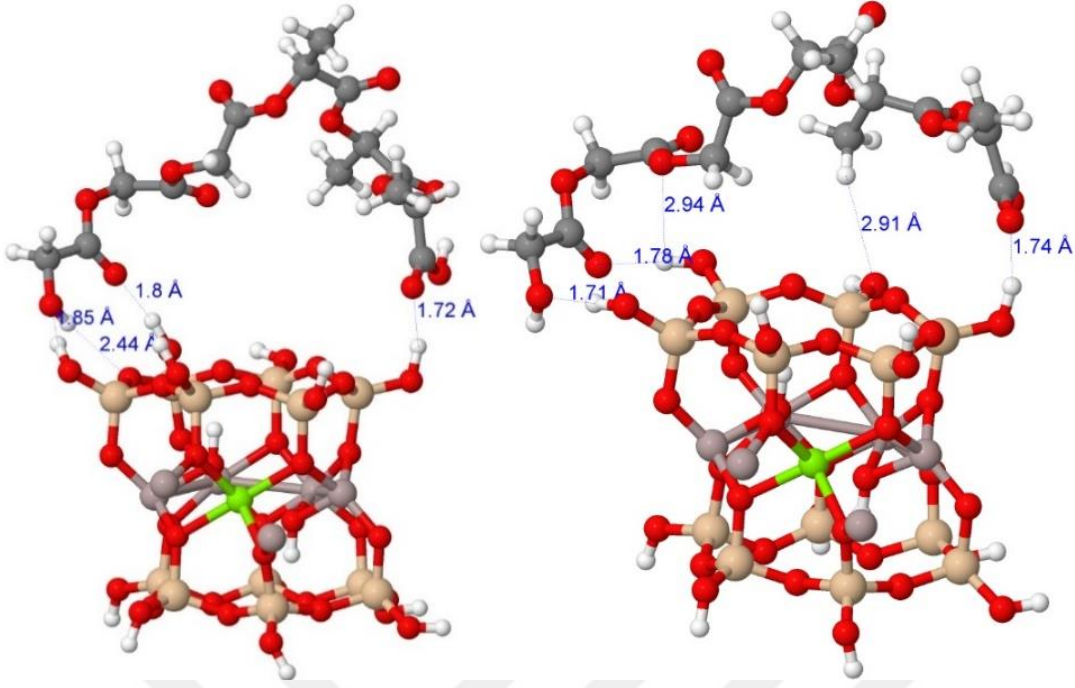
Model	acetone		DCM	
	CP	non-CP	CP	non-CP
curcumin (keto) – LA ₁ GA ₁	-39,62	-44,27	-33,74	-37,66
curcumin (enol) – LA ₁ GA ₁	-59,03	-64,52	-60,55	-66,14
curcumin (keto) – LA ₂ GA ₂	-70,11	-77,23	-70,29	-77,40
curcumin (enol) – LA ₂ GA ₂	-55,63	-61,03	-56,36	-62,06
curcumin (keto) – LA ₃ GA ₃	-109,22	-121,65	-110,50	-123,04
curcumin (enol) – LA ₃ GA ₃	-61,34	-61,57	-62,50	-68,70

Çizelge 4.9 ve Şekil 4.30'daki veriler bize, aseton ve DCM ortamında ele alınmış yapıların hem enol hem de keto formunun PLGA'nın her türlü formu ile etkileşebileceğini gösteriyor. Artan PLGA zincir uzunluğuna bağlı olarak keto formu ile oluşan Curcumin yapılarının enol etkileşimlerine nazaran daha çok bağlanma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Deneysel çalışmalarda 150-300 nm ye (Filipe ve ark, 2010; Holzer ve ark, 2009) kadar olan uzunluklara sahip PLGA polimeri ile Curcuminin birbiri ile etkileşimi, organik çözücü ortamında rahatlıkla gerçekleşmektedir. Bu iki Curcumin formu ile trimer yapıdaki PLGA polimerini ele alıp montmorillonit kilinin birim hücresinden (Viani ve ark, 2002) üretilmiş olan kil modelleri ile de YFT hesaplamaları tekrar edilmiştir.

4.4.2 PLGA/Curcumin ve kil etkileşimlerinin YFT ile modellenmesi

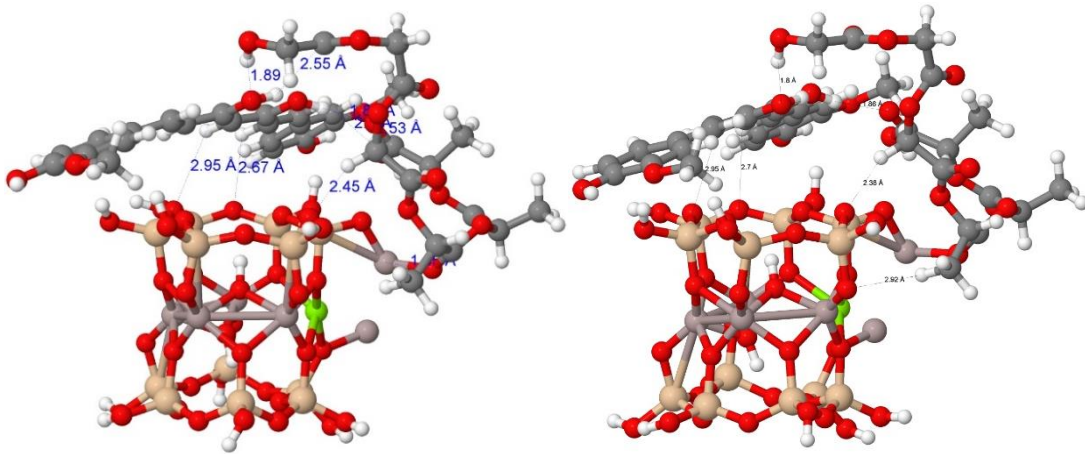
Deneysel çalışmalarda üretilmiş olan nano partiküllerin nihai düzeninin nasıl olduğunun anlaşılabilmesi için, hazırlanan farklı yapıdaki kil numuneleri ile bir önceki teorik modellemelere benzer çalışmalar tekrarlanmıştır. Bunlarla PLGA-Curcumin-MMT üçlüsünün arasındaki atomik ilişki ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Bunu gerçekleştirirken, Curcuminin enol ve keto formları ile PLGA trimeri (LA_3GA_3) yanısıra iki tetrahedron bir oktahedron tabaka (TOT) ve bir tetrahedron bir oktahedron tabaka (TO) şeklinde üretilen kil modelleri ile de ayrı ayrı YFT hesaplamaları gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak doğada tetrahedran-oktahedran-tetrahedran (2:1) (TOT) formda bulunan kil minerali temsilen üretilmiş ve hesaplama iş yükü elverdiği ölçüde düzenlenerek sırasıyla PLGA (Şekil 4.31), PLGA/enol (Şekil 4.32) ve keto-enol (ketonol) (Şekil 4.33) yapıları gaz ve su ortamında optimize edilmiştir. Şekil 4.31'de, oktahedral tabakadaki bir alüminyum atomu bir magnezyum atomu ile yer değiştirmek suretiyle elde edilmiş bir kil modeli görülmektedir. Burada su ortamındaki yapı gaz ortamındakine göre bazal yüzeye daha çok yaklaşmak eğilimindedir. Mesafelere bakıldığında ise, su ortamındaki yapının H-bağ mesafeleri, biraz daha düşük olarak hesap edilmiştir. Genelde O-H arasındaki bu H-bağ mesafeleri, su ortamındaki geometride PLGA ya ait metile ($-CH_3$) bağlı H ile silisyuma ait oksijen arasındaki 2.91 Å luk nispeten daha zayıf bir H-bağ mesafesi ölçülmüştür. -O-H arasındaki bu H-bağları yüzeylerdeki sanal hidrojenler tarafından ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle, PLGA'nın kil ile olan etkileşimi çok net anlaşılamamaktadır.



Şekil 4.31 : PLGA/TOT soldan sağa gaz ve su ortamındaki optimize geometrileri. Gri, beyaz, kırmızı, kavuniçi sarısı, mor ve yeşil renkler sırası ile karbon, hidrojen, oksijen, silisyum, alimünyum ve magnezyum atomlarını temsil etmektedir.

Etkileşimi daha iyi anlayabilmek için, bu model yapısının başlangıç koordinatlarına bir tane enol eklenerek, model tekrar optimize edilmiş ve Şekil 4.32’de final geometrileri oluşmuştur.

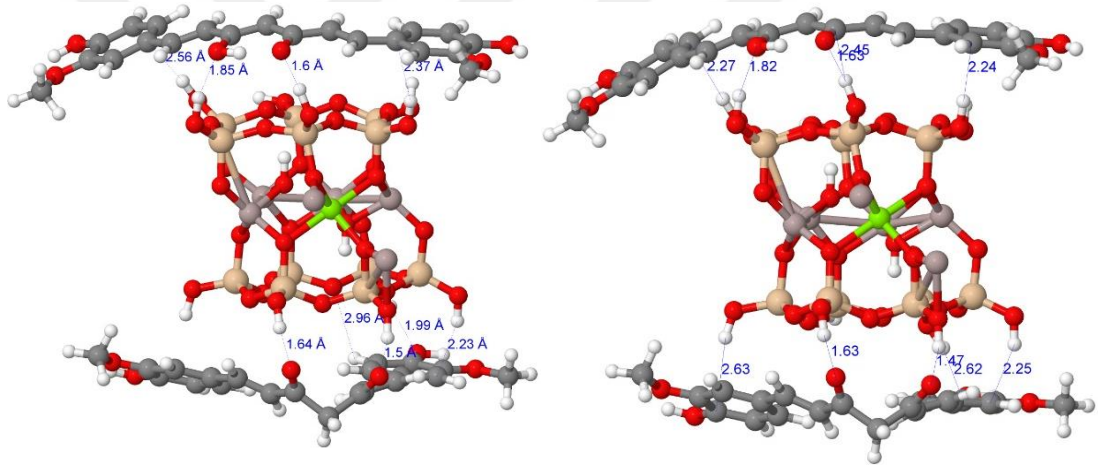


Şekil 4.32 : PLGA-enol/TOT soldan sağa gaz ve su ortamındaki optimize geometrileri.

Şekil 4.32’de, enol varlığında PLGA daha çok yana doğru kaymakta ve enol ise bazal yüzeye yerleşmeye çalışmaktadır. Moleküller arası bağlar daha çok PLGA-enol arasında oluşurken, enol yapısındaki –CH e ait hidrojen ile silisyumun oksijeni

arasında 2.67 ve 2.95 Å mesafede H-bağ oluşumu görülmektedir. Bu bağ mesafeleri su ortamında –beklendiği gibi- daha da küçük olarak ölçülmüştür. Öte yandan Şekil 4.31’de gözlenmeyen ve oktahedralde bulunan –Al- bağı koparak veya kırılarak tetrahedraldeki –O ve PLGA polimerindeki –OH ile etkileşime girerek –AlOH komplek yapısını meydana getirmiştir. Bundan enol varlığında PLGA/kil etkileşiminin iyileştiği varsayılabilir.

Son olarak, PLGA yerine bir tane keto yapısı konarak optimizasyon tekrarlanmış ve sonuç geometrileri Şekil 4.33’teki olarak elde edilmiştir. Şekil 4.33’de başlangıçta enol üstte ve keto ise altta olmak şartı ile optimizasyon gerçekleştirilmiş ve alınan bağ etkileşimlerinin diğer sistemlerde olduğu gibi -C-H, -O-H ve -SiO-H olduğu görülmüştür. Su fazdaki enol yapısı ise biraz daha bükülürken keto formu, hafifçe düzelme eğilimi göstermektedir.

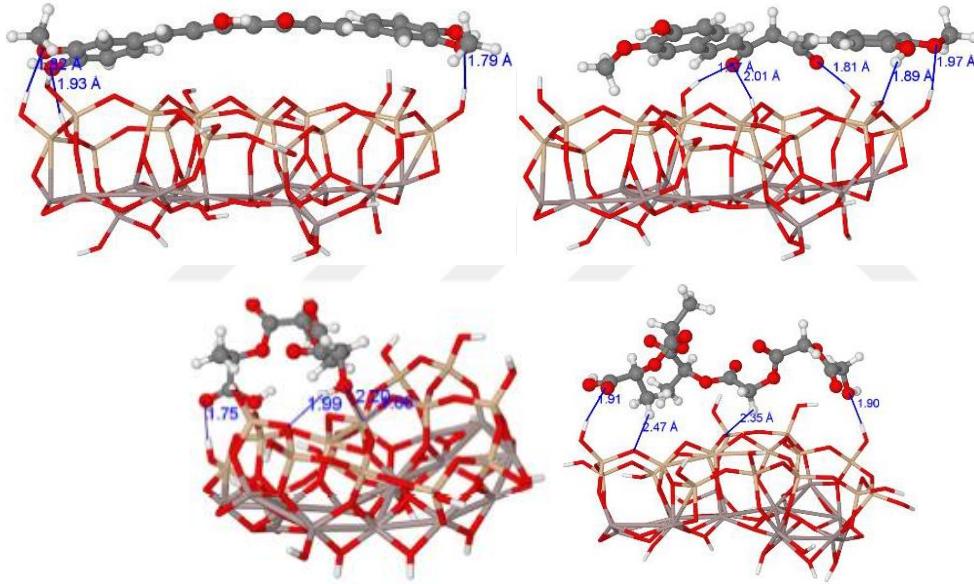


Şekil 4.33 : Soldan sağa ketonol/TOT gaz ve su ortamındaki optimize geometrileri.

Genel olarak bakıldığında, kısmen de olsa PLGA, enol ve keto formları sanal hidrojenlerle de olsa birbirileri ve kil modeli ile etkileşim halindedir. Buradaki en büyük handikap kil yüzeyinin diğer materyallere nazaran oldukça küçük olmasıdır. Organik moleküllere yakın olmayan kil yüzeylerin çok da etkin rol almadığı ortaya çıkmıştır. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında, 4 adet tetrahedrardan oluşan TO tabakası ile benzer çalışmalar gerçekleştirilmiş ve nihai modellerin bağlanma enerjileri benzer yöntemle B97-D/TZVP seviyesindeki gibi hesaplanmıştır. Gaz fazındaki eniyilemelerde montmorillonitin Şekil 4.34’te gösterilen bir kesiti alınmıştır. Bu kesitte bir tetrahedral ve oktahedral tabakasından oluşan montmorillonitin, Curcumin ve PLGA (LA_3GA_3) ile tam olarak etkileşebilmesi için yüzeyi yeterince

büyütülmüştür. Bu kesitteki tüm sallanan (dangling) bağlar daha önceki modellerde olduğu gibi hidrojen ile doyurulmuştur. Yüzey genişletildiğinde enol yapısına ait –CH formundaki hidrojenin silisyumun oksijeni ile daha çok bağ yaptığı görülmektedir. Bu da, enol biriminin bazal yüzeye adsorblanabileceğini göstermektedir. Ayrıca, MMT-enol modelinde oluşan tüm bağ çeşitleri, keto/TO modelinde de görülmektedir (Şekil 4.34). MMT-keto modelinde atom sayısı 1 tane az olmasına karşın, yaptığı bağ sayısı enol yapısına göre daha çoktur. Bu da keto yapısının MMT kiline daha güçlü bir biçimde adsorbe olabileceğini göstermektedir.

Curcumin yapıları dışında, PLGA polimerinin yüzeye adsorplanma bölgesini ve dolayısı ile olası istiflenme şeklini ortaya koymak amacı ile 2 farklı yapıda oluşturulmuş, PLGA polimeri ile TO yapısı için de geometri optimizasyonu yapılmıştır.



Şekil 4.34 : Sırasıyla (Sol üst) MMT-Curcumin (enol), (Sağ üst) MMT-Curcumin (keto) ve (Sol alt) MMT- LA₂GA₂, (sağ alt) MMT- LA₃GA₃ optimize modelleri.

Optimizasyon modellemesinin ilki, dimer kodlu ve ikişer tane LA ve GA, ikincisi ise, trimer kodlu üçer adet LA ve GA yapısından oluşmaktadır. Şekil 4.34'te sol alttaki geometri, MMT-LA₂GA₂ yapısını temsil etmektedir. Buradaki bağlanma ilişkilerine bakıldığında önceki modellerde oluşan C-H, O-H gibi bağ yapılarının yanında ilk kez GA yapısının baş kısmındaki hidroksil grubuna ait oksijen ile silisyum arasında bir – SiOH etkileşimi gözlenmektedir. Bu yapı su ortamındaki geometride de bulunmaktadır. Monomer sayısı birer arttırılmış sağ alttaki model de ise, benzer bağ

türleri oluşmakla birlikte, LA kısmı yüzeye daha fazla sayıda bağ yapmakta ve daha düzlemsel olarak yüzeye adsorplanmaktadır. Yukarıdaki optimize olmuş tüm modellerin bağlanma enerjileri hesaplanmış ve tüm sonuçlar Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.10 : Curcumin ve PLGA’nın MMT ile etkileşim enerjileri [kJ/mol].

Model	Vakum		Su	
	CP	non-CP	CP	non-CP
MMT-enol	-191,38	-217,10	-178,02	-203,02
MMT-keto	-275,80	-303,38	-266,30	-293,97
MMT-LA ₂ GA ₂	-201,47	-221,08	-197,67	-216,72
MMT-LA ₃ GA ₃	-165,23	-185,56	-157,97	-177,09

Optimize olmuş yapıların gaz ve su ortamında tüm modellerin birbirleri ile etkileşimi gözlenmektedir (Çizelge 4.10). Genel olarak, Curcumin-kil etkileşimi PLGA-kil’ e nazaran daha düşük enerjili olarak elde edilmiştir. Curcuminin enol formunun kil ile etkileşimine baktığımızda, Curcuminin uçlarında bulunun oksijenlerin kil yüzeyindeki hidrojenlerle etkileşim halinde oldukları görülmektedir. Benzer bir durum Curcuminin keto formu için de söz konusudur. Bunun nedeni, keto-kil etkileşimde daha fazla hidrojen bağı etkileşimi mevcuttur (Şekil 4.34). Ayrıca, keto formu enole göre daha düşük bir etkileşim enerjisine sahiptir. Örneğin; sulu ortamda keto formu yaklaşık 88 kJ/mol daha düşük bir etkileşim enerjisine sahiptir. Bunun, düzlemsel olarak optimize olan enol yapısının bağ yapmasını olumsuz etkilediği söylenebilir. PLGA temsilleri ile yapılan modellemelerde ise, MMT/LA₂GA₂ modelin üçlü modele göre ortalama 30 kJ/mol daha fazla enerji ile bağlandığı görülmektedir. Buradaki farkı yeni oluşan – SiOH formu belirlemiş olabilir. Ayrıca, su ortamında, gaz ortamına göre PLGA ve Curcumin yapılarının hidrofobisitesinden kaynaklanan ortalama 7 kJ/mol enerji düşüşü hesaplanmıştır. PLGA zinciri de, Curcumine benzer şekilde kilin yüzeyindeki hidrojenlerle etkileşime girerek kararlı bir yapı sergilemektedir. Ancak PLGA, Curcumine göre kil yüzeyine daha zayıf bir bağlanma göstermektedir. Bu aşamada ki hesaplamalarda Curcumin ve PLGA’ nın kil ile etkileşimde kil yüzeyindeki hidrojenlerin önemli olduğunu gördük. Gerçekte, bu hidrojenler kilin doğal yapısında bulunmamaktadır ve sadece küme hesaplamaları yapabilmek adına sonradan sisteme eklenmişlerdir. Sistemin bu “sanal” etkileşimlerle domine edilmesi hesaplarımızın doğruluğunu zedelemektedir. Bu nedenle, bundan sonraki kauntum mekanik hesaplamalarında kil, bir kesit olarak değil, montmorillonitin kristal yapısı olarak

kullanılmış ve sırasıyla, MMT-enol, MMT-keto ve MMT-PLGA modelleri için daha gerçekçi periyodik hesaplamalar yapılmıştır.

4.4.3 Periyodik YFT hesapları

Peryodik, yoğunluk fonksiyonel teori (YFT) hesaplamaları Materials Studio programı içerisinde yer alan CASTEP (Clark ve ark, 2005) modülüyle gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, Şekil 2.1'deki montmorillonit birim hücresi “XYZ” boyutları 3x3x2 defa genişletilip, 15.54 x 26.96 x 30.00 Å' lük triklinik bir süper-hücre üretilmiştir. Daha sonra, tek ve çift tabakalı montmorillonit içeren bu sistemde kil-Curcumin ve kil-PLGA (LA_3GA_3) etkileşimleri incelenmiştir. Bu modellemede, montmorillonit yüzeyinde “sanal” hidrojen bulunmamaktadır (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 : Soldan sağa doğru sırasıyla MMT-curcumin (enol), MMT-curcumin (keto)ve MMT/ LA_3GA_3 sistemleri.

Şekil 4.35'te tek tabakalı kil modelinin bazal yüzeylerine adsorbe olmuş organik moleküller ve bunların kendi atomları arasındaki etkileşimler görülmektedir. Kesikli mavi çizgilerle belirtilen, bu moleküllerin hidrojenleriyle kil yüzeyindeki oksijenler arasındaki etkileşimlerin sistemleri kararlı hale getirdiği saptanmıştır. Bu etkileşimler, MMT kilinin bazal yüzeyindeki silisyuma ait oksijen ile organik bileşiklerdeki -CH yapısındaki hidrojen arasında ve 3 Å mesafeden küçük H-bağ mesafeleridir. Önceki bölümde anlatılan periyodik olmayan YFT hesapları ile elde edilen nihai konfigürasyonlar periyodik YFT hesaplamalarıyla elde ettiğimiz modellerle karşılaştırıldığında organik moleküller hemen hemen aynı bağ türleri ile yüzeye bağlanmışken, kildeki bükülme ve büzüşme yok denecek kadar azalmıştır. Elde edilen yapılarda, enol düzlemsel, keto bükülmüş pozisyonda iken PLGA 3'lü yapısında LA monomerinin etkin olduğu aşıkârdır. Bu yapıyı daha iyi açıklayabilmek için, tüm

modellerin vakum ortamda bağlanma enerjisi hesabı gerçekleştirilmiş ve hesaben bulunan sonuçlar Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11’deki “MMT- LA_3GA_3 ” ifadesi sadece 1 adet organik molekülün 1 adet MMT kil tabakası üzerinde olduğu anlamına gelmektedir. Enol-kil ve keto-kil arasında oldukça yüksek bir etkileşim enerji farkı vardır, enol formundaki etkileşim sayısı ketoya nazaran daha düşük olmakta, buna paralel olarak keto formu ise daha güçlü bir şekilde kile adsorbe olmaktadır. Çizelge 4.11’deki modellere ait BE enerji değerlerinde, kil yapılarındaki yapay hidrojenlerin varlığına bağlı olarak, periyodik olmayan sistemlerle yapılan modelleme çalışmalarından elde edilmiş olan enerjilere göre çok büyük miktarda düşme gözlenmiştir. Örneğin, MMT-enol ve MMT-keto modelleri için elde edilen etkileşim enerji değerleri sırasıyla -1,52 ve -12,25 kJ/mol iken Çizelge 4.10’daki küme hesaplamalarıyla karşılaştırıldığında oldukça düşüktür.

Çizelge 4.11 : Kil-Curcumin ve Kil-PLGA sistemlerinin bağlanma enerjileri.

Model	BE [kJ/mol]
MMT- LA_3GA_3	-6,75
MMT-enol	-1,52
MMT-keto	-12,25
MMT-2x[LA_3GA_3]	-0,40
MMT-keto/ LA_3GA_3	-10,52
MMT-keto/enol	-16,87
MMT-enol/ LA_1GA_1	-4,67
MMT-enol/ LA_2GA_2	-32,06

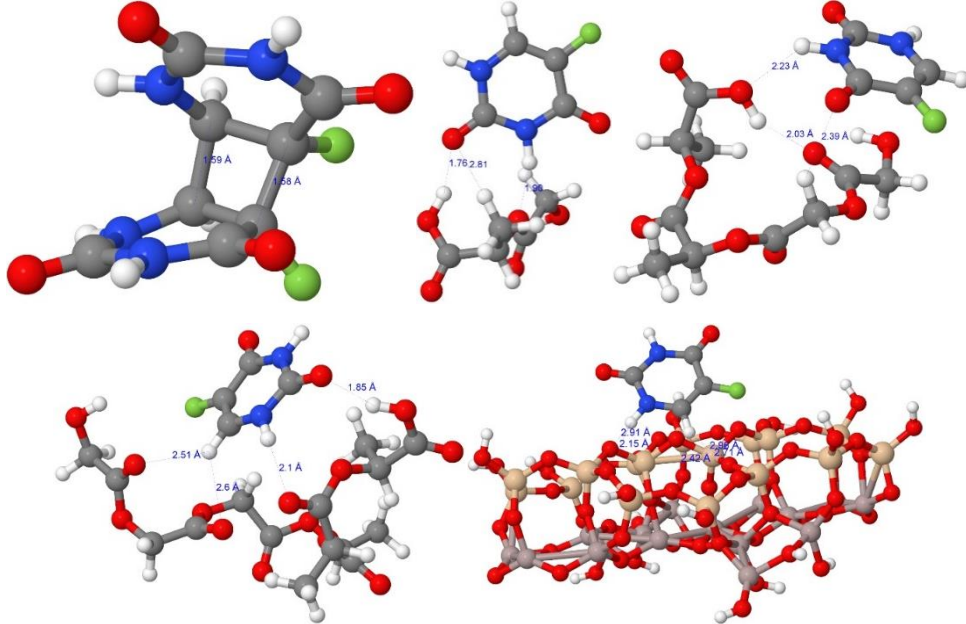
PLGA-kil arasındaki etkileşim için de benzer bir durum söz konusudur. Bu ikilinin etkileşim enerjileri Çizelge 4.10’daki CP-düzeltilmiş değerleriyle karşılaştırıldığında yaklaşık 160 kJ/mol daha az elde edilmiştir. PLGA-kil ve Curcumin-kil periyodik YFT etkileşim enerjileri de kıyaslandığında, keto-kil sisteminin PLGA-kilden 22,81 kJ/mol daha düşük bir enerjiye sahip olduğu görülmektedir. Buradan Curcuminin PLGA’ dan ziyade, kille etkileşime daha meyilli olduğu anlaşılmaktadır. Tek tabaka kil üzerine 2 adet farklı organik molekül konduğunda ise BE’nin daha da arttığı görülmüştür. Örneğin; 1 adet keto ve 1 adet PLGA trimeri tek tabaka kil üzerine konduğunda BE - 10,52 kJ/mol iken, 1 adet keto ve 1 adet enol konduğunda ise bağlanma enerjisi -16,87 kJ/mol olmaktadır. PLGA zincir uzunluğu azaltılıp, monomer ve dimer şeklindeki enol

ile birlikte tek tabaka kil üzerine konduğunda ise değerler sırasıyla -4,67 ve -32,06 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

Yapılan kuantum mekanik hesaplamaların, küçük sistemler için oldukça doğru sonuçlar verdiği sonucuna varılmıştır. Ancak büyük sistemler için çok fazla hesaplama kaynağına gereksinim gösterdiklerinden kullanımı elverişli değildir. Bu nedenle, kil-Curcumin-PLGA’ dan oluşan büyük sistemi daha gerçekçi boyutla çalışabilmek için moleküler dinamik (MD) simülasyonlar daha uygun bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yüzden, bir sonraki bölümde daha büyük ve çok atom içeren modeller ele alınarak MD simülasyonlar gerçekleştirilmiştir.

4.4.4 5-FU ile yapılan YFT hesaplamaları

Curcumin içeren modellere benzer biçimde 5-FU molekülü ile de oluşturulan yapılara ait YFT çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak periyodik olmayan hesaplamalar yapılmış ve modellere ait bağlanma enerjileri hesap edilmiştir. Bu hesaplamalar sonucu, Çizelge 4.12’de enerji değerleri olan en kararlı konfigürasyonlar Şekil 4.36’da verilmiştir.



Şekil 4.36 : 5-FU molekülü ile elde edilmiş modellere ait en kararlı konfigürasyonlar.

Şekil 4.36’da yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla, 5-FU-5-FU, 5-FU-LA₁GA₁, 5-FU-LA₂GA₂, 5-FU-LA₃GA₃, ve 5-FU-MMT modellerini temsil etmektedir. İlaç-ilaç etkileşiminde güçlü karbon-karbon etkileşimi gözlenmiştir. Diğer modellerde ise, 5-

FU molekülü diğer moleküllerle H-bağı yaparak kararlı hale gelmiştir. Bu yapılara ait bağlanma enerji değerleri Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12 : 5-FU içeren modellere ait bağlanma enerjileri [kJ/mol].

Model	Vakum		Su		DCM		Aseton	
	CP	non-CP	CP	non-CP	CP	non-CP	CP	non-CP
5-FU-5-FU	-433,95	-445,69	-407,63	-419,40	-413,60	-425,43	-408,42	-420,26
5-FU-LA ₁ GA ₁	-51,16	-54,72	-52,80	-56,61	-52,75	-56,50	-52,75	-56,54
5-FU-LA ₂ GA ₂	-44,81	-50,14	-43,11	-47,94	-43,31	-48,25	-42,66	-47,55
5-FU-LA ₃ GA ₃	-89,93	-96,67	-86,46	-92,86	-88,03	-94,50	-87,65	-94,07
5-FU-MMT	-60,33	-67,59	-54,01	-61,93	-58,69	-66,40	-56,88	-64,72

Çizelge 4.12’de gözlenen en önemli durum, Şekil 4.36’da da görüleceği üzere, aromatik halkalar arasındaki kovalent bağ oluşumundan dolayı bağlanma enerjisinin çok büyük çıkmış olmasıdır. İki 5-FU monomeri bir araya gelerek adeta bir yeni molekül oluşturmuşlardır. Öte yandan, ortam değişse bile zincir değişmedikçe ilaç ve polimer arasındaki etkileşim çok değişmemektedir. Örneğin, vakum ortamda -51,16 kJ/mol olan monomer ilaç etkileşimi, örtük (implisit) su ortamında -52,80 kJ/mol olarak hesaplanmıştır.

Artan zincir uzunluğuna bağlı olarak ise bağlanma enerjileri arasındaki fark yavaşta olsa giderek artmaktadır. 5-FU molekülünün MMT bazal yüzeyine adsorbsiyonu da ortalama 56 kJ/mol olarak bulunmuştur. Curcumin içeren modellerde olduğu gibi, periyodik olarak 1 tane 5-FU molekülü tek tabaka kilin (001) bazal yüzeyine yerleştirildikten sonra optimize edilmiş ve bağlanma enerjisi +0,21 kJ/mol olarak hesaplanmıştır ve hiçbir H-bağı görülememiştir. Buradan, periyodik olmayan modellerdeki yapay hidrojenler sayesinde oluşan H-bağ etkileşiminin 5-FU molekülünü kil yüzeyinde kararlı bir şekilde tuttuğu düşünülmektedir.

4.5 Moleküler Dinamik (MD) simülasyonları

Bu bölümde deneysel olarak geliştirilen nanopartikülü oluşturan bileşenlerin birbiri ile olan etkileşimleri MD simülasyon hesaplamalarıyla ortaya konmuştur. Cevaplanmayı bekleyen temel soru; PLGA ile Na-MMT’nin nasıl bir ilişki içerisinde oldukları idi ve bu sorunun deneysel çalışmalarla bir kısmı çözülmüşken üçlünün atomik skalada birbirleri ile olan etkileşim ve uyumu kuantum mekanik yöntemlerin yanında MD simülasyonları ile açıklığa kavuşturulmuştur. MD simülasyonları ile hedeflenen amaç,

ilaç moleküllerinin adsorbsiyonu ve salımını açığa çıkarmaktır. Literatürde, yapılmış benzer çalışmalar mevcuttur. Chen ve arkadaşları tarafından yayınlanan derlemede (Chen ve ark, 2008) polimer-kil etkileşim sonuçları Şekil 3.3'te de olduğu gibi, geleneksel, interkale ve eksfoliye kompozitler olarak üç farklı sınıfta toplanmıştır. MD çalışmalarına da yer veren bu ve benzeri çalışmalarda (Hughes, 2005; Li ve Hou, 2010) kil ve polimerin kimyasal yapısının yanı sıra oluşacak olan kompozit türünün bu iki bileşenin konsantrasyonuna da bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu, yapılmış olan deneysel ve teorik çalışmalarla aydınlığa kavuşmuş en önemli durumdur. Bunun için, kuantum kimya teknikleri kullanılarak modellenmiş üç bileşen MD araçları ile de simüle edilmiş ve konu etraflica araştırılmıştır. İlk olarak 10000 atomdan daha düşük ve sadece kilin yüzey olarak kabul edildiği çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Modellemelerde, PLGA trimer ve dekamer gibi kısa zincir uzunluklu seçilirken, Curcumin 1 adet, 5-FU ise 3 adet olarak alınmış, olası adsorbsiyon siteleri ve formları, çeşitli görseller ve analizlerle ortaya çıkarılmıştır.

4.5.1 Na-MMT yüzeylerinde Curcumin/PLGA kompozitinin MD simülasyonları

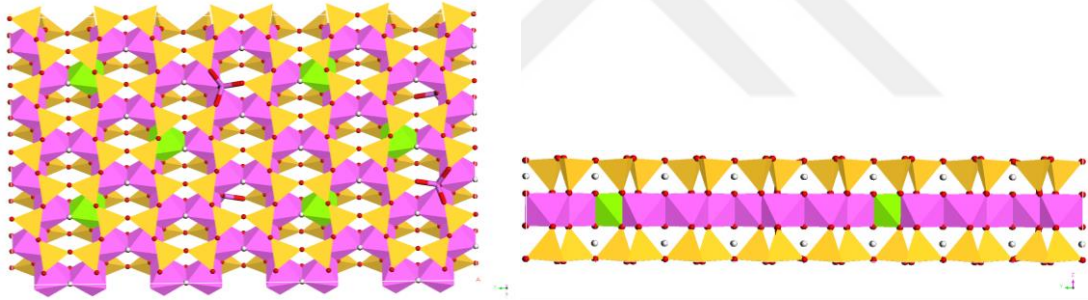
Simülasyonlara başlamadan önce kile ait 85 meq/100g katyon değiştirme kapasiteli model üretilmiştir. Bunun için kil birim hücresinin “XYZ” boyutları, 4x4x2 olacak şekilde 2 tabaka haline getirilmiştir. Literatürdeki çalışmalarda (Fermeglia ve ark, 2003; Tanaka ve Goettler, 2002) birim hücre formülü (4.1) no'lu eşitlikteki gibi olan kil modelleri için ise, izomorfik yerdeğiştirme baz alınarak 85 KDK motifli bir model elde edilmiştir.

$$M_xSi_8(Al_{[4-x]}Mg_x)O_{20}(OH)_4 \quad (4.1)$$

Burada, M sodyum atomunu (Na) temsil ederken x tabaka yükünü belirtmektedir. Montmorillonitin ampirik formüldeki stokiyometrik oranı düşünülerek “ x ” 0.625 alındığında kil modelinin toplam moleküler ağırlığı 733.32 g/mol olarak bulunur. Buna bağlı olarak KDK yaklaşık olarak 85.23 meq/100g olarak hesap edilmiştir. Modellenen yapıda izomorfik yerdeğiştirme adedi, herbiri 16 adet birim hücreden oluşan tabakalar için 10 adet olarak bulunmuştur. Bu da bize, herbir tabaka için 10 tane yer değiştirme yapılabileceğini göstermektedir. Heinz ve Zheng'in yaptıkları 2 ayrı çalışmada (Heinz ve Suter 2004; Zeng ve ark, 2003) bu izomorfik yerdeğiştirme ele alınmıştır. Makaledeki veriler tabakaları oluşturan tetrahedran/oktahedran oranını 40/60 olarak seçmemizde etkili olmuştur. Bu oran, kilin deneysel XRD paternindeki

tabaka içi yerdeğiştirme oranlarına bağlı olarak 20/80 olacağı gibi 100/0 veya 0/100 olarak da ele alınabilir. Birbirine simetrik olacak biçimde tabakaların tetrahedran kısımlarında Si^{4+} yerine Al^{3+} ve oktahedranlarında Al^{3+} yerine Mg^{2+} yer değiştirmesi yapıldı. Bu substitüsyon sonucunda sistemde, kil tabakalarına ait negatif yük yoğunluğu ortaya çıkmıştır. Bu negatif yükü nötralize edebilmek içinse tabaka aralarına ve bazal boşluğa eşit olacak şekilde sodyum iyonu (Na^+) ilave edilerek Na-MMT modeli üretildi. Şekil 4.37’de verilmiş olan Na-MMT modeline ait nihai kimyasal kompozisyon

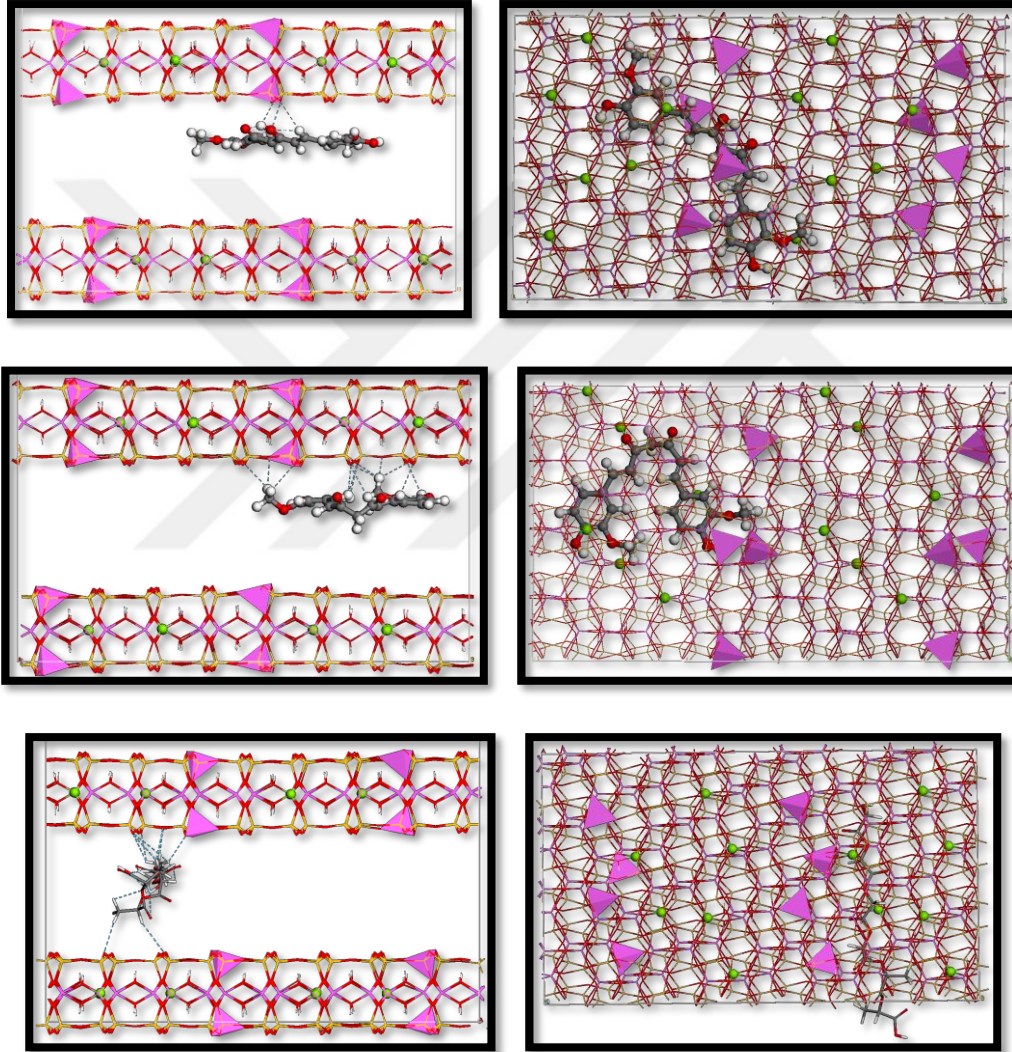
$[(\text{Na}_{0,625})\text{Si}_8(\text{Al}_{3,375})(\text{Mg}_{0,625})\text{O}_{20}(\text{OH})_4].n(\text{H}_2\text{O})$ olarak netleşmiştir. Şekil 4.37’de gösterilen tek tabakalı super hücrenin “Z” eksenı boyunca kendisinin imajı ile etkileşmesini önlemek ve yeterli oranda bazal yüzeye su ilave edebilmek için bu eksen 200 Å olarak uzatılmış ve $20 \times 36 \times 200 \text{ Å}^3$ olarak boyutlandırılmıştır. 1300 adet bazal yüzeye, ampirik formülünde olduğu gibi her bir birim hücreesine 10 adet olacak şekilde tabakalar arasına 160 adet su molekülü ilave edilmiştir. İlk MD çalışmaları Curcumin/PLGA kompozitinin çift tabakalı Na-MMT kilinin tabakalar arasına eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.37 : MMT kilinin üstten (sol) ve yandan (sağ) polihedron stilindeki görünümü. Kırmızı, beyaz, sarı, yeşil ve pembe renkleri sırasıyla oksijen, hidrojen, silisyum, magnezyum ve alüminyum.

Simülasyon çalışmaları Materials Studio 4.2 versiyonunda (v 4.2 Accelrys, San Diego, CA, USA, 2007) yer alan “Discover” modülü kullanılarak yapılmıştır. Periyodik olan bütün MD simülasyonlarında parametrizasyon CVFF kuvvet alanı ile gerçekleştirilmiştir. Yapısal düzensizlikleri minimize etmek ve potansiyel enerjiyi denge haline getirmek için de Steepest Descent yöntemi ile 10000 adımlık bir minimizasyon yapılmıştır. Sabit sıcaklık (andersen) ve basınç (berendsen) topluluğunda (NPT), 1 fs süre aralıklarla 1 ns simülasyon koşturulmuştur. Bu başlangıç parametreleri baz alınarak ilk olarak enol/kil ilişkisi incelenmiş, sonrasında ise sırasıyla keto ve PLGA moleküllerinin ayrı ayrı tabakalar arasındaki oryantasyonu

simüle edilmiştir. PLGA amfifil özelliğine sahip bir polimerdir. Hidrofil ve hidrofob siteleri bulunmaktadır. Hidrofil kısmı ile kilin tabakalaşması ve yüzeyinin aktifleşmesi amaçlanırken. hidrofob kısmı ile de hidrofob olan Curcumin ketonol formları ile tutunması hedeflenmiştir. Simülasyonlar sonucu Curcumin, PLGA ve kil etkileşimleri XRD ve ortalama karesel yakınsaklık “mean square displacement” (MSD) analizleri ile ortaya konmuştur. Şekil 4.38’de figürlerin daha iyi anlaşılması için araştırma konusu olmayan sular gösterilmemektedir.

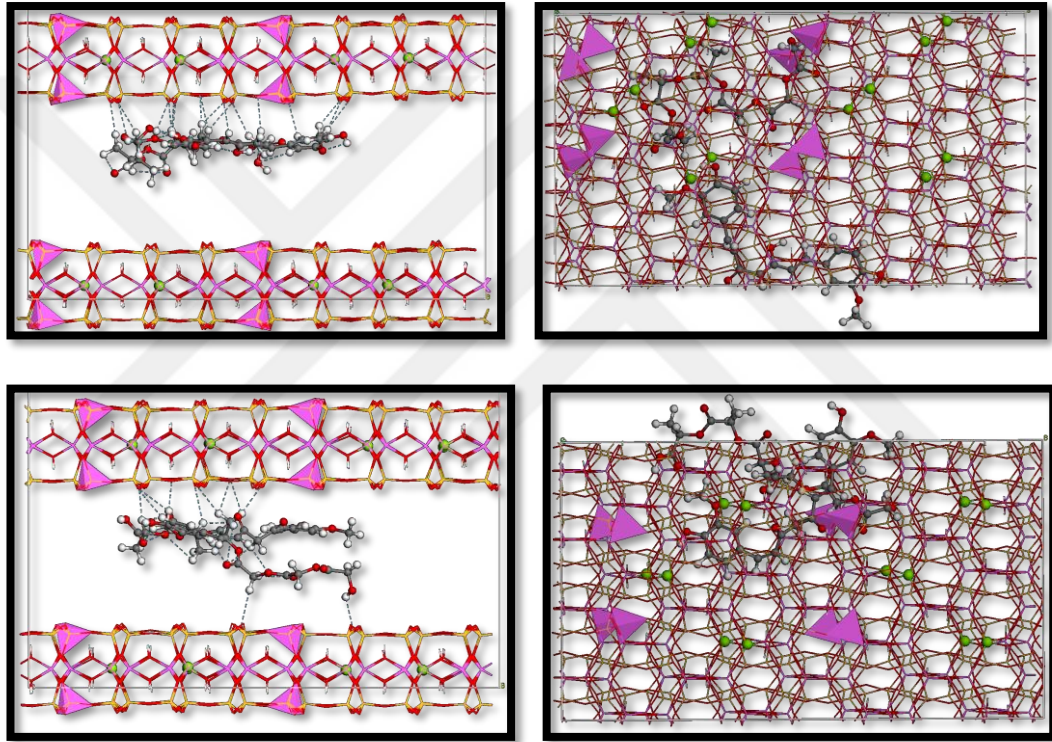


Şekil 4.38 : Enol (üstte), keto (ortada), PLGA (altta) modellerinin ayrı ayrı tabakaları arasındaki 1 ns sonraki görüntüleri.

Şekil 4.38’deki ilk iki figür enol yapısına aittir ve bakıldığında enol, yerdeğiştirmiş olan alüminyum ve silisyum iyonlarının ortasına doğru hafif bir kıvrımla, tabakalar arasında kalma eğilimi göstermiştir. Şekil 4.38’de ortadaki resimlerde görülen keto/kil yapısında ise, enole nispeten keto daha çok kıvrılmış ve daha çok oktahedral

tabakadaki yerdeğiştirmeye doğru kayarak konumlanmıştır. Son olarak, trimer formdaki PLGA polimeri en az kıvrımla ve yerdeğiştirmenin yoğun olduğu düzlem boyunca yerleşmiş olarak gözlenmiştir. Her üç modelde de organik molekül, $-\text{SiO}$ tabakalarına doğru yönelmişken, moleküllere yakın bölgedeki sodyum iyonları diğerlerine nazaran biraz daha uzaklaşarak su moleküllerinin diğer tabakaya yaklaşmasını sağlamıştır.

Böylece her üç simülasyonda da bir adsorblanma gözlenebilmektedir. İlk iki modele üçüncü modeldeki PLGA ilave edilerek simülasyonlar tekrarlanmış ve 1 ns sonraki konfigürasyonlar Şekil 4.39’da verilmiştir.

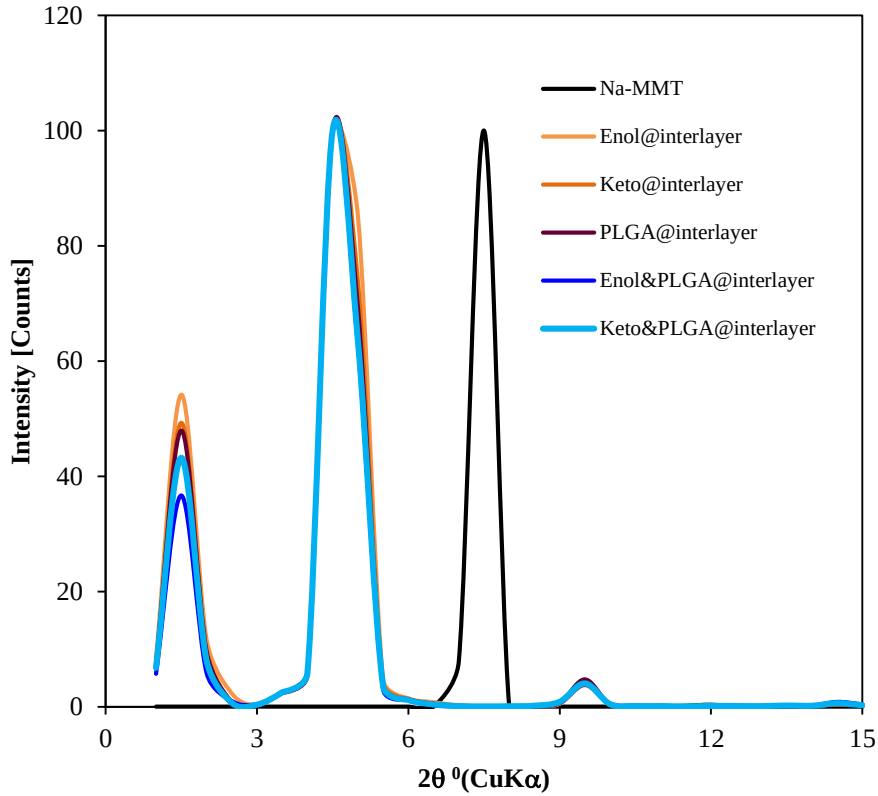


Şekil 4.39 : PLGA/enol (üstte) ve PLGA/keto (altta) kompozitlerinin Na-MMT tabakaları arasındaki final geometrisi.

Şekil 4.39’da PLGA/enol modellerinde enol Şekil 4.37’deki figüre nazaran biraz daha keskin bir kıvrım göstermiş ve yerdeğiştirmenin olmadığı bir bölgede tutunmuştur. PLGA/keto sistemlerinde ise keto Şekil 4.38’deki ile karşılaştırıldığında çok daha düzlemsel hale gelmiş ve hemen hemen Şekil 4.39’daki enol bölgesi civarına kaymıştır. Ayrıca sodyum iyonları ve su moleküllerinde çok büyük bir değişim gözlenmemiştir. Yapılan simülasyonlarda da görüleceği üzere, oluşan konfigürasyonlarda hem enol hem de keto formdaki Curcuminin kil tabakaları arasına yüklenebileceği görülmektedir. Curcumin, kilin yüzeyine yakın ve kendi etrafındaki

suları uzaklaştırarak Na-MMT kiline adsorbe olmaktadır. Tabakalar arasında PLGA varlığında ise, tek başına kıvrım halinde duran keto formu, bu davranışını terk edip enol form şeklinde durmak istemektedir.

Na-MMT kilinin yapısında meydana gelen değişiklikler Materials Studio programında bulunan Reflex modülü ile yapılan XRD analizleri sonucu ortaya konmuştur (Şekil 4.40). Saf kile ait hesaplanmış olan (001) yüzeyinin bazal mesafesi deneysel çalışmalarda aldığımız değere çok yakın olan 11.78 Å bulunmuştur. Simülasyonda oluşturduğumuz 5 modelin tabakalar arası mesafesi ise, sola doğru kayarak 19.62 Å olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.40). Curcumin ve PLGA için tabakalaşma mesafesinin aynı olmasının nedeninin miktarlarının azlığı, ilacın hidrofobisitesi ve polimer zincirinin kısalığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



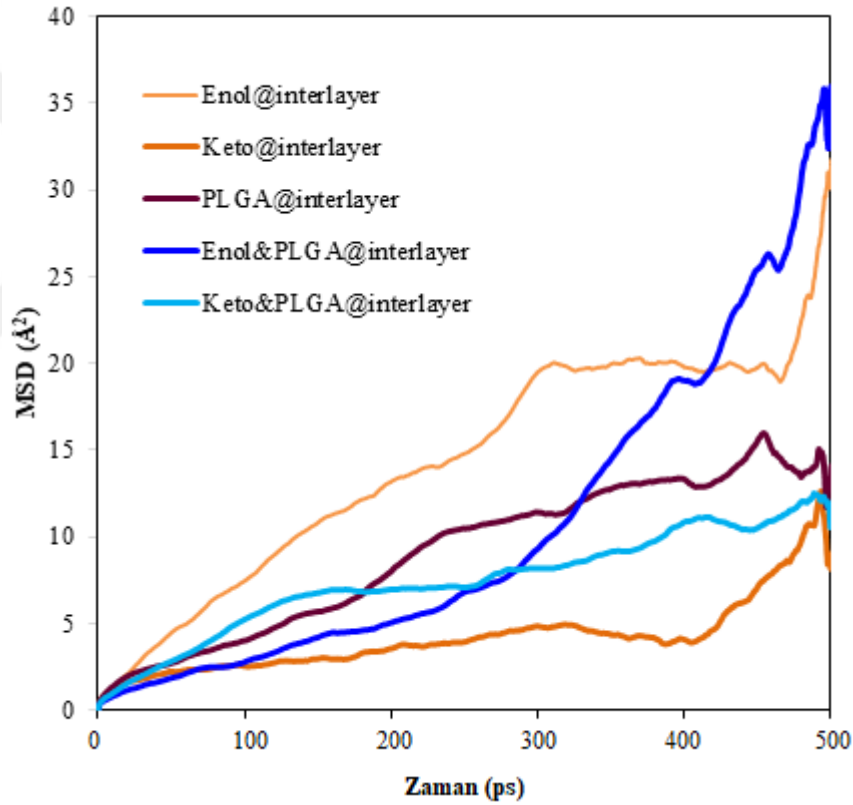
Şekil 4.40 : Tüm modellerin XRD paternleri.

Şekil 4.40'ta gözlenen sola kayma da, Na-MMT kilinin yapısında meydana gelen değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, saf kilde hesaplanan tek bir pikin modifiye ve muamele edilmiş modellerde sayısal olarak çok daha fazla sayıda olduğu görülmüştür. Bu değişiklikler, literatürde de sıkça bahsedilen şişme ve tabakalaşma olgularıdır. Bunlara su ve PLGA dışında Curcumin de sebep olmaktadır. 4 bileşeni

olan bu sistemlerde Curcuminin şişen killerde ve sulu ortamlarda difüzyon katsayısını hesaplamak için MSD analizleri 0,5-1,0 ns aralığında yapılmıştır. Hesaplanan bu eğriler Şekil 4.41’de verilmektedir. Şekil 4.41’deki eğrilerin eğimi kullanılarak Difüzyon katsayısı hesaplanmıştır. Bu katsayı, Green ve Kubo’nun yapmış oldukları 2 ayrı çalışma (Green, 1952; Kubo, 1957) baz alınarak geliştirilen ve denklem 4.2’de verilmiş olan Einstein yaklaşımı ile bulunmuştur.

$$\text{Slope}=2dDt \quad (4.2)$$

Burada, d sistemin boyut sayısını ($d=3$), t eğrilerin üretilirken geçen simülasyon süresini ($t=0.5$ ns) ve D cm²/s biriminde difüzyon katsayısını temsil etmektedir. Sıcaklık ise 298° K olarak alınmıştır.



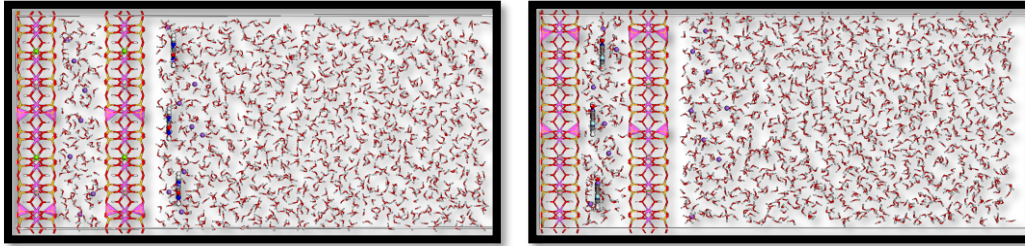
Şekil 4.41 : Simüle edilen modellerin 0.5-1 ns arasındaki MSD eğrileri.

Şekil 4.41’deki MSD eğrilerinin eğimleri kullanılarak her bir modeldeki Curcumin molekülünün karbon (C) atomuna ait difüzyon katsayısı PLGA polimerinin olmadığı modellerde enol formu için 1.08×10^{-6} cm²/s ve keto formu için $2,77 \times 10^{-7}$ cm²/s olarak hesaplanmıştır. Tabakalar arasındaki enol formundaki Curcumin keto forma göre daha fazla difüze olmuştur. Sadece PLGA trimerinin olduğu modele ait katsayı ise

$4,70 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak hesaplanmıştır. PLGA ile enol ve keto formlar ayrı ayrı sisteme ilave edildiğinde ise bu katsayılar, sırası ile enol ve keto için $1,17 \times 10^{-6}$ ve $3,83 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak hesap edilmiştir. PLGA varlığında enol formun difüzyonunda büyük bir değişiklik olmamasına rağmen, keto formunda penetrasyon hızı belirgin bir şekilde artmaktadır. Bunun nedeninin, PLGA varlığında keto formundaki büyük değişiklikten kaynaklanabilmiş olabileceği düşünülmüştür. Keto formundaki Curcuminin PLGA ile etkileşiminin yanında, PLGA varlığında kil ile de etkileşimi artmış olabilir.

4.5.2 Na-MMT yüzeylerinde 5-FU/PLGA kompozitinin MD simülasyonları

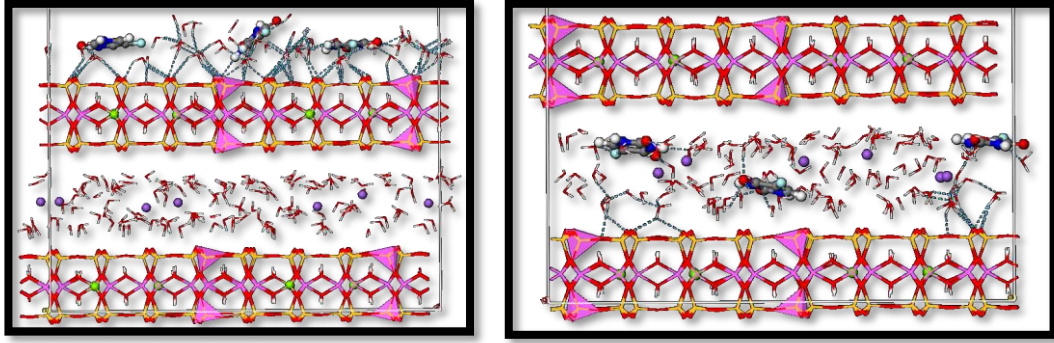
5-FU ilacının kile yüklenip yükelenemeyeceğini ortaya koymak için iki farklı model üzerinde Moleküler Dinamik (MD) simülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 5-FU ilacının su varlığında 3 adet 5-FU ilacının dış yüzeyde birikmesi sonucu oluşan modeller ve tabakalar arasında da bulunma durumuna göre 2 farklı konfigürasyon (Şekil 4.42) inşa edilerek yapılmış olan simülasyonlardır. İkinci simülasyonlar, ise 10'ar adet LA ve GA yapıtaşından üretilen PLGA zinciri varlığında bazal yüzey ve tabakalar arasında 5-FU ilacının kil ile olan etkileşimlerini içermektedir. Bu MD simülasyonlarındaki tüm başlangıç parametreleri daha önceki ile aynı alınmıştır. Sadece simülasyon süresi 300 ps ile sınırlandırılmıştır. Simülasyon sonuçları XRD, MSD ve açısız dağılım fonksiyon (RDF) analizleri ve çeşitli şekiller ile desteklenmiştir.



Şekil 4.42 : Bazal ve tabakalar arası 5-FU ilacının konumlanması ile oluşturulan 4x4x2 büyüklüğündeki Na-MMT kili ve su moleküllerini de içeren başlangıç geometrileri.

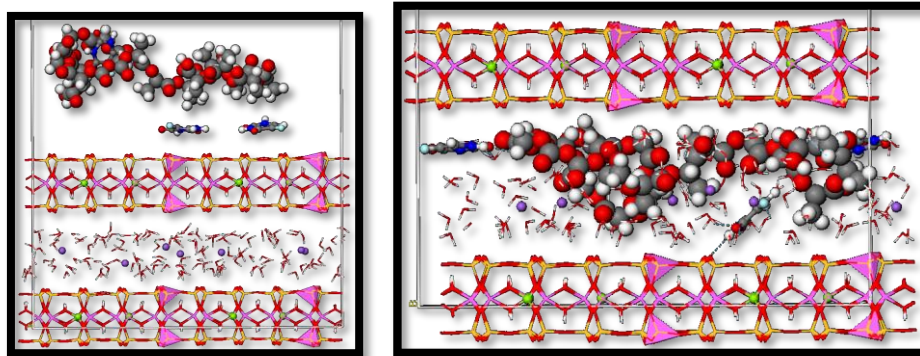
Şekil 4.42’de 2 adet kil tabakası 1300’ü bazal yüzeyde 160’ı da tabkalar arasında olan 1460 su molekülü ve bazal yüzey ve tabakalar arasında ayrı ayrı 3’er adet 5-FU molekülü sergilenmektedir. Simülasyonlar sonucu 5-FU kil etkileşimleri XRD, “mean square displacement” (MSD) ve Radial Distribution Function (RDF) analizleri ile ortaya konmuş ve çeşitli şekiller ile desteklenmiştir. Örneğin 300 ps sonra elde edilmiş

olan 5-FU/kil modellerine ait final geometrileri Şekil 4.43'te verilmiştir. Figürlerin net anlaşılması için bazal yüzeydeki sular gösterilmemektedir.



Şekil 4.43 : Na-MMT kili ve 5-FU ilacının 300 ps sonunda oluşan final geometrileri.

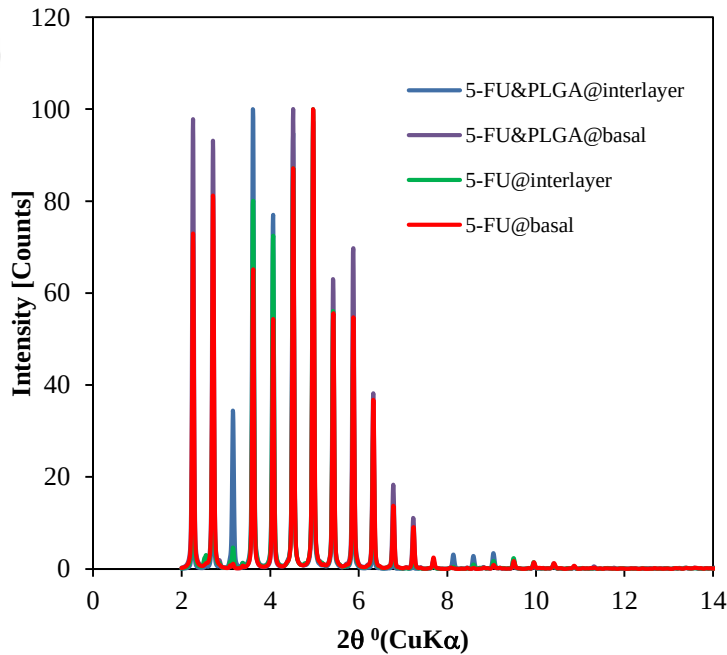
Simülasyon sonucunda oluşan konfigürasyonda, 5-FU molekülleri sularla birlikte bazal yüzeylere yaklaşmaktadır (Şekil 4.42). Bu moleküller kil yüzeyine yakın ve kendi etrafındaki suları uzaklaştırarak Na-MMT kiline adsorbe olmaktadır. Soldaki modelde ortadaki 5-FU molekülünün karbon donor hidrojeni yüzeydeki oksijen ile H-bağı yaparak bunu sergilemektedir. Ayrıca sağdaki modelde de 5-FU molekülleri yüzeye yaklaşıp etrafındaki suları arkalarında biriktirmektedir. PLGA varlığında da bu simülasyonlar tekrar edilmiş ve elde edilen final konfigürasyonları Şekil 4.44'te verilmiştir.



Şekil 4.44 : PLGA dekameri varlığında Na-MMT kili ve 5-FU ilacının 300 ps sonunda oluşan final geometrisi.

Şekil 4.44'te de Şekil 4.43'te olduğu gibi 5-FU molekülleri yüzeye yakınlaşmak eğilimindedir. PLGA varlığında özellikle bazal yüzey modellerinde Şekil 4.43'e göre 1-2 Å daha uzağa yerleşmekte ve en soldaki ilaç molekülü polimerin kıvrımları arasına girerek kil yüzeyinden uzaklaşmıştır. Tabakalar arası modelde ise, PLGA polimeri

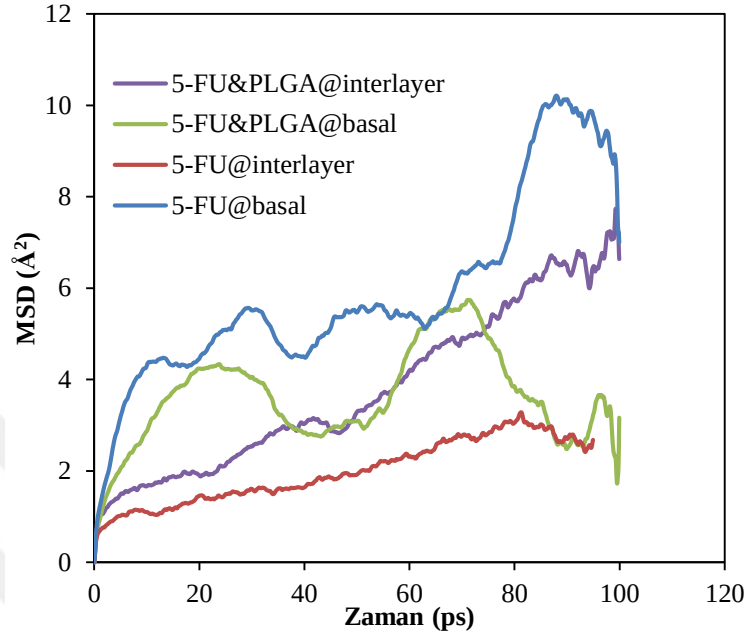
kilin üst tabakasına yakın suları tamamen uzaklaştırmış ve 5-FU moleküllerinin yaklaşmasını kolaylaştırmıştır. Bu modellerde de ilaç molekülü ve kil yüzeyleri arasındaki H-bağı gözlenmiş ve kesikli mavi çizgi ile Şekil 4.43'te olduğu gibi Şekil 4.44'te de gösterilmiştir. PLGA polimerinin varlığında ve yokluğunda, Na-MMT kilinin yapısında meydana gelen değişiklikler XRD analizleri sonucu ortaya konmuştur (Şekil 4.45). Şekil 4.45'te, Şekil 4.40'ta verilmiş olan ve 7,5 derecedeki karakteristik Na-MMT pikinin yoğunluğu çarpıcı bir şekilde düşmüş ve sola doğru çok büyük pikler belirginleşmiştir. Sistemde sadece 5-FU ilacının olduğu modellerde tabakalar arası mesafe 17,78 Å olarak bulunmuşken, PLGA varlığında ve 5-FU ilacı kil yüzeylerinde iken bazal boşluk 19,55 Å olarak hesaplanmıştır. En belirgin sonuç, 5-FU ilacının PLGA ile tabakalar arasında bulunduğu modelde, 24,47 Å olarak bulunmuştur. 5-FU ilacının her iki modelinde de mesafenin değişmemesi (17,78 Å), ilacın boyutunun çok küçük olması, miktarının az olması ve yeterince hidrofil olmamasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. PLGA polimerinin tabakalar arasına girmesi ile oluşan model de ise, hem şişme hem de tabakalaşma çok daha belirgin olarak gözlenmektedir.



Şekil 4.45 : Tüm modellerin XRD paternleri.

Şekil 4.45'te gözlenen sola kayma, Curcumin/PLGA sistemlerinde de gözlenmiş ve fakat 5-FU/PLGA sistemlerinde daha belirgin olmuştur. PLGA zincir uzunluğunun yaklaşık 3.5 kat fazla olması ve 5-FU ilacının nispeten daha hidrofil olması bunun

temel nedeni olabilir. 4 tip yapı içeren bu sistemlerde 5-FU ilacının şişen killerde ve sulu ortamlarda difüzyon katsayısını hesaplamak için 200-300 ps aralığında 100 ps boyunca MSD eğrileri hesaplanmıştır. Hesaplanan bu eğriler Şekil 4.46’da verilmiştir.

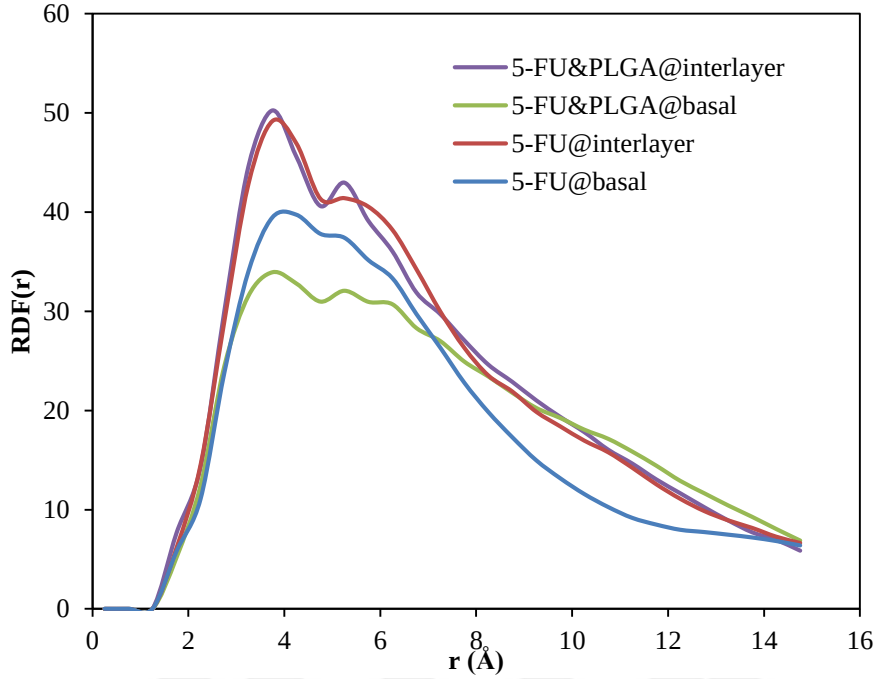


Şekil 4.46 : Simüle edilen modellerin MSD eğrileri.

Şekil 4.46’daki MSD eğrilerinin eğimleri kullanılarak PLGA polimerinin olmadığı modellerdeki 5-FU molekülünün difüzyon katsayıları bazal yüzeyde ve tabakalar arasında sırasıyla $1,74 \times 10^{-6}$ ve $6,25 \times 10^{-7}$ cm^2/s olarak hesaplanmıştır. Tabakalar arasındaki 5-FU, bazal yüzeydeki 5-FU molekülüne göre daha yavaş difüze olmuştur. Modellere PLGA ilave edildiğinde bu katsayılar, sırasıyla $9,42 \times 10^{-7}$ ve $1,20 \times 10^{-6}$ cm^2/s olarak hesap edilmiştir. Buradan tabakalar arasındaki 5-FU ilaç molekülleri çok daha hızlı olarak difüze olduğu sonucuna varılabilir.

5-FU molekülünün difüzyonu ve etrafında bulunduğu su molekülleri çevresinde bulunma olasılığını ortaya koymak için Şekil 4.47’de de görüleceği üzere RDF fonksiyonları hesaplanmıştır. Referans molekülü olan su ile belirlenen mesafede bulunma sıklığı ve sayısını ortaya koymak ve hidrofobisitesi hakkında bilgi vermek için RDF grafikleri çizilmiştir. Şekil 4.47’den de anlaşılacağı üzere çok küçük mesafelerde atom çaplarının birbirine çok yakın olması ve birbirini itmesi (0-2 Å) RDF sıfır olarak hesap edilmiştir. Tüm modellerde 5-FU ilacı yaklaşık 4 Å mesafede en fazla oranda bulunmuştur. Buradaki RDF’ler yüzey, tabakalar arası ve PLGA varlığında yüzey ve tabakalar arası modelleri için sırasıyla 32, 39, 49 ve 50 değerlerini

göstermektedir. Bu mesafelerde 5-FU ilacı PLGA varlığında tabakalar arası modelde en fazla bulunma eğiliminde ve oldukça fazla bağ yapmıştır.



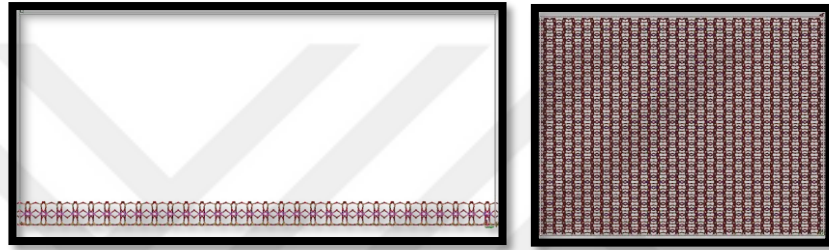
Şekil 4.47 : Simüle edilen modellerin RDF eğrileri.

Daha sonra RDF fonksiyon değerleri 5 Å mesafede bir minimum noktasına gelmektedir ve 5-FU ilacının bu mesafelerde bulunma şansı azalmaktadır. Daha uzun mesafelerde ise, RDF değerleri düşmeye başlayıp 15 Å mesafelere doğru osile olmaktadır. Bu mesafelerde yeterli bulunma olasılığı gerçekleşmemiş ve bağ sayısı sıfır olmuştur. Öte yandan bu modellere ait yapılan ilaç-kil arasındaki bağlanma enerjisi hesaplarında 5-FU molekülünün bazal yüzeydeki etkileşimi -50,14 kcal/mol iken PLGA varlığında etkileşim dikkat çekici bir şekilde zayıflayarak -18,27 kcal/mol olmuştur. Bunun temel sebebinin Şekil 4.44'te de görüleceği üzere bir tane 5-FU molekülünün PLGA zinciri ile etkileşime girerek kil yüzeyinden uzaklaşmış olmasıdır. 5-FU molekülleri tabakalar arasında iken PLGA'nın olmadığı modelde etkileşim -43,70 kcal/mol olmuştur. PLGA varlığında bu değer -40,53 kcal/mol'e gerilemiştir. Benzer çalışma Curcumin ilacının enol ve keto formları için de yapılmıştır. Enol molekülü bazal yüzeyde iken -55,43 kcal/mol iken PLGA varlığında ve tabakalar arasındaki etkileşim -50,40 kcal/mol değere gerilemiştir. Keto için bu değerler sırasıyla -52,62 ve -51,63 kcal/mol olarak hesap edilmiştir. 5-FU içeren modellerde olduğu gibi Curcumin moleküllerinin bazal yüzeydeki adsorbsiyonu tabakalar arasındakinden daha güçlüdür. PLGA varlığında ise özellikle 5-FU moleküllerinin desorbsiyonu artmıştır.

Buraya kadar yapılan çalışmalar izomorfik yerdeğiştirmenin tabakalaşmadaki önemi ve ilaç moleküllerinin kilin bazal boşluklarındaki etkileşimi için yapılmıştır. Daha kompleks ve büyük sistemler için kilin geleneksel, interkale ve eksfoliye olma durumları için de simülasyonlar gerçekleştirilmiştir.

4.5.3 Geleneksel kompozit ile yapılan MD alışmaları

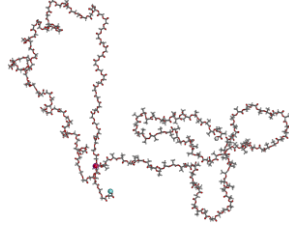
Bu bölümde, şekil 3.3'teki senaryolar baz alınarak Curcumin ve 5-FU ilaçlarının kil ile olan etkileşimleri simüle edilecektir. şekil 4.48'deki kil yapısı üretilmiş ve üzerine sırasıyla literatür değerleri baz alınarak çeşitli oranlarda Curcumin ve 5-FU ilaçları ve PLGA polimer zinciri ile su ortamında MD alışmaları gerçekleştirilmiştir.



şekil 4.48 : 20x15x4 büyütme ile elde edilmiş MMT tabakası.

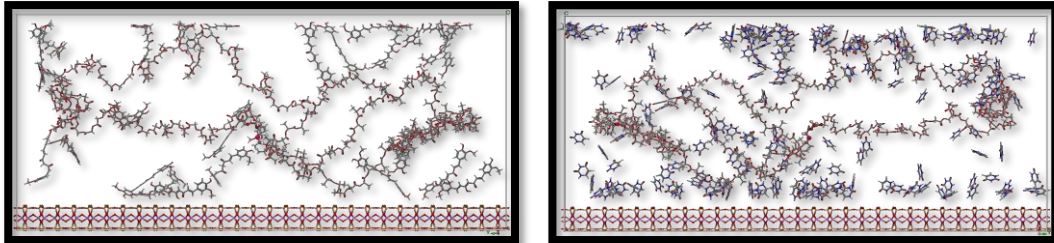
şekil 4.48'deki kil tabakası Materials Studio programının görselleştirme arayüzü (Visualizer) kullanılarak MMT birim hücresi “XYZ” boyutlarının 20x15x4 katı büyütölmesi ile elde edilmiştir. Üçüncü boyutu olan “Z” eksenini sekiz katına çıkarıldıktan sonra kile ait diğer üç tabaka silinerek üretilmiştir. Boyut uzunlukları $a=103,6$ $b=134,7$ ve $c=120,0$ Å olurken her üç açısı da 90^0 olan triklinik latis tipindedir. Bir sonraki aşamada ise PLGA polimerine ait zincir aynı programın “blok-ko-polimer” aracı vasıtasıyla inşa edilmiştir. Bilindiği üzere PLGA gibi biyobozunur polimerlerin sahip oldukları yüksek mol ağırlıkları ve polidispersite gibi özellikleri polimerin mukavemetini ve ilaç salımını da etkilemektedir. Dolayısıyla bu parametreler ilaç salım sisteminin taşınımının yanında bozunma hızını ve hidrolizini de etkiler (Kamaly ve ark, 2016; Makadia ve Siegel, 2011). Bu nedenle ilaç salımında kullanılacak olan PLGA polimerindeki zincir sıralaması ve oranı önem kazanmaktadır. PLGA'nın bu parametre ve özellikleri ile birlikte hidrofilite, kristalinite gibi özelliklerinin yanında polimerizasyon derecesi (PDI) de önemli olmaktadır. Polimerizasyon derecesi, polimerdeki tekrar eden monomerik birimlerin sayısını ifade etmekte ve genellikle yüksek moleküler ağırlıklı polimerler için 100'den büyüktür (Feldman, 1981). DeneySEL çalışmalarımızda 50:50 oranında ve 30000-50000 moleküler ağırlığında

PLGA polimeri kullanılmıştır. Bu polimerin polimerizasyon derecesi, hesaben 180 civarı bulunmuştur. 100 er adet LA ve GA monomeri ile istiflenmesi, burulma açısı serbest halde gelişen ve polimerizasyon derecesi 200 olan Şekil 4.49’da gösterildiği gibi bir polimer zinciri Material Studio programı kullanılarak üretilmiştir.



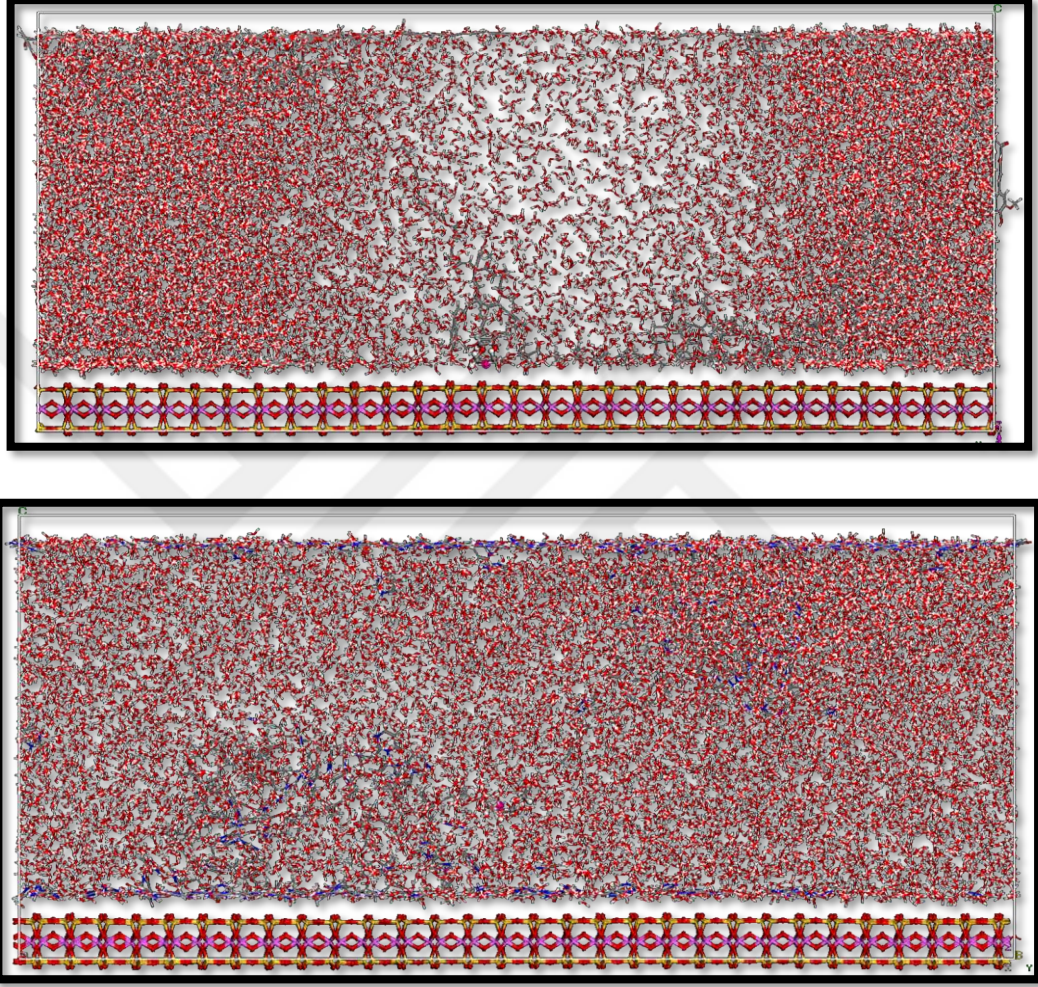
Şekil 4.49 : MD çalışmalarında kullanılan PLGA zinciri.

Şekil 4.49’da, yeşil kısımdan başlayıp orta bölgedeki kırmızı olan bağlantı noktasına kadar zincir GA monomerlerinden oluşmaktadır. Sağdaki kısım ise LA monomerlerinden oluşmuştur. Bu yapı manuel olarak Şekil 4.47’deki kilin boşluk kısmına yerleştirilmiştir. Polimer ilavesinden sonra, ilaç molekülleri Şekil 4.47’deki geri kalan boş bölgelere paketlenmek suretiyle yerleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Materials Studio programının “Amorphous Cell” modülü kullanılarak yapılan bu işlemde mol rasyo ve yoğunluk 1 alınmışken, diğer parametreler “Forcite” ile yapılan geometri optimizasyonu ile aynı alınmıştır. Paketleme işlemi önce Curcumin ve sonra 5-FU ilaçları için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Curcumin ilacı için literatürde yapılmış olan çalışmadaki (Gören ve ark, 2009) ve deneysel çalışmalarda kullanılan Curcumine ait HPLC kromatografındaki sonuçlara göre enol formunun (%80-90), keto ve diğer formlarının ise %10-20 civarında olduğu ortaya konmuştur. MD simülasyon çalışmalarında, bu oranı baz alıp kullanarak iki formun farkını açıklamaya çalıştık. Sonuçta, 5 adet keto ve 21 adet enol formunda ilaç molekülleri PLGA kaplı MMT üzerine yerleştirilmiştir. Aynı parametreler ile 185 adet 5-FU ilaç molekülü paketlenmiş ve tüm başlangıç geometrileri Şekil 4.50’de verilmiştir.



Şekil 4.50 : Curcumin (sol) ve 5-FU (sağ) ilaç molekülleri içeren PLGA kaplı 001 MMT yüzeyi.

Şekil 4.50'deki modellere yoğunluğu 1 g/cm³ değerine karşılık gelen su miktarı hesaplanarak sırasıyla TIP3P (Jorgensen ve ark, 1983) modelindeki 13197 ve 13098 adet su molekülü sisteme ilave edilmiştir. Elde edilen bu final konfigürasyonları ile 1 ns simülasyon koşturulmuştur. Simülasyon sonucu elde edilmiş olan geometriler Şekil 4.51'de verilmiştir.

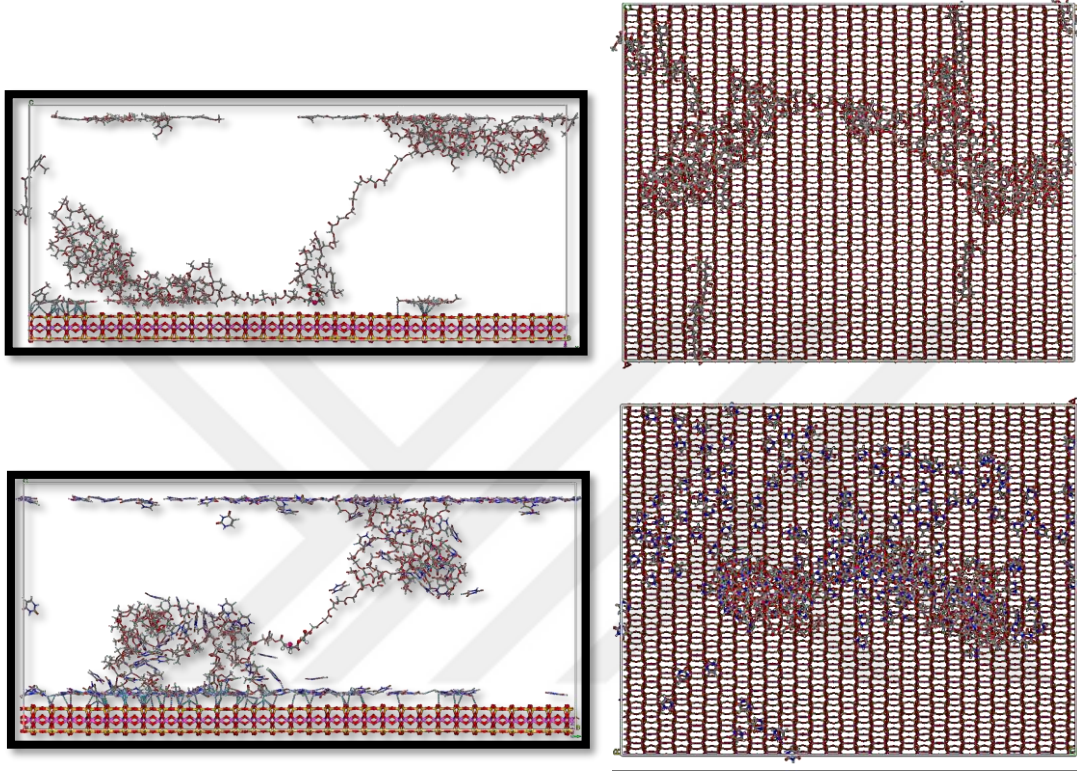


Şekil 4.51 : MD simülasyonlarının son yapıları.

Şekil 4.51'te su içeren final geometrileri yer almaktadır. Suların silindikten sonra geriye kalan kısmını içeren konfigürasyonlar sırasıyla Curcumin ve 5-FU için Şekil 4.52'de verilmiştir. Şekil 4.52'de, üstteki ilk iki figür Curcumin formlarını içeren 1,5 ns sonucundaki görüntülerdir. Diğer iki figür ise, 5-FU ilacını içeren final yapılarıdır.

Her iki ilaç için de “Z” eksenı boyunca bulunan kilin sanal imajı ile düzlemsel bir tabaka oluştuğu görülürken, gerçek kil tabakası yüzeyinde Curcumine nazaran 5-FU ilacı yüzeye daha fazladır ve düzlemsel olarak etkileşmektedir. Buradaki aktif etkileşimlerden biri Şekil 4.51 ve 4.52'de kesikli mavi çizgilerle verilen H-bağı olduğu

aşikârdır. Curcumin ilaç molekülleri hem kil hem de PLGA ile olan etkileşimleri neticesinde tabaka yüzeyine sıralanmışken, PLGA polimerinin LA ve GA monomerleri kil yüzeylerine ilaç molekülleri kadar yaklaşmamıştır. 5-FU ilacı varken Curcumin içeren modellere benzer şekilde bu moleküllerde tabaka yüzeylerinde H-bağları sayesinde sıralanmıştır.

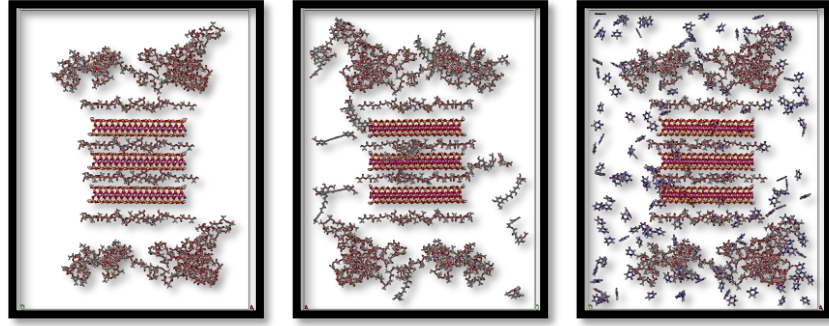


Şekil 4.52 : MD simülasyonlar sonucu elde edilen konfigürasyonlar.

Şekil 4.52'deki 5-FU molekülleri PLGA zincirinin LA monomeri içeren kısmı çevresinde daha çok birikmiştir. Geri kalan moleküller ise homojen olarak kil yüzeyine adsorblanmıştır. PLGA zinciri de Curcumin içeren modeldeki gibi bulunduğu doğrultuda ilaç ve su moleküllerinin etkisiyle kilin yüzeyine doğru yönelmiştir.

4.5.4 İnterkale kompozit ile yapılan MD çalışmaları

Şekil 3.3'te belirtilen ikinci senaryo ise kilin tabkalarının polimer veya bir başka organik molekül tarafından aralanarak oluşturulan interkale kil kompozit modelidir. Bu model kullanılarak oluşturulan konfigürasyon Şekil 4.53'te verilmektedir. Şekil 4.53'teki modelde Şekil 4.50'deki modele ait olan tüm bileşenler bulunmaktadır. İlaç molekülleri sayısı ve hücre boyutu birebir aynı alınmıştır.



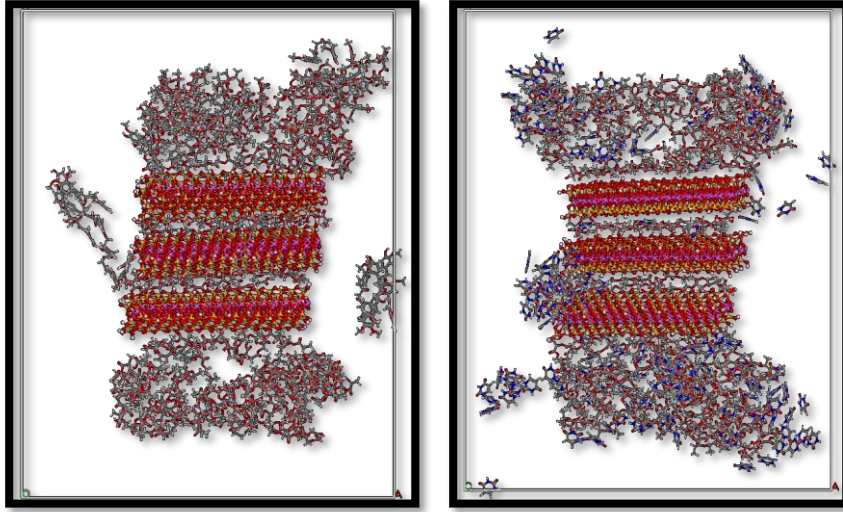
Şekil 4.53 : PLGA polimeri (sol), Curcumin (orta) ve 5-FU (sağ) ilaç moleküllerini içeren interkale nanokil partikülleri.

Şekil 4.53'teki modeldeki kil diğerinden farklı olarak yüzey (substrate) olmak yerine partikül gibi düşünülerek 3 tabakalı olarak üretilmiştir. Bir tabaka kil, birim hücrenin “XY” eksenleri boyunca 8 ve 2 defa büyütülerek elde edilmiş ve serbest tüm oksijen atomları hidrojen ile doyurularak süper hücrenin ortasına yerleştirilmiştir. Bu modelde diğerinde 1 olan 100 birimlik PLGA polimer sayısı 2'ye çıkarılmıştır.

İnterkale kil kompozitini oluştururken 50'şer birimlik ve aralarındaki açı 180° derece olacak biçimde 4'er adet PLGA zinciri daha elle yerleştirilmiştir. Önceki modeldeki ile aynı sayıda Curcumin ve 5-FU molekülleri “Sorption” modülü ile yerleştirilmiştir. Benzer şekilde aynı sayıda alınan bir diğer bileşen ise modelin yoğunluğunun 1'e karşılık gelmesi için gerekli olan su molekülü adedidir. Buna göre Şekil 4.53'te Curcumin içeren ortadaki modele 13197 adet ve 5-FU içeren sağdaki modele ise 13098 adet su molekülü “Sorption” modülü ile ilave edilmiştir. Diğer tüm parametreler de aynı olacak şekilde 1,5 ns simülasyon koşturulmuştur. Simülasyonlar sonucu elde edilen final geometrileri Şekil 4.54'te verilmiştir.

Şekil 4.54'te soldaki görüntü Curcumin, sağdaki ise 5-FU moleküllerini içeren modellere aittir. Şekil 4.53'deki başlangıç geometrileri ile karşılaştırıldığında, dikkati çeken ilk değişim kil tabakalarının birbirlerinden ayrılma eğiliminde olmasıdır.

Diğer bir değişim ise ilaç moleküllerinin hem kil tabakalarının arasına girme çabası hem de polimer sarmalının içerisine girmek istemesidir. Ayrıca kil-ilâç-polimer üçlüsü gerek hidrofobik gerekse elektrostatik itme ve çekme kuvvetlerinden dolayı su moleküllerini çevresinden uzaklaştırarak biraraya gelmiştir. Bu gibi yapısal ve dinamik değişimler ileriki bölümde etraflıca incelenecektir. Şekil 4.54'teki su molekülleri modellerin daha iyi anlaşılması için silinmiştir.

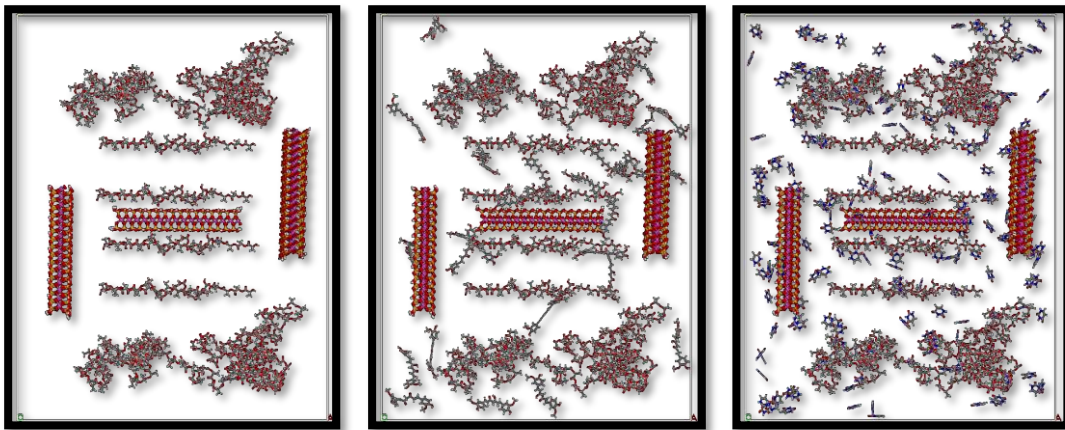


Şekil 4.54 : MD simülasyonlar sonucu elde edilen konfigürasyonlar.

Çalışmamızın son aşamasında ise eksfoliye olmuş, başka bir deyişle tabakaları birbirinden bağımsız hale gelmiş veya getirilmiş olan kil yüzeylerinde MD simülasyonun gerçekleştirilmesidir.

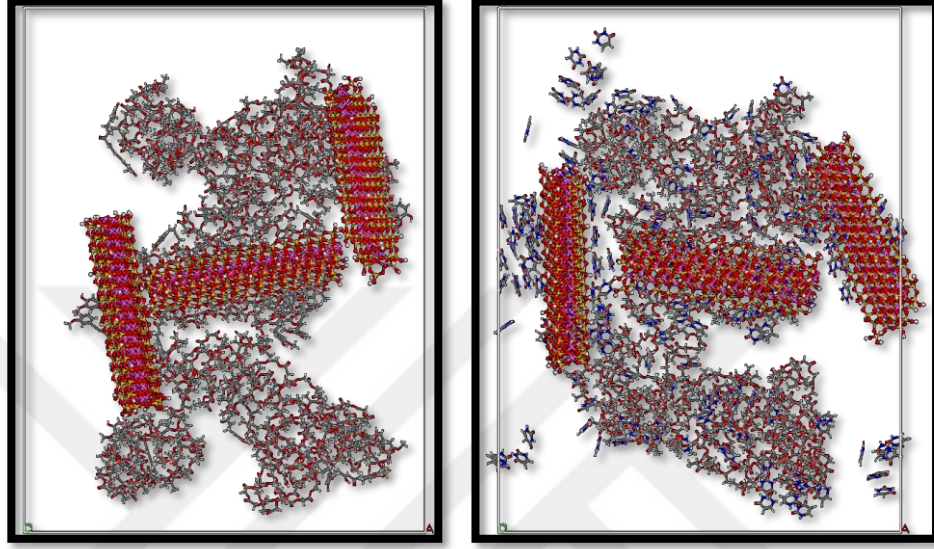
4.5.5 Eksfoliye kompozit ile yapılan MD çalışmaları

Şekil 3.3'te belirtilen üçüncü senaryo, kilin tabakalarının birbirlerinden tamamen ayrılması sonucu oluşan modeli temsil etmekteydi. Aynı zamanda bizim tez çalışmamız boyunca deneysel olarak ürettiğimiz nanopartikülün en olası senaryosuydu. Bu nedenle, Şekil 4.55'teki gibi bir model geliştirilerek moleküler seviyede de bu senaryonun gerçekleşip gerçekleşmediği araştırılmıştır.



Şekil 4.55 : PLGA polimeri (sol) ve Curcumin (orta) ve 5-FU (sağ) ilaç moleküllerini içeren eksfoliye kil nano partikülleri.

Şekil 4.55’te önceki senaryolarda olduğu gibi kil katkılı hibrid kompozitler sergilenmektedir. Bir önceki senaryodaki kil partikülleri elle birbirinden ayrıldıktan sonra polimerler de aynı sayıda ve yakın pozisyonlarda yerleştirilmiştir. Daha sonra “Sorption” modülü ile sırasıyla aynı miktarda ilaç ve su molekülleri ilave edilmiştir. 1,5 ns lik simülasyon tekrar edilmiş, oluşan nihai geometriler Şekil 4.56’da verilmiştir.



Şekil 4.56 : MD simülasyonlar sonucu elde edilen konfigürasyonlar.

Şekil 4.56’da verilen nihai geometrilere ait simülasyonlar boyunca hem Curcumin hem 5-FU ilaç moleküllerinin PLGA polimerinin sarmallarına H-bağları ile adsorblanması gözlenmiştir. Ayrıca ilaç moleküllerinin birbiri ile olan etkileşimleri sonucu topaklanması ve hidrofil kil yüzeylerine yapışması izlenmiştir. En önemlisi ise başlangıç konumları ile karşılaştırıldığında kil-PLGA-ilâç üçlüsü arasında biraraya gelme eğilimi net bir biçimde gözlenmiş ve nanopartikül oluşumu saptanmıştır.

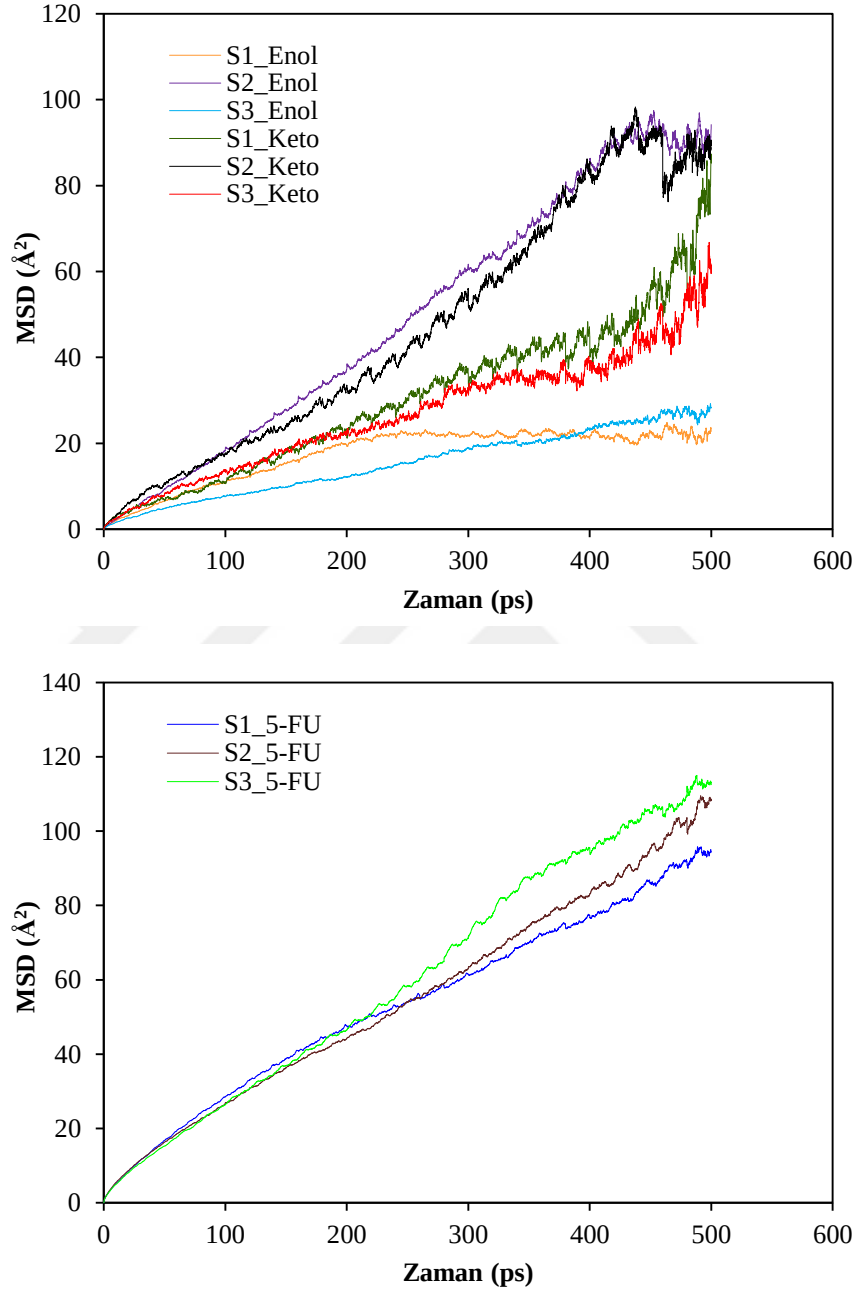
4.5.6 Modellere ait analiz sonuçları

Tüm senaryolara ait bileşenlerin cinsi aynı olmasına rağmen, sadece interkale ve eksfoliye kil nanopartiküllerine ait senaryoların içerdiği bileşenlerin ve atomlarının sayısı eş değerdedir. Ancak, bahsi geçen bu senaryolara ait nitelik olarak yapılan gözlemlerin yanında nicelik olarak da analizleri gerçekleştirilmiştir. Böylece kil-PLGA-ilâç üçlüsü arandaki etkileşim ilişkileri daha iyi açıklanmıştır. Özellikle son iki senaryo karakteristik özelliklerinin yanında enerjistik olarak da karşılaştırılarak en olası senaryo ortaya konmuştur. Bunun için, “Forcite” modülü ile RDF, MSD, BE ve XRD gibi yapısal ve dinamik özellikler analiz edilmiştir.

Bu analizler yapılmadan önce, ilaç moleküllerine ve kile ait referans atomlar belirlenmiştir. Seçilmiş olan referans atomları ile ilaç ve kil arasındaki etkileşim mekanizmaları ve büyüklüğü ortaya çıkarılmıştır. Curcumin ilacının enol formu için hidroksil grubuna (-OH) bağlı ve yükü +0,0297 olan karbon (C) atomları seçilmişken, keto içinse çift bağlı serbest olan oksijenlerin ortasındaki metilen grubuna (-CH₂) ait ve yükü -0,2 olan karbonlar belirlenmiştir. 5-FU ilacı içinse yapıdaki nitrojenlere bağlı ve yükü +0,28 olan hidrojenler (H) işaretlenmiştir. Bunlara referans olarak ise S1 kodlu senaryoda kilin bazal yüzeyindeki -0,3 yüklü oksijen (O) seçilmişken, S2 ve S3 kodlu modellerde de kile ait tetrahedron tabakaya bağlı hidroksil grubuna ait ve yükü -0,5688 olan oksijen atomları tayin edilmiştir. Bu atomlar alınarak sırasıyla MSD ve RDF analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm bileşenleri ve atom sayıları eşit olan S2 ve S3 kodlu modellerin analizleri karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır.

Tanımlanmış olan atomlar kullanılarak ilaç moleküllerinin simülasyon süresi boyunca kil yüzeylerine hangi hızla difüze olduğunu ortaya çıkarmak için MSD analizleri gerçekleştirilmiştir. MSD değerleri denklem 4.2'deki eşitlik kullanılarak simülasyonun son yarım ns için hesaplanmıştır. Eşitlikteki boyut 3 alınmıştır. Hesaplama adım aralığı 20 pikosaniye (ps) seçilmiş ve elde edilen eğriler Şekil 4.57'de verilmiştir. Şekil 4.57'de Curcumin ve 5-FU molekülleri içeren modellere ait MSD eğrileri sergilenmektedir. S1, S2 ve S3 sırasıyla geleneksel, interkale ve eksfoliye nanopartikülleri temsil eden kodlardır. Bu eğrilerin eğimi alınarak difüzyon katsayısı elde edilerek penetrasyon ivmesi hesaplanmıştır. Curcumin içeren S1 kodlu modele ait difüzyon katsayıları enol ve keto için sırasıyla $1,52 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ve $5,68 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak bulunmuştur. Öte yandan, enol ve keto formuna ait karbon (C) atomlarının difüzyon katsayısı interkale senaryoda (S2) $6,28 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ve $5,95 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ iken eksfoliye modelde (S3) bu değerler sırasıyla $1,89 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ve $4,10 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak hesap edilmiştir. Bu katsayılar göre, S2 kodlu modelde enol formu 21 adet olmasına karşın 5 adet olan keto forma göre ivmelenmesi çok büyük olamamıştır. Hatta S1 modelde ketoya nazaran çok daha yavaş difüze olmuştur. Aynı durum S2 kodlu modelde de gözlenmiş ve keto formun difüzyonu yaklaşık 2,17 kat enol moleküllerine göre daha yavaş olmuştur. Nitekim Şekil 4.50'de de görüleceği üzere özellikle S3 kodlu senaryoda 375.nci ns'den sonra keto formu enol forma göre oldukça hızlanmıştır. Bunun nedeninin, keto moleküllerinin yapısal formundaki büyük değişiklikten kaynaklanmış olabileceği gibi, PLGA ve kil ile artan etkileşimi de

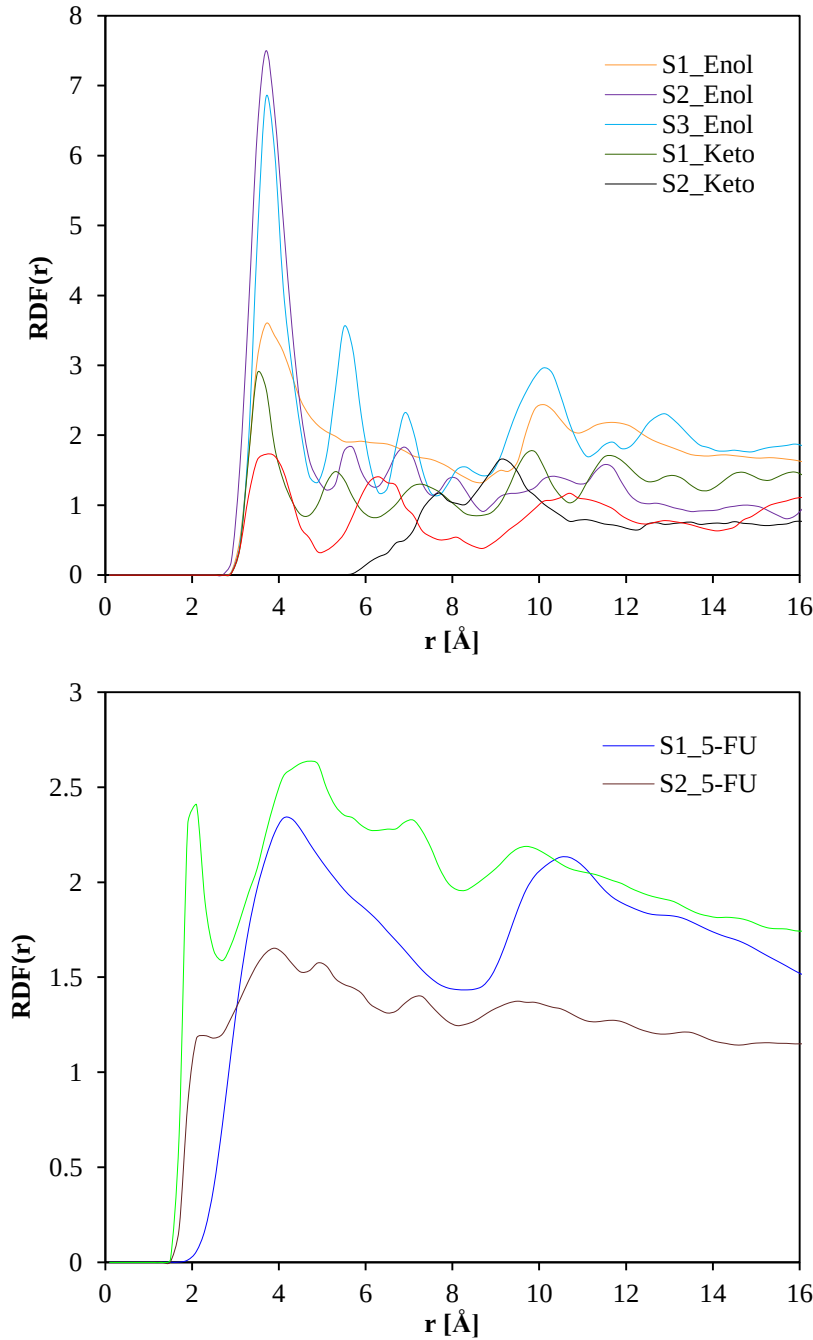
olabilir. Benzer şekilde, 5-FU moleküllerine ait difüzyon katsayıları da S2 ve S3 senaryoları için sırasıyla $7,21 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ ve $7,50 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak hesaplanmıştır. Her iki senaryodaki değerler de birbirine çok yakın olarak bulunmuştur.



Şekil 4.57 : Sırasıyla Curcumin (üst) ve 5-FU (alt) moleküllerine ait MSD eğrileri.

Buradan her iki senaryoya ait 5-FU ilaç molekülleri kil yüzeyleri ile yaklaşık olarak aynı penetrasyon hızında difüze olduğu sonucuna varılabilir. Öte yandan, S1 kodlu modele ait 5-FU moleküllerinin difüzyonu ise $6,29 \times 10^{-6}$ olarak elde edilmiştir. S2 ve S3 modele nispeten daha düşük olan bu değerden S1 kodlu modeldeki molekkülerin

daha yavaş difüze olduğu anlaşılmaktadır. Genel olarak, Curcumin molekülleri ile karşılaştırıldığında ise daha hidrofil ve çok miktarda olan 5-FU molekülleri kil yüzeylerine nispeten daha hızlı olarak difüze olduğu görülmüştür. MSD analizleri ile su ve PLGA varlığında ilaç moleküllerinin kil ile etkileşime girmek istedikleri kısmen de olsa saptanmıştır. Ancak bu moleküllerin belli mesafelerde kil yüzeyi ile olan bağ sayısını ve bulunma olasılıklarını ortaya çıkarmak için de RDF analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.58).



Şekil 4.58 : Sırasıyla Curcumin/kil (üst) ve 5-FU/kil (alt) bileşenlerine ait RDF eğrileri.

MSD analizlerinde kullanılan aynı atom tiplerinin periyodik etkileşimleri alınarak RDF fonksiyonları çizilmiştir. RDF eğrileri simülasyon trajektorileri kullanılarak 0,2 Å aralıklarla ayırma limit (cut-off) değeri 20 Å olacak şekilde hesaplanmıştır. RDF eğrileri hem ilgili atomlara hem referans atomlara ait fonksiyon değerleri birlikte toplanarak hesaplanmıştır. Şekil 4.58'deki eğriler MSD eğrileri belirtilen kil ve ilaç bileşenlerine ait aynı atomlarla oluşturulan fonksiyonların toplamı olarak elde edilmiştir. Grafiklerde de görüldüğü gibi 0-2 Å arasındaki mesafede atom çaplarının birbirine çok yakın olması ve birbirini itmesi sonucu RDF sıfır olarak hesap edilmiştir. S1 kodlu model hem kilin yüzey hem daha az sayıda bileşen içermesinden dolayı 4 Å mesafelerde Curcumin molekülleri 3-4 tane bağ yapabilmıştır. Ancak polimer miktarı daha fazla olan S2 ve S3 kodlu modellerde bu mesafelerde enol formu en çok bulunma eğiliminde ve burdaki bağ sayısı ise 7 adet olarak bulunmuştur. Bu mesafeden sonra ise kile ait yapısal değişikliklerden kaynaklı küçük pikler elde edilmiş ve mesafe arttıkça ilaç moleküllerinin bulunma olasılığı giderek azalmış ve 1-2 arasına gerilemiştir.

Öte yandan, simülasyon süresince keto formunun kil yüzeylerinden ziyade PLGA polimeri ile daha çok etkileşime girdiği izlenmiştir. Dolayısıyla 4 Å mesafelerde S3 kodlu senaryoda az da olsa görülen etkileşim, S2 kodlu modelde gözlenememiştir. Uzun mesafelerde ise yaklaşık 9 Å civarında S1 ve S3 kodlu senaryolara ait keto formundan kaynaklı bir etkileşim az da olsa belirginleşmiş ancak bu mesafelerde enol ile karşılaştırıldığında çok da kayda değer bir etkileşim olamamıştır. Curcumin içeren modellerde enol formun kil yüzeyi ile daha fazla etkileşime girdiği görülmüştür. 5-FU molekülleri içeren modellerde ise kısa mesafelerde 2-3 olan bağ sayısı, uzun mesafelerde 1 değerine doğru osile olmaktadır. Genel olarak, kısa aralıklı mesafelerde ilaç ve kil arasında hem H-bağlarından dolayı hem de elektrostatik etkileşimlerden dolayı bir ilişki olduğu açıkken, uzun mesafelerde özellikle PLGA polimerinin hidrofobik sitelerinden dolayı etkileşim azalmıştır. Tüm bu inter/intramoleküler etkileşimler sonucu yaklaşık 11 Å olan Na-MMT kiline ait (001) yüzeyinin bazal boşluğu, S2 kodlu model baz alınarak, 14 Å olarak hesap edilmiş ve bu da kilin bulk ortamında interkale olabileceğini göstermiştir.

Öte yandan, 1,5 ns simülasyonlara ait modellerin bağlanma enerjileri (BE) hesaplanmıştır. Organik moleküllerin kil ile olan etkileşimleri hesap edildiği için sular ihmal edilmiştir. Denklem 3.3'teki eşitlik kullanılarak herbir moleküle ait toplam

enerji değeri bulunmuş ve bunlarla bağlanma enerjileri hesaplanmıştır. Burada hesap yapılırken nanopartiküle ait bileşenler ikiye ikiye ele alınarak enerjiler hesap edilmiş ve sonuçları Çizelge 4.13 ve 4.14'te verilmiştir.

Çizelge 4.13 : Curcumin içeren modellerin BE enerji değerleri [kcal/mol].

Model	Geleneksel	İnterkale	Eksfoliye
PLGA/CUR	-393,24	-591,96	-805,53
MMT/PLGA	-316,02	-690,36	-635,07
MMT/CUR	-872,01	-110,13	-419,30

Çizelge 4.13'te bağlanma enerjilerine bakıldığında, geleneksel senaryoya ait ilaç ve kil etkileşimi diğer iki senaryodan sırasıyla 761,88 ve 552,71 kcal/mol daha fazladır. PLGA/MMT etkileşimine bakıldığında ise diğer iki senaryo bu senaryodan yaklaşık iki kat daha fazla etkileşim göstermiştir. İlaç ve polimer arasındaki etkileşimde ise eksfoliye olan senaryoya ait model en kararlı olanı olarak gözlenmiştir. Özetle PLGA varlığında geleneksel kil modeline ait bileşenlerin birbiri ile olan etkileşimleri azalırken diğer iki modelde bu giderek artmaktadır. Burada hem PLGA polimerinin hem de Curcumin ilacının hidrofob yapıda olması etken rol oynadığı düşünülmektedir. Çizelge 4.14'te ise 5-FU içeren modellere ait enerji değerleri sergilenmektedir.

Çizelge 4.14 : 5-FU içeren modellerin BE enerji değerleri [kcal/mol].

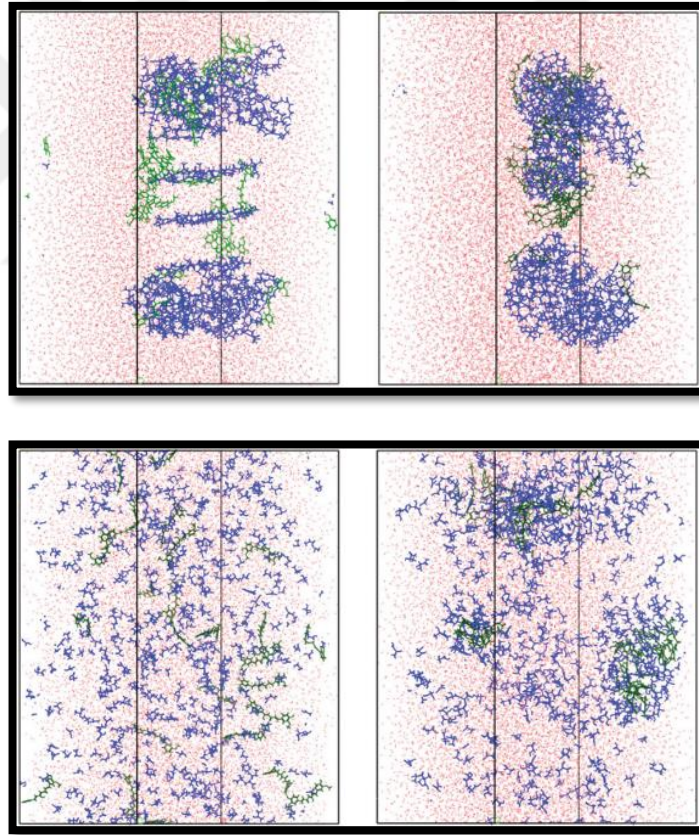
Model	Geleneksel	İnterkale	Eksfoliye
PLGA/5-FU	-1020,04	-1796,81	-1720,21
MMT/PLGA	-171,06	-820,53	-320,37
MMT/5-FU	-1110,52	-341,80	-765,62

Çizelge 4.14'te görüleceği üzere, Çizelge 4.13'te olduğu gibi geleneksel modele ait ilaç/kil etkileşimi -1110,52 kcal/mol enerji değeri ile en kararlı kompozit olarak ortaya çıkmıştır. Ancak kilin polimer ile olan etkileşimi gözle görülecek şekilde azalmış ve bağlanma enerjisi -171,06 kcal/mol e kadar çıkmıştır. Buna karşın polimerin ilaç ile olan etkileşimi ise -1020,04 kcal/mol olarak hesaplanmıştır. İnterkale kil içeren modelde MMT/PLGA ve PLGA/5-FU bağlanma artmışken MMT/5-FU arasında kayda değer bir düşüş saptanmıştır. Kili eksfoliye ederek ilaç ve polimerle etkileşim alanını arttırmamıza rağmen bağlanmanın önemli derecede düşmesinin temel nedeni kilin doğal halde olduğu gibi tabakalı olarak daha çok durma isteğidir. Nitekim, Şekil 4.56'daki son geometrilerde de görüldüğü üzere, kil tabakalarının başlangıç pozisyonlarına göre birbirine yaklaştığı simülasyon boyunca izlenmiştir.

4.5.7 Asidik ve nötr pH ortamlarında MD simülasyonları

Deneysel çalışmalar tümü curcumin ilacı kullanılarak detaylandırılmış ve sonrasında 5-FU ilacı ile tekrar edilmişti. Deneysel olarak hazırlanan nanopartikül normal vücut sıcaklığı olan 37,5 °C değerinde hasta bireye verildiği bilinmektedir. Bunun için çalışmamızın teorik kısmında da bu koşullar göz önünde bulundurularak Curcumine ait bir önceki modeller ve modellere ait başlangıç parametreleri aynı kalmak koşuluyla, 310,5 K sıcaklığında, simülasyonlar 1 ns daha koşturulmuştur.

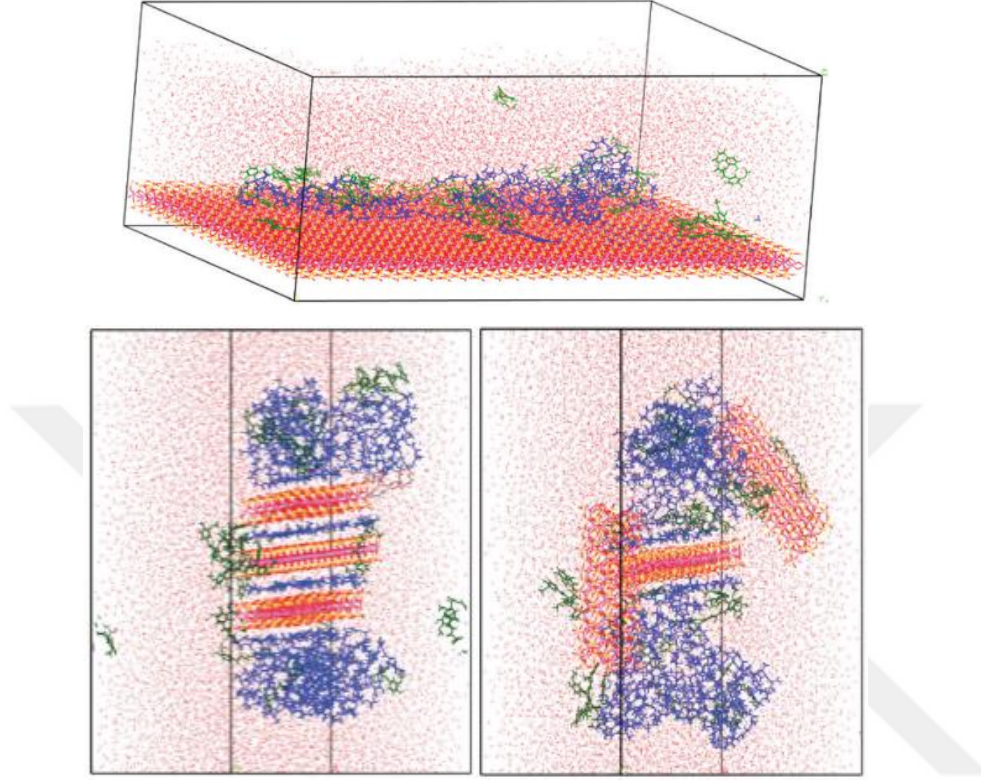
MD simülasyonları ilk olarak, kil içermeyen modeller için gerçekleştirildi. Nötr ortam için interkale kil içeren modeldeki kil silinip simülasyon 2,5 ns ye çıkarıldı. Asidik ortam için su ortamında degradasyona uğrayan PLGA monomerleri (LA ve GA) olarak alınıp 2,5 ns simülasyon yapıldı. Modellere ait başlangıç ve sonuç geometrileri Şekil 4.59'da verilmiştir.



Şekil 4.59 : Sırasıyla nötr (üst) ve asidik (alt) ortamda MMT içermeyen kompozitlerin başlangıç ve sonuç konumları. Yeşil Curcumin, mavi PLGA ve kırmızı-beyaz renkler su molekülleri.

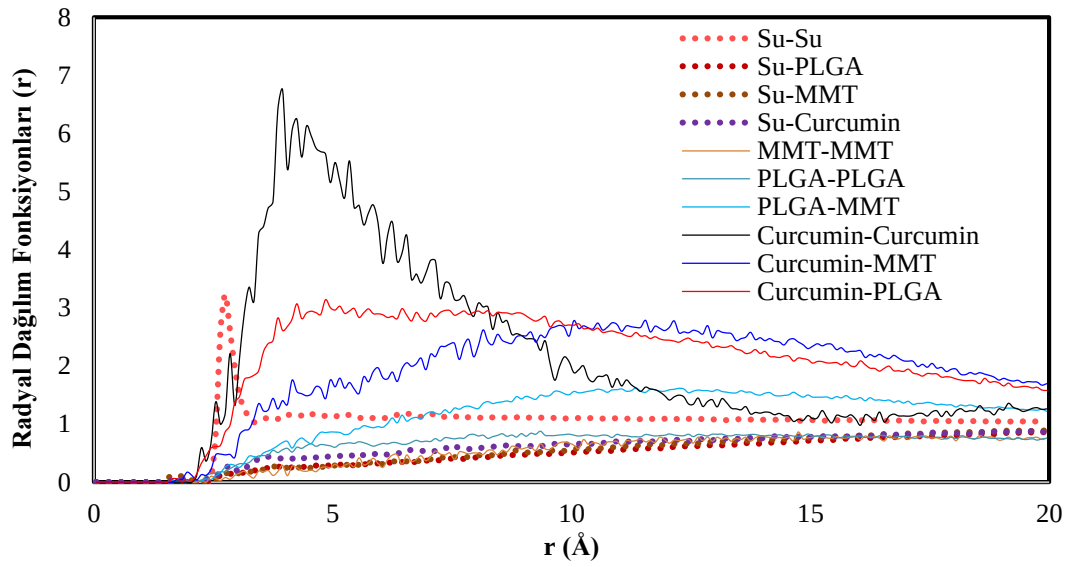
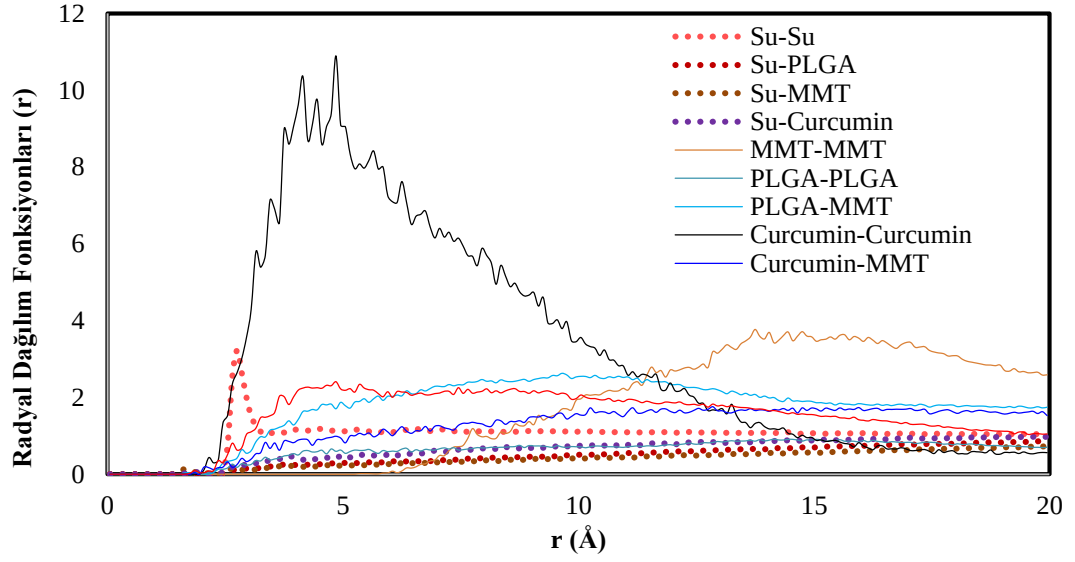
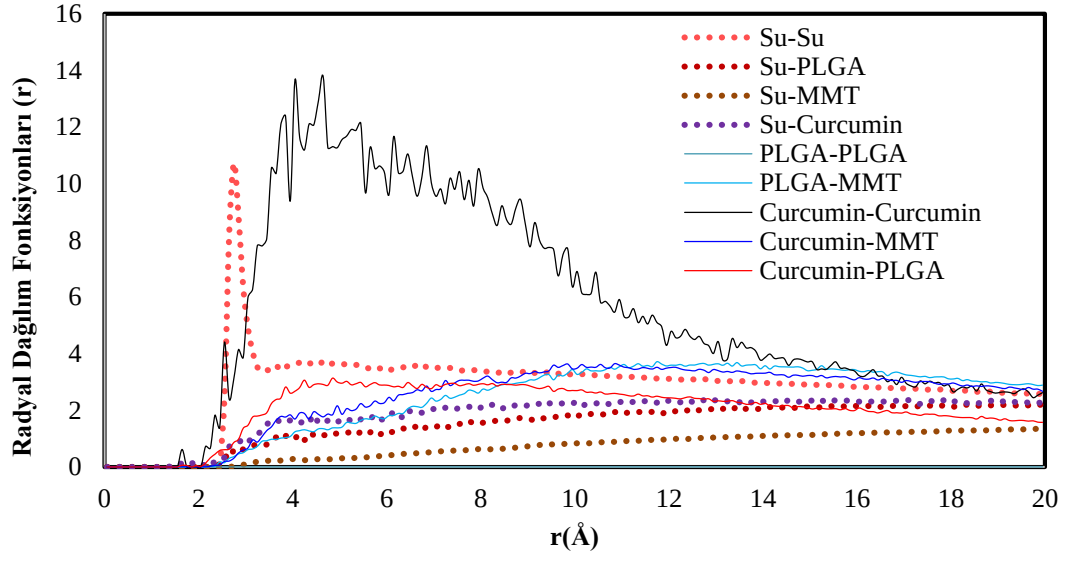
Şekil 4.59'da görüldüğü gibi, simülasyondan sonra, PLGA polimer zincirleri özellikle nötr pH'da agregalar oluşturmak üzere birbirlerine daha çok yaklaşma eğilimindedir.

Öte yandan, nötr ortamı daha iyi simüle etmek ve kilin önemini ortaya çıkarmak için, MMT'yi de içeren üç kompozit modelin simülasyonları gerçekleştirildi ve sonuç enstantaneleri Şekil 4.60'da gösterilmektedir.



Şekil 4.60 : 2,5 ns simülasyondan sonra nötr pH'da geleneksel (üst), interkale (sol alt) ve eksfoliye (sağ alt) kompozitlerinin sonuç görüntüleri.

Şekil 4.60'taki geleneksel kil içeren model için, ilaç moleküllerinin hem PLGA zinciri hem de MMT'nin bazal yüzeyi ile etkileşime girdiği gözlemlendi. İnterkale kompozitinde, ilaç molekülleri PLGA zincirini MMT'den daha fazla tercih ettiği görüldü. Dahası, etkileşime girmeyen PLGA zincirleri bir araya gelerek agregalar oluşturdu. Benzer durum Curcumin için de gözlemlendi. Bu arada simülasyon sırasında MMT katmanlarında önemli bir değişiklik gözlenmedi. İnterkale kil içeren modelde olduğu, PLGA zincirleri eksfoliye kompozit içinde de birbirleri ile etkileşim halindeydi. Farklı olarak ise MMT katmanları birbirine yaklaşma eğilimindeydi. Simülasyon sonucunda elde edilen modellere ait RDF eğrileri Şekil 4.61'de verilmiştir. 2017 yılında yayınlamış olduğumuz yayında (Karataş ve ark, 2017) da belirtildiği üzere, su moleküllerinin oksijen atomları seçildikten sonra Curcumin, PLGA ve MMT'nin merkezlerine göre RDF'ler hesaplanmıştır.



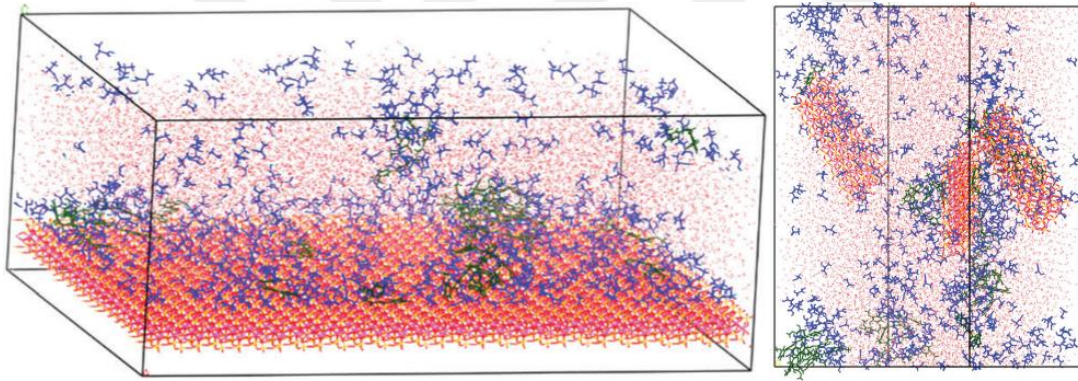
Şekil 4.61 : Sırasıyla geleneksel, interkale ve eksfoliye modellerine ait radyal dağılım fonksiyonları.

Her üç simülasyon modelinde, curcumin-curcumin fonksiyonları en yüksek değere ulaşmışlardır. Bu da, curcumin molekülleri arasında çok güçlü çekme etkileşiminin olduğunu göstermiştir. Daha sonra ise, su molekülleri arasındaki etkileşimler belirginleşmişlerdir.

Curcumin-MMT, Curcumin-PLGA ve PLGA-MMT etkileşimleri kıyaslandığında ise, eksfoliye kil içeren modelde bunlar daha yüksek olarak hesaplanmıştır.

Her üç kompozit için de, Curcumin-PLGA ve Curcumin-MMT'nin RDF'leri uzun mesafelerde maksimum değerlerine ulaştı. Dahası, RDF'ler, tüm kompozitlerde, curcumin'in PLGA'ya MMT'den daha fazla ilgi duyduğunu gösterdi.

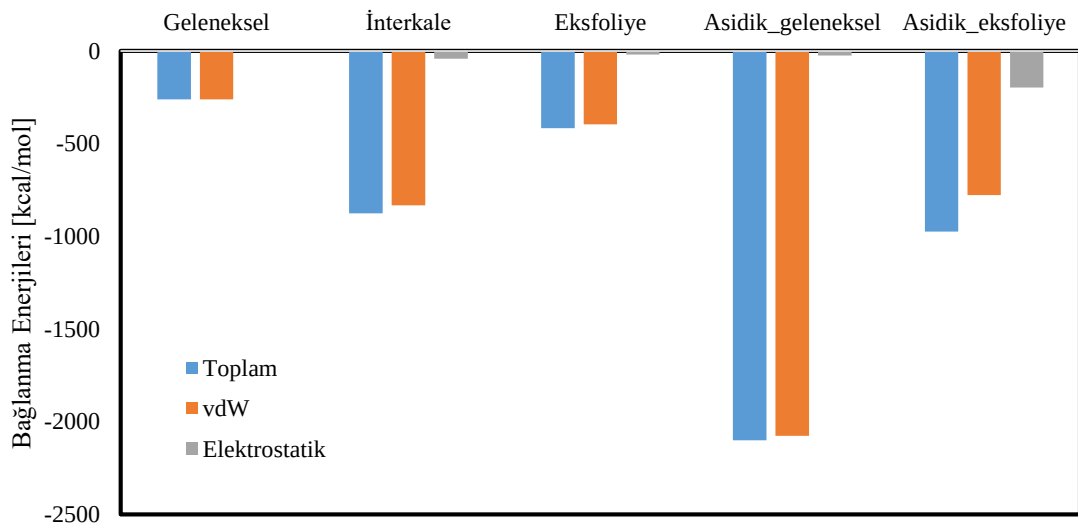
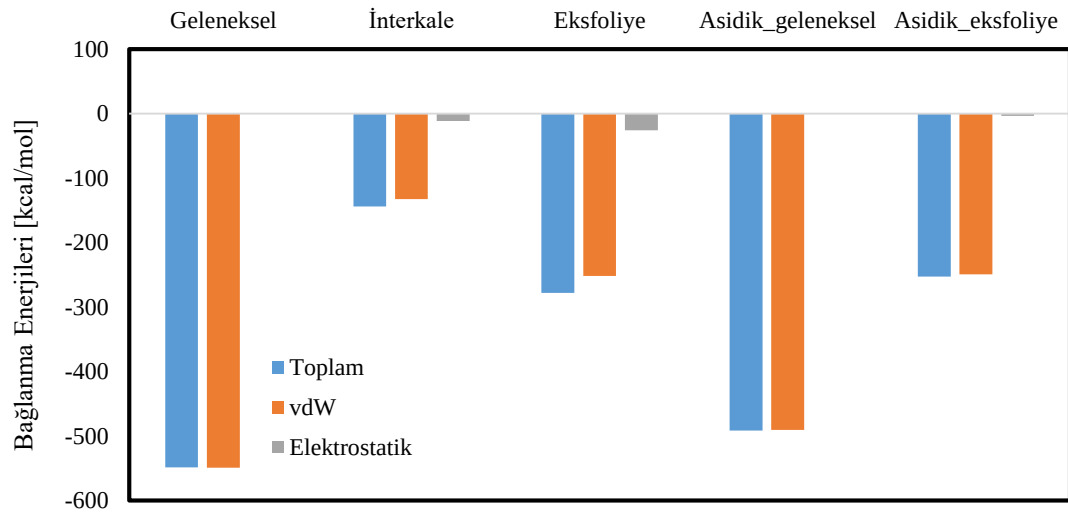
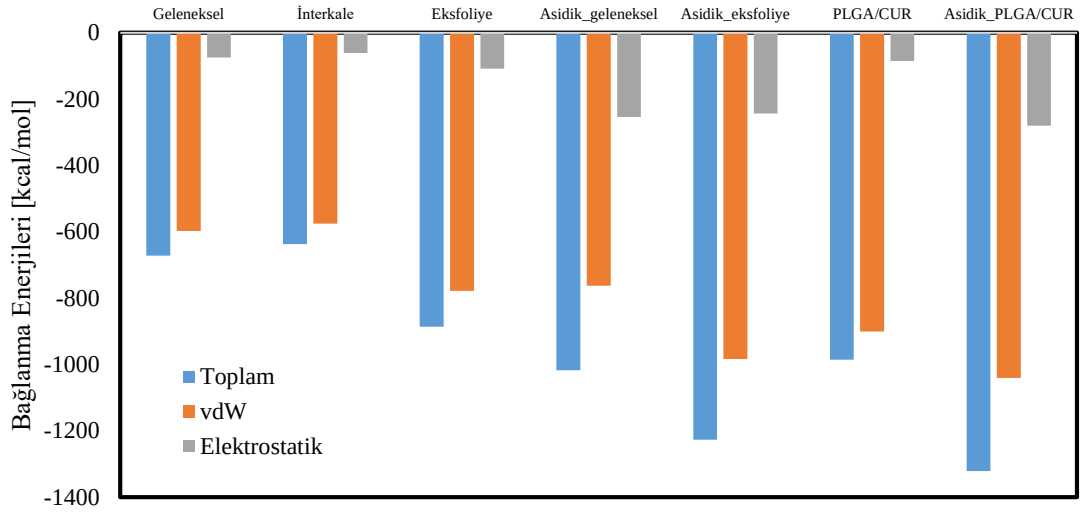
Asidik pH ortamı simülasyonları kil içeren modeller için de gerçekleştirildi. Bunun için geleneksel ve eksfoliye kil içeren modeller tercih edildi ve Şekil 4.62'de sonuç geometrileri verilmektedir.



Şekil 4.62 : 2,5 ns simülasyondan sonra geleneksel (sol) ve eksfoliyasyonlu (sağ) kompozitlerin asidik pH'taki sonuç görüntüleri.

Şekil 4.62'de gösterilen geleneksel modelde, hem curcumin hem de LA ve GA monomerleri Sorption modülü ile aynı anda simülasyon kutusuna yerleştirildi. Bununla birlikte, simülasyonun sonunda, LA ve GA monomerleri MMT katmanına yaklaşma eğiliminde iken Curcumin molekülleri hem monomerlerle hem de kil yüzeyi ile etkileşim halindedir. Eksfoliye kompozit modeli için de benzer bir davranış gözlemlendi.

Adisik ve nötr pH ortamlarında gerçekleşen tüm simülasyonlara ait etkileşim enerjileri hesap edilmiştir. Etkileşim enerjileri, Curcumin-MMT, PLGA-MMT ve PLGA-Curcumin ikililerine ait van der Waals (vdW) ve elektrostatik katkılarla birlikte Şekil 4.63'te gösterilmektedir.



Şekil 4.63 : Sırasıyla PLGA-Curcumin (üst), Curcumin-MMT (orta) ve PLGA-MMT ikililerinin farklı pH ortamlarında van der Waals, elektrostatik ve toplam etkileşim enerjileri.

Şekil 4.63'te de gösterildiği gibi, nötr ortamdaki modellerin ortamı belirtilmemişken asidik ortamdakiler belirtilmiştir. PLGA/CUR, kil içermeyen nötr ortamdaki PLGA ve Curcumin içeren modeli temsil ederken, asidik ortamdaki de Asidik_PLGA/CUR şeklinde kodlanmıştır. PLGA ve Curcumin arasında belirgin olan vdW enerjilerinden dolayı güçlü bir etkileşim vardır. Ancak elektrostatik etkileşimler asidik ortamlarda daha belirgin haldedir. Özellikle toplam etkileşim enerjisinin 1/5'i elektrostatik katkılardan kaynaklanmaktadır. Bunun nedeni, LA ve GA monomerlerinin, sonlu küme hesaplamalarda daha önce görüldüğü gibi Curcumin ile kolayca hidrojen bağı oluşturabilmesidir. MMT'yi içeren nötr pH simülasyonlarında, en düşük toplam etkileşim enerjisi, eksfoliyasyonlu kompozit modelinde elde edildi. Öyleki hem geleneksel hem de interkale kil içeren modeller yaklaşık 260 kcal/mol eksfoliyasyonlu modelde daha fazla etkileşim göstermiştir. Kilin olmaması ise PLGA-Curcumin arasındaki etkileşimi 100 kcal/mol düşürmüştür. Çte yandan Şekil 4.63'te gösterilen ortadaki histogramlar MMT-Curcumin arasındaki etkileşime aittir. Nötr pH'da, en kuvvetli MMT-curcumin etkileşimi, geleneksel modelde oluşmuştur. Burada da etkin etkileşim bileşeni vdW enerjisidir. Geleneksel kil içeren modeldeki MMT-Curcumin etkileşimi sırasıyla 270 ve 404 kcal/mol eksfoliyasyonlu ve interkalasyonlu kompozitlere göre daha düşüktür. Çünkü bu modellerde az da olsa bir elektrostatik katkı mevcuttur. Asitik pH değerinde geleneksel kompozit içerisindeki MMT-Curcumin'in etkileşim enerjisi eksfoliyasyonlu modeldekinden düşük bulunmuştur. Bununla birlikte, bu enerjiler sırasıyla eksfoliyasyonlu ve geleneksel kompozitler için nötr pH değerinden 26 ve 57 kcal/mol daha yüksektir. Nötr pH'ın tersine, eksfoliyasyonlu kompozitte elektrostatik katkı azalmıştır. Şekil 4.63'te soldaki histogramlarda da görüleceği üzere, PLGA ve MMT arasında da güçlü bir etkileşim vardır. Nötr pH'da, interkale kompozitteki PLGA-MMT, 876 kcal/mol enerji ile en düşük etkileşimi sergilemektedir. Bu, eksfoliyasyonlu ve geleneksel kompozitlerden 460 ve 614 kcal/mol daha düşüktür. Her durumda elektrostatik katkı önemsenecek kadar küçüktür. Asitik pH'da etkileşim enerjisinde muazzam bir artış var. Özellikle, etkileşim enerjisi, geleneksel ve eksfoliyasyonlu kompozitlerde, nötr pH'a kıyasla, asidik pH ortamında sırasıyla 1838 ve 558 kcal/mol daha düşük bulunmuştur. Elektrostatik katkı sadece asidik ortamdaki eksfoliyasyonlu kompozitte kayda değer bir etki yapmıştır.

Bu etkileşim çiftlerine ait H-bağ sayıları Çizelge 4.15'te verilmiştir.

Çizelge 4.15 : Asidik ve nötr pH ortamlarındaki çiftlere ait H-bağ sayıları.

Etkileşim Çifti	Geleneksel	İnterkale	Eksfoliye	Asidik geleneksel	Asidik eksfoliye	PLGA/CUR	Asidik PLGA/CUR
CUR-MMT	1-2	1-3	1-11	0-2	0-4	-	-
PLGA-MMT	0-0	5-10	1-7	3-24	4-65	-	-
PLGA-CUR	4-8	1-9	1-12	6-65	5-57	9-14	4-71
MMT-H ₂ O	175-138	176-197	173-236	86-75	163-242	-	-
PLGA-H ₂ O	148-117	305-204	322-202	1980-1597	1682-1734	214-193	1725-1827
CUR-H ₂ O	135-101	128-95	137-101	158-84	125-73	130-85	107-47

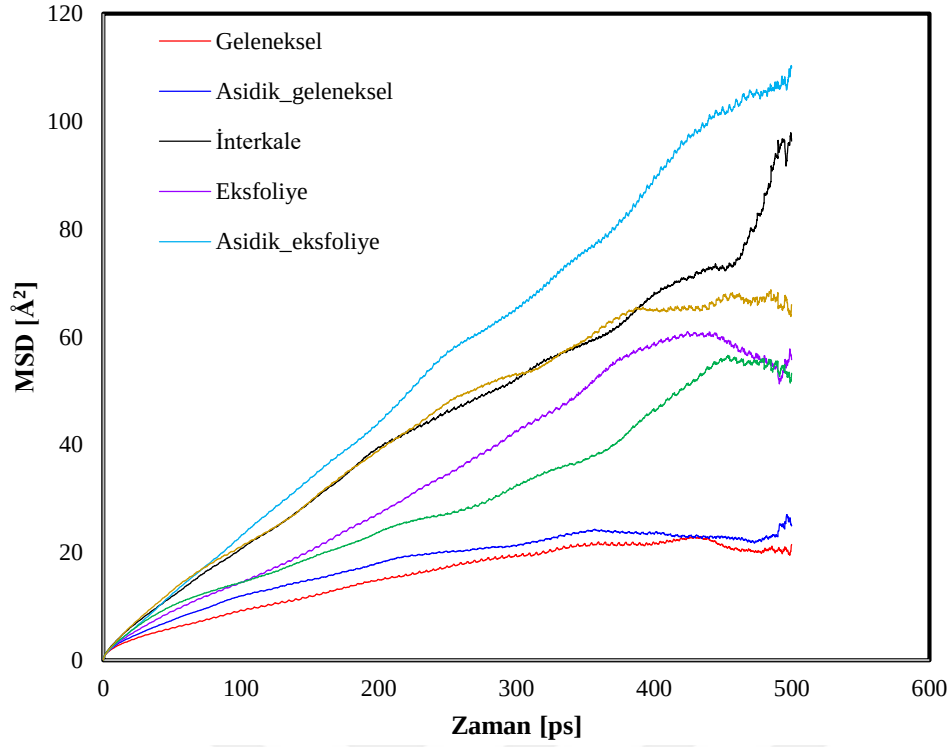
Çizelge 4.15'teki ilk rakamlar başlangıç geometrilerinde bulunan H-bağ sayısı iken ikinci olanlar ise simülasyon sonucunda elde edilen geometrilere ait rakamlardır. Çizelge 4.15'teki sayılar Şekil 4.63'te gösterilen elektrostatik enerjiler ile uyum içerisindedir. En çoğu 11 olan en az H-bağ sayısı MMT-Curcumin ikililerinde gözlenmiştir. Bunu MMT-PLGA ve PLGA-Curcumin takip etmiştir.

Asidik pH ortamında MMT-PLGA ve PLGA-Curcumin çiftlerindeki hidrojen bağlarının sayısı, sırasıyla geleneksel ve eksfoliyasyonlu kompozitlerde 0 ila 24 ve 7 ila 65 arasında büyük bir artış göstermiştir. Bütün bu hidrojen bağları ilgili molekülün hidrojenleri ve MMT yüzeyindeki oksijenler tarafından oluşmuştur.

Difüzyon katsayılarını hesaplamak için modellere ait MSD eğrileri hesaplanmıştır. Bu katsayılar, eğrilerin eğimi alındıktan sonra denklem 4.2'deki eşitlik kullanılarak bulunmuştur. Bu denklemdeki boyut sayısı 3 alınmış ve bulunan tüm katsayılar Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Şekil 4.64'te de görüleceği üzere, asidik pH'da, Curcumin normal pH değerine kıyasla daha fazla difüze olmuştur. Bu gözlem, Mahdavi ve ark.'nın çalışması (Mahdavi ve ark, 2016) ile uyumludur. Normal pH'da, Curcumin interkale modelde daha hızlı hareket etmiştir. Bunun sebebi muhtemelen

Şekil 4.64'te de gösterildiği gibi MMT-Curcumin ve PLGA-Curcumin arasındaki zayıf etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Hesaplanan difüzyon katsayıları, literatürdeki bir çalışmada (Samanta ve Roccatano, 2013) polietilen ve polipropilen içeren bir blok kopolimerdeki Curcumine ait MSD ile de uyumludur ve difüzyon katsayısı da aynı çalışmada $6,11 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.64 : Her model için MSD eğrileri.

Genel olarak, ilaç ve kil mineralleri (özellikle MMT) arasında kuvvetli bir etkileşim vardır ve bu nedenle ilacın salınması daha fazla bastırılmış ve kandaki ilaç konsantrasyonu düşürülmüştür (Yang ve ark, 2016). Kandaki acil bir terapötik konsantrasyonu gerektiren antihistaminikler için bastırılmış ilaç salınımı istenmemektedir.

Çizelge 4.16 : Modellere ait Curcumin moleküllerinin difüzyon katsayıları.

Model	Difüzyon katsayıları, $\times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$
Geleneksel	1,33
İnterkale	5,39
Eksfoliye	4,27
Asidik_geleneksel	1,34
Asidik_eksfoliye	7,31
PLGA/CUR	3,55
Asidik_PLGA/CUR	4,59

Öte yandan, yavaş ve sürekli salım gerektiren antibiyotikler, antihipertansif ve anti-psikotik ilaçlar için killer umut verici bir seçenek haline gelebilir (Yang ve ark, 2016). Bizim çalışmada da Curcumin ve MMT arasında genel duruma benzer güçlü bir etkileşimin olduğunu bulduk. İlaçların fizyolojik bir solüsyonda vücutta H^+ , Na^+ , K^+ ve Ca^{2+} gibi katyonlarla iyon değiştirme prosesi ile salınabileceği kabul edilmiştir (Jafarbeglou ve ark, 2016; Yang ve ark, 2016). Bu varsayımı test etmek için, en yüksek Curcumin-MMT etkileşimine sahip geleneksel kompozitin (-548 kcal/mol) son durumdaki geometrisi kullanılmıştır. Bunun için biyolojik iyonu temsilen, kilin doğasında bulunan ve her hegzagona 1 tane düşecek şekilde 580 tane sodyum iyonu (Na^+) ilave edilmiştir. Tüm sodyum iyonları başlangıçta -SiO altıgenlerin üzerinde konumlandırılmış ve daha sonra simülasyon 1 ns için sürdürülmüştür. Simülasyonun sonunda, çoğu Na iyonu MMT yüzeyinde bulunmayı tercih etmiştir. Şekil 4.60'tan da görüleceği üzere, MMT yüzeyi ile etkileşen birçok Curcumin molekülü bulunmaktadır. Sodyum iyonların eklenmesi ile bu etkileşim -548 kcal/mol'den -436 kcal/mol'e kadar zayıflamıştır. Bu bulgu, MMT yüzeyine kuvvetle bağlı olan Curcumin moleküllerinin, biyolojik iyonların eklenmesiyle serbest bırakılabileceğini ortaya koymaktadır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hedefli kanser tedavisine yönelik kil katkılı nanopartikül üretimi ve modellenmesi başlıklı tez çalışmasında, kanser tedavisine yönelik, farmakolojik uygulamaya hazır kil katkılı nanopartikülün, sistematik olarak nasıl üretilmesi gerektiği ortaya konmuştur. Üretilen NP sodyum montmorillonit (Na-MMT) kili, poli laktik ko-glikolik asit (PLGA) polimeri ve Curcumin anti-kanser ilacı bileşenlerini içermektedir. Kil, attritor kullanılarak nano boyuta indirgenmiştir. Dinamik ışın taraması (DLS) yöntemi ile üretilen kilin ortalama boyutu 30 nm olarak ölçülmüştür. PLGA/Curcumin kompoziti asetonda çözündürüldükten sonra kil çözeltisinin üzerine damlatılmış ve Diyaliz Membranı (DM) kullanılarak aseton bünayedden uzaklaştırılmıştır. Böylece, ortalama boyutu 200 nm altında ve uniform NP üretilmiştir.

Karakterizasyon analizlerinde kilin ve ilacın miktarca çok olan polimerin zincirlerine adsorbe olduğu ortaya çıkarılmış, bu üretim tekniği, literatürde ilk kez gerçekleştirilmiştir. Literatürde var olan yöntemlerde, polimer bazlı lipozomlar, misel ve dendrimer gibi nanopartiküller kullanılmıştır. Geliştirdiğimiz üretim yönteminde ise, kilin tabakalarının birbirinden ayrılması ve yaprağımsı hale getirilmesi işi, tamamen fiziksel yollarla gerçekleştirilmiş ve kil nm boyutta ilk kez bu kadar detaylı incelenmiştir.

Üretilen NP, hedefli kanser tedavisine uygun boyutlarda ve kendiliğinden birleşme prensibine göre miseller şeklinde üretilmiştir. NP'lerin maksimum 1250 µg Curcumin içerdiği saptanmış ve kil içermeyen PLGA/Curcumin partikülüne göre yaklaşık 5 kat daha uzun süre ile salımı gerçekleştirilmiştir. Yapılan toksisite ölçümlerinde, 3 gün süre ile maksimum dozda yapılan beslemede hücrelerin %70'nin yaşayabildiği ve dolayısıyla partikülün toksik olmadığı ortaya çıkarılmıştır. İn-vitro deneylerinde de Curcumin ilacının kanserli hücrelerin tamamına yakını öldürdüğü gözlenmiştir. Curcumin içeren bu nanopartikülün bileşenlerinin miktarca oranları 50 mg PLGA polimeri, 1250 µg Curcumin ilacı ve 10 mg Na-MMT kili olarak kayda geçmiştir. Ancak sulu ortamda 200 nm altında elde edilen bu nanopartiküllerin, dondurularak kurutulduktan sonra agregat oluşturduğu ve buna neden olanın da hidrofob olan

Curcumin ilacı olduğu ortaya çıkarılmıştır. Uygulamada bu sorunu ortadan kaldırmak için sulu ortamda üretilen NP çözeltisi -20 °C dondurularak piyasaya sürülebilir. Daha sonra uygun ortamda oda sıcaklığına getirilip kullanılabilir. Uygulama şekli damardan enjeksiyon (I. V.) yerine kontrollü veya oral salım şeklinde olabilir. Bu yöntem, az maliyetli olmasına karşın, taşınma sırasında olası kırılma riskini taşımaktadır. İstenirse, tween 80, poli etilen glikol (PEG) gibi polimerlerle, serbest haldeki Curcumin agregatlarını uzaklaştırıp daha kararlı ve duraylı bir NP üretmek ve bu şekilde kullanmak da mümkündür.

Curcumin ilacı ile birlikte üretilen NP, bir başka kanser etken madde, 5-Flourourasil (5-FU) ilacı ile de tekrar üretilmiştir. Curcumin ilacına göre daha hidrofil olan 5-FU, 500 µg alınarak deneyler tekrarlanmıştır. 5-FU içerikli nanopartiküllerin ortalama boyutları uniform ve 150 nm civarında elde edilmiştir. Yapılan karakterizasyon testleri sonucunda, Curcumin içeren NP'lerde olduğu gibi kil ve 5-FU molekülleri, miktarca çok olan PLGA sarmalına adsorbe olmuştur. Yapılan salım testlerinde, 5-FU ilacının inhibisyonu sağlayacak konsantrasyonunun yarı değeri, (IC₅₀) 21,30 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bu değer literatürdeki değerlerin yaklaşık iki katıdır. Yapılan in-vitro deneylerinde, 3 gün süre geçmesine rağmen hücrelerin birçoğunun halen yaşamakta olduğu görüldü. Bunun temel sebebi ise, hidrofil olan 5-FU ilacının PLGA/MMT kompoziti ile güçlü bir etkileşime girmiş olabileceği ve Curcumin ilacı ile karşılaştırıldığında salımının daha yavaş olabileceğidir. Hazırlanan formülasyonun 5-FU ile uygun olamayabileceği de değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında, deneysel çalışmaların yanında teorik çalışmalara da gereksinim duyulmuştur. Çünkü üretilen NP'e ait üç bileşenin birbiri ile olan etkileşimi net olarak ortaya çıkarılamamıştır. Bunun için ilk olarak sonlu küme hesaplamaları yapılmış ve LA-GA monomerlerinin birbiri ile olan ilişkisi implisit aseton, diklorometan ve su ortamında ortaya çıkarılmıştır. Benzer şekilde, PLGA-Curcumin, PLGA-MMT, MMT-Curcumin etkileşimleri de modellenmiş ve keto formun, enol formdan daha güçlü bir şekilde bağlandığı ortaya çıkarılmıştır.

Bu modellerdeki dezavantaj, hidrojen ile doyurulmuş sallantılı atomların, bundan dolayı oluşan H-bağları sayesinde çok büyük etkileşim enerjileridir. Bunu ortadan kaldırmak için periyodik modeller ele alınmış ve bağlanma enerjileri, yine H-bağları sayesinde daha makul değerlere düşürülmüştür. Benzer çalışmalar 5-FU içeren modeller için de gerçekleştirilmiştir. İlaç moleküllerinin kendi arasında kovalent bağ

oluşturarak başka bir molekül meydana getirmişlerdir. Bunun dışında, ilaç-polimer ve ilaç-kil arasındaki etkileşimlerin, Curcuminde olduğu gibi H-bağı sayesinde olduğu anlaşılmıştır. Daha karmaşık sistemlerin açıklanabilmesi için, kuantum hesaplamalarının yanı sıra moleküler dinamik (MD) simülasyonlar da gerçekleştirilmiştir. Bilindiği üzere çalışmada kullanılan Na-MMT kili tabakalı bir yapıdadır ve organik bir molekül ile adsorblandığında tabakalar arası bazal boşluk artmakta, kil interkale (aralanmış) hale gelmektedir. Küçük ilaç moleküllerinin bu boşluklarda birikebileceği öngörülmüştür. Bir diğer özellik ise, doğal montmorillonit kilinin tetrahedral ve oktehdral tabakalarındaki izomorfik yer değiştirme yeteneğidir. Bu yer değiştirme, yapısında bulunan serbest katyonlardan dolayıdır ve bu tip killer yüksek katyon değiştirme kapasitesine (KDK) sahiptirler. Bu özelliğinden dolayı da ilaç molekülleri yüzeylerdeki ve bazal boşluklardaki katyonlarla yer değiştirip kile adsorbe olabilmektedir.

Bu iki özellik, baz alınarak 85 KDK motifli bir Na-MMT iki tabakalı modeli su ortamında oluşturulup Curcumin ve 5-FU molekülleri ile ayrı ayrı MD simülasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen modellerde, özellikle tabakalar arasındaki ilaç moleküllerinin sodyum atomlarının yerine geçtiği gözlenmiştir. Modellere PLGA ilave edildiğinde ise tabakalaşmanın biraz daha arttığı görülmüş ve ilaç moleküllerinin kil yüzeylerinin yanında PLGA zinciri ile de etkileşime girdiği görülmüştür. Bu modellerde, daha çok interkale olmuş kil üzerinde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Literatürde de, organik bir molekül ile etkileşime giren montmorillonit tip killerin geleneksel ve eksfoliye modellerinin de adsorbsiyonda büyük rol aldığı ortaya konmuştur. Bulgularla, Curcumin ve 5-FU molekülleri için ayrı ayrı daha büyük ve kompleks modeller üretilmiş ve normal şartlar altında (1 atm, 298 K) 1,5 ns simülasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu simülasyonlar neticesinde PLGA/CUR, PLGA/MMT ve MMT/CUR arasında etkileşim olduğu ortaya çıkarılmış, PLGA ve ilaç moleküllerinin MMT yüzeyine adsorbsiyonu simülasyon süresince gözlenmiştir.

5-FU içeren geleneksel kil modelinde MMT/5-FU arasındaki etkileşim Curcumin içeren modelden yaklaşık 238 kcal/mol daha güçlü iken interkale modelde bu değer çok değişmemiş, eksfoliye modelde ise 346 kcal/mol enerjiye çıkmıştır. Eksfoliye kil formasyonunda 5-FU ile MMT arasında Curcumine nazaran daha güçlü bir etkileşim gözlenmiştir. Bu da, deneysel çalışmalarımızda in-vitro deneylerden gözlediğimiz 5-FU ilacının daha az hücre öldürmesi, acaba kil 5-FU ilaç moleküllerini yeterince

salamadı mı, sorusunu akla getirmektedir. Görüldüğü üzere kil ilaç etkileşimleri irdelenirken kilin ilacı taşımasının yanında salımının mümkün olup olmadığı da bir başka soru olarak karşımıza çıkmaktadır. Deneysel çalışmalarda olduğu gibi Curcumin ilacı için kil içeren ve içermeyen modeller geliştirilip MD simülasyonları normal vücut sıcaklığı olan 37,5 °C de 2,5 ns'ye kadar çıkarılmıştır. Burada, sıcaklığın arttırılmasının yanında su ortamında bozunup monomerlerine ayrışan PLGA polimeri de, LA ve GA monomerleri formunda ele alınmıştır. Böylece hem asidik hem de nötr ortamlarda kil içeren ve içermeyen modellere ait simülasyonlarla kil/ilac etkileşimi daha iyi incelenmiştir.

Yapılan bu simülasyonlarda asidik ortamda PLGA/MMT, PLGA/CUR ve MMT/CUR etkileşimleri hem elektrostatik hem de daha etkin vdW kuvvetlerinden dolayı nötr ortamdaki geleneksel kil modelinde görülmüşken ikinci olarak ise asidik ortamdaki geleneksel kil modelinde saptanmıştır. Buradaki etkileşim enerjileri sırasıyla -548 ve -491 kcal/mol olarak bulunmuştur.

Ancak halen ilacı hedefine ulaştırdıktan sonra salımını nasıl yapacağı büyük bir sorudur. Bunun için de literatürde bahsi geçen biyolojik iyon varlığında ilaç moleküllerinin desorbe olabileceği düşüncesini doğrulamak gerekir. MMT/CUR etkileşiminin en kuvvetli olduğu nötr ortamdaki geleneksel kil içeren modeldeki MMT kilinin bazal yüzeyini kaplayacak şekilde 580 tane sodyum iyonu yerleştirilmiş ve simülasyon 1 ns daha devam ettirilmiştir. Bunun sonucunda -548 kcal/mol olan etkileşim enerjisi -436 kcal/mol'e kadar düşmüş ve ilacın kil yüzeyinden desorbe olabileceği ortaya konmuştur.

Deneysel çalışmaların yanında teorik çalışmalarla da üretilen partikülün bileşenleri arasındaki etkileşim ortaya çıkarılmıştır. Curcumin ve 5-FU antikanser ilaçları ile PLGA ve MMT etkileşimleri sonlu küme, periyodik ve MD modelleri ile hesaplanmıştır. Sonlu küme modeli hesaplamalarında Curcumin'in PLGA ve MMT ile kuvvetli bir şekilde etkileşime girdiğini ortaya çıkarılmıştır. PLGA'yı oluşturan LA ve GA monomerleri de hidrojen bağı oluşumu yoluyla etkileşime girebildiği saptanmıştır. Periyodik bir MMT yüzeyinin kullanılmasının daha doğru etkileşim enerjileri elde etmek için bir gereklilik olduğu bulunmuştur. Böyle bir sonsuz MMT yüzeyi kullanıldığında, etkileşim enerjileri büyük ölçüde azalmıştır. Hem küme hem de

periyodik kuantum hesaplamaları, dikkate alınan kompozitlerin modellenmesi için belirli boyut sınırlamaları taşır.

Etkileşim enerjileri, üç farklı kompozit kullanılarak farklı pH değerlerinde MD simülasyonları ile araştırılmıştır: geleneksel, interkale ve eksfoliye. Bu simülasyonlar, PLGA-curcumin, MMT-curcumin ve PLGA-MMT'nin güçlü etkileşimde olduğunu ortaya koymuştur. Etkileşimin büyük kısmının vdW kuvvetlerinden kaynaklandığı ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, elektrostatik etkileşimlerin de sadece asidik pH'da belirgin hale geldiği bulunmuştur. MMT yokluğunda bile, PLGA'nın Curcumin'i kapsüllediği gözlenmiştir. MMT'nin varlığı, artan difüzyon oranına bağlı olarak Curcumin'in serbest bırakılmasını kolaylaştırmıştır. Curcumin ve MMT arasındaki güçlü etkileşim, biyolojik iyonların eklenmesiyle zayıflatılmış ve ilacın kil yüzeylerinden desorbe olduğu saptanmıştır. Genel olarak, bulgularımız, Curcumin'in bir MMT/PLGA kompozit ile birlikte taşınabileceği ve salımının mümkün olabileceğini göstermiştir.

Özetle, deneysel çalışmalarda üretilen MMT/PLGA kompozitine hem curcumin hem de 5-FU ilacı yüklenmesi ile malzemenin, alkaloyid yapısını taşımakta gösterdiği kabiliyet ortaya çıkarılmıştır. Deneysel çalışmalar sonucunda, dünyada ilk defa bu yöntemle üretilen ve kanser tedavisinde kullanılabilen bu nano ilaç taşıyıcının daha önce üretilen emsallerinden üstün özellikleri, aşağıda belirtildiği gibidir:

- Kilin eksfoliyasyonuna gerek duymadan polimerik materyal ile birleştirilmesi
- Santrifüjlemeye gerek duymadan nanokompozit elde edilmesi
- Daha yüksek ilaç yükleme kapasitesinin elde edilmesi
- Daha az toksik nanokompozit oluşturulması
- Hedefli kanser tedavisine yönelik ideal salım davranışına sahip nano ilaç taşıma sistemi üretilmesi

Üretilen NP kilin, yapıda sağlamlaştırıcı bir rol oynadığı düşünülmektedir. Sodyum gibi biyolojik iyon varlığında ise, Curcumin ilacının MMT yüzeyinden desorbe olabileceği ve MMT gibi killerin varlığı nanopartiküle mukoadhesif yetenek sağlayabileceği düşünülmüştür. Böylelikle ilacın, vücutta geçeceği ortamlarda hedefine daha etkin ve başarılı bir şekilde ulaşabileceği öngörülmüştür.

Üretilen NP'nin en önemli eksiği, in-vivo ortamda anti-kanser deneylerinin yapılmamış olmasıdır. Curcumin içeren NP ile in-vivo hayvan hücreleri üzerinde çalışmaların

yapılması gerekmekte ve başarılı olması halinde ileri safhalara geçileceği, özellikle 5-FU ile hazırlanacak olan NP'ün göğüs kanseri tedavisinde kullanılabileceği ve klinik, muadili tedavilerden daha üstün ve başarılı sonuçlar alabileceği öngörülmektedir.

Sonuç olarak, ticari olarak üretilebilecek bu NP'ün farmakolojik ve tıbbi uygulamalarda rahatlıkla kullanılabileceği öngörülmektedir.

Son yıllarda yapılan kanser tedavisi çalışmalarında boyutun önemi daha çok ön planda tutulmuştur. 50 nm civarında üretilebilecek nanopartiküllerle daha etkin ve hızlı hedefli kanser tedavisinin gerçekleştirileceği üzerine çalışmalar mevcuttur. Bizim çalışmamızda elde edilen hidrofil kil nano partikülleri 30-40 nm boyutlarında ölçülebilmektedir. İleriki çalışma dönemlerinde polimer kullanmadan kil ile uyumlu olabilecek 5-FU gibi hidrofil bir anti-kanser ilacıyla nanopartikül üretimi düşünülmektedir. Başarılı olması durumunda daha etkin ve verimli olmasının yanında daha doğal ve az maliyetli bir proses geliştirilmiş olacaktır. Polimerin çeşidinin ve varlığının tartışıldığı durumda kilin çeşidi de tartışmaya açıktır. Nitekin yapılacak in-vivo çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edilmezse sepiyolit tip bir kil de kullanılıp nanopartikül üretimi gerçekleştirilebilir ve hatta pirinç kabuğundan elde edilebilen mezoporos silikalar da kullanılıp kanser tedavisine uygun nano partikül üretimi yapılabilir.

Özetle bu çalışma, Reşadiye bölgesine ait sodyum montmorillonit katkılı nanopartikül üretimi ve modellenmesi başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek bitirilmiştir. Görüleceği üzere Türkiye başta montmorillonit ve sepiyolit olmak üzere Dünya ölçeğinde çok fazla kil mineraline sahiptir. Bu mineraller ile kanser tedavisine uygun partikül üretilebilir ve sağlık sektöründe egemen devletlerin güçleri kırılabilir ve özellikle ilaç sektöründe söz sahibi olan bir ülke haline gelebiliriz.

KAYNAKLAR

- Aguzzi, C., Cerezo, P., Viseras, C., & Caramella, C.** (2007). Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations. *Applied Clay Science*, 36(1-3), 22-36. doi:10.1016/j.clay.2006.06.015
- Ahlrichs, R., Bar, M., Haser, M., Horn, H., & Kolmel, C.** (1989). Electronic-Structure Calculations on Workstation Computers - the Program System Turbomole. *Chemical Physics Letters*, 162(3), 165-169. doi: 10.1016/0009-2614(89)85118-8
- Alin, J., Rubino, M., & Auras, R.** (2015). Effect of the solvent on the size of clay nanoparticles in solution as determined using an ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy methodology. *Appl Spectrosc*, 69(6), 671-678. doi:10.1366/14-07704
- Anand, P., Nair, H. B., Sung, B., Kunnumakkara, A. B., Yadav, V. R., Tekmal, R. R., & Aggarwal, B. B.** (2010). Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochem Pharmacol*, 79(3), 330-338. doi:10.1016/j.bcp.2009.09.003
- Astete, C. E., & Sabliov, C. M.** (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(3), 247-289. doi:10.1163/156856206775997322
- Atilhan, S.** (2007). *Molecular dynamics simulation of montmorillonite and mechanical and thermodynamic properties calculations*. (MSc. Thesis), Texas A&M University.
- Baek, M., Lee, J.-A., & Choi, S.-J.** (2012). Toxicological effects of a cationic clay, montmorillonite in vitro and in vivo. *Molecular & Cellular Toxicology*, 8(1), 95-101. doi:10.1007/s13273-012-0012-x
- Bahadori, F., Tekin, A., Karataş, D., & Çelik, M. S.** (2017). *Hedefli Kanser Tedavisine Yönelik PLGA-MMT nano kompozitinin üretimi ve Moleküler Dinamik simülasyonlarla incelenmesi* (Tübitak 115S801 no'lu projesi). Ankara
- Bahadori, F., Topcu, G., Eroglu, M. S., & Onyüksel, H.** (2014). A new lipid-based nano formulation of vinorelbine. *AAPS PharmSciTech*, 15(5), 1138-1148. doi:10.1208/s12249-014-0146-3

- Bakre, L. G., Sarvaiya, J. I., & Agrawal, Y. K.** (2016). Synthesis, Characterization, and Study of Drug Release Properties of Curcumin from Polycaprolactone /Organommodified Montmorillonite Nanocomposite. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. doi:10.1007/s12247-016-9253-x
- Basak, A., Chahatray R., Nayak, P.L.** (2014). Soy Protein Isolate Blended with Cloisite 30B for Controlled Release of Anticancer Drug Vincristine. *World Journal of Nano Science & Technology*, 3(1), 39-44. doi:10.5829/idosi.wjnst.2014.3.1.105
- Baxter, G. P., Burgess, L. L., & Daudt, H. W.** (1911). The Refractive Index of Water. *Journal of the American Chemical Society*, 33(6), 893-901. doi:10.1021/ja02219a010
- Becke, A. D.** (2009). Basis-set-free density-functional quantum chemistry. *International Journal of Quantum Chemistry*, 36(S23), 599-609. doi:10.1002/qua.560360862
- Beeman, D.** (1976). Some multistep methods for use in molecular dynamics calculations. *Journal of Computational Physics*, 20(2), 130-139. doi:10.1016/0021-9991(76)90059-0
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., & Haak, J. R.** (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8), 3684. doi:10.1063/1.448118
- Bilensoy, E., Gurkaynak, O., Ertan, M., Sen, M., & Hincal, A. A.** (2008). Development of nonsurfactant cyclodextrin nanoparticles loaded with anticancer drug paclitaxel. *J Pharm Sci*, 97(4), 1519-1529. doi:10.1002/jps.21111
- Bilici, A.** (2009). *Oksidatif Polikondezasyon ile Aromatik Halkalı Azometin Polimerlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu*. (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Boyd, D. B.** (1990). Aspects of Molecular Modeling. 321-354. doi:10.1002/9780470125786.ch9
- Boylu, F.** (2013). Modelling and optimisation of ageing characteristics of soda activated Na⁺-bentonites. *Applied Clay Science*, 83-84, 300-307. doi:10.1016/j.clay.2013.08.024
- Boylu, F., Cinku, K., Esenli, F., & Celik, M. S.** (2010). The separation efficiency of Na-bentonite by hydrocyclone and characterization of hydrocyclone products. *International Journal of Mineral Processing*, 94(3-4), 196-202. doi:10.1016/j.minpro.2009.12.004
- Boylu, F., Hojiyev, R., Ersever, G., Ulcay, Y., & Çelik, M. S.** (2012). Production of Ultrapure Bentonite Clays through Centrifugation Techniques. *Separation Science and Technology*, 47(6), 842-849. doi:10.1080/01496395.2011.634475

- Boys, S. F.** (1950). Electronic Wave Functions. I. A General Method of Calculation for the Stationary States of Any Molecular System. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 200(1063), 542-554. doi:10.1098/rspa.1950.0036
- Bragg, W. H., & Bragg, W. L.** (1913). The Reflection of X-rays by Crystals. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 88(605), 428-438. doi:10.1098/rspa.1913.0040
- Bulut, G., Chimeddorj, M., Esenli, F., & Çelik, M. S.** (2009). Production of desiccants from Turkish bentonites. *Applied Clay Science*, 46(2), 141-147. doi:10.1016/j.clay.2009.07.013
- Carothers, W. H.** (1929). Studies on Polymerization and Ring Formation. I. An Introduction to the General Theory of Condensation Polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 51(8), 2548-2559. doi:10.1021/ja01383a041
- Carroll, D.** (1959). Ion Exchange in Clays and Other Minerals. *Geological Society of America Bulletin*, 70(6), 749. doi:10.1130/0016-7606(1959)70[749:ieicao]2.0.co;2
- Chen, B., Evans, J. R., Greenwell, H. C., Boulet, P., Coveney, P. V., Bowden, A. A., & Whiting, A.** (2008). A critical appraisal of polymer-clay nanocomposites. *Chem Soc Rev*, 37(3), 568-594. doi:10.1039/b702653f
- Clark, S. J., Segall, M. D., Pickard, C. J., Hasnip, P. J., Probert, M. J., Refson, K., & Payne, M. C.** (2005). First principles methods using CASTEP. *Zeitschrift Fur Kristallographie*, 220(5-6), 567-570. doi:10.1524/zkri.220.5.567.65075
- Cui, L., Cho, H. Y., Shin, J.-W., Tarte, N. H., & Woo, S. I.** (2007). Polyethylene-Montmorillonite Nanocomposites: Preparation, Characterization and Properties. *Macromolecular Symposia*, 260(1), 49-57. doi:10.1002/masy.200751408
- D'Avila Carvalho Erbetta, C.** (2012). Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 03(02), 208-225. doi:10.4236/jbnnb.2012.32027
- Datt, A.** (2012). *Applications of mesoporous silica and zeolites for drug delivery*. (PhD), University of Iowa.
- Datta, S., and M.** (2013). MMT-PLGA Nanocomposites as an Oral and Controlled Release Carrier For 5-Fluorouracil: A Novel Approach. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 332-341.
- Dauber-Osguthorpe, P., Roberts, V. A., Osguthorpe, D. J., Wolff, J., Genest, M., & Hagler, A. T.** (1988). Structure and energetics of ligand binding to proteins: Escherichia coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins*, 4(1), 31-47. doi:10.1002/prot.340040106

- Davis, A. M., Joanis, G., & Tribe, L.** (2008). Molecular modeling of polymer-clay nanocomposite precursors: Lysine in montmorillonite interlayers. *J Comput Chem*, 29(6), 983-987. doi:10.1002/jcc.20855
- Debi Prasanna Mohanty, Y. P. P., Debasish Sahoo and P.L.Nayak.** (2012). Synthesis and Characterization of Chitosan/Cloisite 30B(MMT) Nanocomposite for Controlled Release of Anticancer Drug Curcumin *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 1(4), 52-62.
- Değim, İ.** (2011). Mised. *Farmasötik Nanoteknoloji.*, 8-13, 198-205.
- del Hoyo, C., Rives, V., & Vicente, M. A.** (1996). Thermal studies of pharmaceutical-clay systems Part I. Montmorillonite-based systems. *Thermochimica Acta*, 286(1), 89-103. doi:10.1016/0040-6031(96)02946-2
- Demirbas, A., Sari, A., & Isildak, O.** (2006). Adsorption thermodynamics of stearic acid onto bentonite. *J Hazard Mater*, 135(1-3), 226-231. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.11.056
- Depan, D., Kumar, A. P., & Singh, R. P.** (2009). Cell proliferation and controlled drug release studies of nanohybrids based on chitosan-g-lactic acid and montmorillonite. *Acta Biomater*, 5(1), 93-100. doi:10.1016/j.actbio.2008.08.007
- Dong, Y., & Feng, S. S.** (2005). Poly(d,l-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(30), 6068-6076. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.021
- Dunning, T. H.** (1989). Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *The Journal of Chemical Physics*, 90(2), 1007. doi:10.1063/1.456153
- Erkan, İ.** (2008). *Reşadiye bentonitinin amin ile modifikasyonu ve epoksi bazlı nanokompozit malzeme üretimi.* (Master Tezi), Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.
- Erkan, İ., Alp, İ., & Çelik, M. S.** (2010). Characterization of Organo-Bentonites Obtained from Different Linear-Chain Quaternary Alkylammonium Salts. *Clays and Clay Minerals*, 58(6), 792-802. doi:10.1346/ccmn.2010.0580607
- Erol, İ.** (2002). *1,2,3,4-Tetrahidronaftalin, Mesitilen Halkaları içeren 1,3 Trisüstitüe SiklobütanKetoetil Metakrilat Monomer ve Polimerlerinin Sentezi Karakterizasyonu.* (Doktora Tezi), Fırat Üniversitesi, Elazığ.
- Essawy, H., & El-Nashar, D.** (2004). The use of montmorillonite as a reinforcing and compatibilizing filler for NBR/SBR rubber blend. *Polymer Testing*, 23(7), 803-807. doi:10.1016/j.polymertesting.2004.03.003

- Farshi Azhar, F., & Olad, A.** (2014). A study on sustained release formulations for oral delivery of 5-fluorouracil based on alginate–chitosan/montmorillonite nanocomposite systems. *Applied Clay Science*, 101, 288-296. doi:10.1016/j.clay.2014.09.004
- Feldman, D.** (1981). Contemporary polymer chemistry, H. R. Allcock and F. W. Lampe, prentice-hall, englewood cliffs, NJ, 1981, 599 pp. *Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition*, 19(5), 275-276. doi:10.1002/pol.1981.130190509
- Feng, S. S.** (2006). Nanoparticle-based drug delivery system: Google Patents.
- Fermeglia, M., Ferrone, M., & Pricl, S.** (2003). Computer simulation of nylon-6/organoclay nanocomposites: prediction of the binding energy. *Fluid Phase Equilibria*, 212(1-2), 315-329. doi:10.1016/S0378-3812(03)00273-5
- Filipe, V., Hawe, A., & Jiskoot, W.** (2010). Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*, 27(5), 796-810. doi:10.1007/s11095-010-0073-2
- Flory, P. J.** (1937). The Mechanism of Vinyl Polymerizations1. *Journal of the American Chemical Society*, 59(2), 241-253. doi:10.1021/ja01281a007
- Francis, G. P., & Payne, M. C.** (1990). Finite Basis Set Corrections to Total Energy Pseudopotential Calculations. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 2(19), 4395-4404. doi: 10.1088/0953-8984/2/19/007
- Freeman, A. I., & Mayhew, E.** (1986). Targeted drug delivery. *Cancer*, 58(2 Suppl), 573-583.
- Furukawa, Y., Watkins, J. L., Kim, J., Curry, K. J., & Bennett, R. H.** (2009). Aggregation of montmorillonite and organic matter in aqueous media containing artificial seawater. *Geochem Trans*, 10, 2. doi:10.1186/1467-4866-10-2
- Gabbott, P.** (2008). *Principles and Applications of Thermal Analysis*: Blackwell.
- Gören, A. C., Çikrikçi, S., Çergel, M., & Bilsel, G.** (2009). Rapid quantitation of curcumin in turmeric via NMR and LC–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 113(4), 1239-1242. doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.014
- Gradishar, W. J., Tjulandin, S., Davidson, N., Shaw, H., Desai, N., Bhar, P., O'Shaughnessy, J.** (2005). Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol*, 23(31), 7794-7803. doi:10.1200/JCO.2005.04.937

- Greathouse, J., Johnson, K., & Greenwell, H.** (2014). Interaction of Natural Organic Matter with Layered Minerals: Recent Developments in Computational Methods at the Nanoscale. *Minerals*, 4(2), 519-540. doi:10.3390/min4020519
- Green, M. S.** (1952). Markoff Random Processes and the Statistical Mechanics of Time-Dependent Phenomena. *The Journal of Chemical Physics*, 20(8), 1281-1295.
- Greene-Kelly, R.** (1970). Optical Properties of Organic Complexes of Montmorillonite. *Clay Minerals*, 8.
- Heinz, H.** (2012). Clay minerals for nanocomposites and biotechnology: surface modification, dynamics and responses to stimuli. *Clay Minerals*, 47(2), 205-230. doi:10.1180/claymin.2012.047.2.05
- Heinz, H., & Suter, U. W.** (2004). Atomic Charges for Classical Simulations of Polar Systems. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(47), 18341-18352. doi:10.1021/jp048142t
- Helmy, A. K., Ferreira, E. A., & Debussetti, S. G.** (1994). Cation-Exchange Capacity and Condition of Zero Charge of Hydroxy-Al Montmorillonite. *Clays and Clay Minerals*, 42(4), 444-450. doi: 10.1346/Ccmn.1994.0420410
- Hocine, O., Boufatit, M., & Khouider, A.** (2004). Use of montmorillonite clays as adsorbents of hazardous pollutants. *Desalination*, 167, 141-145. doi:10.1016/j.desal.2004.06.122
- Hohenberg, P., & Kohn, W.** (1964). Inhomogeneous Electron Gas. *Physical Review*, 136(3B), B864-B871. doi:10.1103/PhysRev.136.B864
- Holzer, M., Vogel, V., Mantele, W., Schwartz, D., Haase, W., & Langer, K.** (2009). Physico-chemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2), 428-437.
- Hou, D., Gui, R., Hu, S., Huang, Y., Feng, Z., & Ping, Q.** (2015). Preparation and Characterization of Novel Drug-Inserted-Montmorillonite Chitosan Carriers for Ocular Drug Delivery. *Advances in Nanoparticles*, 04(03), 70-84. doi:10.4236/anp.2015.43009
- Hughes, G. A.** (2005). Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine*, 1(1), 22-30. doi:10.1016/j.nano.2004.11.009
- Iliescu, R. I., Andronescu, E., Ghitulica, C. D., Voicu, G., Ficai, A., & Hoteteu, M.** (2014). Montmorillonite-alginate nanocomposite as a drug delivery system--incorporation and in vitro release of irinotecan. *Int J Pharm*, 463(2), 184-192. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.08.043

- Jafarbeglou, M., Abdouss, M., Shoushtari, A. M., & Jafarbeglou, M.** (2016). Clay nanocomposites as engineered drug delivery systems. *RSC Adv.*, 6(55), 50002-50016. doi:10.1039/c6ra03942a
- Jagtap, S. B., Rao, V. S., & Ratna, D.** (2013). Preparation of flexible epoxy/clay nanocomposites: effect of preparation method, clay modifier and matrix ductility. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 32(3), 183-196. doi:10.1177/0731684412462916
- Jones, M. C., & Leroux, J. C.** (1999). Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 48(2), 101-111. doi: 10.1016/S0939-6411(99)00039-9
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L.** (1983). Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926-935. doi: 10.1063/1.445869
- Joshi, G. V., Kevadiya, B. D., Patel, H. A., Bajaj, H. C., & Jasra, R. V.** (2009). Montmorillonite as a drug delivery system: intercalation and in vitro release of timolol maleate. *Int J Pharm*, 374(1-2), 53-57. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.03.004
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C.** (2016). Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem Rev*, 116(4), 2602-2663. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00346
- Karataş, D.** (2011). *Sepiyolit kiline kuvaterner amin surfaktanlarının adsorbsiyonunun deneysel ve teorik olarak incelenmesi.* (Master Tezi), İstanbul Teknik Üniversitesi.
- Karataş, D., Tekin, A., Bahadori, F., & Celik, M. S.** (2017). Interaction of Curcumin in a Drug Delivery System including a Composite with Poly(lactic-co-glycolic acid) and Montmorillonite: A density functional theory and Molecular Dynamics Study. *J. Mater. Chem. B*. doi:10.1039/c7tb01964e
- Karataş, D., Tekin, A., & Çelik, M. S.** (2013). Adsorption of quaternary amine surfactants and their penetration into the intracrystalline cavities of sepiolite. *New Journal of Chemistry*, 37(12), 3936. doi:10.1039/c3nj00752a
- Kaur, M., & Datta, M. D.** (2013). Synthesis and characterization of Biodegradable clay-polymer nanocomposites for oral sustained release of antiinflammatory drug. *European Chemical Bulletin*, 2(9), 670-678.
- Kedar, U., Phutane, P., Shidhaye, S., & Kadam, V.** (2010). Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine*, 6(6), 714-729. doi:10.1016/j.nano.2010.05.005

- Keren, R., & Oconnor, G. A.** (1982). Effect of Exchangeable Ions and Ionic-Strength on Boron Adsorption by Montmorillonite and Illite. *Clays and Clay Minerals*, 30(5), 341-346. doi: 10.1346/Ccmn.1982.0300504
- Kevadiya, B. D., Patel, H. A., Joshi, G. V., Abdi, S. H., & Bajaj, H. C.** (2010). Montmorillonite-Alginate Composites as a Drug delivery System: Intercalation and In vitro Release of Diclofenac sodium. *Indian J Pharm Sci*, 72(6), 732-737. doi:10.4103/0250-474X.84582
- Kevadiya, B. D., Patel, T. A., Jhala, D. D., Thumbar, R. P., Brahmbhatt, H., Pandya, M. P., Bajaj, H. C.** (2012). Layered inorganic nanocomposites: a promising carrier for 5-fluorouracil (5-FU). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81(1), 91-101. doi:10.1016/j.ejpb.2012.01.004
- Khalili, F. I., Salameh, N. a. H., & Shaybe, M. M.** (2013). Sorption of Uranium(VI) and Thorium(IV) by Jordanian Bentonite. *Journal of Chemistry*, 2013, 1-13. doi:10.1155/2013/586136
- Koçoğlu, İ.** (2006). *Çok cisimli analitik gömülü ataom potansiyellerini kullanılarak sıvı bcc metal ve alaşımlarının moleküler dinamik simülasyonu.* (PhD.), Trakya Üniversitesi, Edirne.
- Kohn, W., & Sham, L. J.** (1965). Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Physical Review*, 140(4A), A1133-A1138. doi:10.1103/PhysRev.140.A1133
- Kolev, T. M., Velcheva, E. A., Stamboliyska, B. A., & Spiteller, M.** (2005). DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. *International Journal of Quantum Chemistry*, 102(6), 1069-1079. doi:10.1002/qua.20469
- Kubo, R.** (1957). Statistical-Mechanical Theory of Irreversible Processes. I. General Theory and Simple Applications to Magnetic and Conduction Problems. *Journal of the Physical Society of Japan*, 12(6), 570-586. doi:10.1143/jpsj.12.570
- Li, Y. Y., & Hou, T. J.** (2010). Computational Simulation of Drug Delivery at Molecular Level. *Current Medicinal Chemistry*, 17(36), 4482-4491. doi: 10.2174/092986710794182935
- Lin, F. H., Lee, Y. H., Jian, C. H., Wong, J. M., Shieh, M. J., & Wang, C. Y.** (2002). A study of purified montmorillonite intercalated with 5-fluorouracil as drug carrier. *Biomaterials*, 23(9), 1981-1987. doi: 10.1016/S0142-9612(01)00325-8
- López-Galindo, A., & Viseras, C.** (2004). Pharmaceutical and cosmetic applications of clays. 1, 267-289. doi:10.1016/s1573-4285(04)80044-9

- Madusanka, N., de Silva, K. M., & Amaratunga, G.** (2015). A curcumin activated carboxymethyl cellulose-montmorillonite clay nanocomposite having enhanced curcumin release in aqueous media. *Carbohydr Polym*, 134, 695-699. doi:10.1016/j.carbpol.2015.08.030
- Mahdavi, M., Rahmani, F., & Nouranian, S.** (2016). Molecular simulation of pH-dependent diffusion, loading, and release of doxorubicin in graphene and graphene oxide drug delivery systems. *J. Mater. Chem. B*, 4(46), 7441-7451. doi:10.1039/c6tb00746e
- Mainardes, R. M., Gremião, M. P. D., Evangelista, R. C.** (2006). Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4, 523-530.
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J.** (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*, 3(3), 1377-1397. doi:10.3390/polym3031377
- Malayoğlu, U., Akar, A.** (1995). Killerin sınıflandırılmasında ve kullanım alanlarının saptanmasında aranan kriterlerin irdelenmesi. *Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu*, 125-132.
- Malesu, V. K., Sahoo, D., Nayak, P. L.** (2011). Chitosan-Sodium alginate nanocomposites blended with Cloisite 30B as a novel drug delivery system for anticancer drug curcumin. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical technology*, 2(3), 402-411.
- Masindi, V., Gitari, M. W., Tutu, H., & DeBeer, M.** (2015). Efficiency of ball milled South African bentonite clay for remediation of acid mine drainage. *Journal of Water Process Engineering*, 8, 227-240. doi:10.1016/j.jwpe.2015.11.001
- Mathew, A., Fukuda, T., Nagaoka, Y., Hasumura, T., Morimoto, H., Yoshida, Y., Kumar, D. S.** (2012). Curcumin loaded-PLGA nanoparticles conjugated with Tet-1 peptide for potential use in Alzheimer's disease. *PLoS One*, 7(3), e32616. doi:10.1371/journal.pone.0032616
- Meier, L. P., & Nuesch, R.** (1999). The Lower Cation Exchange Capacity Limit of Montmorillonite. *J Colloid Interface Sci*, 217(1), 77-85. doi:10.1006/jcis.1999.6254
- Milman, V. V., Lee, M. H., & Payne, M. C.** (1994). Ground-state properties of CoSi₂ determined by a total-energy pseudopotential method. *Phys Rev B Condens Matter*, 49(23), 16300-16308.
- Mohammadi, F., Bordbar, A. K., Divsalar, A., Mohammadi, K., & Saboury, A. A.** (2009). Analysis of Binding Interaction of Curcumin and Diacetylcurcumin with Human and Bovine Serum Albumin Using Fluorescence and Circular Dichroism Spectroscopy. *Protein Journal*, 28(3-4), 189-196. doi:10.1007/s10930-009-9184-1

- Mohan, P. R. K., Sreelakshmi, G., Muraleedharan, C. V., & Joseph, R.** (2012). Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 62, 77-84. doi:10.1016/j.vibspec.2012.05.002
- Mohanambe, L., & Vasudevan, S.** (2005). Anionic clays containing anti-inflammatory drug molecules: comparison of molecular dynamics simulation and measurements. *J Phys Chem B*, 109(32), 15651-15658. doi:10.1021/jp050480m
- Motokura, K., Nakagiri, N., Mizugaki, T., Ebitani, K., & Kaneda, K.** (2007). Nucleophilic substitution reactions of alcohols with use of montmorillonite catalysts as solid Bronsted acids. *J Org Chem*, 72(16), 6006-6015. doi:10.1021/jo070416w
- Mukerjee, A., & Vishwanatha, J. K.** (2009). Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. *Anticancer Res*, 29(10), 3867-3875.
- Nosé, S.** (1984). A unified formulation of the constant temperature molecular dynamics methods. *The Journal of Chemical Physics*, 81(1), 511. doi:10.1063/1.447334
- Oliveira, G. F., Ferrari, P. C., Carvalho, L. Q., & Evangelista, R. C.** (2010). Chitosan–pectin multiparticulate systems associated with enteric polymers for colonic drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 1004-1009. doi:10.1016/j.carbpol.2010.06.041
- Önal, M., Sarıkaya, Y., Alemdaroğlu, T.** (2001). Investigation of the Microporous and Mesoporous Structures of the Reşadiye (Tokat/Turkey) Bentonite and its Fractions. *Turkish Journal of Chemistry*, 25, 241-249.
- Onyüksel, H., & Banerjee, A.** (2011). Phospholipid-based Nanomicelles in Cancer Nanomedicine. In V. R. Preedy (Ed.).
- Önyüksel, H., & Çomoğlu, T.** (2014). Nanotaşıyıcıların Hedeflendirilmesi. In A. Zırh-Gürsoy (Ed.), *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları* (pp. 211-225).
- Oruçoğlu, E.** (2011). *Reşadiye bentonitinin organik ve inorganik katyonlarla modifikasyonu ve modifiye ürünlerde 75Se radyoizotopunun adsorpsiyonunun incelenmesi*. (Doktora Tezi) İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul.
- Orucoglu, E., & Schroeder, P. A.** (2016). Investigating the expanding behavior and thermal stability of HDPy modified organo-bentonite by X-ray diffraction technique. *Applied Clay Science*, 132-133, 90-95. doi:10.1016/j.clay.2016.05.021
- Otto, C. C., & Haydel, S. E.** (2013). Exchangeable ions are responsible for the in vitro antibacterial properties of natural clay mixtures. *PLoS One*, 8(5), e64068. doi:10.1371/journal.pone.0064068

- Parida, U. K., Nayak, A. K., Binhani, B. K., & Nayak, P. L.** (2011). Synthesis and Characterization of Chitosan-Polyvinyl Alcohol Blended with Cloisite 30B for Controlled Release of the Anticancer Drug Curcumin. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 02(04), 414-425. doi:10.4236/jbnb.2011.24051
- Park, J. H., Allen, M. G., & Prausnitz, M. R.** (2005). Biodegradable polymer microneedles: fabrication, mechanics and transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 104 (2005) 51 – 66
- Patel, M. P., Patel, R. R., & Patel, J. K.** (2010). Chitosan Mediated Targeted Drug Delivery System: A Review. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 536-557.
- Pavot, V., Berthet, M., Resseguier, J., Legaz, S., Handke, N., Gilbert, S. C., Verrier, B.** (2014). Poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) particles as versatile carrier platforms for vaccine delivery. *Nanomedicine (Lond)*, 9(17), 2703-2718. doi:10.2217/nnm.14.156
- Perdew, J. P., Burke, K., & Ernzerhof, M.** (1996). Generalized gradient approximation made simple. *Physical Review Letters*, 77(18), 3865-3868. doi:10.1103/PhysRevLett.77.3865
- Perdew, J. P., Chevary, J. A., Vosko, S. H., Jackson, K. A., Pederson, M. R., Singh, D. J., & Fiolhais, C.** (1992). Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. *Physical Review B*, 46(11), 6671-6687.
- Poli, A. L., Batista, T., Schmitt, C. C., Gessner, F., & Neumann, M. G.** (2008). Effect of sonication on the particle size of montmorillonite clays. *J Colloid Interface Sci*, 325(2), 386-390. doi:10.1016/j.jcis.2008.06.016
- Potenza, M. A., Sanvito, T., Argenti, S., Cella, C., Paroli, B., Lenardi, C., & Milani, P.** (2015). Single particle optical extinction and scattering allows real time quantitative characterization of drug payload and degradation of polymeric nanoparticles. *Sci Rep*, 5, 18228. doi:10.1038/srep18228
- Rachmawati, H., Yanda, Y. L., Rahma, A., & Mase, N.** (2016). Curcumin-Loaded PLA Nanoparticles: Formulation and Physical Evaluation. *Sci Pharm*, 84(1), 191-202. doi:10.3797/scipharm.ISP.2015.10
- Ray, S. S., & Okamoto, M.** (2003). Polymer/layered silicate nanocomposites: a review from preparation to processing. *Progress in Polymer Science*, 28(11), 1539-1641. doi:10.1016/j.progpolymsci.2003.08.002
- Reddy, A. B., Manjula, B., Jayaramudu, T., Sadiku, E. R., Anand Babu, P., & Periyar Selvam, S.** (2016). 5-Fluorouracil Loaded Chitosan-PVA/Na+MMT Nanocomposite Films for Drug Release and Antimicrobial Activity. *Nano-Micro Letters*. doi:10.1007/s40820-016-0086-4

- Rosenthal, E., Poizot-Martin, I., Saint-Marc, T., Spano, J. P., Cacoub, P., & Group, D. N. X. S.** (2002). Phase IV study of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in AIDS-related Kaposi sarcoma. *Am J Clin Oncol*, 25(1), 57-59.
- Rostamizadeh, K., Vahedpour, M., & Bozorgi, S.** (2012). Synthesis, characterization and evaluation of computationally designed nanoparticles of molecular imprinted polymers as drug delivery systems. *Int J Pharm*, 424(1-2), 67-75. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.054
- Rungnim, C., Rungrotmongkol, T., Hannongbua, S., & Okumura, H.** (2013). Replica exchange molecular dynamics simulation of chitosan for drug delivery system based on carbon nanotube. *J Mol Graph Model*, 39, 183-192. doi:10.1016/j.jmgm.2012.11.004
- Sabah, E., & Çelik, M. S.** (2002). Adsorption Mechanism of Quaternary Amines by Sepiolite. *Separation Science and Technology*, 37(13), 3081-3097. doi:10.1081/ss-120005658
- Sahu, A., Kasoju, N., & Bora, U.** (2008). Fluorescence study of the curcumin-casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells. *Biomacromolecules*, 9(10), 2905-2912. doi:10.1021/bm800683f
- Salcedo, I., Aguzzi, C., Sandri, G., Bonferoni, M. C., Mori, M., Cerezo, P., Caramella, C.** (2012). In vitro biocompatibility and mucoadhesion of montmorillonite chitosan nanocomposite: A new drug delivery. *Applied Clay Science*, 55, 131-137. doi:10.1016/j.clay.2011.11.006
- Samadi, N., Abbadessa, A., Di Stefano, A., van Nostrum, C. F., Vermonden, T., Rahimian, S., Hennink, W. E.** (2013). The effect of lauryl capping group on protein release and degradation of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) particles. *J Control Release*, 172(2), 436-443. doi:10.1016/j.jconrel.2013.05.034
- Samanta, S., & Roccatano, D.** (2013). Interaction of Curcumin with PEO-PPO-PEO block copolymers: a molecular dynamics study. *J Phys Chem B*, 117(11), 3250-3257. doi:10.1021/jp309476u
- Schäfer, A., Huber, C., & Ahlrichs, R.** (1994). Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr. *The Journal of Chemical Physics*, 100(8), 5829-5835. doi:10.1063/1.467146
- Schofield, P.** (1973). Computer simulation studies of the liquid state. *Computer Physics Communications*, 5(1), 17-23. doi:10.1016/0010-4655(73)90004-0
- Sevim, A. M., Hojiyev, R., Gül, A., & Çelik, M. S.** (2011). Preparation of novel heterogeneous catalysts by adsorption of a cationic tetrapyrrole on to bentonite: equilibrium, kinetics, and thermodynamics. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, 143(3), 385-400. doi:10.1007/s00706-011-0599-y

- Sezgin, Z., Yüksel, N., & Baykara, T.** (2003). İlaç taşıyıcı sistemler olarak polimerik misellerin hazırlanması ve karakterizasyonu. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 32(2), 125-142.
- Singh, B., & Chauhan, N.** (2008). Preliminary evaluation of molecular imprinting of 5-fluorouracil within hydrogels for use as drug delivery systems. *Acta Biomater*, 4(5), 1244-1254. doi:10.1016/j.actbio.2008.03.017
- Staudinger, H.** (1920). *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 53(1073).
- Sun, B., Ranganathan, B., & Feng, S. S.** (2008). Multifunctional poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer. *Biomaterials*, 29(4), 475-486. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.09.038
- Svagan, A. J., Akesson, A., Cardenas, M., Bulut, S., Knudsen, J. C., Risbo, J., & Plackett, D.** (2012). Transparent films based on PLA and montmorillonite with tunable oxygen barrier properties. *Biomacromolecules*, 13(2), 397-405. doi:10.1021/bm201438m
- Tanaka, G., & Goettler, L. A.** (2002). Predicting the binding energy for nylon 6,6/clay nanocomposites by molecular modeling. *Polymer*, 43(2), 541-553. doi:10.1016/S1089-3156(01)00014-9
- Tombácz, E., & Szekeres, M.** (2006). Surface charge heterogeneity of kaolinite in aqueous suspension in comparison with montmorillonite. *Applied Clay Science*, 34(1-4), 105-124. doi:10.1016/j.clay.2006.05.009
- Torchilin, V. P.** (2001). Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2-3), 137-172. doi:10.1016/s0168-3659(01)00299-1
- Toth, R., Ferrone, M., Miertus, S., Chiellini, E., Fermeiglia, M., & Pricl, S.** (2006). Structure and energetics of biocompatible polymer nanocomposite systems: a molecular dynamics study. *Biomacromolecules*, 7(6), 1714-1719. doi:10.1021/bm050937y
- Url-1**<<http://chemistry.tutorvista.com/analytical-chemistry/computational-chemistry.html>>, erişim tarihi 06.03.2017.
- Verdonck, E., Schaap, K., & Thomas, L. C.** (1999). A discussion of the principles and applications of Modulated Temperature DSC (MTDSC). *International Journal of Pharmaceutics*, 192(1), 3-20. doi:10.1016/s0378-5173(99)00267-7
- Viani, A., Gaultieri, A. F., & Artioli, G.** (2002). The nature of disorder in montmorillonite by simulation of X-ray powder patterns. *American Mineralogist*, 87(7), 966-975.

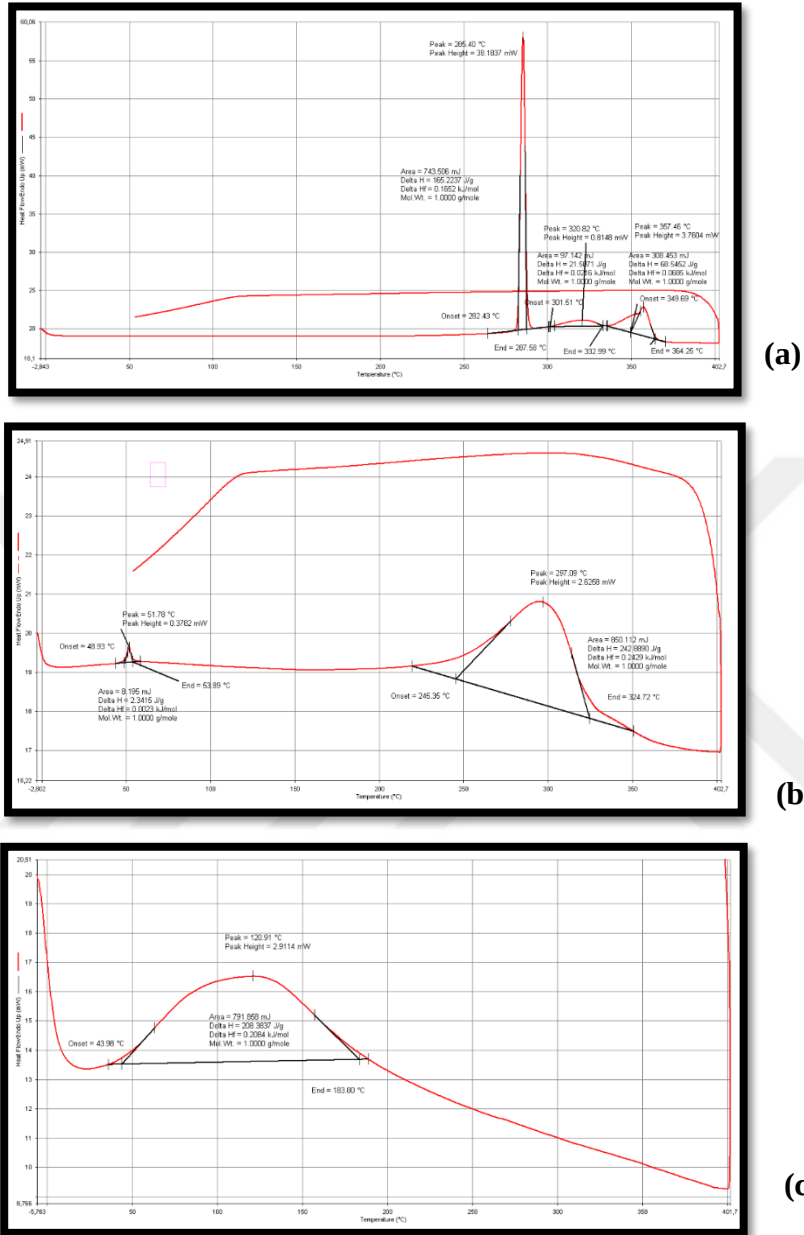
- Viseras, C., Cerezo, P., Sanchez, R., Salcedo, I., & Aguzzi, C.** (2010). Current challenges in clay minerals for drug delivery. *Applied Clay Science*, 48(3), 291-295. doi:10.1016/j.clay.2010.01.007
- Waghela, B. N., Sharma, A., Dhumale, S., Pandey, S. M., & Pathak, C.** (2015). Curcumin conjugated with PLGA potentiates sustainability, anti-proliferative activity and apoptosis in human colon carcinoma cells. *PLoS One*, 10(2), e0117526. doi:10.1371/journal.pone.0117526
- Wang, X., Du, Y., & Luo, J.** (2008). Biopolymer/montmorillonite nanocomposite: preparation, drug-controlled release property and cytotoxicity. *Nanotechnology*, 19(6), 065707. doi:10.1088/0957-4484/19/6/065707
- Wilson, M. J.** (1999). The origin and formation of clay minerals in soils: past, present and future perspectives. *Clay Minerals*, 34(1), 7-25. doi: 10.1180/000985599545957
- Xi, Y., Frost, R. L., He, H., Klopogge, T., & Bostrom, T.** (2005). Modification of Wyoming montmorillonite surfaces using a cationic surfactant. *Langmuir*, 21(19), 8675-8680. doi:10.1021/la051454i
- Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M., & Chauhan, S. C.** (2010). Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *J Colloid Interface Sci*, 351(1), 19-29. doi:10.1016/j.jcis.2010.05.022
- Yang, J. H., Lee, J. H., Ryu, H. J., Elzatahry, A. A., Allothman, Z. A., & Choy, J. H.** (2016). Drug-clay nanohybrids as sustained delivery systems. *Applied Clay Science*, 130, 20-32. doi:10.1016/j.clay.2016.01.021
- Yıldırım, H.** (2012). *Bakır Metali Nanoparçacıkların Molkeüler Dinamik Simülasyonu*. (Master Tezi), PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ, Denizli.
- Zeng, Q. H., Yu, A. B., Lu, G. Q., & Standish, R. K.** (2003). Molecular dynamics simulation of organic-inorganic nanocomposites: Layering behavior and interlayer structure of organoclays. *Chemistry of Materials*, 15(25), 4732-4738. doi:10.1021/cm0342952
- Zhang, C., Qineng, P., & Zhang, H.** (2004). Self-assembly and characterization of paclitaxel-loaded N-octyl-O-sulfate chitosan micellar system. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 39(1-2), 69-75. doi:10.1016/j.colsurfb.2004.09.002
- Zhang, H., Xu, Z. P., Lu, G. Q., & Smith, S. C.** (2010). Computer Modeling Study for Intercalation of Drug Heparin into Layered Double Hydroxide. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(29), 12618-12629. doi:10.1021/jp102724s
- Zırh-Gürsoy, A.** (2014). *Nanotaşıyıcıların Hedeflendirilmesi*. Kontrollü salım sistemleri derneği, Yayın No:3, İstanbul, Türkiye.

EKLER

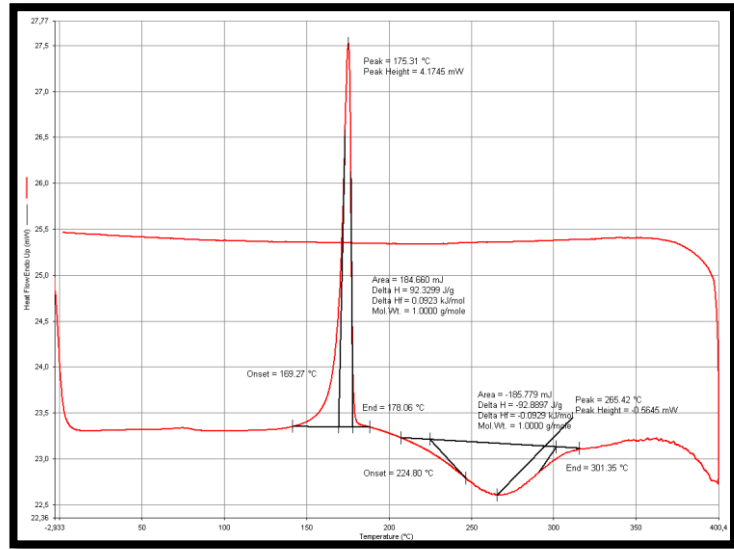
EK A: DSC eğrileri



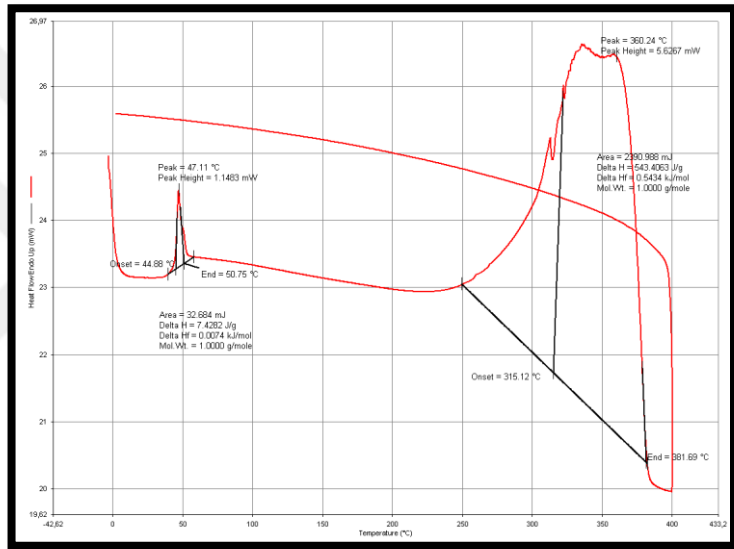
EK A



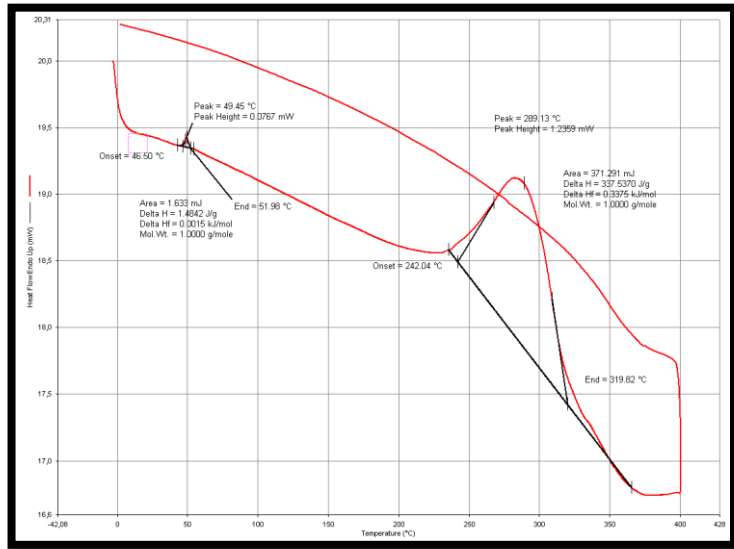
Şekil A 1: DSC termogramları: (a) 5-FU, (b) 5-FU_NP, (c) AT1.



(a)



(b)



(c)

Şekil A 2: DSC termogramları: (a) Curcumin, (b) PLGA ve (c) DM3 kodlu NP.

Çizelge A.1 : Kil süspansiyonunun tekrarlanmış boyut analiz sonuçları.

Numune adı	Pik sayısı	Hacimsel, %	Hacimsel boyut, nm	Sayı adedi, %	Nümerik boyut, nm
%0,1 seyreltme 0 dak, UP	1	13,1	100,7	100	105,8
	2	86,9	491,5		
%0,1 seyreltme 0,5 dak, UP	1	79,1	326,7	100	57,14
	2	20,9	57,0		
%0,1 seyreltme 1,5 dak, UP	1	22,0	109,9	100	101,9
	2	78,0	581,4		
%0,1 seyreltme 3 dak, UP	1	20,1	53,8	100	146,3
	2	79,9	261,4		
%0,1 seyreltme 5 dak, UP	1	100	212,4	100	54,3
%0,1 seyreltme 3 dak, UP-eski	1	100	199,5	100	71,7
%0,01 seyreltme 3 dak, UP-eski	1	34	198,1	100	119,6
	2	66	5206		
%0,005 seyreltme 0,5 dak, UP-eski	1	100	221,1	100	144,2
%0,1 seyreltme 0 dak, UP- 1saat 6000 rpm	1	32,0	39,5	100	38,3
	2	31,0	99,94		
	3	37,0	233,4		
%0,1 seyreltme 5 dak, UP- 1saat 6000 rpm	1	9,7	79,3	100	70,0
	2	35,3	412,1		
	3	55,0	5061		
%0,1 seyreltme 3 dak, UP- 1saat 6000 rpm- eski	1	100	146,8	100	89,2
%0,01 seyreltme 3 dak, UP- 1saat 6000 rpm- eski	1	53,1	144,8	100	88,8
	2	46,9	5387		
%0,005 seyreltme 3 dak, UP- 1saat 6000 rpm- eski	1	61,9	104,0	100	79,9
	2	38,1	234,9		

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyad :Deniz Karataş
Doğum Tarihi ve Yeri : 01.01.1982/Gölmarmara
E-posta : karatasde@itu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2009, İstanbul Teknik Üniversitesi, Maden Fakültesi, Maden Mühendisliği
- **Yükseklisans** : 2011, İstanbul Teknik Üniversitesi, Cevher Hazırlama Mühendisliği Anabilim Dalı, Cevher Hazırlama Mühendisliği Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2004-2009 yılları arasında İstanbul Teknik Üniversitesi Maden Mühendisliği bölümünden 2.lık derecesiyle mezun oldu.
- 2009-2011 yılları arasında İTÜ Cevher Hazırlama ve Hesaplamalı Bilim ve Mühendislik bilimleri ortak çalışmasıyla Türkiye ilk defa bu alanda disiplinler arası çalışma ile Yüksek Lisans derecesiyle mezun oldu.
- 2011-2017 yılları arasında deneysel ve atomistik modelleme yöntemleriyle kanser tedavisine yönelik doğal kil katkılı nanopartikül üretimi doktora tez kapsamında Tübitak projesi ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Farmakoloji Bölümü destekleriyle başarılı bir şekilde bitirilmiştir.

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Karataş, D.**, Tekin, A., Bahadori, F., ve Çelik, M.S., 2017. Interaction of Curcumin in a Drug Delivery System including a Composite with Poly(lactic-co-glycolic acid) and Montmorillonite: A density functional theory and Molecular Dynamics Study, *Journal of Materials Chemistry B*, DOI: 10.1039/C7TB01964E.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Karataş, D., Tekin, A., ve Çelik, M.S., 2017. Density functional theory computation of organic compound penetration into sepiolite tunnels, *Clays and Clay Minerals*, 65 (1), 1-13.

Karataş, D., Tekin, A., ve Çelik, M.S., 2013. Adsorption of quaternary amine surfactants and their penetration into the intracrystalline cavities of sepiolite, *New Journal of Chemistry*, 37(12), 3936-3948.