

**TERAGNOZ AMAÇLI FONKSİYONEL ÖZELLİKLERE SAHİP  
POLİMERİK NANOKÜRELERİN HAZIRLANMASI VE  
KARAKTERİZASYONU**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF POLYMERIC  
NANOSPHERES WITH FUNCTIONAL CHARACTERISTICS  
FOR THERAGNOSIS**

**BURCU ASLAN**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP Ana Bilim Dalı İçin Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2009

ANKARA

# TERAGNOZ AMAÇLI FONKSİYONEL ÖZELLİKLERE SAHİP POLİMERİK NANOKÜRELERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

**BURCU ASLAN**

**ÖZ**

Son yıllarda tümör-spesifik nano-yapılı ilaç salım sistemleri, tümör bölgelerindeki eşsiz birikim davranışlarından dolayı kanser tedavisinde oldukça ilgi çekmektedir. Doğal veya sentetik polimerlerden hazırlanan polimerik nanopartiküller yüksek kararlılıkları, endüstriyel üretim için uygulanabilirlikleri ve ileri yüzey nanoyapılandırılabilme gibi özelliklerinden dolayı bu amaçla kullanılmaktadır. Polimer özellikleri ve yüzey kimyası değiştirilerek bu nanopartiküller hem kontrollü ilaç salımı, hem de tümör hedeflemesi amacıyla kullanılabilir. Bu çalışmada kanser tedavisinde kullanılmak üzere reseptör aracılı nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında PLA ve karboksimetil kitosan gibi biyobozunur ve biyouyumlu polimerler kullanılmış ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Nanopartiküllerin fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri; FTIR ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile belirlenerek; karıştırma süresinin, hızının ve stabilize edici ajan miktarının partikül boyutu üzerine etkisi zeta boyut analizi ile incelenmiştir. Antioksidan ve anti-kanser ajan özelliklerini taşıyan kuersetin, nanopartiküllere yüklenerek ilaç salım profilleri elde edilmiştir. Kanser hücrelerinin “aktif” hedeflenmesi amacıyla nanopartiküller Bevacizumab ile modifiye edilmiştir. Çalışmanın son basamağında sitotoksikite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Kuersetin yüklü ve Bevacizumab ile modifiye edilmiş PLA/CMCh nanopartiküllerin kanser tedavisi için biyouyumlu ve verimli bir yol sağladığını göstermiştir.

**Anahtar Sözcükler:** PLA/CMCh Nanopartikül, Polilaktik asit, Karboksimetil kitosan, Kuersetin, Bevacizumab, Hedefli kanser tedavisi

**Danışman:** Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı

**Yardımcı Danışman:** Dr. Eylem Güven, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

# PREPARATION AND CHARACTERISATION OF FUNCTIONAL POLYMERIC NANOSPHERES FOR THERAGNOSIS

**BURCU ASLAN**

## ABSTRACT

Recently tumour-specific nano-structured drug delivery systems have received much attention due to their unique accumulation at tumour region. Polymeric nanoparticles made from natural or synthetic polymers have drawn major attention due to higher stability, maneuverability for industrial manufacture, and opportunity for further surface nanoengineering. They can be tailor-made to achieve both controlled drug release and tumor-targeting by tuning the polymer properties and surface chemistry. Aim of this study was to to prepare and characterize nanoparticles to use in receptor-mediated cancer therapy. Biodegradable polymers such as PLA, carboxymethyl chitosan were used to prepare nanoparticles. Physicochemical and morphological properties of nanoparticles were determined by using FTIR and Atomic Force Microscopy (AFM). Effect of stirring time, stirring rate and amount of surfactant on nanoparticle size were also investigated by Zeta Size Analyser. Quercetin, an antioxidant and neoplastic agent, was loaded into nanoparticles and drug release profiles were obtained. For 'active' targeting of cancerous cells; nanoparticles were modified with Bevacizumab. At the last stage of the study cytotoxicity and targeting studies were performed. Obtained results showed that quercetin-loaded and Bevacizumab-modified PLA/CMCh nanoparticles provide a biocompatible and efficient means for the treatment of cancer.

**Keywords** : PLA/CMCh Nanoparticles, Polylactide, Carboxymethyl chitosan, Quercetin, Bevacizumab, Receptor mediated cancer therapy

**Supervisor** : Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ, Hacettepe University, Department of Chemistry, Biochemistry Division

**Co-Advisor** : Dr. Eylem Güven, Hacettepe University, Institute of Pure & Applied Science, Nanotechnology and Nanomedicine Division

## TEŞEKKÜR

*Bu tezin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde, teorik bilgi birikiminden pratik uygulamalara dek bütün süreçlerde, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, yol göstericiliği ve değerli katkılarından dolayı sayın hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaşı'a ve grubumuza gerçek bir aile olduğumuzu hissettiren sevgili ailesine;*

*Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan hocalarım sayın Prof. Dr. Mehmet Ali Onur, Prof. Dr. Kezban Ulubayram, Prof. Dr. Adil Denizli, Doç. Dr. Muzaffer Eroğlu'na,*

*Tez boyunca sahip olduğu deneyim ve birikimi benimle paylaşan, zamanını ve desteğini esirgemeyen Dr. Eylem Öztürk Güven'e ;*

*Tez çalışmalarımıdaki yardım ve desteği için hocam Yrd. Doç. Dr. Mustafa Türk'e,*

*Çalışmalarım esnasında sorularımı yanıtsız ve beni çaresiz bırakmayan Dr. Lokman Uzun'a,*

*Zaman, mekan ya da koşul gözetmeksizin ihtiyacım olan her an yanımda bulabileceğimden şüphe ettirmeyen Dr. Halil Murat Aydın'a,*

*Birlikte olmaktan ve çalışmaktan mutluluk duyduğum Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu üyeleri, Yrd. Doç.Dr. Mesut Şam, Yrd. Doç.Dr Melike Demirbilek, Murat Demirbilek, Cem Bayram, Doğa Kavaz, Osman Kazak, Tayfun Vural, Ebru Erdal, Zeynep Karahaliloğlu, Öznur Özsoy, Betül Bozdağan Pala, Pınar Çakır, Merve Gültekinoğlu, İlkay Çorumluoğlu, Funda Budak' a;*

*Gerek bilim, gerek hayat anlayışında büyük etkileri olan, birlikte çalışmaktan keyif aldığım, beni hiç yalnız bırakmayan arkadaşım Tamer Çırak'a,*

*Çalışmalarım esnasında yardım taleplerimi asla geri çevirmeyen, agresif tavırlarıma aldırmayıp üzerimde anti-depresan etkisi yaratan Sedat Odabaşı'a,*

*Destekleri ve paylaştıkları keyifli vakitler için Biyomühendislik Anabilim Dalı üyeleri arkadaşlarım Kadriye, Tolga, Oğulcan, Güneş, Burcu Çelen, Burcu Otman, Filiz, Oğuzhan, Cafer ve Asya'ya,*

*Evdeki çalışmalarım da lojistik destek ve motivasyon sağlayan Yekta-Dilara Çaliker Kardeşler ve hakkını ödeyemeyeceğimi bildiğim dostum Demet Töre'ye,*

*Hayatımın en hatırlanması anılarını paylaştığım, trajikomik gençliğimin benzersiz karakterleri, Eren Beril Bahadır, Devran Gültekin, Erdem Hançer, Dicle-Alper Üzal, Emre İlke Coşar, Meryem Tamtabak, Özge Horasan ve Çiço'ya,*

*Beni, dünyanın en güzel masalını yaşatarak tarif edilmez bir özen ve özveriyle büyüten, prenses sendromumun sebepleri; sevgi dolu anneme, süper kahramanım babama ve minik kardeşim Buse'ye,*

*Sonsuz teşekkürler...*

*Ayrıca tezin taşıyıcı hazırlanması ve karakterizasyonu bölümünde 09 01 602 006 No'lu kapsamlı araştırma projesi ile önemli desteğini gördüğümüz Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Başkanlığı'na teşekkürlerimizi sunarız.*

*Burcu Aslan*

*Eylül 2009*

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

## Sayfa No

ÖZ .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
2.1. Kanser ve Nanoteknoloji.....	4
2.2. Kanser .....	4
2.3. Kanser tedavisi .....	9
2.3.1. Kemoterapi .....	9
2.3.1.1. Kemoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar .....	10
2.3.2. Radyoterapi .....	11
2.3.2.1. Radyoterapi Tedavisinde Karşılaşılan Olumsuzluklar.....	12
2.3.3. İmmünoterapi.....	13
2.3.3.1. İmmünoterapi Tedavisinde Karşılaşılan Olumsuzluklar .....	14
2.4. Kanser Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar .....	14
2.4.1. Nanosistemler.....	16
2.4.2. Lipozomlar .....	17
2.4.3. Monoklonal Antikorlar .....	18
2.4.3.1. Kimerik Proteinler .....	18
2.4.3.2. İmmünotoksinler .....	19
2.4.3.3. Monoklonal Antikorların Etki Mekanizmaları .....	19
2.4.3.4. Monoklonal Antikorların Klinik Kullanımı .....	20
2.4.3.4.1. Rituximab (MabThera) .....	20
2.4.3.4.2. Alemtuzumab (Campath – 1H) .....	22
2.4.3.4.3. Trastuzumab (Herceptin) .....	22

2.4.3.4.4. Cetuximab (Erbix) .....	22
2.4.3.4.5. Bevacizumab (Avastin) .....	23
2.5. Kuersetin .....	23
2.6. Polilaktik Asit .....	26
2.7. Kitosan.....	31
2.8. Karboksimetil Kitosan .....	32
2.9. Hücre Kültürü.....	33
2.9.1. Hücre Kültürünün Kullanım Alanları.....	33
2.9.2. Hücre Kültürü Koşulları .....	34
2.9.3. Hücre Kültür Sistemleri .....	34
2.9.3.1. Kaynaklarına Göre Hücre Kültür Sistemleri .....	34
2.9.3.2. Büyüme Biçimlerine Göre Hücre Kültür Sistemleri.....	35
2.9.4. Sitotoksosite Testleri.....	35
2.9.4.1. MTT Testi .....	36
<b>3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>37</b>
3.1. Kimyasallar .....	37
3.2. PLA polimerinin sentezlenmesi.....	37
3.3. Karboksimetil Kitosan Sentezlenmesi.....	38
3.4. PLA/CMCh Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	39
3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu .....	40
3.5.1. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi .....	40
3.5.2. Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi .....	41
3.5.3. Nanopartikül Boyut Analizi.....	41
3.6. Kuersetin Yüklü Nanopartiküllerde İlaç Yükleme ve Salımı .....	41
3.6.1. İlaç Yükleme ve Enkapsülasyon Verimliliği.....	41
3.6.2. İlaç Salım Çalışmaları.....	42
3.7. PLA/CMCh Nanopartiküllerin Bevacizumab ile Modifikasyonu .....	43
3.8. In vitro PLA/CMCh Nanotaşıyıcı – Hücre Etkileşimleri.....	33
3.8.1. Sitotoksosite testleri (MTT) .....	45
<b>4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....</b>	<b>47</b>
4.1. PLA Sentezi ve Karakterizasyonu .....	47
4.2. CMCh Sentezi ve Karakterizasyonu .....	48
4.3. PLA/CMCh Nanopartiküllerin Karakterizasyonu .....	49

4.3.1. Kimyasal Karakterizasyon .....	49
4.3.2. Morfolojik Karakterizasyon.....	50
4.4. Nanopartikül Boyut Analizi.....	52
4.4.1. Homojenizasyon Hızının Nanopartikül Boyutuna Etkisi .....	52
4.4.2. Homojenizasyon Süresinin Nanopartikül Boyutuna Etkisi.....	53
4.4.3. Stabilize Edici Ajan Konsantrasyonunun Nanopartikül Boyutuna Etkisi.....	55
4.5. PLA/CMCh Nanopartiküllere Bevacizumab Bağlanma Verimliliği .....	56
4.6. Kuersetin Yüklü Nanopartiküllerde İlaç Yükleme ve Salımı .....	56
4.6.1. İlaç Yükleme ve Enkapsülasyon Verimliliği.....	56
4.6.2. İlaç Salım Çalışmaları.....	57
4.7. PLA/CMCh Nanotaşıyıcı- Hücre Etkileşimleri .....	58
4.7.1 Sitotoksosite Çalışması.....	58
<b>SONUÇLAR .....</b>	<b>63</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>65</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>74</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PLA	-	Polilaktik Asit
CMCh	-	Karboksimetil Kitosan
FTIR	-	Fourier Transform Infrared Spektrometresi
SEM	-	Taramalı Elektron Mikroskobu
MW	-	Moleküler Ağırlık
AFM	-	Atomik Kuvvet Mikroskobu
T <sub>g</sub>	-	Camsı geçiş sıcaklığı
T <sub>m</sub>	-	Erime sıcaklığı
VEGF	-	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
EGFR	-	Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
FDA	-	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
DNA	-	Deoksiribonükleik Asit
EDAC	-	1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl) Carbodiimide

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Şekil 2.1. Hücre döngüsü ve süresi .....	4
Şekil 2.2. Üç ana kontrol noktası .....	6
Şekil 2.3. Radyoterapi uygulamasının şematik gösterimi .....	12
Şekil 2.4. Kanser tedavisinde nanotaşıyıcı etki mekanizması .....	15
Şekil 2.5. Nanoküre ve nanokapsüllerin şematik gösterimi .....	17
Şekil 2.6. Lipozomun yapısı ve şematik görünümü .....	18
Şekil 2.7. Kimerik antikörlerin şematik gösterimi .....	19
Şekil 2.8. İmmunotoksinlerin şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.9. Rituximab aktivitesinin şematik gösterimi .....	21
Şekil 2.10. Kuersetinin kimyasal yapısı .....	24
Şekil 2.11. Laktat stereoizomerleri .....	26
Şekil 2.12. Laktik asit kondenzasyonu.....	28
Şekil 2.13. Halka açılması polimerizasyonu .....	29
Şekil 2.14. Kitosanın kimyasal yapısı .....	31
Şekil 2.15. Karboksimetil kitosan (CMCh)'in kimyasal yapısı .....	32
Şekil 2.16. MTT(3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromür) .....	35
Şekil 3.1. Laktat dimerinin polimerizasyon reaksiyonu .....	37
Şekil 3.2. PLA/CMCh nanopartiküllerin hazırlanma prosedürü.....	39
Şekil 3.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu'nun (AFM) şematik görünümü .....	40
Şekil 3.4. Bevacizumab'ın yapısı (Magdelaine-Beuzelin ve ark., 2007) .....	43
Şekil 3.5. Bevacizumab'ın bağlanma mekanizması.....	44
Şekil 4.1. PDLLA'ya ait <sup>1</sup> H-NMR spektrumu.....	47
Şekil 4.2. PLA'ya ait FT-IR spektrumu.....	47
Şekil 4.3. (A) Karboksimetil Kitosan ve (B) Kitosana ait FT-IR spektrumları .....	48
Şekil 4.4. (A)PLA, (B) CMC ve (C)PLA/CMCh nanopartikül FT-IR spektrumu .....	49
Şekil 4.5. PLA/CMCh Nanopartiküllerin AFM görüntüsü .....	50
Şekil 4.6. PLA/CMCh nanopartiküllerinin farklı büyütme oranlarında SEM görüntüleri.....	51
Şekil 4.7. Homojenizasyon hızının nanopartikül boyutuna etkisi .....	53

Şekil 4.8. Homojenizasyon süresinin nanopartikül boyutuna etkisi.....	54
Şekil 4.9. PVA miktarının nanopartikül boyutuna etkisi .....	55
Şekil 4.10. 50 mL salım ortamı içerisinde 10 mg PLA-CMCh nanopartikülden kümülatif Kuersetin salım profili.....	58

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 2.1. Kuersetinin etkin olduğu hücre hatları .....	25
Çizelge 2.2. Polilaktik asidin bazı özellikleri.....	27
Çizelge 2.3. Kitosanın Biyolojik Özellikleri .....	31
Çizelge 2.3. Kitosanın fizikokimyasal Özellikleri .....	32
Çizelge 4.1. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Verimliliği ve İlaç Yükleme Oranları .....	57
Çizelge 4.2. Hazırlanan PLA/CMCh nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	60
Çizelge 4.3. Hazırlanan PLA/CMCh nanopartiküllerin L929 fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.....	61

## 1. GİRİŞ

Günümüzde kanser, pek çok gelişmiş ve Türkiye'nin de içinde olduğu gelişmekte olan ülkelerde ölüm sebeplerinin ilk sıralarında yer almaktadır. Erken teşhisi ve tedavisi mümkün olan bu rahatsızlığın tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi gibi birçok farklı yöntem sıralanabilirken (Jain, 2001), son yıllarda özellikle nanoteknoloji alanında gerçekleştirilen gelişmeler arasında yer alan nanotaşıyıcı sistemler sayesinde devrim niteliği taşıyan önemli aşamalar kaydedilmiştir.

Geleneksel kemoterapötik ajanlar kanser hücrelerine karşı duyarlı olmakla birlikte, DNA ve mikrotübül hasarına neden olarak, hücre proliferasyonunu durdurabilmektedir. Hastalığın başlangıç evresinde tedavi olumlu yanıt verebilirken, özellikle metastaz söz konusu olduğunda, kemoterapi ile tedavi ihtimali azalmaktadır. Bu nedenle son yıllarda kanserli hücrelerin tedavisinde kullanılmak üzere spesifik hedeflemeye yönelik yeni yöntemler üzerine çalışmalar yürütülmektedir (Klein ve Levitzki, 2006).

Hedeflendirilmiş tedavi yöntemlerinde kanserli hücrenin metabolik yollarını hasara uğratan birçok farklı ajan kullanılmaktadır. Hedeflemenin getirdiği yöntem çeşitliliği, bu konuda ortaya çıkabilecek birçok yeniliğin habercisi olarak görülmektedir (Adjei ve Rowinsky, 2003).

Hedeflemede kullanılan tümör-spesifik ajanlar sayesinde; nanoyapılı ilaç taşıyıcı sistemler, tümörlü bölgeye seçimli olarak gönderilebilmekte ve böylelikle sağlıklı hücrelerin zarar görmesi önlenmektedir. Ayrıca ilaç taşıyıcı sisteme görüntüleme ajanı da dahil edilebilmekte ve bu şekilde aynı zamanda hem teşhis hem de tedavi mümkün kılınabilmektedir. Hem teşhis (diyagnoz), hem de tedavi (terapi) uygulamasını içeren bu yöntem 'teragnoz' adı verilmektedir (Gilham, 2002).

Küçük boyutları ve biyobozunur özellikleri nanopartiküllerin bu uygulamalar için tercih edilme nedenlerini oluşturmaktadır. Nano ölçekli boyutları sayesinde hücre içine alınmaları ve hedeflenen bölgede seçimli ilaç birikimini sağlamaları

kolaylaştırılmaktadır (Desai ve ark.,1997; Panyam ve Labhasetwar, 2003; Panyam ve ark., 2003b). Biyobozunur olmaları ise, vücut içinde birikme riskini ortadan kaldırmakta ve ilaç salımının kontrollü olmasını sağlamaktadır. Örneğin; biyobozunur polimerler olan PLA ve PLGA kullanılarak hazırlanan nanopartiküller ile kontrollü ilaç salımının daha etkili olduğu saptanmıştır (Barrera ve ark., 1993; Davda ve Labhasetwar, 2002; Panyam ve Labhasetwar, 2003).

İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan biyobozunur polimerler arasında olan polilaktik asit, en çok toksikolojik ve klinik veriye sahip alifatik poliesterdir. Bu polimer diğerlerine göre yüksek biyolojik uyumluluk, net olarak tanımlanabilen biyodegradasyon kinetiği, kolay işlenebilirlik ve değişik formlarda hazırlanabilme gibi üstünlüklere sahip olup, özellikle biyolojik olarak aktif maddelerin kontrollü salımında kullanılmaktadır.

Kitosan ise hücre hedefleme çalışmalarında, ilaç taşıyıcı sistemlerde ve diğer biyomedikal uygulamalarda biyobozunur ve kimyasal modifikasyona yatkın olması gibi özellikleriyle tercih edilen polimerik bir malzemedir. Kitosanın sudaki sınırlı çözünürlüğü kimyasal modifikasyon ile giderilebilen bir problemdir (Jayakumar ve ark., 2007). Bu modifikasyonlar çözünürlük, antimikrobiyal aktivite ve diğer maddelerle etkileşim özelliklerini değiştirmek amacıyla gerçekleştirilmektedir. (Singh ve ark., 2008). Örneğin karboksimetilleme yöntemi ile gerçekleştirilen modifikasyonlarda karboksimetil kitin ve kitosanın, N-asetil glukozamin içeren orijinal yapıları biyoyuymuluk, hidrofilitate, biyobozunurluk ve farklı formlar alabilme özelliklerini arttırmaktadır (Muzzarelli, 1988). Farklı birçok spesifik molekül, sahip oldukları amino, karboksil, primer ve sekonder hidroksil grupları sayesinde, karboksimetillenmiş türevlerin nanopartiküllerine bağlanabilmektedir (Sun, 2006). Bu malzemeler ilaç taşınımı dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere sentezlenmektedir (Shi ve ark., 2005).

Bu çalışmanın amacı, öncelikle biyobozunur polimerler olan polilaktik asit ve karboksimetil kitosanın sentezlenmesi ve uygun yöntemlerle karakterize edilerek biyoyuymuluğu yüksek ve yüzeyinde fonksiyonel gruplar bulunduran, uygun

boyutlarda nanopartiküllerin hazırlanmasıdır. Ayrıca günümüzde antioksidan ve anti-kanser ajan olarak kanser tedavisinde henüz çalışmaları devam eden Kuersetin, model etken madde olarak seçilmiş ve nanotaşıyıcıların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanan nanopartiküllerin yüzeyi kanserli hücelere hedeflemede kullanılmak üzere, üzerinde yoğun çalışmalar yapılan ve FDA onayı almış insan kaynaklı bir monoklonal antikor olan Bevacizumab ile modifiye edilmiştir. Karakterizasyon aşamasında nanotaşıyıcıların morfolojik özellikleri SEM, AFM gibi yöntemlerle, fizikokimyasal özellikleri ise FTIR kullanılarak değerlendirilmiştir. Homojenizasyon süresinin, hızının ve stabilize edici ajan miktarının partikül boyutu üzerine etkisi zeta boyut analizi ile incelenmiştir. Daha sonra bu nanotaşıyıcılar Kuersetin içeren ve Bevacizumab ile modifiye edilmiş formları hazırlanarak karakterize edilmiştir. Çalışmanın bu aşamasında nanopartiküllere ligand bağlanma verimliliği ve *in vitro* ilaç salım profilleri elde edilmiştir. Son basamakta ligand ve ilacın aktivitelerini belirlemek amacıyla hedefleme ve sitotoksite çalışmaları yapılarak nanopartiküller, *in vivo* çalışmalara hazır hale getirilmeye çalışılmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Kanser ve Nanoteknoloji**

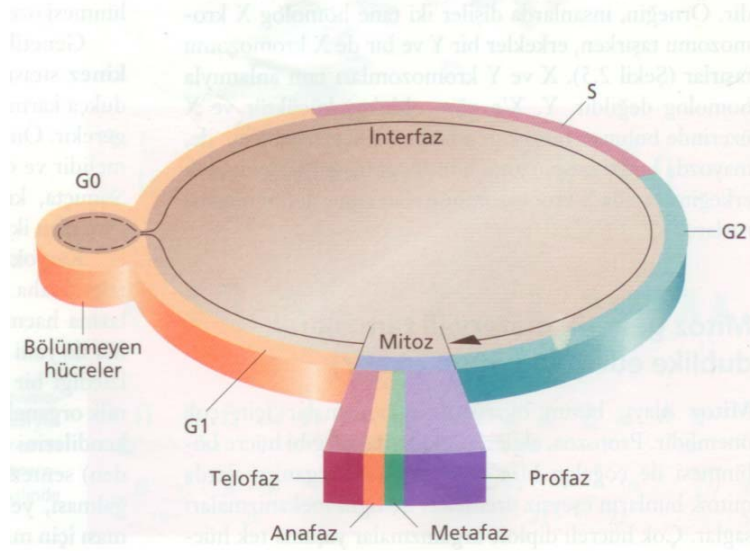
Kanser günümüzde ölüm nedenlerinin ilk sıralarında yer almakla beraber, son elli yılda bildirilen raporlara göre hastalığın ortaya çıkma sayısı ve sebep olduğu ölüm oranı her geçen gün artmaktadır (Stewart ve ark., 2003). Bu sebeple klinisyenlerin ve araştırmacıların çoğu tarafından kanser teşhis ve tedavisi üzerine yapılan çalışmalar yoğunlaştırılmıştır.

Kanser tedavisinde geleneksel olarak birçok tedavi yöntemi (kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi, cerrahi yöntemler vs.) uygulanmaktadır (Jain ve ark., 2001). Fakat bu yöntemlerde kullanılan ilaçların sağlıklı doku ve organlar üzerine yan etkiler gösterdikleri ve risk potansiyeli taşıdıkları da bilinmektedir (Parmiani ve ark., 2002). Varolan sitotoksikite riskini ortadan kaldırmak amacıyla genetik, immunolojik yada manyetik yönlendirmelerle gerçekleştirilen hedefleme çalışmaları benzeri yeni stratejiler geliştirilmektedir (Guowei ve ark., 2007). Aynı zamanda kullanılan yöntemler teragnoz olarak adlandırılan, hastalığın teşhis ve tedavisinin aynı anda gerçekleştirilmesini sağlayan uygulamaları da beraberinde getirmektedir (Bentzen ve ark., 2007). Öte yandan son yıllarda nanoteknoloji ve nanoteknolojinin sağlık bilimlerindeki yansımaları oluşturarak nanotıp uygulamaları sayesinde kanser teşhis ve tedavisinde yeni ufuklar açılmaktadır. Çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde; kanser, kanser teşhis ve tedavisinde uygulanan geleneksel yöntemler, nanoteknolojinin kanser teşhis ve tedavisine kazandırdığı yenilikler alt başlıklar halinde açıklanmaktadır.

### **2.2. Kanser**

Kanser, düzensiz büyüyen ve vücudun başka bölümlerine dağılan hücrelerle tanımlanmaktadır (Corner, 2001; Yarbrow, Frogge and Goodman, 2005). Hücre, canlı sistemlerin tüm yaşam özelliklerini taşıyan ve uygun koşullarda yaşamını tek başına sürdürme yeteneğine sahip temel yapı ve işlem birimidir. Ökaryotik hücreler mitoz ve mayoz adı altında iki farklı bölünme tipi ile çoğalma özelliği gösterirler. Mitoz bölünme kromozom sayısı ana hücre ile aynı olan iki hücre oluşumuna yol açar. Daha kesin bir ifade ile hücre döngüsünün kalıtsal bileşenlerinin tam ve eşit olarak, yavru hücreye bölündüğü kısımdır. Birçok hücre

bölünme ve bölünmeme arasında sürekli bir ardışık özellik göstermektedir. Bir bölünmenin tamamlanmasından bir sonraki bölünmeye kadar geçen olaylar hücre döngüsünü oluşturur ve interfaz olarak adlandırılır (Şekil 2.1).

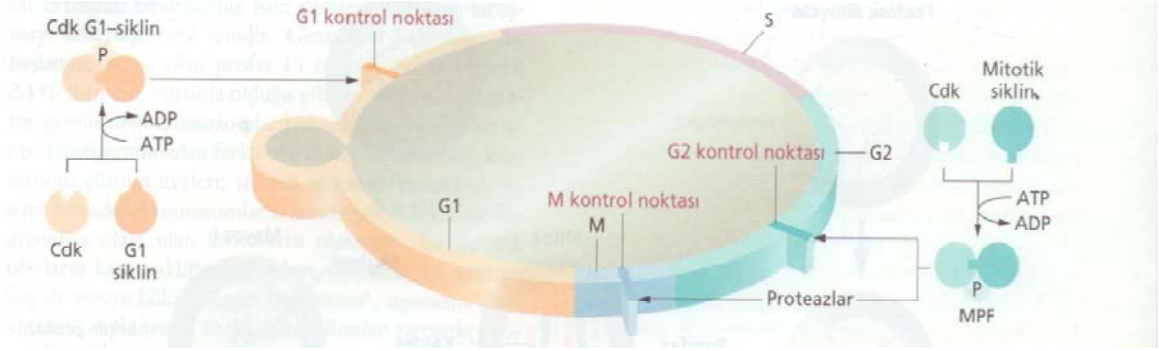


Şekil 2.1. Hücre döngüsü ve süresi

Hücre döngüsünde deoksiribonukleik asit (DNA) sentezinin olduğu S evresi, bu evrenin öncesinde ve sonrasında DNA sentezinin olmadığı, fakat yoğun biyokimyasal olayların gerçekleştiği, sırasıyla G1 (gap 1) ve G2 (gap 2) evreleri gözlenmektedir. G1 evresinin önemi büyüktür. Çünkü G1'in geç bir noktasında, bütün hücreler iki yoldan birini izler. Hücreler ya döngüden çıkarak G0'daki bir dinlenme evresine girer ya da DNA sentezini başlatarak döngüyü tamamlar. G0'a giren hücreler canlı ve metabolik olarak aktif kalırlar fakat çoğalamazlar. Kanser hücreleri, belirgin bir şekilde G0'a girmekten kaçınırlar ve bu evreyi çok hızlı bir şekilde geçerler.

Hücre döngüsü sırasında üç önemli kontrol noktası saptanmıştır (Şekil 2.2). Bu noktalar, hücrenin bir sonraki döngüye girmesinden önce kontrol edilip izlendiği noktalardır. Bu genlerin birçoğunun ürünü *cdc* kinazlar adı verilen enzimlerdir. Söz konusu enzimler, diğer proteinlere fosfat ekler. *Cdc* kinazlar, ana kontrol molekülleri olarak görev alırlar ve siklin adı verilen proteinlerle birlikte çalışırlar. Bu kinazlar siklinleri fosforile ederek bunların hücre döngüsünün kontrol noktalarındaki aktivitelerini etkiler. Hücre döngüsündeki üç kontrol noktasından

birincisi G1/S kontrol noktası olup, bir önceki mitozu izleyen dönemde hücrenin eriştiği boyutu ve DNA'nın hasar görüp görmediğini kontrol eder. Eğer hücre uygun bir boyuta ulaşmadıysa ya da DNA'sı hasar görmüşse, bu koşullar düzeltilene kadar döngünün ilerleyişi durdurulur. Eğer başlangıçta her iki durum normal ise kontrol noktası aşılır ve hücre döngünün S evresine geçer.



Şekil 2.2. Üç ana kontrol noktası

İkinci önemli kontrol noktası ise G2/M kontrol noktası olup, burada mitoz girmeden önce hücrenin fizyolojik koşulları tekrar gözden geçirilir. Eğer DNA replikasyonu ya da herhangi bir DNA hasarının onarımı tamamlanmamışsa, bu olaylar tamamlanana kadar hücre döngüsü durdurulur. Son kontrol noktası ise mitoz içinde yer alan M kontrol noktasıdır. Burada hem iğ iplikleri sisteminin başarılı bir şekilde oluşup oluşmadığı, hem de sentromerlerle bir araya gelmiş kinetokorlara iğ ipliklerinin tutunup tutunmadığı kontrol edilir. Eğer uygun değilse, mitoz durdurulur.

Hücre döngüsü esnasında kansere neden olan problem ise hücrede hasar tespit edilmesine rağmen kontrol noktalarında mitozun durdurulmamasıdır. Böylece kanserleşmiş hücreyi tanımlayan kontrolsüz bölünmeler dizisi başlayabilir.

Örneğin tümör baskılayıcı gen olan *p53* geni G1/M kontrol noktasında programlanmış hücre ölümünün gerçekleştirildiği genetik işlem olan apoptozun düzenlenmesinde görevlidir. Eğer *p53* geni mutasyona uğramış ve anormal fonksiyonlu *p53* geni ürünü oluşmuş ise, hasar görmüş hücre kontrol noktasını geçerek kontrolsüz bir biçimde çoğalmaya devam eder. İnsan kanserlerinin büyük bölümünde *p53* geninin mutant olduğu görülmüştür. Bunlar arasında kalın bağırsak, göğüs, akciğer ve idrar kesesi kanser türleri sayılabilir.

Bir başka tümör baskılayıcı gen olarak *retinoblastoma* (RB) geni örnek verilebilir. Bu genin ürünleri, hücre döngüsünün G2/M kontrol noktasında ve S evresinde fosforile edilir, fakat döngünün G0 ve G1 evrelerinde fosforile edilemez.

Yukarıda da belirtildiği gibi herhangi bir sebeple ortaya çıkan hasara rağmen hücrenin kontrolsüz bölünmesi, sağlıklı hücrelerin gerektiği yerde ve sayıda üreme prensibini öngören kontakt inhibisyon kuralının ihlal edilmesi anlamına gelir. Kontrolsüz bölünen kanserli hücreler çoğalarak ve biraraya gelerek kitleler (tümör) oluştururlar. Oluşan tümörler dokuları sıkıştırabilir, içine sızabilir, tahrip edebilir ya da metastaz olarak adlandırılan kan veya lenf dolaşımı aracılığıyla vücudun farklı bölgelerine ulaşabilirler.

Yıllar boyunca kanser gelişiminin, sağlıklı hücrelerin asi hücrelere dönüşmesine neden olan genetik değişimleri yansıttığı ve çok aşamalı bir süreç olduğu öne sürülmüştür. Hanahan ve Weinberg (2000) bir incelemelerinde bu değişimleri hücrenin fizyolojisini kolektif şekilde habis gelişime sürükleyen altı değişiklik olarak özetlemektedirler. Bu değişiklikler aşağıdaki gibidir:

*Gelişme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik:* Sağlıklı hücreler çoğalmak için gelişme sinyallerine ihtiyaç duymaktadırlar. Birçok kanser hücresi kendi gelişme sinyallerini üretme kabiliyeti kazanırlar, yani gelişme faktörlerini sentezleyebilirler ve ayrıca bunlara tepki verebilirler. Hücreler, büyük bir organizmanın parçası olarak hareket etmek yerine bağımsız birer eleman olarak hareket etmeye başlarlar. Bunun bir örneği glioblastomanın PDGF üretebilme yeteneğine sahip olmasıdır (Hermanson et al., 1988).

*Inhibitör (Anti-yayılma) işaretlerine karşı tepkisizlik:* Hücreler kendi dış çevrelerini kontrol ederek, çoğalma veya çoğalmama kararı vermektedir. Birçok anti-çoğalma sinyali Rb proteini aracılığıyla çalışır. Dolayısıyla, eğer bu protein zarar görürse hücre döngüsünün kontrolü kaybedilir ve hücreler çoğalır. Bu durum retinoblastoma kanserinde görülmektedir. Çocukluğun erken dönemlerinde Rb geninin yok olması veya mutasyona uğraması sonucunda bir gözde veya her iki gözde birden tümör gelişebilmektedir.

*Apoptozdan kaçınma:* Geçtiğimiz on yılda yapılan araştırmalar apoptotik programın vücuttaki hemen her hücrede gizli şekilde mevcut olduğunu

göstermiştir. Ona direnç göstermenin, çoğu ve belki tüm kanserlerin karakteristik özelliği olduğu görülmektedir. Apoptozdan kaçınmanın bir yolu, DNA'nın uğradığı hasarı algılayan bir düzenleyici olarak hareket eden p53'ün kaybı veya mutasyonudur.

*Sınırsız çoğalma potansiyeli:* Kültür hücrelerinde yapılan araştırmalar sağlıklı hücrelerin yalnızca 60-70 kez çoğalabileceğini ve bundan sonra gelişmeyi bırakıp öleceklerini öngörmektedir. Kanser hücreleri ise, çoğunlukla telomeraz adı verilen bir enzime bağlı olarak, sınırsız çoğalma kapasitesi kazanmışlardır. Her kromozomun sonunda telomer adı verilen ve birkaç bin baz çifti tekrarından oluşan bir bölge bulunur. Her sağlıklı hücre çoğalması sırasında telomerler, kromozomal DNA'yı koruyamayacak kadar kısılır ve bunu takiben hücre ölür. Ancak, eğer telomeraz up-regüle edilirse, telomerler kritik bir uzunluğun üzerinde muhafaza edilerek hücreler ölümsüz hale gelebilmektedir.

*Sürekli anjiyogenez:* Anjiyogenez yeni kan damarlarının oluşturulmasıdır. Bu işlemin sürekliliği tümör kitlesinde yer alan hücrelere besin ve oksijen sağlanması açısından önemlidir. Görünen odur ki, tümörler anjiyogenez indükleyicilerinin ve inhibitörlerinin dengesini, gen ifadelerini değiştirerek etkileyebilmektedirler. VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) ekspresyonunun artırılması (Hanahan and Folkman, 1996) ve sonucunda anjiyogenezin sürekliliği örnek olarak verilebilir.

*Doku invazyonu ve metastaz:* Kanser ölümlerinin büyük çoğunluğu birincil tümör kitlesinin vücudun diğer bölgelerine yayılması sonucu oluşur. Bu süreç, hücrelerin sitoskeletlerini yeniden düzenleyerek diğer hücrelere eklenmelerini, diğer hücreler üzerinden veya etrafından geçmelerini sağlayarak başlar. Bir engelle karşılaştıklarında, örneğin bazal lamina, kanser hücreleri engeli parçalamak için enzimler salgırlar. Bu enzimlerin içinde 'moleküler makaslar' olarak hareket eden ve kanser hücrelerinin geçişini engelleyen proteinleri kesen matrix metalloproteinleri bulunur. Bazal laminayı geçtikten sonra hücreler kan damarlarının içine girebilir ve vücutta yerleşip çoğalmalarına uygun bir alan bulana kadar dolaşabilirler. Metastaza yol açan ve sıkça karşılaşılan bir değişim de hücrelerin birbiriyle iletişimini sağlayan bir molekül olan E-cadherin ile ilgilidir. Bu molekülün hücreler arasında çiftleşmesi anti-büyüme işaretlerinin iletilmesine neden olmaktadır. Bu da invazyon ve metastazı bastırıcı bir etki yapmaktadır.

Epitelyal kanserlerin çoğunda gen mutasyonuna bağılı olarak E-cadherin'in fonksiyonunu yitirdiğı bilinmektedir.

### **2.3. Kanser tedavisi**

Kanser tedavisinde günümüze kadar yaygın olarak kullanılan geleneksel tedavi yöntemleri; kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, hormon tedavisi ve cerrahi girişimlerdir. Söz konusu uygulamalardan özellikle cerrahi girişimler kanserli organ ve dokunun tedavisinde son derece belirgin ve erken dönemlerde teşhis edilmiş olan vakalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer uygulamalardan bazıları ile ilgili ayrıntılar izleyen alt bölümlerde sunulmuştur.

#### **2.3.1. Kemoterapi**

“Kemoterapi” terimi kanser hücrelerinin gelişimini durdurmak veya yavaşlatmak için ilaç kullanılması anlamına gelmektedir. Çoğu kanser ilacı DNA'ya zarar verir veya apoptozu sağlayan kromozomal replikasyonu engeller. Yakın zamanda hücre gelişiminde izlenen yolları engelleyen ilaçlar geliştirilmiştir. Sert kitle tümörler için kemoterapi uygulamaları ilk olarak 1940'larda lenfoma tedavisinde hardal gazı kullanılmasıyla başlamıştır. Geçen 60 yıl içinde bir tümörün doğal gelişimini etkileyen yeni sitotoksik ilaçlar geliştirilmiştir. İyileşme olasılığı lenfoma ve germ hücre tümörleri gibi az sayıdaki hastalıklarda ileri evrelerde dahi mevcuttur. Birçok kemoterapi ajanı, bakteri ve bitkilerden çıkarılan doğal bileşiklerdir. Örneğin vinca alkaloids vinblastine ve vincristine Cezayir menekşesinden, paclitaxel pasifik porsuk ağacının kabuğundan elde edilmektedir. Diğer ilaçlar sitotoksik etkileri sebebiyle özel olarak geliştirilen kimyasallardır. Örneğin cisplatin platin elektrotların oluşturduğu bir elektrik alanına maruz kalan bakterilerin bölünmeyi bıraktığının gözlenmesinden sonra geliştirilmiştir.

Palyatif tedavi: Kemoterapi gören hastaların çoğu ileri metastatik aşamdadır. Bu hastalarda kemoterapiye karşı mevcut veya gelişmekte olan direnç yüzünden, kemoterapi kanseri tamamen yok edemez. Palyatif kemoterapi genellikle semptomlarda ve hayat kalitesinde önemli ölçüde düzelme sağlar. Bazı kanser türlerinde kurtulma şansını artırır. Palyatif kemoterapi üzerine klinik denemelerde tedaviye yanıt verme hızının artırılması ve toksisite önemli ölçüde yükseltilmeden genel kurtulma şansının artırılması üzerine odaklanılır.

Küratif tedavi: Bazı kanser türleri sitotoksik kemoterapiye karşı aşırı derecede hassastır. Testis esaslı tümörler, lenfoma, akut lösemi ve birçok pediyatrik malignanlıklar kemoterapiye o kadar iyi yanıt verir ki, hastalığın çok ilerlediği durumlarda bile iyileştirici olabilir. Kemoterapi iyileştirme amacıyla yapılmıyorsa kısa vadeli toksisite daha kabul edilebilir bir yöntem olarak görülür ve bu nedenle bu tedavilerin çoğu aşırı derecede toksiktir (Örneğin yüksek doz kemoterapi). Günümüzde serbest klinik denemeler sonuçtan ödün vermeden toksisiteyi azaltmayı amaçlamaktadırlar.

Adjuvant tedavi: Birçok hasta ameliyat veya primer radyoterapiden sonra hastalıklarından kurtulabilmektedirler. Ancak, diğer hastaların durumunda gerileme görülmekte ve teşhis sırasında tespit edilemeyen mikro metastatik hastalık nedeniyle hayatlarını kaybetmektedirler. Kemoterapi mikro metastazı öldürmek için primer terapiye yardımcı olmaktadır. Adjuvant kemoterapi göğüs kanserinin tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır.

Neoadjuvant tedavi: Bazı klinik senaryolarda kemoterapi ameliyat veya radyoterapiden önce uygulanmalıdır. Bu neoadjuvant terapinin amacı geleneksel görüntüleme cihazlarında görülemeyen mikrometastazı tedavi etmektir. Ayrıca tümörün ebatının küçülmesini sağlayarak ameliyat edilebilir hale getirebilir veya daha az radikal olan yöntemlerin uygulanmasına olanak sağlayabilir. Neoadjuvant kemoterapinin kullanıldığı durumlara örnek olarak göğüs kanserinde kadınların mastektomi yerine geniş lokal eksizyon yaptırmasına olanak vermesi gösterilebilir. Ayrıca yemek borusu kanserlerinde ve osteosarkom tedavisinde rutin olarak kullanılmaktadır.

Kemoterapi ilaçlarının çoğu hücre gelişim hızını düşürmektedir. Bunu DNA ile etkileşerek (normal hücrelere oranla kanser hücrelerinin onarmakta etkisiz olduğu hasarlara yol açarak) veya hücre bölünmesine müdahale ederek yaparlar; bu da hücrenin daha fazla bölünmesini engellemekte ve genellikle apoptotik oluşuma yol açabilmektedir.

### **2.3.1.1. Kemoterapide Karşılaşılan Olumsuzluklar**

Kemoterapi almakta olan hastaların çoğu kolay yorulabilen, ancak günlük aktivitelerinin büyük kısmını devam ettirebilen bir durumda hissetmektedir. Her kişi

ve her tedavi birbirinden farklıdır, bu nedenle herkes için geçerli tek bir tablonun tanımlanması güçtür. Fakat genel olarak gözlenen yan etkiler bulantı, kusma, saç dökülmesi, kemik iliği ilgili problemler, enfeksiyon riski artışı, anemi, yorgunluk, kanama, ağız-diş eti ve boğaz problemleri, iştahsızlık, ishal ya da kabızlık olarak sıralanabilir.

Kemoterapi ile uygulanan ajanların, tedavi edilmesi gereken bölgeye ulaştırılmasındaki güçlükler, tolere edilmeleri oldukça zor olan toksik ajanların kullanılması, değişik yan etkiler, ilaç direnci gelişimi ve gelişen tümöral dokuların heterojen dinamik biyolojik yapıda oluşları gibi nedenlerle tedavideki başarı verimi oldukça düşük olmaktadır (Jang ve ark., 2003).

### **2.3.2. Radyoterapi**

Radyoterapi, radyoaktif ışınlarla tedavi anlamına gelmektedir. Radyasyon, cerrahi müdahaleden önce kanserli bir tümörün küçültülmesi için, cerrahi müdahaleden sonra geriye kalan kanser hücrelerinin büyümesinin durdurulması veya anti-kanser ilaçları ile ölümcül bir durumda olan tümörün ortadan kaldırılması için kullanılabilir. Radyasyon özellikle lenf düğümleri veya ses tellerindeki habis tümörler gibi belli lokalize kanser çeşitlerinin tedavisinde etkilidir. Radyoterapi uygulamasına ait şematik gösterim Şekil 2.3'te sunulmuştur.

Radyasyon tedavisi, Co-60 ya da Lineer Hızlandırıcı gibi cihazlar aracılığıyla vücudun dışından veya vücut boşlukları ya da doku içine radyoaktif maddelerin yerleştirilmesi yoluyla vücudun içerisinden gerçekleştirilir.



Şekil 2.3. Radyoterapi uygulamasının şematik gösterimi

Radyoterapide kanser hücrelerinin bölünmesini engellemek amacıyla yüksek enerjili x ışınları kullanılır. Absorbe edilen radyasyonun birimi 'rad' olarak bilinmektedir ( 1 rad: 1 kg maddenin 0.01 J enerji soğurmasıdır). Radyoterapi gören bir hasta tedavi süresine göre birkaç yüz rad'lık radyasyona maruz kalır. Örneğin modern bir mamografi cihazında her x-ışını yaklaşık olarak 0.1 ile 0.2 rad arasında bir enerji taşımaktadır.

Radyoterapi esnasında, uygulanan bölgeye x ışınları ile belirli oranlarda enerji verilmektedir. Hedef, hücrelerin genetik materyalinin moleküler yapısını bozarak, bölünmelerini engellemektir. Radyasyonun kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücreleri de yok etmesine rağmen, sağlıklı hücreler kendilerini tamir ederek tekrar fonksiyonel hale gelebilirler. Ameliyatlarda olduğu gibi radyoterapi de lokal bir tedavi olmakla birlikte sadece uygulanan bölgedeki hücreleri etkilemektedir. Radyoterapi cilt, beyin, meme, prostat ve rahim kanseri tedavilerinde etkin olarak kullanılmaktadır. Ayrıca lenf ve kan kanseri tedavisinde de kullanıldığı görülmektedir.

### **2.3.2.1. Radyoterapi Tedavisinde Karşılaşılan Olumsuzluklar**

Radyoterapinin amacı kanserli hücreleri yok etmektir, fakat bu esnada tedavi alanı içinde kalan sağlıklı hücreler de etkilenmektedir. Bu şekilde ortaya çıkabilecek yan etkiler çoğu zaman hafif olmakla beraber, bazı hastalarda önemli sakıncalar yaratmaktadır.

Radyoterapi bazen kan yapıcı sistemin ürettiği hücreleri etkileyebilir. Erişkin bir insanda kan hücrelerinin yapımı özellikle kemik iliği dokusunda gerçekleşir. Dolayısıyla radyoterapi alanı dahilindeki kemik dokusu hacmi arttıkça (omurga, kalça kemiği gibi) kanla ilgili yan etki riski de artmaktadır. Ayrıca kemoterapi ile birlikte giden ya da kemoterapiden hemen sonra başlayan radyoterapide kan ile ilgili yan etkiler daha sık görülmektedir.

Radyasyon tedavisinin uygulandığı her bölgede cilde ait birtakım yan etkiler gelişebilir. Bu yan etki riski, uygulanması planlanan toplam doz yükseldikçe artmaktadır. Yan etkiler daha çok 5-6 hafta süren uzun süreli tedavilerde ve tedavinin ileri dönemlerinde görülmektedir. Koltuk altı, boyun gibi cilt dokusunun ince olduğu bölgelerde, anüs bölgesi, ağız içi gibi mukoza dokularında bu tip yan etki riski daha fazladır. Cilde ait yan etkiler, üzerine basmakla solan güneş yanığı benzeri hafif kızarıklıklarla başlayıp ve sulu, açık yaralara kadar gidebilmektedir.

Radyoterapi sonrasında hastada, uygulanan bölgeye yakınlığına göre yutma zorluğu, bulantı, kusma iştahsızlık, ishal, öksürük gibi geçici; bazen de uygulama dozuna göre nefes darlığı ve akciğer yetmezliği gibi kalıcı hasarlar oluşabilmektedir.

### **2.3.3. İmmünoterapi**

Vücuttaki immün sistem, 'yabancı' olarak adlandırılan maddelere karşı denetleyici bir sistem olarak hareket etmektedir. Örneğin bir organ bağışçısından nakledilen organın varlığına verilen immün yanıt, bu organın reddedilmesi şeklinde olabilir.

Kanser hücreleri de yabancı olarak kabul edilmektedirler. Uzun süredir araştırmacılar kanser hücrelerine karşı doğal immün reaksiyonu arttırmaya çalışmaktadır. Bu yöntem tedavi amaçlı kullanıldığında, bu tekniğe immünoterapi adı verilmektedir.

Beyaz kan hücreleri (lökosit) tarafından normal olarak üretilen ve lenfokinler olarak bilinen biyolojik açıdan aktif maddelerin kullanımı immünoterapiye dahildir. En iyi kanıtlanmış olan immünoterapi aktif maddesi, viral bir enfeksiyona cevap olarak vücut tarafından üretilen interferonlardır.

Araştırmacılar yakın zamanda interferon alfa denilen bir interferon çeşidi ile birkaç çeşit kanserin kontrol altına alınmasında başarı elde etmişlerdir (Tagliaferri ve ark., 2005). Özellikle interferon, nadir görülen ve saçaklı hücreli lösemi olarak bilinen kanser rahatsızlığı olan kişilerde dikkate değer gelişmeleri ortaya çıkarmıştır. Bu, aynı zamanda belli tipte lenf dokusu kanserleri karşısında sınırlı yararları da ortaya çıkarmaktadır.

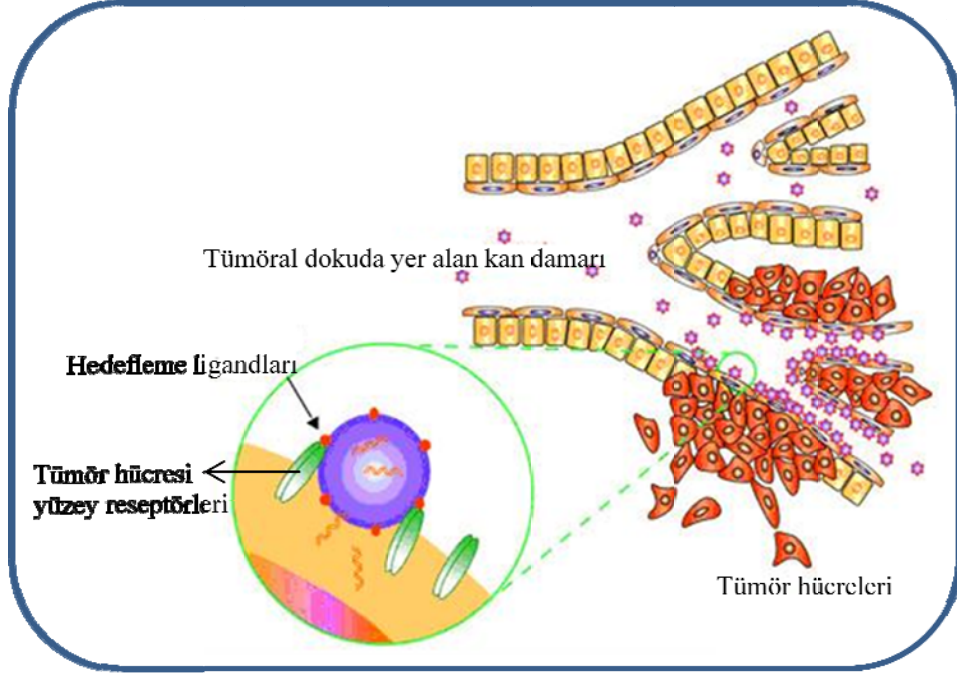
### **2.3.3.1. İmmünoterapi Tedavisinde Karşılaşılan Olumsuzluklar**

İmmünoterapi sonrası enjeksiyon yerinde, birtakım kızarıklık ve şişmeler gözlemlenebilmektedir. Daha az görülmekle birlikte, hırıltılı solunum, burun ve boğazda kaşıntı, burun tıkanıklığı ile/ya da burun akıntısı, öksürük, deride kızarıklık ve kaşıntı, nefes darlığı, göğüste sıkışma duygusu, dudaklarda ve göz kapaklarında şişme ve yutkunma zorluğu gibi yan etkiler de bildirilmiştir (Parmiani ve ark., 2005).

### **2.4. Kanser Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar**

Yukarıda sözü edilen ve günümüzde kanser tedavisi amacıyla klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan geleneksel tedavi yöntemlerinde karşılaşılan olumsuzlukların giderilebilmesi ve ilaçların hedefli olarak gerekli bölgeye, gerekli olduğu kadar iletilebilmesi için spesifik olarak tasarlanmış yeni nesil ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu şekilde hem tedavi etkinliğini arttırmak hem de anti kanser ajanların sistemik toksisitesini azaltmak mümkün olabilecektir. Bu nedenle söz konusu sistemlerin hızla geliştirilebilmesi, kanser hastalarının yaşamlarını sürdürebilmeleri açısından büyük önem taşımaktadır (Vasir ve Labhasetwar, 2005).

Taşıyıcıların hem görüntüleme hem de tedavi amaçlı kullanımını sağlayan hedefli etken madde taşıma stratejisi Şekil 2.4.'te özetlenmiştir.



Şekil 2.4. Kanser tedavisinde nanotaşıyıcı etki mekanizması

Şekil 2.4.'de görüldüğü gibi taşıyıcılar tümöral dokuya ulaşan kan damarları yoluyla, hedeflenen bölgeye yüzeylerinde bulunan tümöre özgü fonksiyonel özelliklere sahip ligandlar sayesinde taşınır. Hedeflenen bölgeye ya da dokuya ulaşıldığında taşıyıcıya yüklenen etken madde (örneğin; antineoplastik ajan veya diğer biyomoleküller) kanser hücreleri tarafından endositoz yoluyla alınır ve etken madde etkinlik göstererek tedavi gerçekleştirilir. Bir diğer alternatif tedavi yöntemi ise, manyetik nanotaşıyıcılarla hedeflenen etken maddenin, tümör dokusuna ulaştıktan sonra (ki bu ulaşım MRI sistemiyle kolaylıkla teyid edilebilmektedir), canlı sisteme bir dış manyetik alan uygulanmasıdır. Bu sayede, manyetik nanotaşıyıcılar içerisinde yer alan birimlerin moleküler hareketi sonucu ısıl bir değişim, yani lokal sıcaklık artışı sağlanabilmektedir. Buradaki sıcaklık değişiminin lokal olarak tümör dokusunda 42-45°C'lık bir sıcaklığa ulaşması durumunda kanser hücrelerinin yok olması sağlanabilir. Klinikte hipertermi tedavisi olarak adlandırılan bu tedavi rejimi ile sadece kanser hücreleri yok edilmiş, sağlıklı hücre ve dokulara zarar verilmemiş olacaktır.

Son yıllarda kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen nanoteknolojik yaklaşımlar ve stratejileri; nanoküreler, nanokapsüller, lipozomlar, insan kaynaklı ya da kimerik antikolar, immunotoksinler ile anti kanser ajanların taşınması şeklinde özetlenebilir.

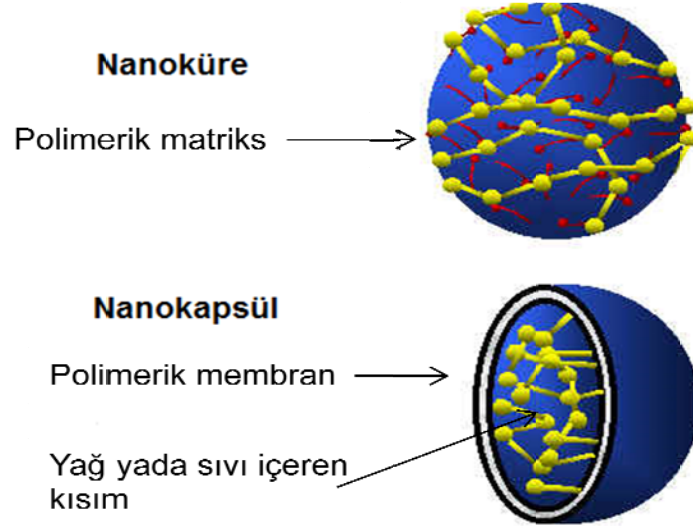
### 2.4.1. Nanosistemler

Yeni nesil tedavi edici uygulamalar nanoteknoloji ürünü olan koloidal ilaç taşıyıcı sistemler ya da akıllı ilaç taşıyıcı sistemlerle gerçekleştirilmektedir. Söz konusu taşıyıcılar genellikle uygun polimerik matrikslerden üretilen nano ölçekli partiküllerden oluşan sistemlerdir. Bu sistemleri akıllı kılan belirtilen taşıyıcıların hazırlanmasından sonra hedeflenecekleri tümöral bölgede yer alan uygun reseptörleri tanıyacak olan ligandlar ile donatılmış olmalarıdır. Bu mantık ile tasarlanan taşıyıcılar hücresel mekanizmayla hareket edecekleri için özellikle çoklu ilaç direnci gibi önemli bir sorunun üstesinden gelebilecek ve lokal tedavi etkinliği ile sağlıklı hücre ve dokulara herhangi bir zarar vermeden etkinlik gösterebilecektir (Vasir ve ark., 2005).

Öte yandan burada sözü edilen nano taşıyıcıların uygun büyüklük ve yüzey özelliklerine sahip olması da onları akıllı kılan diğer özellikler olacaktır. Kullanılan nanopartiküllerin her ne kadar boyutları hücre spesifik yönlendirme ve hücre içine alım prosedürlerinde önemli rol oynasa da, bu işlemi daha kolaylaştıracak ve verimi arttıracak bir diğer önemli parametre de kullanılacak nanopartiküllerin yüzeylerinde elverişli fonksiyonel grup ve moleküllerin barınmasıdır.

Nanoparçacık ya da diğer deyişle nanopartiküller mikron ölçeği altında genellikle biyobozunabilen cinste polimerlerden oluşturulmuş yapılardır. Nanoparçacıkların sınıflandırılmasında nanoküre ve nanokapsül olarak iki alt sınıf sayılabilir (Şekil 2.5).

Bunlardan nanokapsül diye tabir edilen alt sınıfta, ilaç dış bir polimerik kabuk tarafından çevrelenmiş olarak, özelliğine göre yağ ya da su içerisinde çözelti halinde yer alır. Nanoküre olarak adlandırılan diğer tipte ise, parçacık çekirdekten dış kabuğa kadar aynı malzemedan oluşmuştur ve ilaç molekülleri bu polimerik zincirler üzerinde ya kovalent ya da fiziksel olarak bağlanmış durumdadır (Letchford ve Burt, 2007).



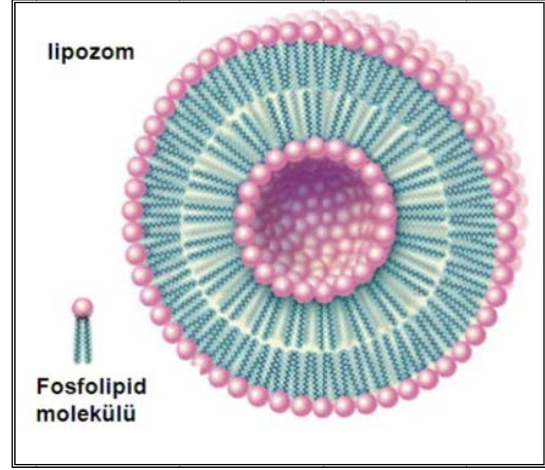
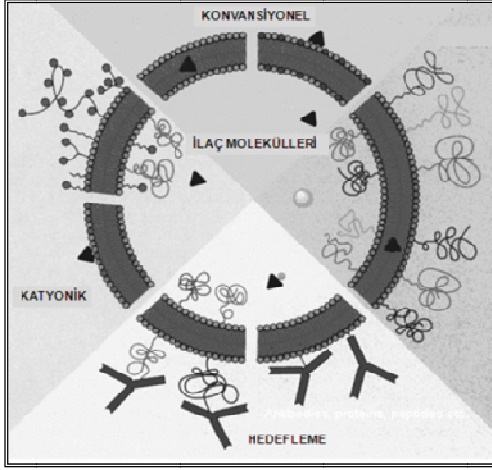
Şekil 2.5. Nanoküre ve nanokapsüllerin şematik gösterimi

Nanoparçacık dizaynında kullanılacak polimer ve ilaçların uygulama yöntemi önemli yer tutmaktadır. Tedavide ilaçların ve taşıyıcı ajanların bozunmadan hedeflerine ulaşmaları ve yüksek verimli bir aktivite göstermeleri ancak uygun dizayn edilmiş bir sistemle mümkün olmaktadır.

Yüksek verimli bir başarı elde etmek için, uygun zaman aralıklarında ya da uygulama başladıktan bir süre sonra, kullanılacak ilaç moleküllerinin nanoyapılardan ortama difüzyonu kontrol edilebilmelidir (Maeda, 2001). Tümörlü alandaki ilaç salım hızı, nanopartikül yapısındaki polimerin molekül ağırlığı ve çapraz bağlanma konsantrasyonu ile, ya da ilaç molekülünün parçacığa bağlanma şekli (kovalent ya da fiziksel adsorpsiyon) ile kontrol edilebilmektedir.

#### 2.4.2. Lipozomlar

Lipozomlar hücre zarına benzer yapıda keseciklerdir. Baş ve kuyruk grupları içeren fosfolipidlerden oluşmuş olup, bu keseciklerin içi ilaç taşınım tedavilerinde ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabilir. Baş kısmı hidrofilik (suyu sever) bir karaktere sahipken, kuyruk olarak adlandırılan kısmı hidrofobik (su tarafından itilen) yapıdadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.6. Lipozomun yapısı ve şematik görünümü

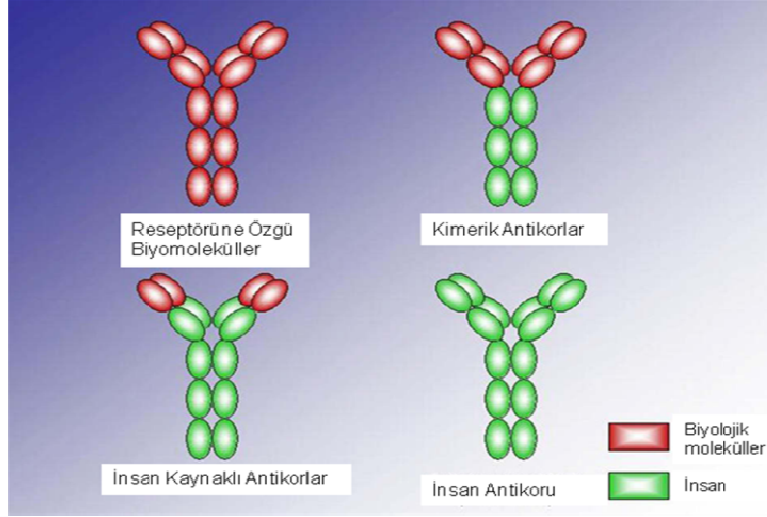
Tümörlü dokulardaki kan damarlarının endotelial hücreleri arasında, sağlıklı bir dokudaki kadar sıkı bağlantı noktaları bulunmaz ve genellikle 400 nm'nin altındaki lipozomal yapılar bu boşluklardan rahatlıkla geçebilir. Günümüzde Doxorubicin, Camptothecin ve Daunorubicin gibi antikanser ilaçlarının taşınımı lipozomal sistemlerde kullanılmaktadır (Chen ve ark ., 2008).

### 2.4.3. Monoklonal Antikorlar

Tümör hücrelerinde bulunan çeşitli hedef moleküllere yönelik geliştirilmiş olan monoklonal antikorlar son yıllarda kanser tedavisinin en etkin araçları arasına girmiştir. Yüksek düzeyde spesifite ve nispeten olumlu toksisite profilleri, bu ajanların standart tedaviler içinde yer almalarını sağlamıştır.

#### 2.4.3.1. Kimerik Proteinler

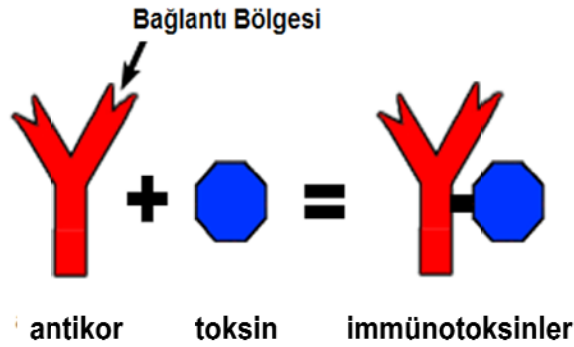
Kimerik proteinler, tümör hücrelerini tanıyan ve yok eden bazı küçük sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri gibi moleküllerin doğal toksinlerle oluşturduğu konjüгатlardır (Ben-Yehudah ve Lorberboum-Galski, 2004).



Şekil 2.7. Kimerik antikorların şematik gösterimi

### 2.4.3.2. İmmünotoksinler

Bir diğer grup olan immünotoksinler, monoklonal antikorların bakteri veya bitki toksinleriyle (*Pseudomonas* ekzotoksini veya *Korinobacterium difteri* toksini) konjüгат oluşturulmasıyla elde edilmektedir. Bu doğal toksinler, spesifik olmayan toksik özellikleri olmasına rağmen, mutasyonel eliminasyon yoluyla kendi reseptörlerine bağlanabilmektedirler. Ancak yüksek dozlarda önemli risk potansiyeli taşırlar (Niv ve ark., 2001; Reiter, 2001).



Şekil 2.8. İmmünotoksinlerin şematik gösterimi

### 2.4.3.3. Monoklonal Antikorların Etki Mekanizmaları

Monoklonal antikorlar, kanser hücreleri yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak aktivasyon ya da inhibisyona neden olmaktadır. Örneğin, anti-CD 20 monoklonal

antikoru apoptozisi indüklerken, EGF reseptörü bağlayan antikor, doğal ligandların bağlanmasını engelleyerek reseptör blokajına neden olmaktadır.

Monoklonal antikorun antijen bağlayan bölümünün diğer ucunda Fc bölgesi yer almaktadır. Çeşitli mononükleer hücreler ve lökositler taşıdıkları Fc reseptörleri aracılığıyla antikor ile kaplanmış tümör hücrelerini fagosite ederek ya da öldürücü granüllerini boşaltarak imha etmektedirler. IgG yapısında monoklonal antikorlar klasik kompleman kaskadını da aktive ederek inflamasyon yanıtı oluşturabilirler. Sitokinler kemotaktik, opsonizasyon ve vasküler geçirgenliği arttırarak monoklonal antikorların tümöre geçişini kolaylaştırmaktadır.

Monoklonal antikorların öldürücü etkilerini 4 ana başlık altında ele alınabilir:

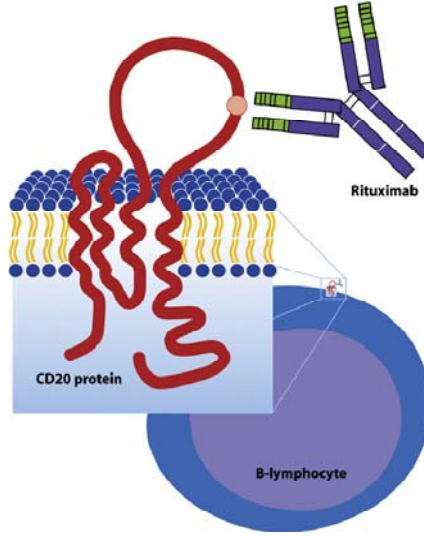
- Monoklonal antikor - antijen birlikteliği oluştuğunda, antijenin kompleman komponentleri aktive olur. Bu da kanser hücrelerinin opsonizasyonu ile sonuçlanır. Kompleman reseptörlerini açığa çıkaran fagositik hücreler tümör hücrelerini direkt lizise uğratar.
- Antikor bağımlı selüler sitotoksisite veya sitokinlerin salınımını sağlarlar.
- Monoklonal antikorlar inhibitör Fc reseptörlerine bağlanarak, hedef hücre aktivasyonunu baskılamaktadırlar.
- Monoklonal antikorlar direkt olarak büyüme faktörü reseptörlerine bağlanarak, kanser hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır.

#### **2.4.3.4. Monoklonal Antikorların Klinik Kullanımı**

##### **2.4.3.4.1. Rituximab (MabThera)**

Rituximab CD20 proteinine karşı oluşturulmuş kimerik bir monoklonal antikordur. CD20 proteini B lenfositlerin yüzeyinde bulunan bir moleküldür ve preB lenfositten B lenfosit kadarki hücrelerde bulunurken B lenfositlerden oluşan plazma hücrelerinin yüzeyinde bulunmaz. CD20 salınmaz, değiştirilmez ve hücre içine alınmaz. CD20'nin kesin fonksiyonu bilinmemekle birlikte, hücre içine kalsiyum salınımından ve konsantrasyonunun devamlılığından sorumlu olduğu, bu şekilde de B lenfositlerin aktivasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. CD20 molekülü B lenfositlerden kaynaklanan kronik lenfoit lösemi ve lenfomalarda, kanser hücreleri

tarafından açığa çıkarılmaktadır. Rituximab kanser hücrelerinin yüzeyini antikorlarla kaplamaktadır. Bu şekilde antikorla kaplı hücreler NK hücrelerini aktifler ve NK hücreleri antikor bağımlı yıkımı meydana getirirler. Bu yıkım, antikor bağımlı selüler sitotoksiteye bağılı olarak gelişmektedir. Ayrıca rituximab kanser hücrelerinde bir takım değişikliklere neden olarak programlı hücre ölümüne neden olmakla birlikte, kanser hücrelerinin kemoterapiye duyarlılığını da arttırmaktadır.



Şekil 2.9. Rituximab aktivitesinin şematik gösterimi (Pescovitz, 2006)

Rituximab'ın yan etkileri:

- Ağır infüzyon reaksiyonu
- Kardiak arrest
- Tümör lizis sendromu
- Enfeksiyonlar: Hepatit B reaktivasyonu, diğer viral aktivasyonlar
- Pulmoner toksisite
- Latent JC virüsü serebral aktivasyonu
- SLE'li hastalarda ölüme neden olduğu bildirilmiştir.

Ayrıca yeni CD20 monoklonal antikorları da mevcuttur. Bunlardan ocrelizumab, %90 insan kaynaklı, ofatumumab ise tamamen insan kaynaklı CD20 monoklonal antikorudur.

#### **2.4.3.4.2. Alemtuzumab (Campath – 1H)**

CD52 olgun lenfositlerin yüzeyinde bulunan proteindir. Kök hücre yüzeyinde bulunmamaktadır. Alemtuzumab, anti-CD 52 etkinlikte bir monoklonal antikor olup, kronik lenfositik lösemideki başarısı ile kullanıma girmiştir. Ayrıca T hücreli lenfoma için de endikasyon almıştır. Bunların yanı sıra böbrek transplantasyonlarında da kullanımı yaygındır. Alemtuzumabın malignensiler dışında, otoimmün hastalıklardan multipl sklerozda da kullanılabildiği bildirilmektedir. Hipotansiyon, ateş, döküntüler, kalp aritmilerine neden olabilmektedir. Kalbe olan etkilerin ölümcül olabildiği gözlenmiştir.

#### **2.4.3.4.3. Trastuzumab (Herceptin)**

Trastuzumab, insan kaynaklı bir monoklonal antikor olup, her2/neu (erbB2) reseptörü üzerinde aktive olmaktadır. Asıl kullanım alanı her2/neu reseptörü pozitif olan meme kanserli olgulardır. her2/neu reseptörü, erken meme kanseri olgularının %20-30'unda pozitif bulunmaktadır.

Trastuzumab'ın etkinliğinin ortaya çıkması ile ilgili çeşitli mekanizmalar öne sürülmektedir:

- her2/neu reseptör blokajı
- Anjiogenezin inhibisyonu
- her2 reseptör down regülasyonu

Meme kanseri hastalarının yaklaşık %30'unda aşırı ekspresyonu gözlenen her2/neu yüzey reseptörüne karşı geliştirilmiş trastuzumab, reseptöre bağlandıktan sonra antikora (ADCC) veya komplemana bağlı (CDC) sitotoksikite etkisinin yanısıra, her2 dimerizasyonunun engellenmesi, reseptör düzeyinin azalması, p27 proteininin indüklenmesi ve yeni neoplastik damar oluşumunun engellenmesi gibi çeşitli mekanizmalarla antitümör etki göstermektedir.

#### **2.4.3.4.4. Cetuximab (Erbix)**

EGFR'nin (Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü) aşırı ekspresyonu birçok solid tümör tipinde sık rastlanan ve bu tümörlere oldukça agresif fenotip kazandıran bir oluşumdur. Hücre yüzeyinde yer alan EGFR'ye yönelik monoklonal antikor cetuximab, baş-boyun ve kolon kanserlerinde denenmiş ve metastatik kolon

kanserlerinin tedavisinde ilaca duyarlılığı arttırması nedeniyle kullanımı onaylanmıştır.

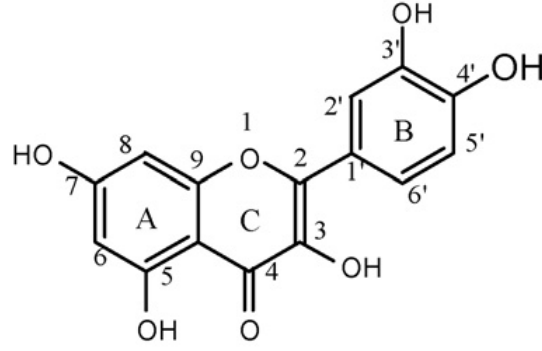
#### **2.4.3.4.5. Bevacizumab (Avastin)**

Tümör neoanjiyogenezinde çok önemli bir rol oynayan VEGF'ye (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) karşı geliştirilen bir monoklonal antikor olan bevacizumab metastatik kolorektal kanseri için FDA onayı almış ve birçok tümör tipinde çalışmaları süren bir ajandır (Culy,2005). Son yıllarda yapılan benzer çalışmalar bevacizumabın renal, ovaryum, akciğer ve göğüs gibi diğer kanser hastalıklarında da etkin olma potansiyelini ispatlamaktadır (Ellis, 2005).

Bevacizumab anjiyogenez inhibitörlerinden olup, tümör hücrelerinde yeni damar oluşumunu engeller. Bu monoklonal antikor, tümör hücrelerinden yeni damar oluşumunu uyarmak için salınan VEGF'ye bağlanır. Bevacizumab, VEGF'nin kan damarlarının endotel yüzeyinde bulunan reseptörüne bağlanmasını engeller. VEGF reseptörlerinin aktivasyonu endotel hücrelerinin büyümesi ve tümör için besleyici yeni kan damarlarının oluşumuna neden olur ki, bu durum da tümör oluşumu için temel unsurdur (Folkman, 1992). Bu büyüme ve yeni damar oluşumunun engellenmesi, metaztazi engeller ve tümör hücrelerinin sitotoksik ilaçlara duyarlılığını arttırır.

#### **2.5. Kuersetin**

Flavonoidler, günlük beslenmede yer alan meyve ve sebzelere, renk ve tat veren bileşikler olup, flavonlar, flavonoller, flavononlar, antosiyanitler ve izoflavonlar olmak üzere altı ana başlık altında toplanabilir. Kanser, kalp rahatsızlıkları ve nörodejeneratif rahatsızlıklar gibi birçok hastalığa çözüm getirdikleri öne sürülmektedir (Williams ve ark., 2004).



Şekil 2.10.Kuersetinin kimyasal yapısı (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon).

Bir flavonoid olan kuersetin, meyve ve sebzelerde bulunmakla birlikte, günlük ortalama kullanımı 6 mg ile 31 mg arasındadır (Alia ve ark., 2006). Kanda glikozit konjugatı olarak bulunması ve yapısı sebebiyle, kuersetinin ulaşabildiği yüksek kan ve doku konsantrasyonu büyük önem taşımaktadır. Çünkü bu özelliği, hücre yanıtının artmasını sağlamaktadır. Hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda kuersetinin gelecekte özellikle anti-kanser ajanı olarak kullanımının hızla artacağı öngörülmekte (Elangovan ve ark., 1994) ve kolorektal, göğüs, mide, ovaryum, lenfoid kanser hücre hatlarında proliferasyonu önleyebildiği bilinmektedir (De ve ark.,1996; Larocca ve ark., 1996). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, uygulanan dozla orantılı olarak tümör büyümesinin baskılandığı bildirilmektedir (Asea ve ark.,2001).

*In vitro* çalışmalar kuersetinin çok sayıda farklı inhibisyon etkisine sahip olduğunu göstermektedir (Lamson ve ark., 2000). Örneğin; antioksidan aktivitesi ile hücre proliferasyonunda görev alan protein kinaz C enzimi gibi sinyal proteinleri, tirozin kinaz ve fosfoinositit 3-kinaz (PI-3 kinaz), anjiyogenesis, DNA hasarı ve apoptozisin inhibisyonu gibi koruyucu etkileri de bilinmektedir (Agullo ve ark.,1997).

Kuersetine bağlı apoptozisin, kaspazların aktivasyonu, mikrotübüllerin bozulması ve sitokrom c'nin mitokondriyal salımı, stres proteinlerinin indüklenmesinin sonucu olarak geliştiği öne sürülmektedir (Ong ve ark., 2004; Gupta ve ark., 2002).

Melanoma B16-BL6 hücrelerinde görülen kuersetine bağlı apoptoziste ilacın mitokondri üzerindeki zararlı etkisi, Bcl-2 geninin ekspresyonunu azaltması ve

kaspaz-3 aktivitesini arttırması ile ilişkilidir (Zhang ve ark., 2005). HeLa hücrelerindeki etkisi de sisplatine bağlı apoptozis ile, kaspaz-3 aktivitesinin indüksiyonu ve hem ısı şoku proteinlerinin hem de ilaca dirençli proteinlerin inhibisyonu ile mümkün olmaktadır (Jakubowicz-Gil ve ark., 2005). Bu yüzden literatüre dayandırılarak ilacın düşük dozda kullanımının apoptozisi ve nekrozisi bir ölçüde azalttığı, fakat yüksek dozda hem apoptozisi hem de nekrozisi arttırdığı söylenebilir. Kuersetinin spesifik özellikleri adjuvan terapide kullanımını da arttırmaktadır. Örneğin, Ewing tümör hücre hattı ile yapılan çalışmada hipertermi uygulamasında kullanılabilirliği ve ısı şoku proteinlerinin ekspresyonunu baskılayabilme özelliği ile öldürülen hücre sayısını arttırdığı görülmüştür (Debes ve ark.,2003).

Kuersetin özellikle epitel hücrelerden köken alan kanserli hücreler olmak üzere birçok hücre hattında etkinlik göstermektedir.

Çizelge 2.1. Kuersetinin etkin olduğu hücre hatları

Hücre hatları	Kuersetin Dozajı	Moleküler Aktivitesi
Kolon kanser hücresi	5 $\mu$ M	CDC6, CDK4 and siklin D1, ekspresyonunun inhibisyonu ,hücre döngüsünün bozulması
Kolon kanser hücreleri	10 $\mu$ M	p21 onkojeni ekspresyonunun inhibisyonu
Akciğer kanser hücre hattı (NCI-H209)	10 $\mu$ M	DNA hasarı
Osteoblast hücreleri (MC3T3-E1)	10 $\mu$ M	TNF- $\alpha$ -bağımlı sitotoksiste
İnsan lösemi hücreleri(U937)	20 $\mu$ M	Kaspaz bağımlı apoptozis indüksiyonu
İnsan kronik miyeloid hücreleri (K562)	25 $\mu$ M	Sitotoksiste
Hepatoma hücreleri (HepG2)	25–50 $\mu$ M	G1 faz blokajı
HepG2 hücreleri	25–75 $\mu$ M	Kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyon seviyelerinde artış
Kolon hücreleri (SW480)	50 $\mu$ M	$\beta$ -Katenin/Tcf transkripsiyonel aktivitesi
Human non-small lung cancer cells (A549)	50–200 $\mu$ M	Konsantrasyona bağlı sitotoksiste
Gastrik kanser hücreleri (HGC-27)	70 $\mu$ M	Hücre döngüsü G1 fazının blokajı, Hücre büyümesi redüksiyonu
HeLa hücreleri	100 $\mu$ M	Hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü inhibisyonu
Meme kanseri hücreleri MDA-MB468	248 $\mu$ M	Mutant p53 geninin down regülasyonu

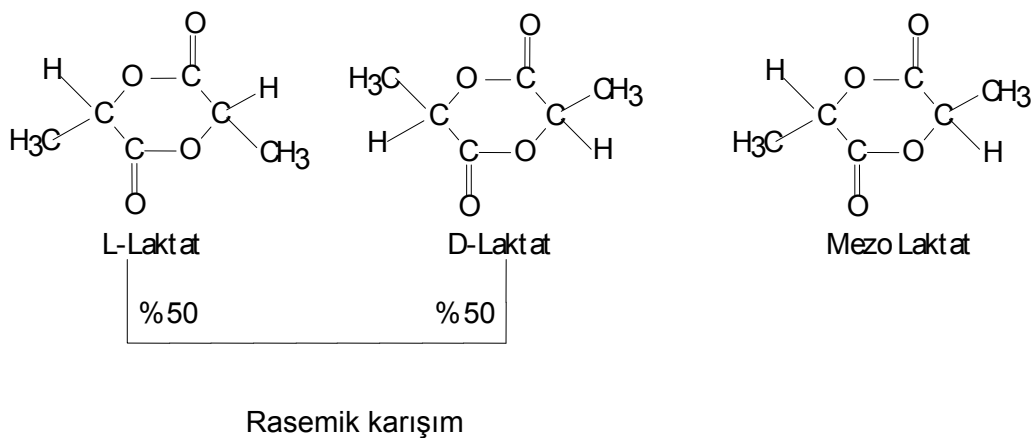
## 2.6. Polilaktik Asit

Laktik asit, asit (COOH) ve alkol (OH) fonksiyonel gruplarını birlikte içeren doğal organik bir bileşik olup,  $\alpha$ -hidroksi propiyonik asidin en yaygın olarak kullanılan adıdır. Suda çözünebilir, zayıf ekşi tatta, sarı renkli, kokusuz bir sıvıdır ve non-toksiktir. Bu nedenle yiyecek endüstrisinde geniş bir kullanım alanı olan bir bileşiktir.

İlk kez 1780 yılında Carl Wilhem tarafından bulunan ve süt asidi olarak adlandırılan laktik asit süt ve süt ürünlerinde, insan ve hayvan dokularında bulunmaktadır (William A. Smeaton, 1986). İnsan vücudunda, karbonhidrat metabolizmasında ya ara ürün ya da son ürün olarak bulunmaktadır. İnsanlarda, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda L-, D- veya bunların değişik oranlardaki karışımları şeklinde görülmektedir.

Laktik asit polimerleri genellikle poliesterler, poli ( $\alpha$ - hidroksi asitler) veya poliglaktonlar olarak sınıflandırılırlar ve genellikle polilaktik asit (PLA) şeklinde isimlendirilirler. Yüksek molekül ağırlıklı laktik asit polimerleri polilaktat olarak da adlandırılırlar, çünkü bunlar genellikle laktik asidin siklik diesterlerinden, laktatlardan sentezlenmektedirler.

Laktik asidin bimoleküler siklik esterleri IUPAC tarafından dilaktat olarak adlandırmaktadır. Heterosiklik bir bileşik olan bu yapı 3,6- dimetil-1,4-dioksan- 2,5-dion şeklinde gösterilebilmesine karşın genellikle laktat olarak belirtilmektedir. Yapıdaki asimetrik karbon atomunun konfigürasyonuna göre laktatlar L-, D- ve mezo şeklinde adlar almaktadır. Şekil 2.10'da laktat izomerleri verilmiştir.



Şekil 2.11. Laktat stereoizomerleri

Bu siklik dimerler genellikle iki kademeli kesikli bir yöntemle üretilir. İlk basamakta monomerden polikondenzasyon ile oligomerler elde edilir. İkinci basamakta ise bu oligomer katalizör varlığında indirgenmiş basınç altında ısıtılarak dimer elde edilir. Yüksek molekül ağırlıklı polimerler bu dimerlerin katalizör varlığında halka açılması yöntemi ile polimerleştirilmesinden elde edilir.

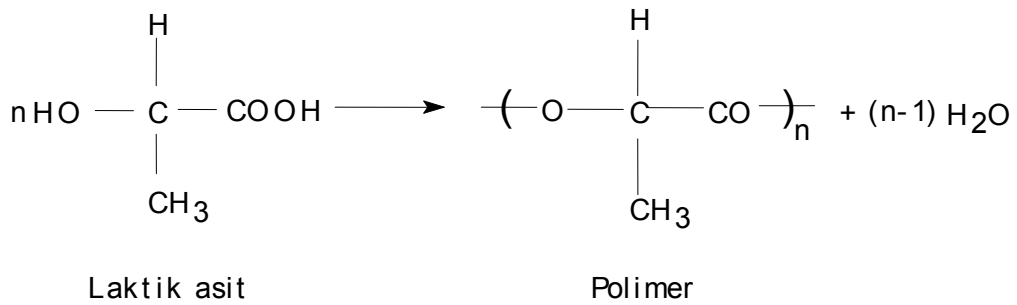
L-laktat doğal olarak bulunan izomerdir. DL-laktat ise, D-laktat ile L-laktat'ın karışımından sentetik olarak elde edilir. L-laktat'ın homopolimeri (LPLA) yarı kristalin bir polimerdir. Bu tip materyaller yüksek gerilme direncine ve uzamaya sahiptir. Bu özellikleri özellikle ortopedik uygulamalar ve ameliyat ipliği yapımı için çok önemlidir. Poli (DL-laktat) (DLPLA) laktik asit izomer formlarının rastgele dağılımından dolayı amorf bir polimerdir. Bu materyal düşük gerilme direncine, yüksek uzamaya ve daha hızlı degradasyon zamanına sahiptir. Bu özelliklerde bu materyalin ilaç salım sistemleri için çok cazip olmasını sağlar. Polilaktik asit, %37 kristalindir ve 175-178°C erime noktasına ve 60-65°C camsı geçiş sıcaklığına sahiptir (Horacek and Kalisek, 1994). LPLA'nın degradasyon zamanı DLPLA'nın degradasyon zamanından daha yavaştır ve tamamen absorpsiyonu 2 yıl gibi bir zaman alır (Gogolewski et. al, 1993). Polilaktik asit polihidroksi asitler grubuna ait laktik asitten üretilen biyobozunur bir poliesterdir. Polistirene benzer, iyi bir estetik sağlar, fakat katı ve kırılımandır. Bu nedenle üretimi sırasında pratik uygulamalar için modifikasyona ihtiyaç duyulmaktadır.

Çizelge 2.2. Polilaktik asitin bazı özellikleri

<i>izomer</i>	<i>L –laktat</i>	<i>D –laktat</i>	<i>D- ve L- karışımı</i>
Tm	95°C	95°C	120-128°C
<b><i>Polimer</i></b>	<b><i>PLLA</i></b>	<b><i>PDLA</i></b>	<b><i>PDLLA</i></b>
Tm	180°C	180°C	-
Tg	58°C	58°C	57°C
Morfoloji	Yarı kristalin	Yarı kristalin	Amorf
MW (kDa)	50-756	-	21-550
Viskozite (dL/g)	0.61-8.2	-	0.25-2.01
Yoğunluk (g/cm <sup>3</sup> )	1.25	-	1.29

PLA canlı doku tarafından absorplanabilir, biyoyumlu, non-toksik ve immünolojik olarak inaktif ve sentetik bir polimerdir. PLA'nın biyodegradasyonu yapısına ve molekül ağırlığına bağlıdır. Yüksek molekül ağırlıklı ve kristalin formdaki PLA daha yavaş biyodegradasyona uğrar. DLPLA'nın degradasyon zamanı 12 ile 16 ay arasında değişirken LPLA'nınki 24 aydan fazladır.

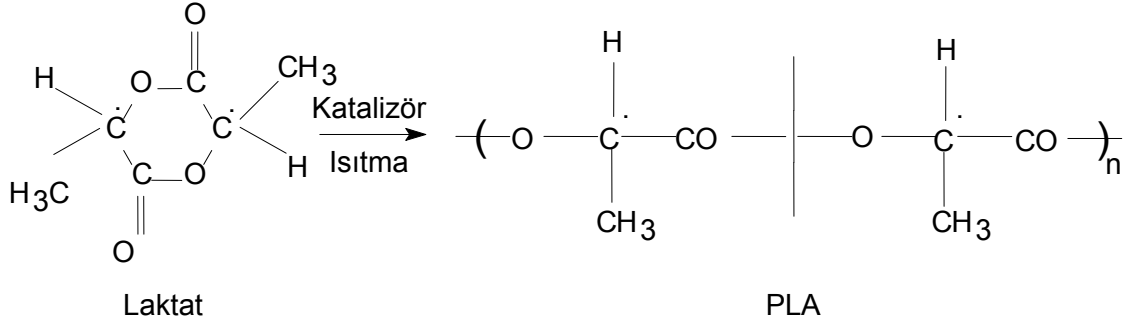
Laktik asidin düşük molekül ağırlığına sahip homo ve kopolimerleri ısıtma prosesleri ile doğrudan sentezlenebilmektedir. Düşük molekül ağırlıklı laktik asit polimeri, laktik asidin doğrudan polimerizasyonu ile sentezlenmektedir. Filachione ve Fisher (1946) tarafından yapılan çalışmalarda reaksiyon karışımlarından suyun uzaklaştırılmasının (kaynatılarak veya aromatik bir hidrokarbon çözücünün azeotropik distilasyonu ile)  $\alpha$ -hidroksi karboksilik asitlerin kondenzasyonuna etki ettiği gösterilmiştir.  $120^{\circ}\text{C}$ 'in altındaki reaksiyon sıcaklıklarında reaksiyon hızı asit katalizli gerçekleşirken bu sıcaklığın üzerinde genellikle suyun uzaklaştırılması hız sınırlayıcı faktördür. Bu sıcaklıklarda katalizör kullanılması pek fayda sağlamamaktadır. Bu yöntemle hazırlanan polimerlerin sayıca ortalama molekül ağırlıkları genellikle 10.000'in altındadır. Ayrıca laktik asidin basit kondenzasyonu yalnızca düşük molekül ağırlıklı polimerler oluşturabilmektedir. Laktik asidin kondenzasyon reaksiyonu Şekil 2.11'de gösterilmiştir.



Şekil 2.12. Laktik asit kondenzasyonu

Yüksek molekül ağırlıklı polilaktat veya laktat/glikolat kopolimeri (PLA/PGA) ise laktat ve glikolat dimerlerinden (laktik ve glikolik asidin siklik dimerleri) zincir açılması polimerizasyonları ile sentezlenebilmektedir (Sipos ve ark., 1991). Bu nedenle molekül ağırlığı 40.000 üzerinde olan polilaktat polimerlerinin üretilmesinde bazı katalizörlerin kullanıldığı halka açılması polimerizasyonları

tercih edilmektedir (Gilding and Reed, 1979; Kleine, 1959). Halka açılması polimerizasyonunda kalay, antimon ve çinko katalizör olarak kullanılır.



Şekil 2.13. Halka açılması polimerizasyonu

Halka açılması polimerizasyon yöntemi oldukça avantajlı bir yöntemdir. Örneğin, sistemden suyun uzaklaştırılması gibi bir sorun yoktur. İkinci olarak, üretilen polimerlerin siklikleştirilmiş monomer ve doğrusal formları, saflaştırmaya müsaade edecek derecede farklı fiziksel özellikler kazandırmaktadır.

Laktatların halka açılması polimerizasyonlarında başlatıcı olarak kullanılan maddeler geniş bir spektruma sahiptir. Bunlar arasında en yaygın kullanıma sahip olan başlatıcılar metalik ve organometalik maddeler, inorganik veya organik çinko ve kalay, tetrafeniltin, dietil çinko, kalay ve çinko klorür, trialkil alüminyum ve tetra alkil kalay, kalay klorür, çinko oksit, kalay oksit, çinko oktoat ve kalay oktoattır.

Bunun yanısıra laktatın daha ılımlı koşullarda ve erime sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklarda, yığın polimerizasyonu sonucu daha yüksek molekül ağırlıklı yapıları sentezlenmiştir.

Biyoplastik olarak önemi gün geçtikçe daha iyi anlaşılan ve her gün yeni bir uygulama alanı bulan PLA'nın uygulamaları başlıklar halinde şu şekilde özetlenebilir.

Tıbbi uygulamaları;

- ✓ Ameliyat iplikleri (Sutures)
- ✓ Protezler
- ✓ Kontrollü salım sistemleri

Paketleme;

- ✓ Perakende poşetler
- ✓ Atılabilir başlıklar
- ✓ Şişeler
- ✓ Zirai uygulama filmleri

Tekstil;

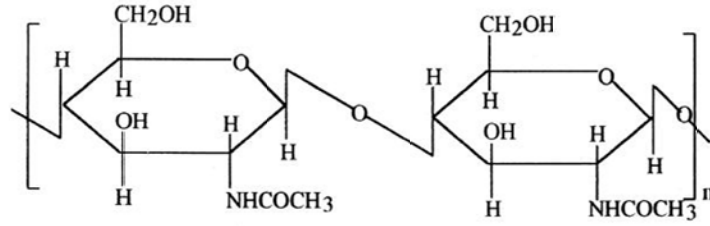
- ✓ Çeşitli kıyafetler
- ✓ Çocuk bezleri

Laktik asidin ameliyat ipliği olarak kabul edilmesi pek çok tıbbi ve farmasötik uygulamalarda, yara kapatıcı, dental tamirler, yapı katılaştırmalarında (kemik tabakalar, vidalar, iğneler ve çatlaklar), bağ onarımında, damar aşılı ve sinir tamiri gibi konularda cazip hale gelmesini sağlamıştır. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan biyobozunur polimerler arasında laktik asit polimerleri, en çok toksikolojik ve klinik veriye sahip alifatik poliesterdir. Çünkü özellikle yirmi yıldan daha uzun bir süredir, laktik asit homo ve kopolimerleri yoğun olarak biyomedikal uygulamalar için araştırılmaktadır. Bu polimer diğerlerine göre yüksek biyolojik uyumluluk, net olarak tanımlanabilen biyodegradasyon kinetiği, kolay işlenebilirlik ve değişik formlarda hazırlanabilme gibi üstünlüklere sahip olup, özellikle biyolojik aktif maddelerin kontrollü salımında kullanılmaktadır.

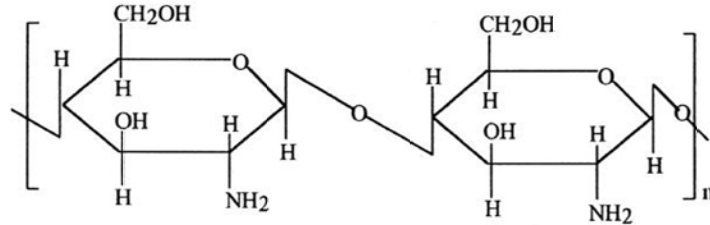
## 2.7. Kitosan

Kitosan, özellikle deniz kabuklularının yapısında yer alan ve kitin adı verilen doğal polimerin deasetile edilmesiyle elde edilmektedir (Şekil 2.13). Yapı itibarı ile kitin, selüloz polimerinden sonra doğada en bol bulunan ikinci doğal polimer ya da biyopolimerdir. Bu nedenle ekonomik olarak son derece ucuz ve yenilenebilir

kaynaklardan elde edilebilmesi nedeniyle de oldukça tercih edilen bir biyopolimerdir. Benzer şekilde kitosan da sahip olduğu birçok benzersiz fizikokimyasal özellikten dolayı, özellikle biyomedikal uygulamalarda son yıllarda üzerinde çalışılan önemli alternatiflerden biri olmuştur (Kumar ve ark., 2000).



kitin



kitosan

Şekil 2.14. Kitosanın kimyasal yapısı

Kitosanın biyomedikal uygulamalara uygun bir polimerik yapı olmasını sağlayan biyolojik özellikler sırasıyla Çizelge 2.3.'te özetlenmiştir (Papadimitriou ve ark., 2008).

Çizelge 2.3. Kitosanın Biyolojik Özellikleri

• biyolojik uyumluluğunun yüksek olması
• biyolojik olarak bozunabilmesi
• antifungal ve antibakteriyel etkisinin olması
• yağ tutucu özelliğinden dolayı kolesterol düşürücü ajan olması
• hemostatik özelliğe sahip olması

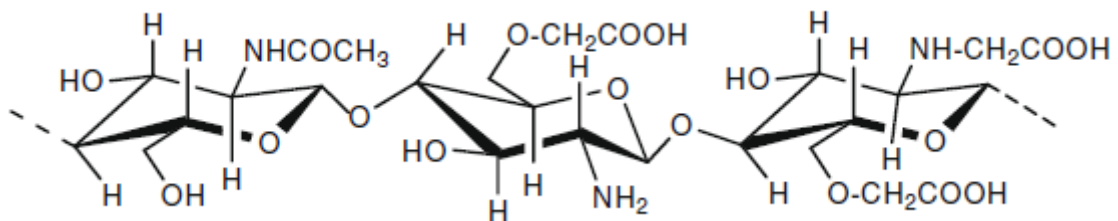
Bunların yanı sıra, özellikle hücre hedefleme çalışmalarında ve diğer uygulamalarda, kimyasal modifikasyona yatkın olmasıyla da önem taşıyan polimerik bir malzemedir. Sunulan çalışmada da bu üstün özelliklerinden dolayı polimerik matriks olarak kullanılmıştır. Kitosan polimerinin genel fizikokimyasal özellikleri Çizelge 2.4.'te özetlenmiştir (Crini ve ark., 1997).

Çizelge 2.4. Kitosanın Fizikokimyasal Özellikleri

• Katyonik poliamin
• Yüksek yük yoğunluğu (pH< 6.5)
• Negatif yüklü yüzeylere yapışma özelliği
• Polianyonlarla jel oluşturabilme özelliği
• Geçiş elementleriyle şelat oluşturabilme özelliği
• Kimyasal modifikasyona yatkınlık özelliği
• Reaktif hidroksi ve amin gruplarının varlığı

## 2.8. Karboksimetil Kitosan

Kitosanın sudaki sınırlı çözünürlüğü kimyasal modifikasyon ile giderilebilen bir problemdir (Jayakumar ve ark., 2007). Bu modifikasyonlar çözünürlük, antimikrobiyal aktivite ve diğer maddelerle etkileşim özelliklerini değiştirmek amacıyla gerçekleştirilmektedir. (Singh ve ark., 2008). Örneğin, karboksimetilleme önemli bir kimyasal modifikasyon yöntemidir.



Şekil 2.15. Karboksimetil kitosan (CMCh)'in kimyasal yapısı

Karboksimetil kitin ve kitosanın N-asetil glukozamin içeren orijinal yapıları, biyouyumluluk, hidrofilisite, biyobozunurluk ve farklı formlar alabilme özelliklerini arttırmaktadır (Muzzarelli, 1988). Bu karboksimetillenmiş türevlerin nanopartikülleri, ilaç taşınımı gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmak üzere sentezlenmektedir (Shi ve ark., 2005).

## 2.9. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, kendiliğinden oluşan hücre göçü, mekanik veya enzimatik parçalanma ile bir dokudan ayrılmış olan hücrelerin üretilmesidir. Hücre kültürü başlıca organ kültürü, doku eksplant kültürleri ve hücre kültürü olarak üçe ayrılabilir. Organ kültürü, organların belirli sürelerde vücut dışında canlı kalmalarının sağlanmasıdır. Doku eksplant kültürü ise, doku parçacıklarının canlılıklarını in-vitro ortamda yürütülmesinin sağlanmasıdır. Hücre kültürünün tarihçesi 1800'lü yıllara kadar dayanır. İlk olarak 1866 yılında *in vitro* doku kültürü çalışılmış ve amfibi kan hücrelerinin 35 gün canlı kalabilmeleri sağlanmıştır.

### 2.9.1. Hücre Kültürünün Kullanım Alanları

Günümüzde hücre kültürünün kullanım alanları hızla artmaktadır. Hemen her alanda bu tür çalışmalara rastlamak mümkündür. Bunlar şu şekilde özetlenebilir:

- Viral aşılarda ve viral teşhis amaçlı kullanımı
- Monoklonal antikor, İnterferon, enzim, aşı, büyüme faktörü, İnterlökin gibi immunoregülatörler, hormon, üretimi
- Somatik gen tedavisi
- *Tümör tedavisi*
- Canlı hücrelerinin farklı amaçlarla kullanılması
  - ✓ Eritrositlerin transfüzyon amaçlı kullanımı
  - ✓ Kemik iliği nakli
  - ✓ Parkinson tedavisinde beyin hücrelerinin kullanılması
- Kompleks üç boyutlu dokular, yapay deri, kıkırdak, karaciğer ve yapay pankreas

### **2.9.2. Hücre Kültürü Koşulları**

Hücre kültür ortamı, hücre ve kültür tipine göre değişmekle birlikte, hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması için gereksinim duyacağı şartları eksiksiz sağlamalıdır.

Kültür ortamı, osmotik olarak dengelenmiş enerji kaynağı, vitaminler, ko-faktörler, inorganik tuzlar, eser elementler, büyüme faktörü, mineraller ve aminoasitlerden oluşmaktadır. Kültür ortamını etkileyen diğer faktörler ise sıcaklık, pH, nemlilik, gaz fazı bileşenleri, ozmolarite ve ışıktır.

Hayvan hücre kültür ortamında fizikokimyasal olarak, optimum pH 7.2–7.5, osmolarite 280–320 mosmol/kg, CO<sub>2</sub> %2-5, sıcaklık da 35-37°C olmalıdır. Bikarbonat gibi tamponlayıcılar (özellikle toz vasat kullanıldığında), glutamin, kan serumu ve antibiyotik ortama sonradan ilave edilmektedir. Farklı hücre kültürleri için farklı özelliklerde kültür ortamları gerekmektedir. Örneğin, memeli hayvan hücre kültüründe optimum pH 7.4 iken birçok deniz canlısında 7.2-7.8, böceklerde 6-7.7, lepidopterlerde 6.2-7.6, bazı salyangoz türlerinde 7-7.9 arasında değişmektedir.

### **2.9.3. Hücre Kültür Sistemleri**

Hücre kültürleri, kaynaklarına ve büyüme biçimlerine göre sınıflandırılırlar.

#### **2.9.3.1. Kaynaklarına Göre Hücre Kültür Sistemleri**

*Primer kültürler*, hayvan veya bitki hücreleri izole edildikten sonra kültüre edilirse primer kültür elde edilmektedir. Bu koşullarda hücre soyu sonludur, yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölür. Bu nedenle, primer hücrelerde belirli sayıda pasajlama yapılabildiğinden, deneyleri bu dönemde yapmak gerekmektedir. Primer hücreler pasajlamalar sonunda ölümsüz olabilirler. Bu durumda bir hücre soyu elde edilmiş olur.

*Hücre soyları*; primer hücrelerde spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden, kimyasal ajanlar veya virüsler eklenerek insan eliyle oluşturulmakta ve tümör dokularından alınan hücrelerden de elde edilebilmektedirler. Primer kültürlerden farkları, kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilmeleri, büyüme faktörüne ve seruma daha az ihtiyaç duymaları, çoğalmak için zemine tutunma ihtiyaçlarının daha az olması ve sonsuz çoğalma yeteneğine sahip olmalarıdır.

### 2.9.3.2. Büyüme Biçimlerine Göre Hücre Kültür Sistemleri

Süspanse kültürler ve yüzeye tutunarak büyüyen hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Kan, dalak, kemik iliği kültürleri ve olgunlaşmamış hücreler bu şekilde üremektedirler.

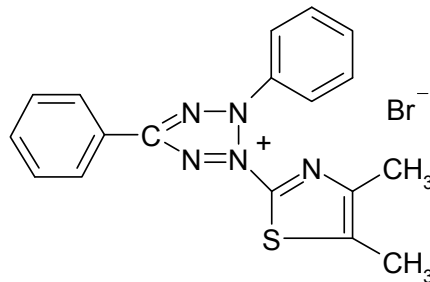
Tutunarak büyüyen hücreler ektoderm ve endoderm kökenli hücreler (fibroblast ve epitel hücreleri) olmak üzere, ekstraselüler matriks olarak adlandırılan ve kollojen, laminin, proteoglikanlar gibi makromoleküllerin bir karışımı olan kompleks bir yapı üzerinde, bu yapıdaki moleküler membran reseptörleri (integrin  $\alpha1\beta3$ ,  $\alpha1\beta5$ ,  $\alpha2\beta3$  v.s.) aracılığı ile etkileşerek büyümektedirler.

### 2.9.4. Sitotoksite Testleri

Hücre kültürü çalışmalarında, hücre sayısının belirlenmesi esastır. Bu nedenle hücre sayımında birçok yöntem geliştirilmiştir. Sadece canlı yada sadece ölü hücreler spesifik enzimler, substratlar veya boyalar kullanılarak sayılmaktadır. Tetrazolium tuzları (MTT, INT, NBT, TNBT, v.b.) bu boyalardan biridir. Lizozomal enzimlerden olan hexoamidinaz da hücre sayımında kullanılan enzimlerdendir. Metilen mavisi, kullanılan boyalardan bir diğeri olup, hücrede negatif gruplara bağlanmaktadır (nükleik asit, posfataz ve bazı proteinler gibi). Bu boyalara ilaveten jenus yeşili, tripan mavisi de hücre sayımında kullanılan boyalar içerisinde yer almaktadır.

#### 2.9.4.1. MTT Testi

MTT testi biyomalzemelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerini gözlemleyebilmek için tetrazolium tuzları kullanılarak canlı hücre sayısının tespit edilmesini kolorimetrik yöntemle sağlayan hücre kültürü çalışmalarından biridir.



Şekil 2.16. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromür)

Canlı hücrelerde mitokondriyal enzimlerin dehidrogenaz aktivitesi sonucu formazan kristalleri meydana gelmesine, bu kristallerin çözünmesi ve spektrofotometrik yöntemle absorbanslarının belirlenmesi temeline dayanmaktadır. Ölü hücrelerde mitokondriyal aktivite gözlenemeyeceği için tetrazolium tuzları ile sadece canlı hücreler sayılabilmektedir.

NAD(P)H formazan kristallerinin oluşumunda indirgeyici olarak çalışmakta ve tetrazolium tuzuna elektron ve hidrojen vermektedir. Bunun sonucunda da formazan kristalleri oluşmaktadır. Çalışmalarda monotetrazolium tuzlarından MTT(3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromür), farklı biyomalzemeler ve bu malzemelerin farklı konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerin canlılıkları ve malzemelerin sebep olduğu sitotoksik etkiler incelenmektedir.

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

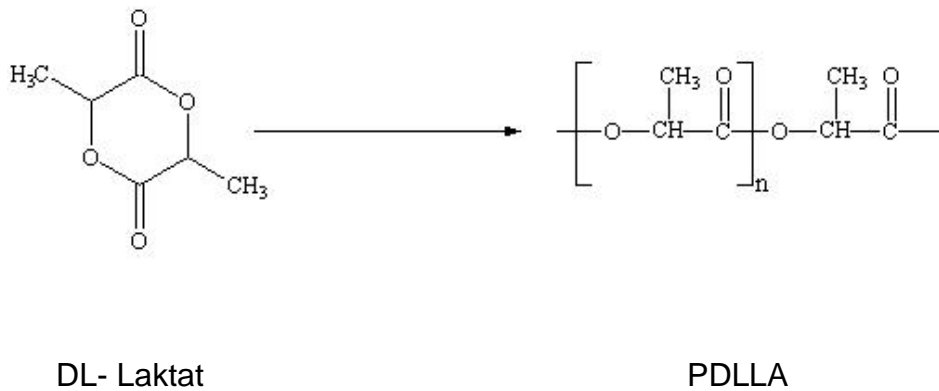
#### 3.1. Kimyasallar

Yapılan çalışmalar esnasında polimer sentezi amacıyla DL-laktat (DLLA) (Purac, Hollanda) dimeri, katalizör olarak kalay oktoat (SnOc) (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Karboksimetil kitosan sentezi için düşük molekül ağırlıklı kitosan (Fluka, Germany), nanopartiküllerin modifikasyonu için Bevacizumab (Altuzan, Roche) temin edilmiştir.

Hücre kültür deneyleri için, Tripsin-EDTA (Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit), DMEM F-12 ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium") besiyeri ve Fetal Sığır Serumu (FCS), DMSO (Dimetilsülfoksit ) ve EZ-DNA Biological Industries (İsrail) firmasından, Tetrazolium Tuzu (MTT) Serva (ABD) firmasından temin edilmiş ve herhangi bir işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır.

#### 3.2. PLA polimerinin sentezlenmesi

Çalışmada polimer sentezi amacıyla DL-laktat (DLLA) (Purac, Hollanda) dimeri ile katalizör olarak kalay oktoat (SnOc) (Sigma, ABD) kullanılarak yığın polimerizasyonu yöntemi ile DL-laktat dimeri polimerleştirilmiştir. Kullanılan DLLA dimeri susuz toluen içerisinde çözülüp yeniden kristallendirilerek saflaştırılırken, katalizör ve kullanılan tüm çözücüler alındığı gibi kullanılmıştır. Polimerizasyon için seçilen dimer/katalizör oranı ağırlıkça 1000 olarak belirlenmiştir. Polimerizasyon cam balon reaktör kullanılarak vakum altında gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1.'de PDLLA polimerizasyon reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 3.1. Laktat dimerinin polimerizasyon reaksiyonu

Polimerizasyon için seçilen DLLA dimer-katalizör oranına göre miktarı hesaplanan katalizör, polimerizasyon reaktörüne yerleştirilmiştir. Katalizör susuz tolüende çözülmüş halde eklenerek, tolüenin tamamı oda sıcaklığında vakum ile uzaklaştırılmıştır. Reaktöre bir süre azot uygulanmasının ardından, ağız kapatılarak polimerizasyon sıcaklığına getirilmiştir. Sonrasında 120°C sıcaklıktaki etüve alınarak reaksiyon başlatılmıştır. Katalizörün homojen bir şekilde karışmasını sağlamak amacıyla reaktör ilk iki saat süresince belli aralıklarla çalkalanmıştır. Yaklaşık 30 saatin sonunda reaksiyonun tamamlanmasıyla birlikte reaktör etüvden çıkarılmış ve oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Polimer susuz kloroformda çözülerek, soğuk metanolde çöktürülmüş ve vakum altında etüvde kurutulmuştur. Elde edilen polimer +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Polimerlerin molekül ağırlıkları GPC (Jel Geçirgenlik Kromatografisi) (Shimadzu, Japonya) kullanılarak tayin edilmiştir. Kalibrasyon işlemi dar molekül ağırlığı dağılımına sahip polistiren standartlar (Merck, Almanya) kullanılarak yapılmıştır. Kolon sıcaklığı ve mobil faz akış hızı sırasıyla 25°C ve 1.0 ml/dk olarak seçilmiştir. Kimyasal yapının aydınlatılması için FTIR spektrofotometre (Shimadzu DR 8101, Japonya) kullanılarak numunenin FTIR spektrumu alınmıştır. Ayrıca 400 MHz ve 13°C sabit sıcaklıkta çalıştırılan NMR-spektrofotometresi (Brucker UltraShield 400, Almanya) kullanılarak polimerin H-NMR spektrumu kaydedilmiştir. Numune CDCl<sub>3</sub> içerisinde çözünerek (4 mg/ml), dâhili standart olarak tetrametilsilan kullanılmıştır. Kimyasal kaymalar ppm cinsinden verilmiştir.

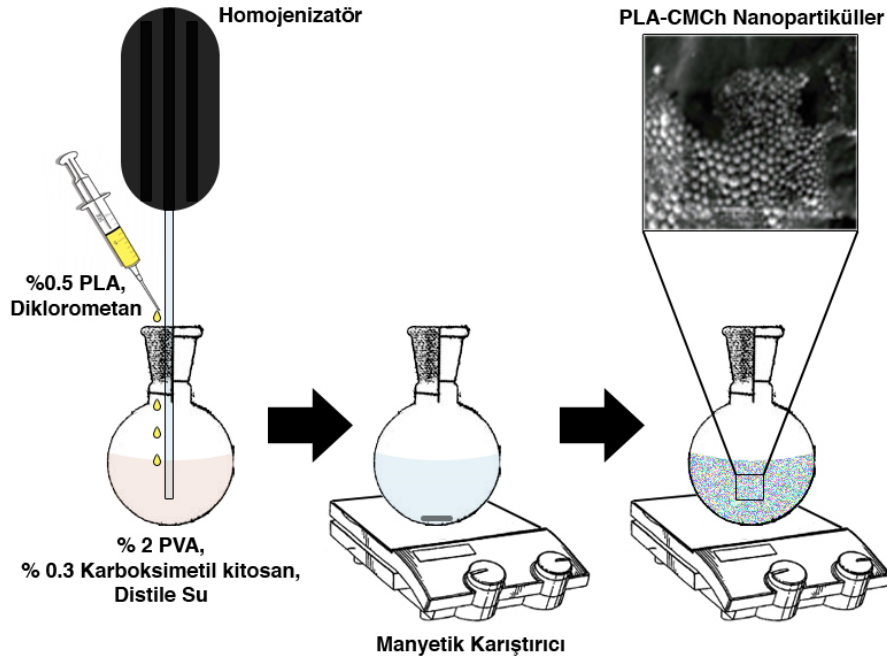
### **3.3. Karboksimetil Kitosan Sentezlenmesi**

2.0 g düşük molekül ağırlıklı kitosan (Fluka, Germany) ve 20 ml izopropil alkol, 5 dakika süre ile mekanik karıştırıcı ve ultrasonik banyo (Elma, Germany) kullanılarak karıştırılmıştır. Sentez, deney ortamı sıcaklığı 25°C'nin altında tutularak gerçekleştirilmiştir. 10 N NaOH çözeltisi karışıma dört dakikalık aralıklarla, 6 eşit hacimde (6 x 0,84 ml) olmak üzere eklenmiş ve 45 dakika karıştırılmıştır. Bir sonraki basamakta kloroasetik asit beş dakikalık aralıklarla, beş eşit hacimde ( 5 x 0.48 g ) olmak üzere eklenmiş ve ultrasonik banyoda ısıtılarak reaksiyon sıcaklığı 60°C'ye yükseltilmiştir. Elde edilen çözelti dört saat boyunca karışmaya bırakılmıştır. 1.7 ml soğuk distile su karışıma eklenmiş ve asetik asit

ilavesi ile karışımın pH değeri 7.0'a ayarlanmıştır. Filtre kağıdı yardımıyla karışım süzölmüş ve 30 ml %30'luk metanol çözeltilisi içinde 30 dk süre ile karıştırılarak yıkama yapılmıştır. Üçüncü yıkamayı takiben, sentezlenen N,O-karboksimetil kitosan 60°C sıcaklık altındaki bir gecelik inkübasyon sonucunda kuru olarak elde edilmiştir (Ernest R. Hayes., 1986).

### 3.4. PLA/CMCh Nanopartiköllerin Hazırlanması

Nanopartiköllerin hazırlanmasında emülsiyon buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. 50 mg PLA, 10 ml diklorometan içerisinde çözülmüş ve % 0,5'lik PLA çözeltilisi hazırlanmıştır. Bu çözeltili % 2 PVA (stabilize edici ajan) ve % 0,3 karboksimetil kitosan (CMCh) içeren sulu çözeltiliye ilave edilmiştir. Elde edilen emülsiyon, homojenizatör (Ultra-Turrax T10, Çin) kullanılarak 30,000 rpm'de 15 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra organik çözücünün uzaklaştırılması amacı ile emülsiyona su ilave edilmiş ve 18-24 saat süre ile oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır. Son basamakta çözeltilinin 12000 rpm'de 30 dakika süre ile santrifüjlenmesinin ardından elde edilen nanopartiköller deiyonize su ile yıkanarak etüvde kurutulmuştur (Kumar ve ark.,2004).

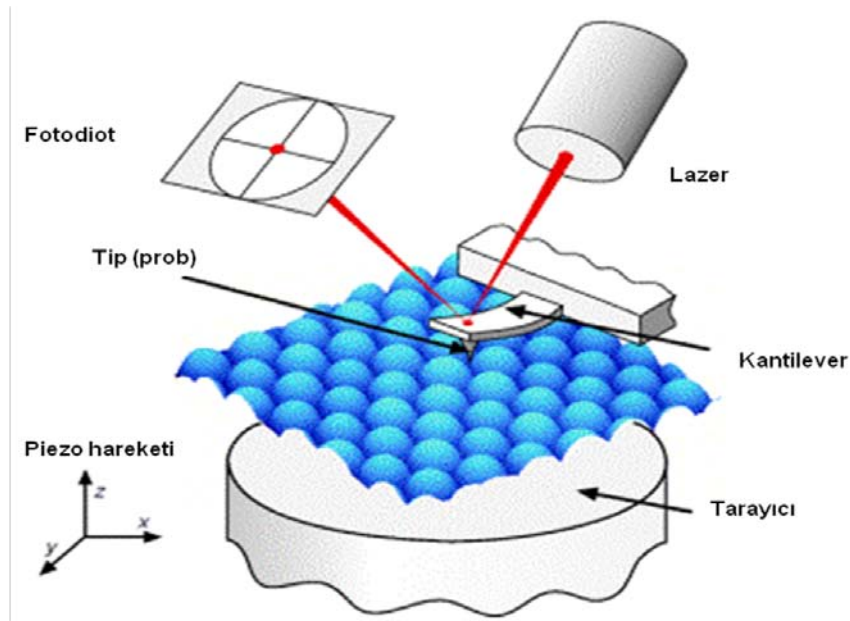


Şekil 3.2. PLA/CMCh nanopartiköllerin hazırlanma prosedürü

### 3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

#### 3.5.1. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

PLA/CMCh nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) sistemlerinden yararlanılmıştır. Bu amaçla hazırlanan PLA/CMCh nanopartiküllerin standart uygulama gereği ince bir altın film tabakasıyla kaplanarak örneklerin SEM görüntüleri alınmış ve örnekler gerek şekil ve geometri, gerekse büyüklük dağılımı yönünden değerlendirilmiştir.



Şekil 3.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu'nun (AFM) şematik görünümü

1980'li yıllarda geliştirilmiş olan atomik kuvvet mikroskobu, (AFM) nano boyuttaki değerlendirmeleri yapabilmek için görüntüler almaya yarayan taramalı uç mikroskoplarından biridir (Binnig,1986; Hoh,1992; Kim,2001). AFM sistemi, Şekil 3.3'te görüldüğü gibi esnek bir kantileverin altına yerleştirilmiş ince atomik ya da moleküler bir tipe sahiptir. Örnek yüzeyini tip tararken, lazer ışığı kantileverle çarpışır, sivri uç yüzeyi tarar ve yüzey ile arasındaki kuvvet ölçülür. Yüzey üzerindeki tipin tarama esnasında hem hızını ve yönünü ayarlamak, hem de iletken AFM tipiyle substrat yüzeyindeki uygun voltajı uygulamak mümkün olmaktadır.

Sunulan tez kapsamında gerçekleştirilen AFM çalışmalarında ise, hazırlanan nanopartiküller doğrudan doğruya AFM örnek tutucu ünitesine yerleştirilmiş ve özellikle örneklerin boy dağılımlarının homojenitesi yönünden incelenebilmesi için AFM görüntüleri alınmıştır.

### **3.5.2. Kimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi**

Karboksimetil kitosanın polilaktik asit yapısına katıldığıının gösterilmesi amacıyla FTIR çalışmaları yapılmıştır. Örnekler KBr ile uygun oranlarda (örneğin; ağırlıkça % 1 olacak şekilde) karıştırılarak 10 tonluk pres yardımıyla incelemeye hazır diskler haline getirilmiş ve FTIR (Schimadzu, DR8101, Japonya) spektrumları alınmıştır. Elde edilen FTIR spektrumları değerlendirilerek hazırlanan örneklerin beklenen kimyasal yapıya ulaşıp ulaşmadığı incelenmiştir.

### **3.5.3. Nanopartikül Boyut Analizi**

Sentezlenen PLA/CMCh nanopartiküllerin büyüklük dağılımlarını belirlemek ve AFM çalışmalarında elde edilen bulgular ile karşılaştırılmak üzere Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Zeta-Sizer, koloidal çözeltilerde partiküllerin boyutunu ve zeta-potansiyelini bulmak için kullanılan bir cihazdır. Dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemleriyle çalışmaktadır. Otomatik titratörüyle pH'ya göre partikülün boyut ve yüzey yükündeki değişimler gözlenebilmektedir. Cihaz ölçüm yöntemi olarak Dinamik Işık saçılması (DLS) kullanılmaktadır. Dinamik ışık saçılması, mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında, örnek çözeltinin küçük bir kısmından saçılan ışığın zamanla değişiminin ölçülmesidir. Sentez sonrası yıkanarak santrifüjlenen nanopartiküller deionize su ile seyreltilmiş ve yaklaşık 3 ml hacimli örnek çözeltisi, polistiren küvet içerisine konulmuştur. Deneysel örnek çözelti içerisinden lazer ışığının geçirilmesi sonucu gerçekleştirilmiştir.

## **3.6. Kuersetin Yüklü Nanopartiküllerde İlaç Yükleme ve Salımı**

### **3.6.1. İlaç Yükleme ve Enkapsülasyon Verimliliği**

PLA/CMCh nanopartiküllere ilaç yüklenmesi amacıyla, kuersetin etanol içerisinde 1/4, 1/8, 1/12 (gr polimer/gr ilaç) oranlarında çözülmüş ve hazırlanan ilaç çözeltileri PLA-diklorometan çözeltilerine ilave edilerek vorteks yardımıyla

kariştirilmiştir. Ardından bölüm 3.4' te detayları verilen prosedür uygulanarak ilaç yüklü nanopartiküller elde edilmiştir.

PLA-CMCh nanopartiküllere yüklenen kuersetin miktarını saptamak amacıyla partiküller 24 saat süresince metanol içerisinde bekletilerek partikül içerisinde ve yüzeyine bağlanan ilaç moleküllerinin serbest ortama geçişi sağlanmıştır. Sonrasında 20000 rpm'de ultrasantrifüj uygulanarak nanopartiküller çöktürülmüştür. Elde edilen çözeltilerden süpernatant kısmı alınarak, gerekli seyreltmeler yapılmış ve hazırlanan örneklerden HPLC sistemi (Dionex P680, ABD) kullanılarak UV dedektörü (Dionex UVD170U, ABD) ile 274 nm dalgaboyunda, pH 7.2 PBS-metanol (1:2 v/v) çözeltisi mobil faz seçilerek 2,250 mL/dk akış hızında C18 (5µm, 120Å, 4,6x150 mm) kolonu (Dionex, Acclaim 120, ABD) kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Kuersetin yüklü nanopartiküllerin hazırlanması aşamasında ortama eklenen kuersetin miktarı toplam ilaç ( $W_t$ ), partiküllerden çözücü etkisiyle dışarı alınan kuersetin miktarı ise yüklenen ilaç ( $W_k$ ) miktarı olarak alınmıştır. Bu analizler esnasında kullanılan nanopartikül miktarı ise toplam nanopartikül ( $W_n$ ) miktarı olarak alınmıştır. İlaç enkapsülasyon verimliliği (EV) ve ilaç yükleme (İY) oranları Eşitlik 3.1 ve 3.2 'de verilen eşitliklere göre hesaplanmıştır.

$$EV (\%) = \frac{W_k}{W_t} \times 100\% \quad \text{Eşitlik 3.1}$$

$$İY (\%) = \frac{W_k}{W_n} \times 100\% \quad \text{Eşitlik 3.2}$$

### 3.6.2. İlaç Salım Çalışmaları

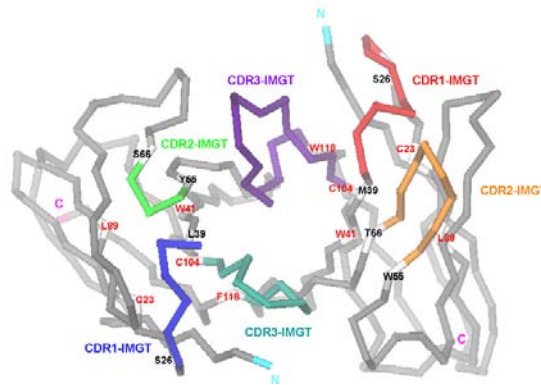
Farklı derişimlere sahip kuersetin çözeltilerinin 274 nm dalga boyundaki absorbansları HPLC (Schimadzu, UV Mini 1240, Japonya) kullanılarak ölçülmüş

ve standart kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiği Ek 1' de verilmiştir.

Kuersetin yüklü PLA-CMCh nanopartiküllerden ilaç salım alışmaları Bölüm 3.6.2' de verilen HPLC parametrelerine bağlı kalınarak diyaliz membranı yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 10 mg nanopartikül 5mL PBS içerisinde homojen olarak dağıtılmış ve diyaliz membranına (MWCO= 12kD) alınarak 45 mL PBS-metanol (1:2 v/v) zltisi içeren ve 37°C'de 100 rpm karışım hızına sahip salım ortamına yerleştirilmiştir. Analiz edilmek üzere belirli zaman aralıklarında alınan örneklerin (100µL) yerine aynı miktarda PBS-metanol zltisi eklenerek ortam koşulları sabit tutulmuştur.

### 3.7. PLA/CMCh Nanoparikllerin Bevacizumab ile Modifikasyonu

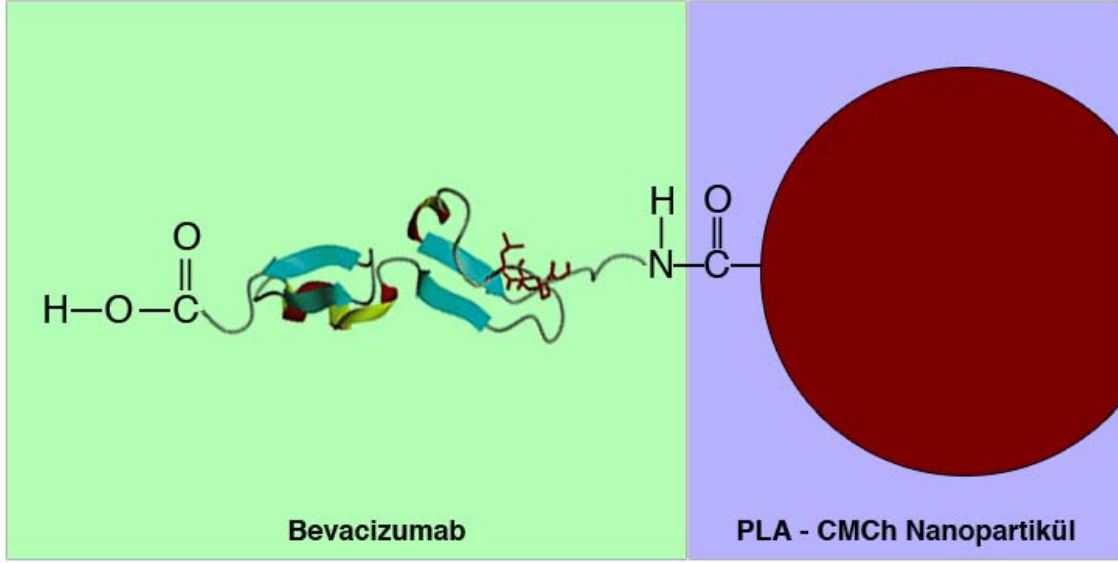
Bevacizumab (şekil 3.3) insan kaynaklı bir monoklonal antikör olmakla birlikte, ticari olarak elde edilebilir bir anjiyogenez inhibitörüdür. Tümör için yeni kan damarları oluşumunu uyaran bir protein olan vasküler endotelisel büyüme faktörü (VEGF)'ne hedefleme yoluyla bağlanmakta ve inhibe etmektedir. Bu şekilde kan damarları formasyonu engellenerek tümörün büyümesi durdurulmaktadır. Günümüzde kanser tedavisinde klinik kullanımı mevcuttur (Presta ve ark., 1997)



şekil 3.4. Bevacizumab'ın yapısı (Magdelaine-Beuzelin ve ark., 2007)

Bu alışmada Bevacizumab, PLA/CMCh nanopartiküllere karboksimetil kitosanın sahip olduğu karboksil (-COOH) grubu üzerinden bağlanmaktadır. Burada PLA/CMCh nanopartiküller glikoenzim olarak davranmaktadır. Kovalent bağlanma nanopartikülün karboksil (-COOH) ucu ile bevacizumabın amin (-NH<sub>2</sub>) terminali

arasında olmaktadır. Nanopartiküllerin yüzeyine ligandın kovalent bağlanma mekanizması aşağıda şematik olarak verilmiştir.



Şekil 3.5. Bevacizumab'ın bağlanma mekanizması

5 mg PLA/CMCh nanopartikül 3 defa pH 5.2 MES tamponu ile yıkanmış ve aynı hacimde süspansiyon edilmiştir. Aktive edilen nanopartiküller ile 25 mg/ml EDAC 30 dakika süreyle oda sıcaklığında, sabit hızda dönen rotatorda (SB1 Stuart Scientific, Fisher, UK) karıştırılmış ve böylelikle yapıdaki amin gruplarının özgün aktif ara formunun oluşması sağlanmıştır. Ortamdaki fazla EDAC, nanopartiküllerin 3 defa pH 5.2 MES tamponu ile yıkanması vasıtasıyla uzaklaştırılmıştır. Nanopartiküller aynı hacimde MES tamponu ile tekrar süspansiyon hale getirilmiştir. 200 µg/ml Bevacizumab süspansiyonu MES tamponunda hazırlanmış ve bağlanma verimini belirlemek amacıyla sonradan yapılan ölçümler için ligand süspansiyonundan 50 µl alınarak 950 µl MES tamponunda çözülmüş ve toplam ligand miktarı olarak kullanılan "bağlanma öncesi örnek" elde edilmiştir. Kalan ligand süspansiyonu ile aktive nanopartiküller 24 saat süreyle oda sıcaklığında sabit hızda karıştırılmıştır. 24 saatin sonunda nanopartiküller santrifüj edilerek ayrılmıştır. Elde edilen supernatan , bağlanmayan ligand miktarının elde edildiği "bağlanma sonrası örnek" olarak alınmıştır. 280 nm dalga boyunda UV spektrofotometre kullanılarak aşağıda verilen eşitlikten yararlanılarak hesaplanmıştır. Bağlanma öncesi örnek ve bağlanma sonrası örneğin farkı

alınarak, nanopartiküllerin yüzeyine bağlanan miktar tayin edilmiş ve bu şekilde bağlanma kapasitesi belirlenmiştir.

$$\% \text{Bağlanma} = \frac{\text{Abs "Bağlanma öncesi örnek"} - \text{Abs "Bağlanma sonrası örnek"}}{\text{Abs "Bağlanma öncesi örnek"}} \times 100$$

Nanopartiküller 1 kez pH 5.2 MES tamponu ile yıkanarak santrifüj ile ayrılmış daha sonra devam eden reaksiyonu durdurmak amacıyla ortama fazla amin kaynağı olarak pH'sı 8.0 olan 1 M glisin çözeltisi eklenmiş ve nanopartiküller 30 dk süreyle oda sıcaklığında sabit hızda dönen karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırma sonunda nanoküreler 12000 rpm'de 30 dk santrifüj kullanımıyla çöktürülerek pH 7.4 fosfat tamponu ile 3 defa yıkanmış ve 2 ml fosfat tamponunda süspanse edilmiştir. Böylelikle Bevacizumab ile modifiye edilmiş PLA/CMCh nanopartiküller elde edilmiştir. Elde edilen modifiye nanotaşıyıcılar sonraki kullanımlar için +4°C'de saklanmışlardır.

### **3.8. *In vitro* PLA/CMCh Nanotaşıyıcı – Hücre Etkileşimleri**

#### **3.8.1. Sitotoksosite testleri (MTT)**

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoluim bromide; Thiazolyl blue) testi hücre canlılığının ve böylelikle sitotoksitesinin kolorimetrik olarak ölçülebildiği bir testtir (Denizot ve Lang, 1986; Hansen ve ark., 1989).

Emülsiyon difüzyon-buharlaştırma yöntemi ile elde edilen PLA/CMCh nanopartiküller için ligand olarak bevacizumab ve antikanser ajan olarak Kuersetin kullanılmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin aktiviteleri ise HeLa ve L929 fare fibroblast hücreleri üzerinde test edilmiştir.

Bunun için HeLa (Henrietta Lacks'ın servikal kanser hücrelerinden oluşturulmuş hücre hattı) ve L929 fare fibroblast hücreleri 96 kuyucuklu plağa ekilmiş, plak bir gece etüvde inkübe edilmiştir. 150-190 nm aralığında hazırlanan nanopartiküller 1mg/ml konsantrasyona fosfat tamponu ile seyreltilerek enjektör filtresi (0,2 µm çaplı) ile steril edildikten sonra hücre kültür vasatı ile farklı konsantrasyonlarda (1, 10, 25 ve 50 µg/ml ) seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu plaklardaki vasat atılıp, farklı konsantrasyonlarda nanopartikül içeren vasat, hücrelerin üzerine 200 µl olacak

şekilde pipetlenmiş ve bir gece 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmiştir. Sonraki basamakta plaktaki vasat atılarak, kuyucuklara 100µl taze vasat ve 13µl (5µg/ml, fenol-red içermeyen RPMI 1640 ile seyreltilmiş) MTT solüsyonu pipetlenmiştir. Etüvde 4 saat süreyle karanlıkta inkübe edildikten sonra, kuyucuklardaki vasat ve MTT solüsyonu dökülmüş ve kuyucuklara 200µl'lik miktarlarda 0,04M HCl içeren saf izopropanol ilave edilmiştir. 30 dakika bekletildikten sonra plak 570 nm'de ELISA okuyucusunda okutulmuştur.

Yapılan çalışmada kullanılan, HeLa hücreleri ve fare fibroblast hücreleri (L929) Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Bankası'ndan temin edilmiş ve Çizelge 3.1'de verilen koşullarda hücre kültür ortamlarında çoğaltılmıştır. Hücreler hücre kültür kabı zeminini kapladıklarında, 1/3 pasaj yapılarak mantar ve bakteri kontaminasyonlarına karşı her gün mikroskopik incelemeye tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.1. HeLa ve L929 fibroblast hücrelerinin hücre kültür ortamında çoğaltılması.

---

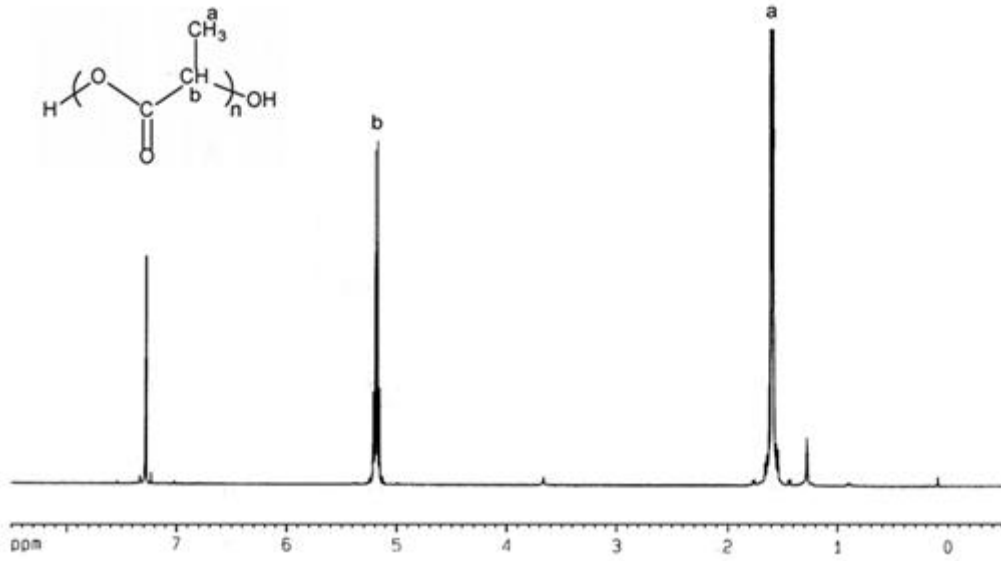
<b>Hücre Türü:</b>	HeLa hücreleri (Human Cervix Carcinoma) ve fare fibroblast hücreleri (L929)
<b>Kültür kabı:</b>	25 cm <sup>3</sup> 'lük polistren flask (yüzeyi hücre tutunmasına uygun)
<b>Kültür vasatı:</b>	%10 Fetal sıgır serumu içeren DMEM-F12; %1 penisilin streptomisin.
<b>Rutin sub-kültür:</b>	1/3
<b>Kültür özelliği:</b>	Monolayer
<b>Toplam hacim:</b>	5 ml
<b>pH:</b>	7,2-7,5
<b>Sıcaklık:</b>	37±0,5°C
<b>İnkübasyon ortamı:</b>	% 5'lik CO <sub>2</sub> etüvü

---

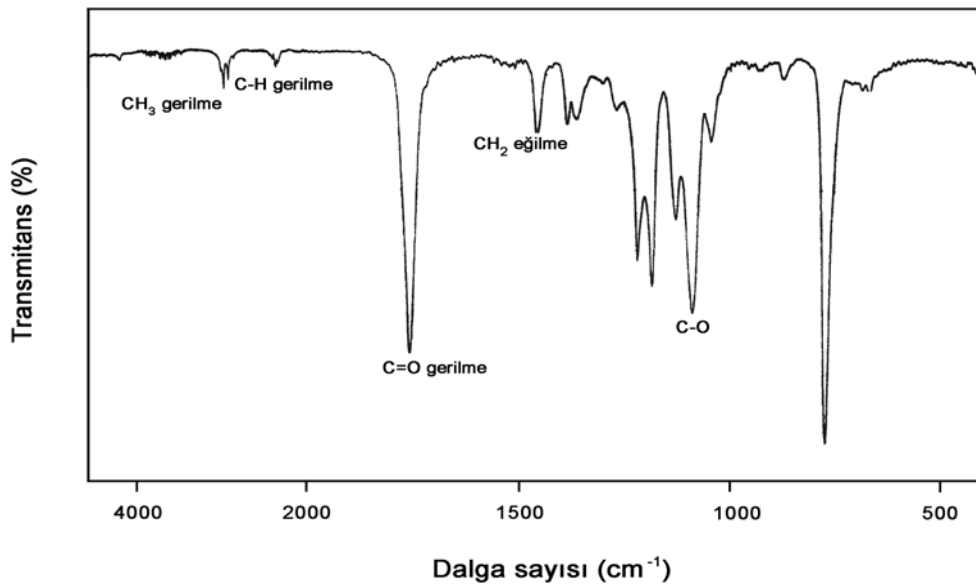
## 4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. PLA Sentezi ve Karakterizasyonu

Şekil 4.1.'de PDLLA'ya ait  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu görülmektedir. PDLLA yapısındaki L-laktatı temsil eden H atomuna ait karakteristik pik grubu 5.1-5.3 ppm bölgesinde görülmektedir. Şekil 4.2 'de ise PDLLA için FT-IR spektrumu verilmiştir. Spektrumda farklı spesifik gruplara ait pikler gösterilmiştir ve polimerizasyonu konfirme etmektedir.



Şekil 4.1. PDLLA'ya ait  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu

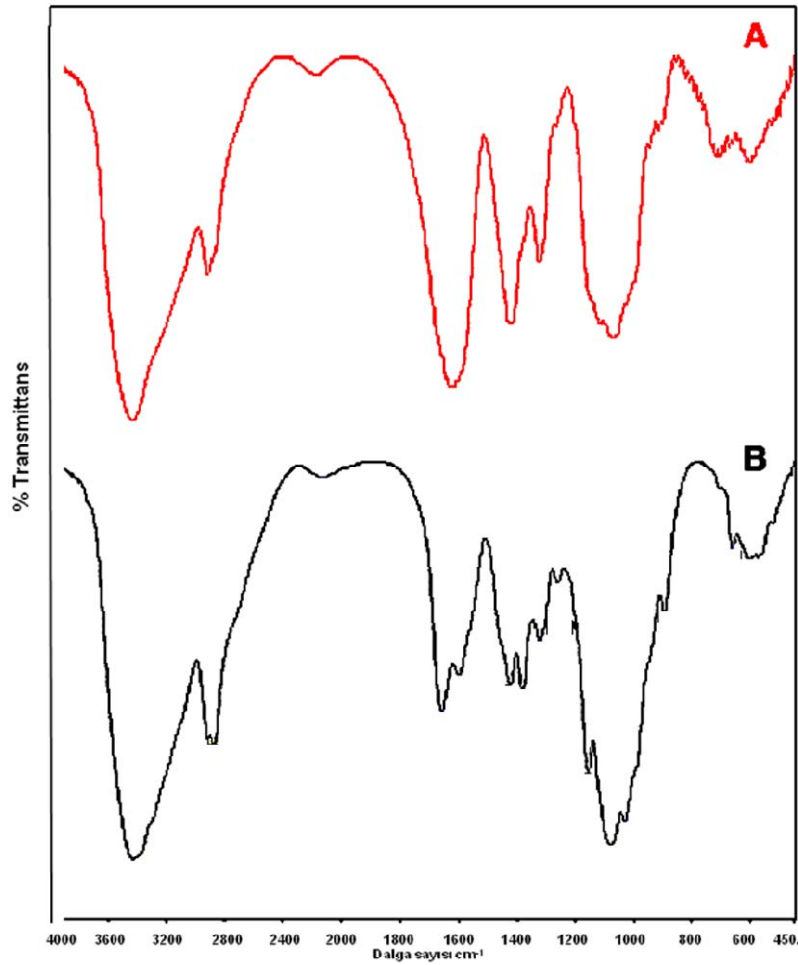


Şekil 4.2. PLA'ya ait FT-IR spektrumu

Jel Geçirgenlik Kromatografisi kullanılarak, bu çalışmada sentezlenen PDLLA polimerinin molekül ağırlığı belirlenmiştir. PDLLA polimerinin sayıca molekül ağırlığı 40000 kDa, ağırlıkça molekül ağırlığı 38300 kDa ve heterojenlik indeksi (HI) 1.556 olarak bulunmuştur.

#### 4.2. CMCh Sentezi ve Karakterizasyonu

Sentezlenen karboksimetil kitosanın karakterizasyonu amacıyla, kullanılan kitosanın ve sentezlenen karboksimetil kitosanın FT-IR spektrumları alınmıştır.



Şekil 4.3. (A) Karboksimetil Kitosan ve (B) Kitosana ait FT-IR spektrumları

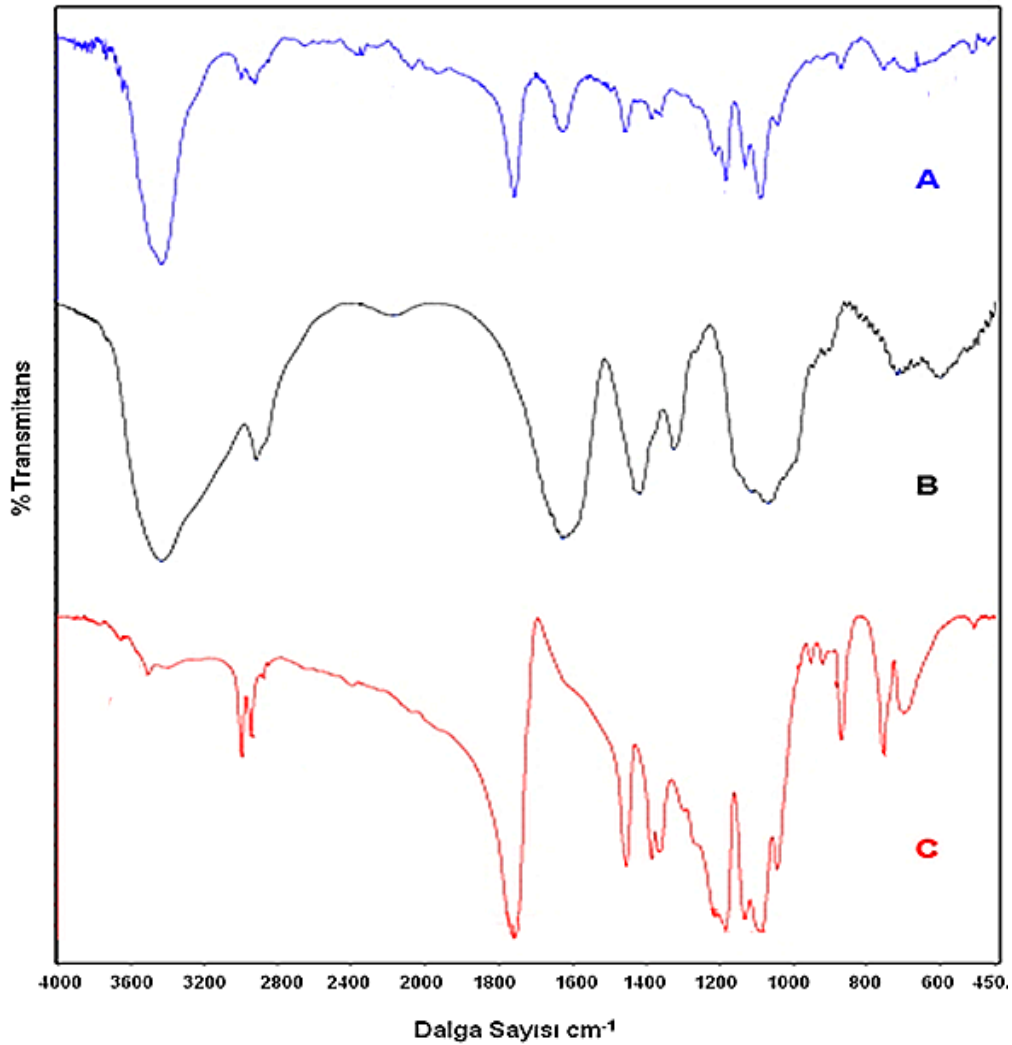
Kitosan ve Karboksimetil kitosana ait FT-IR spektrumları Şekil 4.3. 'te gösterilmiştir. Kitosan için karakteristik FT-IR absorpsiyon pikleri şöyle sıralanmaktadır: 3455 cm<sup>-1</sup> (O-H gerilme), 2867 cm<sup>-1</sup> (C-H gerilme), 1598cm<sup>-1</sup> (N-H eğilme), 1094cm<sup>-1</sup> (C-O gerilme) (Şekil 4.3.A). Karboksimetil kitosana ait

3460  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen geniş band ise N-H gerilme bandıdır (Şekil 4.3.B). Ayrıca 1418  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{COOH}$ ), 1070–1136  $\text{cm}^{-1}$  ( $-\text{C}-\text{O}$ )'de görülen absorpsiyon pikleri karboksimetil kitosanın karakteristik pikleridir (Şekil 4.3.B). 1621 $\text{cm}^{-1}$ 'de ve 1413 $\text{cm}^{-1}$ 'te sırasıyla  $\text{COO}^-$  karboksilat iyonları karakteristik asimetric ve simetric gerilme bantları görülmektedir. Alınan spektrumlar kitosandan karboksimetil kitosan eldesini konfirme etmektedir (Sun ve ark., 2003).

### 4.3.PLA/CMCh Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

#### 4.3.1. Kimyasal Karakterizasyon

Çalışmanın bu bölümünde modifikasyonu konfirme etmek amacıyla, nanopartiküller FT-IR ile karakterize edilerek PLA ve karboksimetil kitosandan elde edilen karakteristik pikler nanopartiküllere ait pikler ile karşılaştırılmıştır.

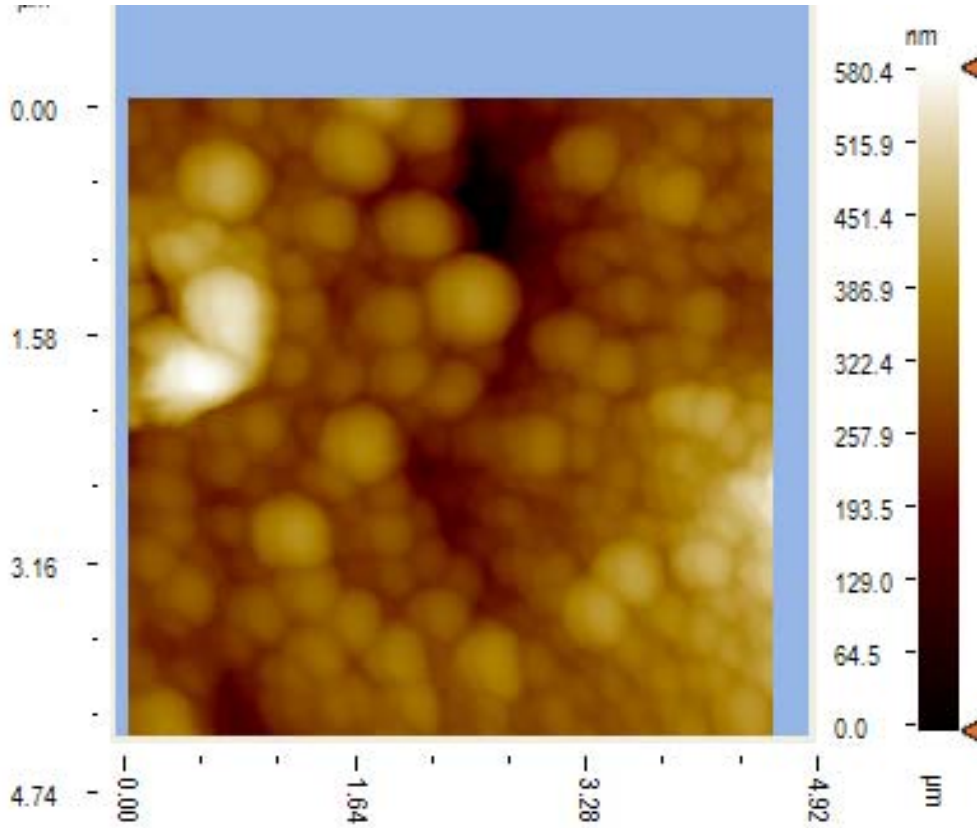


Şekil 4.4. (A)PLA, (B) CMC ve (C)PLA/CMCh nanopartikül FT-IR spektrumu

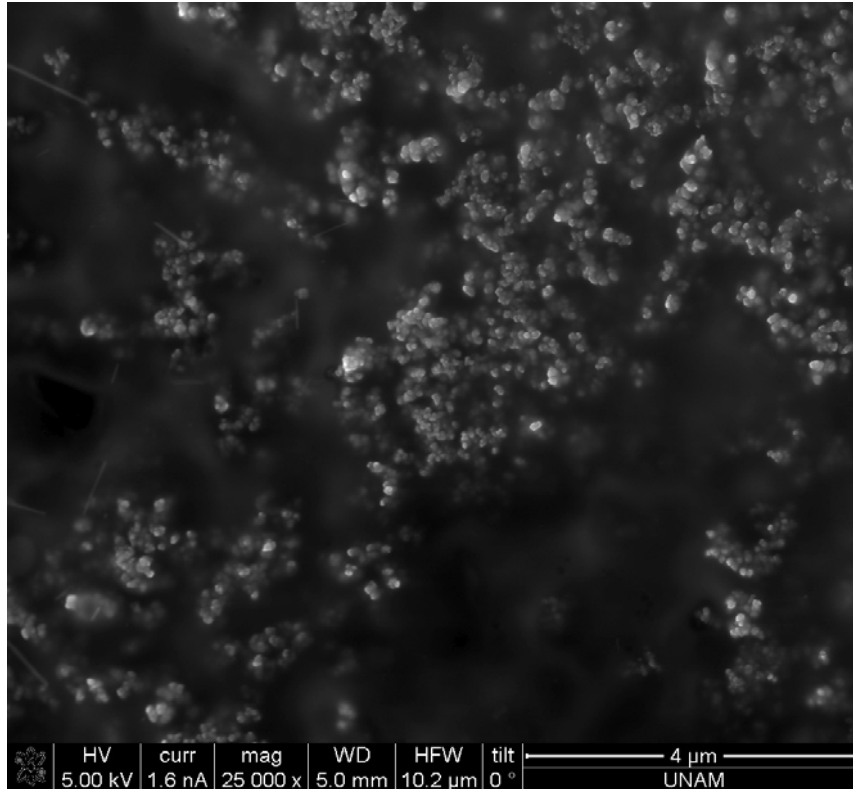
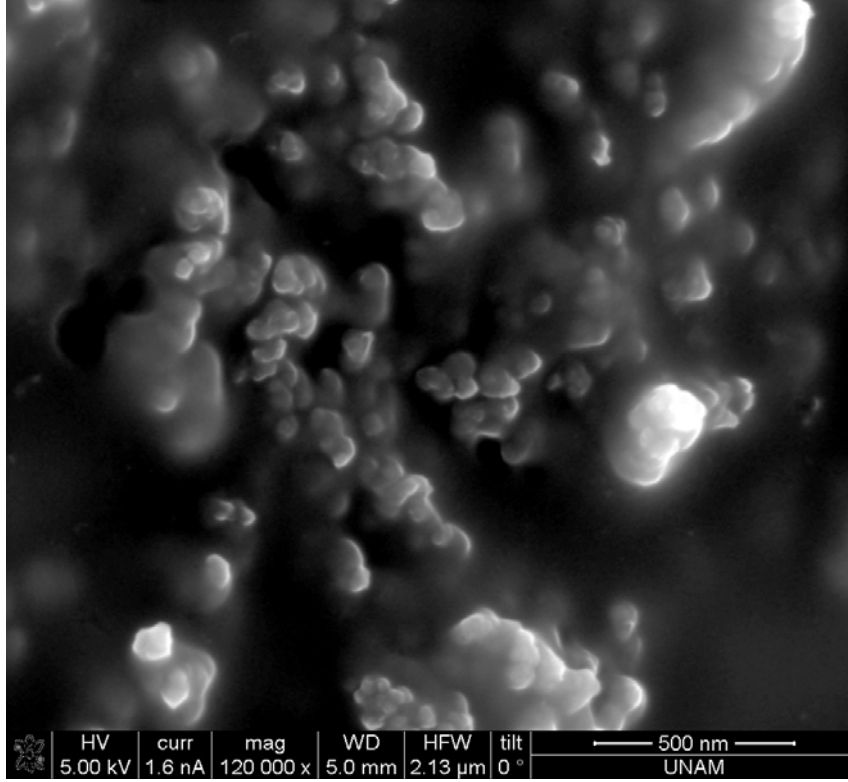
Şekil 4.4.'te (A) PLA, (B) karboksimetil kitosan ve (C) PLA/CMCh nanopartiküle ait FT-IR spektrumları verilmiştir.  $2950\text{ cm}^{-1}$  ve  $3000\text{ cm}^{-1}$  deki IR absorpsiyon pikleri (C-H) gerilimini temsil etmekteyken,  $1453\text{ cm}^{-1}$ ,  $1382\text{ cm}^{-1}$  ve  $1360\text{ cm}^{-1}$ taki pikler (C-H) deformasyon titreşimlerine aittir.  $850\text{ cm}^{-1}$  aralığındaki pikler, (C-O) ve (C-C) gerilme pikleridir.  $1758\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pik, karbonil (C=O) gerilim titreşiminden kaynaklanmaktadır (Singh ve ark., 2002). Karboksimetil kitosan için karakteristik absorpsiyon pikleri Şekil 4.4.B'de gösterilmiş olup piklerin detayları bir önceki başlık altında verilmiştir. Karboksimetil kitosanın amin gruplarından kaynaklanan  $3460\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen N-H gerilme bandı PLA nanopartiküllerin karboksimetil kitosan ile modifikasyonunu konfirme etmektedir (Şekil 4.4).

#### 4.3.2. Morfolojik Karakterizasyon

PLA/CMCh nanopartiküllerin morfolojik değerlendirmeleri, Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.5. PLA/CMCh Nanopartiküllerin AFM görüntüsü



Şekil 4.6. PLA/CMCh nanopartiküllerinin farklı büyütme oranlarında SEM görüntüleri

Şekil 4.5 ve 4.6'dan görüldüğü gibi küresel morfolojiye sahip nanopartiküller yaklaşık 200 nm boyutlarındadır. Ayrıca Şekil 4.6'da verilen SEM görüntüleri partiküllerin düzgün yüzeye sahip olduklarını göstermektedir.

#### **4.4. Nanopartikül Boyut Analizi**

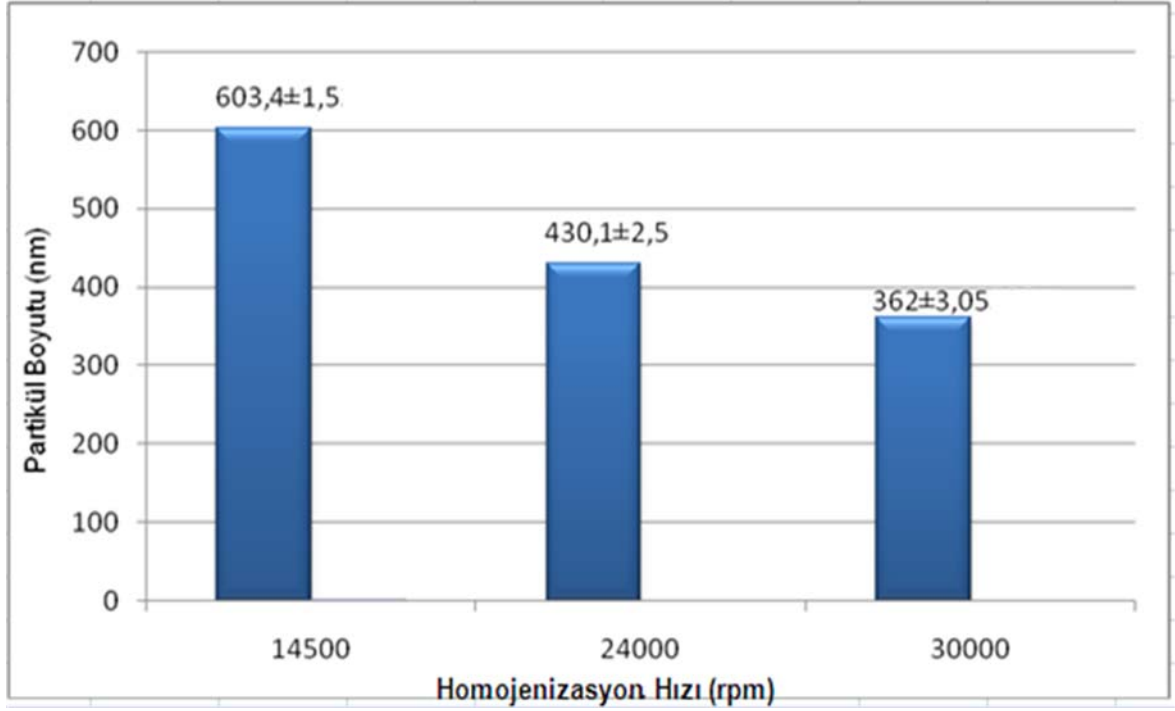
Emülsiyon difüzyon yönteminin ilk basamağında polimeri içeren organik faz, emülsiyon oluşturmak üzere stabilize edici ajan içeren sulu faza ilave edilmekte ve homojenizatör yada sonikatör aracılığıyla uygulanan dış enerji ile emülsiyon, nanodamlacıklara parçalanmaktadır. Bu nanodamlacıklar oldukça uçucu solventin buharlaşması sonucunda nanopartikülleri oluşturmaktadır. Sonuç olarak, nanopartikül oluşumu, solventin hızlı difüzyonundan kaynaklanan polimer damlacıklarının büyüklüğündeki azalma ile mümkün olmaktadır (Budhian ve ark., 2007). Bu yöntemin başarılı olması için en önemli basamak prosesin ilk basamağı olan organik fazın sulu faza ilave edildiği ve homojenizasyon işleminin gerçekleştiği basamaktır. Bu esnada oluşan nanodamlacıkların boyut ve kararlılıkları, elde edilecek olan nanopartiküllerin boyut ve kararlılıkları açısından büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple emülsiyon-difüzyon yöntemi ile nanopartikül hazırlama prosedüründe stabilize edici ajanın konsantrasyonu, homojenizasyon hızı, homojenizasyon süresi, kullanılan polimerlerin konsantrasyonu nanopartiküllerin boyutunu ve kararlılığını belirleyen en önemli faktörler olarak bilinmektedir (Kwon ve ark.,2001).

Yapılan çalışmalar kapsamında, süspansiyon ortamının homojenizasyon hızı, homojenizasyon süresi, yüzdürücü konsantrasyonu ve polimer miktarı, PLA/CMCh nanopartiküllerin boyutuna etki eden parametreler olarak belirlenmiş olup, elde edilen sonuçlar detaylarıyla alt başlıklar altında verilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucu 200-600 nm boyut aralığında PLA/CMCh nanopartiküller hazırlanmıştır.

##### **4.4.1. Homojenizasyon Hızının Nanopartikül Boyutuna Etkisi**

Çalışmanın bu bölümünde homojenizasyon hızının partikül boyutuna etkisini incelemek amacıyla; homojenizasyon hızı 14500-30000 rpm arasında değiştirilmiştir. Homojenizasyon süresi, PVA konsantrasyonu, PLA

konsantrasyonu, PLA:CMC oranı; sırasıyla 10 dakika, 0,01 gr PVA/ml süspansiyon ortamı , % 0,5 (w/v), 5:1 (w:w) olarak sabit tutulmuştur.

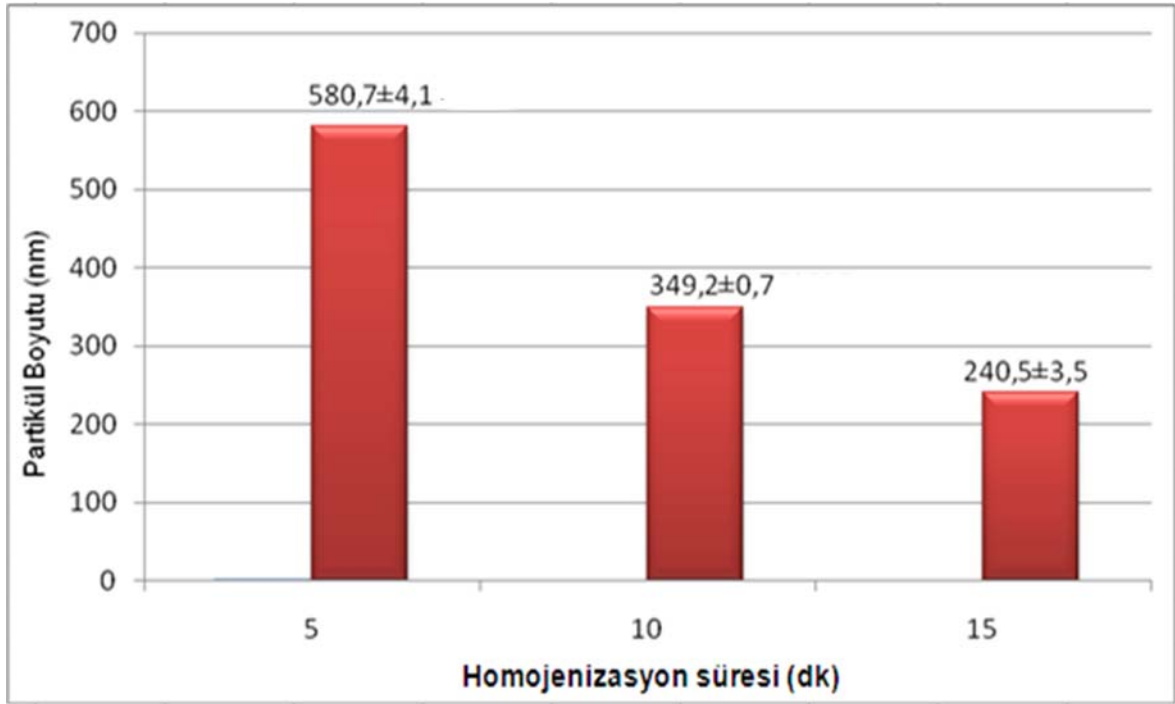


Şekil 4.7. Homojenizasyon hızının nanopartikül boyutuna etkisi

Şekil 4.7'den görüldüğü üzere süspansiyon ortamının homojenizasyon hızı 14500-30000 rpm aralığında arttırıldığında PLA/CMCh nanopartiküllerin boyutlarının azaldığı gözlenmiştir. Homojenizatör hızı arttırıldığında birim zamandaki yüksek kayma dayanımı nedeniyle damlacıkların boyutları azalmakta, buna bağlı olarak nanopartiküllerin boyutu küçülmektedir (Lee ve ark., 2004). Homojenizatör hızı 14500 rpm'den 30000 rpm'e yükseltildiğinde nanopartiküllerin boyutları ortalama olarak 600 nm'den 360 nm'ye düşmüştür.

#### 4.4.2. Homojenizasyon Süresinin Nanopartikül Boyutuna Etkisi

Homojenizasyon süresinin partikül boyutuna etkisini incelemek amacıyla homojenizasyon süresi 5, 10 ve 15 dakika olarak değiştirilmiştir. Homojenizasyon hızı, PVA konsantrasyonu, PLA konsantrasyonu, PLA:CMC oranı sırasıyla 30000 rpm, 0,01 gr PVA/ml süspansiyon ortamı, % 0,5 (w/v), 5:1 (w:w) olarak sabit tutulmuştur.



Şekil 4.8. Homojenizasyon süresinin nanopartikül boyutuna etkisi

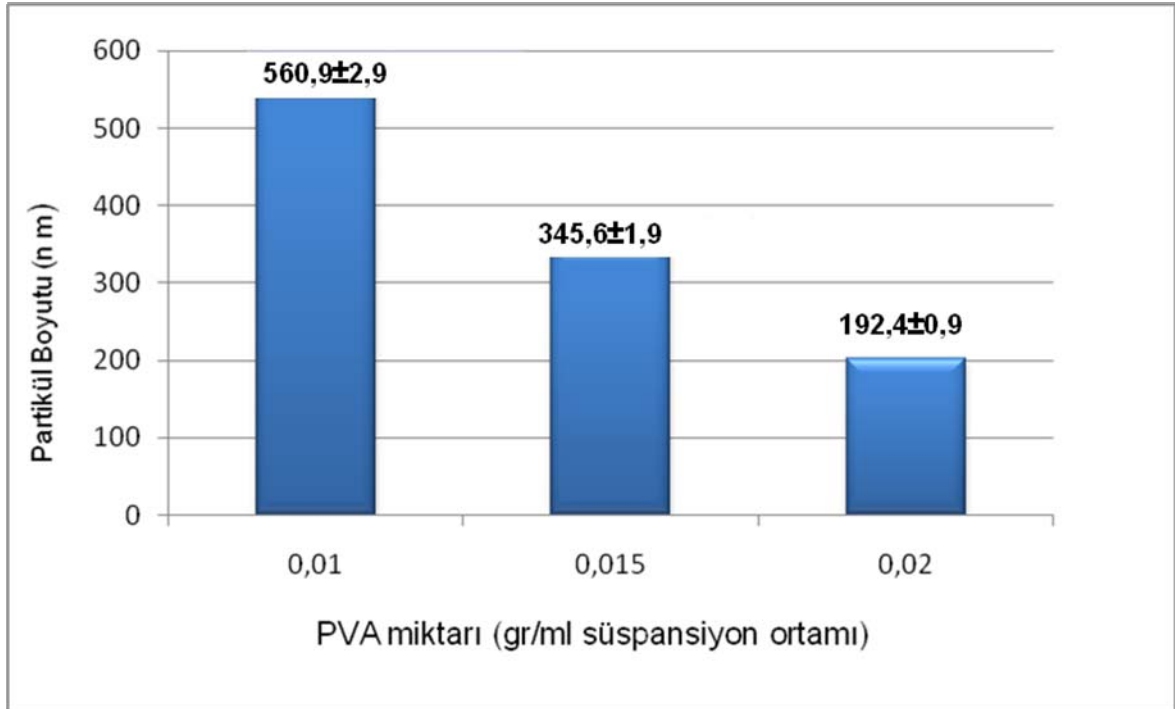
Nanopartikül hazırlama prosedüründe oluşan nanodamlacıkların büyüklüğüne etki eden temel prensip, dış enerji kaynağının nanodamlacıkların oluşumu ile sonuçlanan organik faza kayma gerilimi sağlamasıdır. Nanodamlacıkların büyüklüğü kayma gerilimi büyüklüğü ile ters orantılıdır. Kayma gerilimini azaltan herhangi bir parametre değişikliği, nanodamlacık büyüklüğünü ve dolayısıyla elde edilecek nanopartikül boyutunu da arttırmaktadır. Birim hacime uygulanan enerji miktarı arttırıldığında, kayma gerilimi direkt olarak artmakta ve bu şekilde daha verimli damlacık parçalanması sağlanarak, nanodamlacık büyüklüğünde azalma gözlenmektedir. Sonuç olarak nanodamlacık büyüklüğündeki bu azalma, elde edilecek nanopartiküllerin boyutlarının küçülmesine neden olmaktadır (Desgouilles ve ark., 2003; Galindo-Rodriguez ve ark., 2004, Budhian ve ark., 2007).

Şekil 4.8'den görüldüğü üzere süspansiyon ortamının homojenizasyon süresi 5-15 dakika aralığında arttırıldığında PLA/CMCh nanopartiküllerin boyutlarının azaldığı gözlenmiştir. Homojenizasyon süresinin arttırılması ile birim hacime uygulanan toplam enerji miktarı arttırılmış ve böylelikle emülsifikasyon boyunca kayma gerilimi arttırılarak daha küçük boyutta nanodamlacık ve buna bağlı olarak daha küçük boyutta nanopartikül elde edilmiştir.

#### 4.4.3. Stabilize Edici Ajan Konsantrasyonunun Nanopartikül Boyutuna Etkisi

Emülsiyon difüzyon yönteminde, damlacıkların ve diffüzyon prosesinden sonra protonanopartiküllerin kararlı hale getirilmesi, birleşmenin ve yığın oluşumunun önlenmesi açısından önem arz etmektedir. Stabilize edici ajanların oluşan ara yüzeye adsorpsiyonu sistemin enerjisini düşürmekte ve partiküllerin kümelenmesini önlemektedir (Kwon ve ark.,2001). Bu amaçla tween 80, jelatin, dextran ve PVA gibi çeşitli stabilize edici ajanlar kullanılmaktadır (Lourenco ve ark., 1996).

Stabilize edici ajan miktarının partikül boyutuna etkisini incelemek amacıyla PVA miktarı 0,01, 0,015 ve 0,02 gr (PVA/ml süspansiyon ortamı) olarak değiştirilmiştir. Homojenizasyon süresi, homojenizasyon hızı , PLA konsantrasyonu, PLA:CMC oranı sırasıyla; 15 dakika, 30000 rpm, % 0,5 (w/v), 5:1 (w:w) olarak sabit tutulmuştur.



Şekil 4.9. PVA miktarının nanopartikül boyutuna etkisi

Şekil 4.9'dan görüldüğü üzere süspansiyon ortamındaki PVA miktarı 0,01-0,02 gr (PVA/ml süspansiyon ortamı) aralığında arttırıldığında beklenildiği üzere PLA/CMCh nanopartiküllerin boyutlarının azaldığı gözlenmiştir (Rafati ve ark., 1997).

Sonuç olarak nanopartikül hazırlama prosedüründe homojenizasyon süresi, homojenizasyon hızı, PLA konsantrasyonu, PLA:CMC oranı ve stabilize edici ajan olarak kullanılan PVA konsantrasyonu sırasıyla 15 dakika, 30000 rpm, % 0,5 (w/v), 5:1 (w:w), 0,02 gr (PVA/ml süspansiyon ortamı) olarak seçildiğinde en düşük nanopartikül boyutu olan 192 nm'ye ulaşılmıştır.

#### **4.5. PLA/CMCh Nanopartiküllere Bevacizumab Bağlanma Verimliliği**

PLA/CMCh nanopartiküllerinin seçimli olarak kanser hücrelerine hedeflenmesi amacıyla ligand olarak kullanılan Bevacizumab ile modifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, spektrofotometrik yöntem kullanılarak, Bölüm 3.7.'de açıklandığı üzere aşağıda verilen eşitlikten yararlanılarak PLA/CMCh nanopartiküllere Bevacizumab bağlanma verimliliği hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Bağlanma} = \frac{\text{Abs "Bağlanma öncesi örnek"} - \text{Abs "Bağlanma sonrası örnek"}}{\text{Abs "Bağlanma öncesi örnek"}} \times 100$$

Elde edilen bulgular neticesinde, PLA/CMCh nanotaşıyıcılara Bevacizumab bağlanma kapasitesi ortalama % 82 olarak saptanmıştır.

#### **4.6. Kuersetin Yüklü Nanopartiküllerde İlaç Yükleme ve Salımı**

##### **4.6.1. İlaç Yükleme ve Enkapsülasyon Verimliliği**

İlaç enkapsülasyon verimliliği ve ilaç yükleme deneyleri 274 nm dalgaboyunda UV dedektörü kullanılarak Bölüm 3.6.1'de belirtilen koşullarda HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Kuersetin etken maddesinin analizlerinde gerçekleştirilen

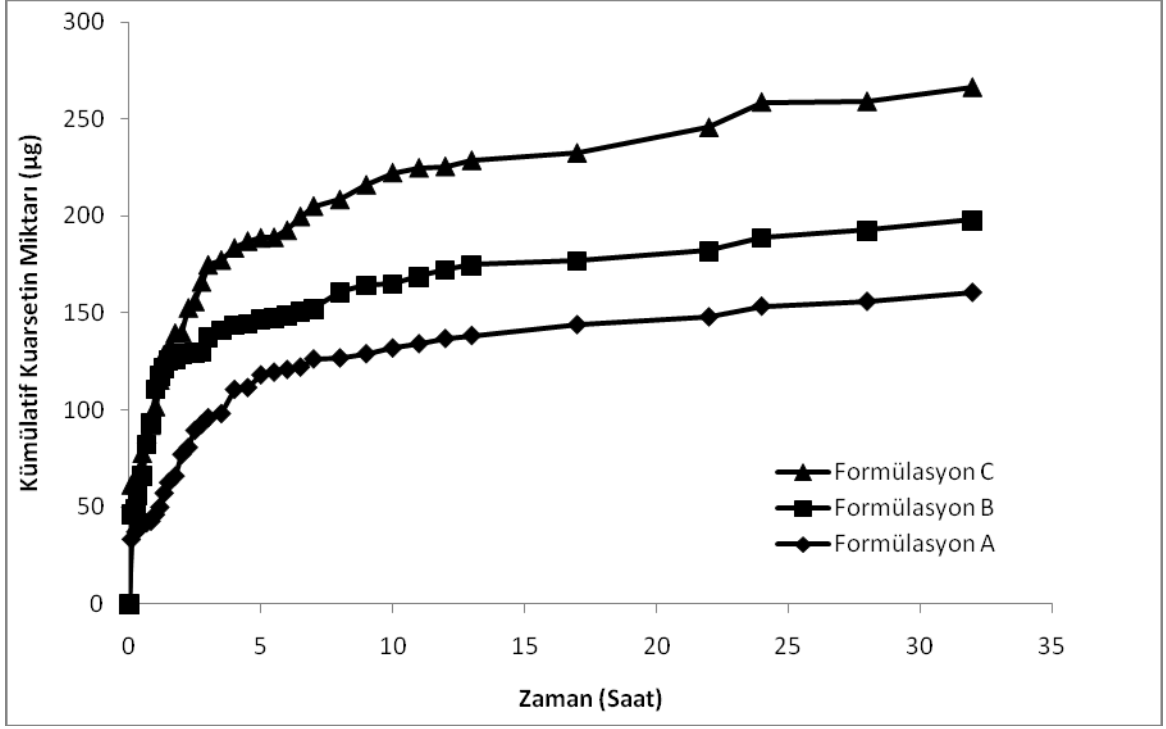
kalibrasyon ölçümlerinde 1µg/mL - 300µg/mL derişimleri aralığında korelasyon katsayısı değeri ( $R^2$ ) 0,9990 olarak belirlenmiştir (Ek 1). Hesaplamalar sonucunda elde edilen ortalama yüzdece kuersetin enkapsülasyon verimliliği ve ortalama yüzdece ilaç yükleme oranları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Nanopartiküllerin Enkapsülasyon Verimliliği ve İlaç Yükleme Oranları

Formülasyon	10 µg Nanopartikül Hazırlanırken Kullanılan Kuersetin Miktarı (µg/mL)	Enkapsülasyon Verimliliği (%EV)	İlaç Yükleme Oranı (%İY)
A	3	15,33	4,60
B	6	18,00	10,80
C	12	19,25	23,10

#### 4.6.2. İlaç Salım Çalışmaları

Bu çalışmada serbest kuersetinin, kuersetin yüklenmiş PLA-CMCh nanopartiküllerden ayrılması amacıyla diyaliz membranı kullanılmıştır. Kuersetinin sudaki çözünürlüğünün çok düşük (7,7 µg/mL) olması sebebiyle (Lauro ve ark.,2002) PBS ortamında aggregasyona uğrayarak diyaliz membranından geçemediği gözlenmiştir. Bu nedenle ilaç salım ortamı olarak PBS-metanol (1:2 v/v) çözeltisi seçilmiş (Li ve ark., 2009) ve ortamda bulunan kuersetinin yeterli çözünürlüğü sağlanmıştır. Bölüm 3.6.2'de verilen ilaç salım ortamı koşullarında ve belirtilen analiz yöntemleriyle kuersetinin PLA-CMCh nanopartiküllerinden kümülatif ilaç salımları Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. 50 mL salım ortamı içerisinde 10 mg PLA-CMCh nanopartikülden kümülatif Kuarsetin salım profili. (Formülasyonların detayları Tablo 4.1'. de verilmiştir.)

#### 4.7. PLA/CMCh Nanotaşıyıcı- Hücre Etkileşimleri

Çalışmanın son aşamasında hazırlanan Kuarsetin yüklü Bevacizumab ile modifiye edilmiş PLA/CMCh nanopartiküllerin HeLa hücreleri (Henrietta Lacks'ın servikal kanser hücrelerinden oluşturulmuş hücre hattı) ile L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki etkinliğinin saptanması amacıyla sitotoksisite ve hedefleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

##### 4.7.1. Sitotoksisite Çalışması

MTT testi hücre canlılığının tespiti için kullanılan bir testtir. Polimerik yapıların sitotoksik olup olmadıkları veya sitotoksisite oranları bu test ile saptanabilir. Yapılan MTT testinde, plağın ilk sütunundaki sekiz kuyucuk kontrol olarak kullanılmış ve her bir farklı konsantrasyondaki PLA/CMCh nanopartikül sekiz tekrarlı olarak çalışılmıştır. Kontrol plağından alınan absorbanların ortalaması %100 kabul edilerek, test kuyucuklarından alınan absorbanların ortalamaları ile

mukayese edilmiş ve nanopartiküllerin toksisiteleri hesaplanmıştır. Örneğin, HeLa hücreleri ile etkileştirilen 50µg/ml konsantrasyonundaki Bevacizumab ile modifiye edilmiş kuersetin yüklü PLA/CMCh nanopartikülün hücrelerle etkileştiği kuyucuktan alınan absorbans 0,211, kontrol kuyucuklarından alınan ise 1,21 olarak saptanmıştır. Buna göre;

1,21	%100
0,211	x

---

X: %17,4 canlılık oranı tespit edilmiştir.

Dolayısıyla, 50µg/ml konsantrasyonundaki Bevacizumab ile modifiye edilmiş, Kuersetin yüklü PLA/CMCh nanopartiküllerin %82.6 oranında sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada 1, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlardaki PLA/CMCh nanopartikül, Bevacizumab, Bevacizumab ile modifiye edilmiş boş PLA/CMCh nanopartikül, Kuersetin, Kuersetin yüklü PLA/CMCh nanopartikül ve Kuersetin yüklü Bevacizumab ile modifiye edilmiş PLA/CMCh nanopartiküllerin HeLa ve L929 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri ayrı ayrı incelenmiştir.

Bunun için HeLa ve L929 hücreleri  $10 \times 10^3$  hücre/ml konsantrasyonda 96 kuyucuklu farklı plaklarda 1, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlardaki PLA/CMCh nanopartikül, Bevacizumab, Kuersetin ve Kuersetin yüklü Bevacizumab ile modifiye edilmiş PLA/CMCh nanopartiküllerle Bölüm 3.8.1.'de anlatıldığı gibi sitotoksisite testine tabi tutulmuştur. Sonuçlar Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre Kuersetin yüklü Bevacizumab ile modifiye edilmiş PLA/CMCh nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerinde beklenildiği gibi daha yüksek sitotoksisiteye sahip olduğu saptanmıştır. Örneğin; 25µg/ml konsantrasyondaki Kuersetin yüklü Bevacizumab ile modifiye edilmiş PLA/CMCh nanopartiküller ile etkileşen HeLa hücrelerinin %47,7'si canlı iken, aynı konsantrasyonda Kuersetin ile etkileşen hücrelerin %84.9'u, Bevacizumab ile etkileşen hücrelerin %80,2'si, Bevacizumab ile modifiye edilmiş boş PLA/CMCh nanopartiküller ile etkileşen

hücrelerin %88,5'i, sadece PLA/CMCh nanopartiküller ile etkileşen hücrelerin %84,5'u, sadece kuersetin yüklü PLA/CMCh nanopartiküller ile etkileşen hücrelerin %84,1'i canlı kalmıştır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Hazırlanan PLA/CMCh nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Hazırlanan PLA/CMCh nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkileri			
		Ortalama Absorbans $\pm$ SD	%Canlılık
	Kontrol	1,21 $\pm$ 0.01	
PLA/CMCh Nanopartikül	1 $\mu$ g/ml	0,9915 $\pm$ 0.01	81,98347
	10 $\mu$ g/ml	1,027 $\pm$ 0,01	84,87603
	25 $\mu$ g/ml	1,023 $\pm$ 0,04	84,54545
	50 $\mu$ g/ml	1,003 $\pm$ 0,02	82,89256
PLA/CMCh Nanopartikül-Kuersetin	1 $\mu$ g/ml	0,956 $\pm$ 0,06	79,00826
	10 $\mu$ g/ml	1,048 $\pm$ 0,03	86,61157
	25 $\mu$ g/ml	1,018 $\pm$ 0,06	84,13223
	50 $\mu$ g/ml	0,928 $\pm$ 0,01	76,69421
PLA/CMCh Nanopartikül-Bevacizumab	1 $\mu$ g/ml	1,104 $\pm$ 0,01	91,23967
	10 $\mu$ g/ml	1,111 $\pm$ 0,05	91,81818
	25 $\mu$ g/ml	1,071 $\pm$ 0,02	88,5124
	50 $\mu$ g/ml	1,101 $\pm$ 0,06	90,99174
<b>PLA/CMCh Nanopartikül-Bevacizumab-Kuersetin</b>	<b>1<math>\mu</math>g/ml</b>	<b>0,976<math>\pm</math>0,02</b>	<b>80,66116</b>
	<b>10<math>\mu</math>g/ml</b>	<b>0.66<math>\pm</math>0,01</b>	<b>54,54545</b>
	<b>25<math>\mu</math>g/ml</b>	<b>0.578<math>\pm</math>0,04</b>	<b>47,7686</b>
	<b>50<math>\mu</math>g/ml</b>	<b>0.211<math>\pm</math>0,01</b>	<b>17,43802</b>
Bevacizumab	1 $\mu$ g/ml	0,99 $\pm$ 0,02	81,81818
	10 $\mu$ g/ml	0,96 $\pm$ 0,01	79,33884
	25 $\mu$ g/ml	0,9705 $\pm$ 0,02	80,20661
	50 $\mu$ g/ml	1,035 $\pm$ 0,06	85,53719
Kuersetin	1 $\mu$ g/ml	0,982 $\pm$ 0,01	81,15702
	10 $\mu$ g/ml	0,960 $\pm$ 0,01	79,33884
	25 $\mu$ g/ml	1,0275 $\pm$ 0,04	84,91736
	50 $\mu$ g/ml	0,922 $\pm$ 0,03	76,19835

Çizelge 4.3. Hazırlanan PLA/CMCh nanopartiküllerin L929 fare fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

Hazırlanan PLA/CMCh nanopartiküllerin L929 fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri			
		Ortalama Absorbans $\pm$ SD	%Canlılık
	Kontrol	1,15	100
PLA/CMCh Nanopartikül	1 $\mu$ g/ml	0,991 $\pm$ 0.05	86,17391
	10 $\mu$ g/ml	1,059 $\pm$ 0.05	92,08696
	25 $\mu$ g/ml	1,0245 $\pm$ 0.06	89,08696
	50 $\mu$ g/ml	0,998 $\pm$ 0.02	86,78261
PLA/CMCh Nanopartikül-Kuersetin	1 $\mu$ g/ml	0,901 $\pm$ 0.04	78,34783
	10 $\mu$ g/ml	0,9265 $\pm$ 0.02	80,56522
	25 $\mu$ g/ml	1,0315 $\pm$ 0.03	89,69565
	50 $\mu$ g/ml	0,967 $\pm$ 0.01	84,08696
PLA/CMCh Nanopartikül-Bevacizumab	1 $\mu$ g/ml	0,945 $\pm$ 0.04	82,17391
	10 $\mu$ g/ml	0,974 $\pm$ 0.05	84,69565
	25 $\mu$ g/ml	0,972 $\pm$ 0.01	84,52174
	50 $\mu$ g/ml	0,9735 $\pm$ 0.01	84,65217
PLA/CMCh Nanopartikül-Bevacizumab-Kuersetin	1 $\mu$ g/ml	0,9415 $\pm$ 0.01	81,86957
	10 $\mu$ g/ml	1,062 $\pm$ 0.04	92,34783
	25 $\mu$ g/ml	0,988 $\pm$ 0.05	85,91304
	50 $\mu$ g/ml	0,9795 $\pm$ 0.01	85,17391
Bevacizumab	1 $\mu$ g/ml	0,949 $\pm$ 0.01	82,52174
	10 $\mu$ g/ml	0,9825 $\pm$ 0.01	85,43478
	25 $\mu$ g/ml	0,9265 $\pm$ 0.01	80,56522
	50 $\mu$ g/ml	0,9385 $\pm$ 0.01	81,6087
Kuersetin	1 $\mu$ g/ml	0,977 $\pm$ 0.01	84,95652
	10 $\mu$ g/ml	0,9725 $\pm$ 0.03	84,56522
	25 $\mu$ g/ml	0,997 $\pm$ 0.01	86,69565
	<b>50<math>\mu</math>g/ml</b>	<b>0,829<math>\pm</math>0.01</b>	<b>72,08696</b>

Bununla birlikte, aynı konsantrasyonda Bevacizumab ile modifiye edilmiş, Kuersetin yüklü PLA/CMCh nanopartiküller ile etkileştirilen L929 hücrelerinin %85,9'u, PLA/CMCh nanopartiküller ile etkileşen hücrelerin %89,0'ı, Bevacizumab ile modifiye edilmiş PLA/CMCh nanopartiküller ile etkileşenlerin %84,5'i, Kuersetin yüklü PLA/CMCh nanopartiküller ile etkileşen hücrelerin %89,6'sı, sadece Bevacizumab ile etkileşen hücrelerin %80,5'i ve sadece Kuersetin ile etkileşen hücrelerin ise %86,6'sı canlı kalmıştır (Çizelge 4.3).

Bu sonuca göre Bevacizumab ile modifiye edilmiş, Kuersetin yüklü PLA/CMCh nanopartiküllerin HeLa ve L929 hücreleri üzerine etkisi karşılaştırıldığında, HeLa hücreleri üzerinde oldukça yüksek sitotoksositeye sahip oldukları, dolayısıyla kullanılan ligandın kanser hücrelerine yöneldiği ve sitotoksik etki gösterdiği, ancak ligand olarak kullanılan Bevacizumab'ın insan kaynaklı bir antikor olması sebebiyle nanopartiküllerin L929 fare fibroblast hücreleri içine alınmadığı gözlenmektedir. Dolayısıyla Bevacizumab ile modifiye edilmiş olan nanopartiküllerle, modifiye edilmemiş nanopartiküller arasında sitotoksik etki bakımından anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Ayrıca L929 fibroblast hücreleri ile yapılan deneylerde elde edilen canlılık oranlarının yüksek olması, PLA/CMCh nanopartiküllerin tek başlarına sitotoksitelerinin düşük olduğunu göstermektedir.

HeLa hücreleri ile yapılan çalışmalarda, Bevacizumab ile modifiye edilmiş ve Kuersetin yüklü PLA/CMCh nanopartiküllere göre, Kuersetin yüklü PLA/CMCh nanopartiküllerin sitotoksitesinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, Bevacizumab ile modifiye edilmemiş olan nanopartiküllerin hücre içine alınmaması nedeniyle Kuersetinin hücreler üzerindeki etkisinin azalmasından kaynaklanmaktadır.

## SONUÇLAR

Sunulan çalışma kapsamında teragnoz amaçlı fonksiyonel özelliklere sahip nanopartiküller hazırlanmış ve elde edilen nanopartiküller karakterize edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmektedir:

- ✓ Çalışmaların ilk basamağında DL-laktat dimeri kullanılarak yığın polimerizasyonu yöntemi ile Poli (DL-laktat) sentezlenmiş olup, H-NMR ve FTIR kullanılarak polimerizasyon konfirme edilmiştir.
- ✓ Karboksimetilleme yöntemi ile kitosandan karboksimetil kitosan eldesi gerçekleştirilmiş ve FTIR spektrumları alınarak sentez doğrulanmıştır.
- ✓ Emülsiyon difüzyon yöntemi ile hazırlanan PLA/CMCh nanopartiküllerin kimyasal karakterizasyonu FT-IR, morfolojik karakterizasyonu SEM ve AFM cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen FTIR bulguları sonucunda karboksimetil kitosanın polilaktik asit yapısına katıldığı doğrulanmıştır. Morfolojik incelemeler sonucu nanopartiküllerin küresel yapıya ve düzgün yüzeye sahip oldukları belirlenmiştir.
- ✓ PLA/CMCh nanopartiküllerin boyut analizi için Zeta Boyut Analizi cihazı kullanılmış; homojenizasyon hızı, homojenizasyon süresi ve stabilize edici ajan konsantrasyonu nanopartikül boyutuna etki eden parametreler olarak değerlendirilmiştir. Homojenizasyon hızı, homojenizasyon süresi ve stabilize edici ajan konsantrasyonu arttırıldığında nanopartikül boyutunda düşüş gözlenmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda 201 nm elde edilen en düşük nanopartikül boyutu olarak bulunmuştur.
- ✓ PLA/CMCh nanopartiküllerin Bevacizumab ile modifikasyonu çalışmalarında, yüzde bağlanma kapasitesi ortalama % 82 olarak hesaplanmıştır.

- ✓ PLA/CMCh nanopartiküllere Kuersetin yükleme çalışmalarında, ilaç yükleme oranı ortalama %20 olarak bulunmuştur.
- ✓ İlaç salım çalışmaları sonucunda, farklı etken madde yükleme oranları için istenilen ilaç salım profilleri elde edilmiştir.
- ✓ Sunulan çalışmalar kapsamında hazırlanan her farklı formülasyon (Bevacizumab ile modifiye edilmemiş ve Kuersetin yüklü olmayan PLA/CMCh nanopartikül, Bevacizumab ile modifiye edilmemiş ve Kuersetin yüklü PLA/CMCh nanopartikül, Bevacizumab ile modifiye edilmiş ve Kuersetin yüklü olmayan PLA/CMCh nanopartikül, Bevacizumab ile modifiye edilmiş ve Kuersetin yüklü PLA/CMCh nanopartikül) ile HeLa ve L929 hücre hatları kullanılarak yapılan hücre etkileşimi çalışmalarından PLA/CMCh nanopartiküllerin seçimli olarak kanser hücrelerine yönlendirilebildiği belirlenmiştir.
- ✓ Sonuç olarak gerçekleştirilen tüm çalışmalar dikkate alındığında elde edilen sonuçlar Kuersetin yüklü ve Bevacizumab ile modifiye edilmiş PLA/CMCh nanopartiküllerin kanser teşhis ve tedavisi için biyoyumlu ve verimli bir yol sağlayabileceğini göstermiştir. Çalışmaların bundan sonraki bölümünde kanserli hücreler ile sağlıklı hücreler aynı anda nanotaşıyıcılar ile etkileştirilerek hedefleme etkinliği doğrulanacak ve ardından hayvan deneylerinin yer aldığı *in vivo* çalışmalara gerçekleştirilecektir.

## KAYNAKLAR

- Adjei A. A., Rowinsky E. K., 2003, Novel anticancer agents in clinical development. *Cancer Biol. Ther.*, 2 (4Suppl 1), 5-15.
- Agullo , G. , Gamet-Payrastre , L. , Manenti , S. , Viala , C. , Remesy , C. , Chap , H. & Payrastre , B. ,1997, Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition , *Biochem Pharmacol* 53 , 1649 – 1657 .
- Alia , M. , Mateos , R. , Ramos , S. , Lecumberri , E. , Bravo , L. & Goya , L. , 2006, Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2) , *Eur J Nutr* 45 , 19 – 28 .
- Asea , A. , Ara , G. , Teicher , B. A. , Stevenson , M. A. & Calderwood , S. K. ,2001, Effects of the flavonoid drug quercetin on the response of human prostate tumours to hyperthermia *in vitro* and *in vivo* , *Int J Hyperthermia* 17 , 347 – 356 .
- Barrera, D.A., et al.,1993. Synthesis and RGDpeptide modification of a newbiodegradable copolymer: poly(lactic acid-co-lysine), *J. Am. Chem. Soc.* 115, 11010–11011.
- Bentzen S.M., 2007, Theragnostic imaging for radiation oncology: dose-painting by numbers *Lancet Oncology*, 6, 112–17
- Chen Q, Krol A, Wright A, Needham D, Dewhirst MW, Yuan F, 2008, International Journal Of Hyperthermia, , 24, (6), 475-482  
chitosan gels in a simulated body fluid, *Asian Chitin Journal*, 2, 91–96.  
commercialisation, *Drug Discov. World*, 17–23.

- D.K. Gilding, A.M. Reed , 1979, Biodegradable polymers for use in surgery polyglycolic/poly(actic acid) homo- and copolymers: 1 *Polymer, Volume 20, Issue, 12, December, 1459-1464*
- Davda, J., Labhasetwar, V., 2002. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells, *Int. J. Pharm*, 233, 51–59.
- De , A. W. , Jr. , Mueller-Dieckmann , H. J. , Schulze-Gahmen , U. , Worland , P. J. , Sausville , E. & Kim , S. H. ,1996 , Structural basis for specificity and potency of a flavonoid inhibitor of human CDK2, a cell cycle kinase, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 , 2735 – 2740 .
- Debes , A. , Oerding , M. , Willers , R. , Gobel , U. & Wessalowski , R. , 2003,
- Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *J. Immunol. Meth.* 89, 271–277.
- Desai, M.P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R.J., Amidon, G.L., 1997, The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent, *Pharm. Res.*, 14, 1568–1573.
- Desgouilles, S., Vauthier, C., Bazile, D., Vacus, J., Grossiord, J.L., Veillard, M., Couvreur, P., 2003. The design of nanoparticles obtained by solvent evaporation: A comprehensive study. *Langmuir* 19, 9504–9510.
- Elangovan , V. , Sekar , N. & Govindasamy , S. , 1994 , Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis .*Cancer Lett* 87 , 107 – 113 .
- Filachione E. M., and Fisher C. H., 1946, Production of Methyl Lactate From Aqueous Solutions of Crude Acid, *Industrial and Engineering Chemistry*, vol.38, n.2, pp:228-232.

- Galindo-Rodriguez, S., Allemann, E., Fessi, H., Doelker, E., 2004. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion and nanoprecipitation methods, *Pharm.Res.*, 21, 142-1439.
- Gupta, K. & Panda, D., 2002, Perturbation of microtubule polymerization by quercetin through tubulin binding: A novel mechanism of its antiproliferative activity, *Biochemistry*, 41, 13029 – 13038.
- Guowei D., Adriane K., Chen X.Z., Jie C., Yinfeng L. (2007). PVP magnetic nanospheres: Biocompatibility, in vitro and in vivo bleomycin release, *International Journal of Pharmaceutics*, 328, 78–85.
- H. Rafati, A. G. A. Coombes, J. Adler, J. Holland, S. S. Davis, 1997, Protein-loaded poly(L-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics, *Journal of Controlled Release*, Volume 43, Issue 1, 89-102
- Hanahan, D. and Folkman, J., 1996, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell*, 86(3), 353–64.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A., 2000, The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hansen, B.M., Nielsen, E.S., Berg, K., 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Meth.* 119, 203–210.
- Hayes R. Ernest., 1986, United States Patents, 4619695,
- Hermansson, M., Nistér, M., Betsholtz, C., 1988 Endothelial cell hyperplasia in human glioblastoma: Coexpression of mRNA for platelet-derived growth factor (PDGF) B chain and PDGF receptor suggests autocrine growth

stimulation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(20), 7748–52.

Li Houli, XiaoBin Zhao , YuKun Ma , GuangXi Zhai , LingBing Li , HongXiang Lou,2009, Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles, *Journal of Controlled Release* 133,238–244

Hye-Young Kwon, Jun-Young Lee, Sung-Wook Choi, Yangsoo Jang, Jung-Hyun Kim, 2001, Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method, *Colloids and Surfaces, Physicochemical and Engineering Aspects* 182 , 123–130

I.Gilham, 2002, Theranostics: an emerging tool in drug discovery and commercialisation, *Drug Discov. World*, 17–23.

Jain R.K., 2001, Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46,1,149.

Jakubowicz-Gil , J. , Paduch , R. , Piersiak , T. , Glowniak , K. , Gawron , A. & Kandefer-Szerszen , M. ,2005, The effect of quercetin on pro-apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells, *Biochem Pharmacol* 69 , 1343 – 1350 .

Jayakumar, R., Nwe, N., Tokura, S., & Tamura, H. ,2007, Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials, *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 175-181.

Jung-Hyun Kim, 2001, Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method, *Colloids and Surfaces, Physicochemical and Engineering Aspects* 182 , 123–130

Kandefer-Szerszen , M. ,2005, The effect of quercetin on pro-apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells, *Biochem Pharmacol* 69 , 1343 – 1350 .

Klein, S., Levitzki A., 2006, Signal Transduction Therapy for Cancer – Whither Now? *Current Signal Transduction Therapy*, 1, 1-12.

Kumar R, U. Bakowsky, C.M. Lehr, 2004, Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers, *Biomaterials* 25 1771–1777

L. Sipos, M. Zsuga and T. Kelen, 1991, Living polymerization of L,L-lactide initiated by potassium t-butoxide and its 18-crown-6 complex., *Polymer Bulletin* 27, 495-502.

Lamson , D. W. & Brignall , M. S., 2000 , Antioxidants and cancer, part 3: Quercetin , *Altern Med Rev* 5 , 196 – 208 .

Larocca, L. M. , Teofili, L. , Maggiano, N. , Piantelli, M. , Ranelletti, F. O. & Leone, G., 1996, Quercetin and the growth of leukemic progenitors , *Leuk Lymphoma* 23 , 49– 53 .

Lauro M.R, M.L. Torre, L. Maggi, F. De Simone, U. Conte, R.P. Aquino, 2002 Fast- and slow release tablets for oral administration of flavonoids: rutin and quercetin, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28 (4), 371–379.

Letchford K, Burt H., 2007, *European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics* ., 65 (3), 259-269.

Maeda, H., 2001, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting , *Advances in Enzyme Regulation.*, 41, 189–207  
melanoma B16-BL6 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC-alpha and translocating PKC-delta, *Cancer Chemotherapy Pharmacol* 55 , 251 – 262 .

- Min Lang Tsai, Shi Wei Bai, Rong Huei Chen , 2008, Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan–sodium tripolyphosphate nanoparticle, *Carbohydrate Polymers*, Volume 71,448-457
- Muzzarelli, R. A. A. ,1988, Carboxymethylated chitin and chitosans, *Carbohydrate Polymers*, 8, 1–21.
- Ong , C. S. , Tran , E. , Nguyen , T. T. , Ong , C. K. , Lee , S. K. , Lee , J. J. , Ng , C. P. , Leong , C. & Huynh , H. ,2004, Quercetin-induced growth inhibition and cell death in nasopharyngeal carcinoma cells are associated with increase in Bad and hypophosphorylated retinoblastoma expressions, *Oncol Rep* 11 , 727 – 733 .
- Panyam, J., Labhasetwar, V., 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and genedelivery to cells and tissue. *Adv. Drug Del. Rev.* 55, 329–347.
- Panyam, J., Sahoo, S.K., Prabha, S., Bargar, T., Labhasetwar, V., 2003, Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-coglycolide) nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 262, 1–11.
- Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM, Anichini A, 2002,*Journal Of The National Cancer Institute*, 94 (11) 805-818  
 Physiochemical and bioactivity behavior of highly soluble chitosan-L-glutamic acid aerogel derivative, *Asian Chitin Journal*, 4, 9–18.  
*Polymers*, 8, 1–21.
- Pescovitz, M.D., 2006, Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am. J. Transplant.* 33, 859–866
- Presta, L.G. *et al.* ,(1997) ,Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 57, 4593–4599.

- R.K. Singh, 2002, Laser based synthesis of nanofunctionalized particulates for pulmonary based controlled drug delivery applications, *Applied surface science*,197-198 610-614
- S. Gogolewski, M. Jovanovic, S.M. Perren, J.G. Dillon, M.K. Hughes, 1993, The effect of melt-processing on the degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides, polyhydroxybutyrate, and polyhydroxybutyrate-co-valerates, *Polymer Degradation and Stability, Volume 40, Issue 3, , Pages 313-322*
- S. Sun, L. Wang, A. Wang., 2006, Adsorption properties of crosslinked carboxymethyl-chitosan resin with Pb(II) as template ions *Journal of Hazardous Materials*, B136, 930.
- Seung-Jun Lee, Jong-Ryul Jeong, Sung-Chul Shin, Jin-Chul Kim, Young-Hwan Chang, Yong-Min Chang, Jong-Duk Kim, 2004, Nanoparticles of magnetic ferric oxides encapsulated with poly(D,L lactide-co-glycolide) and their applications to magnetic resonance imaging contrast agent, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 272–276
- Seung-Jun Lee, Jong-Ryul Jeong,, Sung-Chul Shin, Jin-Chul Kim, Young-Hwan Chang, Yong-Min Chang, Jong-Duk Kim, 2004, Nanoparticles of magnetic ferric oxides encapsulated with poly(D,L lactide-co-glycolide) and their applications to magnetic resonance imaging contrast agent, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 272–276 , 2432–2433.
- Shi, X., Du, Y., Yang, J., Zhang, B., & Sun, L. ,2005, Effect of degree of substitution and molecular weight of carboxymethyl chitosan nanoparticles on doxorubicin Delivery, *Journal of Applied Polymer Science*, 100, 4689–4696.

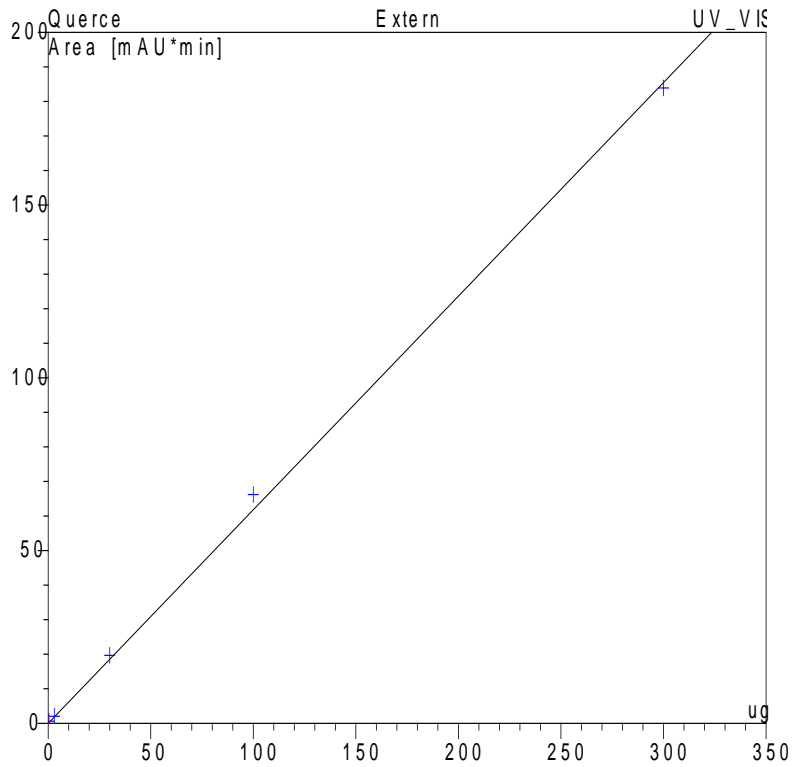
- Singh, J., Dutta, P. K., Dutta, J., Hunt, A. J., Macqarrie, D. J., & Clark, J. H. ,2008,.  
Smeaton William A., 1986, Carl Wilhelm Scheele (1742–1786), Endeavour,  
1,
- Stewart B. W., Kleihues P., 2003, World Cancer Report, International Agency for  
Research on Cancer, March.
- Sun, L., Du, Y., Fan, L., Chen, X., & Yang, J. ,2006, Preparation, characterization  
and antimicrobial activity of quaternized carboxymethyl chitosan and  
application as pulp-cap, Polymer, 47, 1796–1804.
- Tagliaferri P, Caraglia M, Budillon A, Marra M, Vitale G, Viscomi C, Masciari S,  
Tassone P, Abbruzzese A, Venuta S, 2005, Cancer Immunology  
Immunotherapy, , 54 (1), 1-10
- Tao Sun, Peixin Xu, Qing Liu, Jian Xue, Wenming Xie , 2003, Graft  
copolymerization of methacrylic acid onto carboxymethyl  
chitosan,European Polymer Journal 39 189–192,
- Vasir JK, Labhasetwar V., 2005, Targeted drug delivery in cancer therapy,  
Technology in Cancer Research & Treatment, 4,4, 363.
- Williams , R. J. , Spencer , J. P. & Rice-Evans , C. , 2004 , Flavonoids:  
Antioxidants or signalling molecules? ,*Free Radic Biol Med* 36 , 838 – 849 .
- Yarbro, C., Frogge, M. and Goodman, M. ,2005, *Cancer Nursing: Principles and  
Practice*, 6th edn, Jones and Bartlett Publishers, Boston, MA.
- Young-Hwan Chang, Yong-Min Chang, Jong-Duk Kim, 2004, Nanoparticles of  
magnetic ferric oxides encapsulated with poly(D,L lactide-co-glycolide) and  
their applications to magnetic resonance imaging contrast agent, Journal of  
Magnetism and Magnetic Materials 272–276 , 2432–2433

Zhang , X. M. , Chen , J. , Xia , Y. G. & Xu , Q. ,2005, Apoptosis of murine activity  
, *Biochemistry* 41 , 13029 – 13038 .

## EK 1.

### Kuersetin Kalibrasyon Verileri

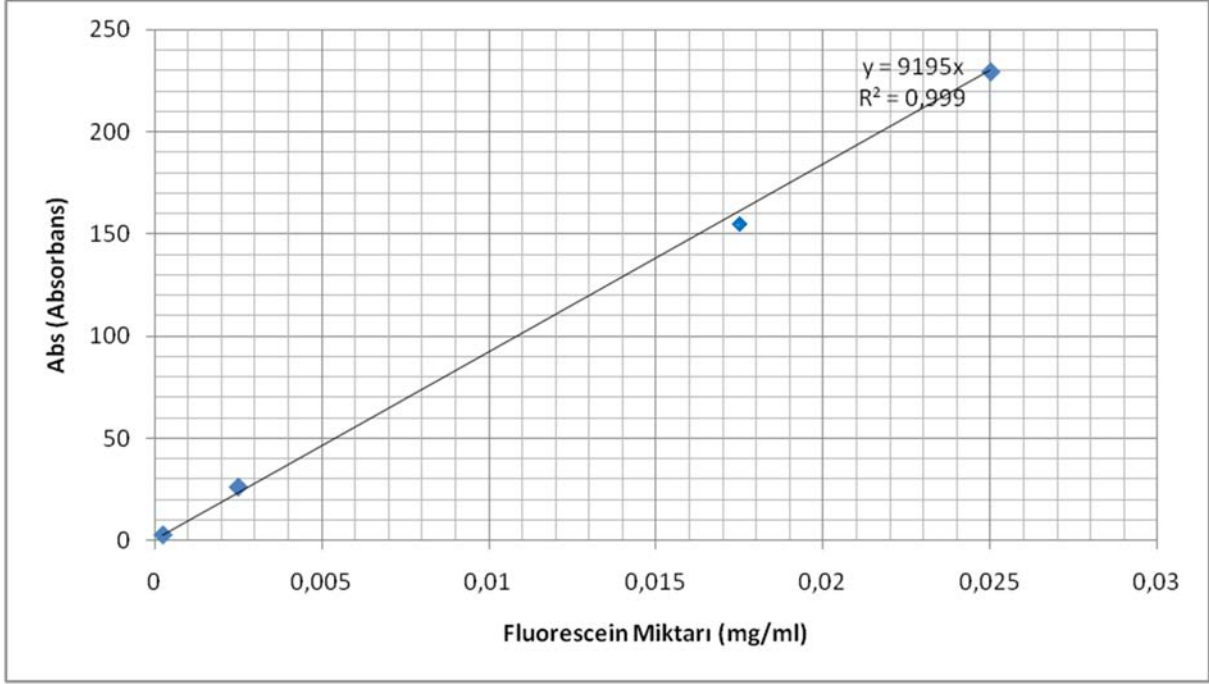
Sample Name:	Quercetin	Injection Volume:	20
Vial Number:	-	Channel:	UV_VIS_1
Sample Type:	standard	Wavelength:	274
Control Program:	Quercetin ilac salimi	Bandwidth:	1
Quantif. Method:	Quercetin ilac salimi	Dilution Factor:	1
Recording Time:	19.8.2009 19:21	Sample Weight:	1
Run Time (min):	5	Sample Amount:	1



No.	Ret.Time	Peak Name	Cal.Type	Points	Coeff.Det.	Offset	Slope	Curve
	min				%			
1	0,82	Quercetin	Lin	5	99,9025	0	0,6182	0
Average:					99,9025	0	0,6182	0

## EK 2.

Fluoresceine ait kalibrasyon eğrisi.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burcu Aslan  
Doğum Yeri : Trabzon  
Doğum Yılı : 1985  
Medeni Hali : Bekar  
Adres : Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı,  
Çankaya/Ankara/TÜRKİYE  
Telefon : +90312 297 61 95  
e-mail : burcu.aslan@hacettepe.edu.tr

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : 1996-2003 Hacı Ömer Tarman Anadolu Lisesi, Ankara  
Lisans : 2003-2007 Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü  
Yüksek Lisans: 2007-2009 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD

Yabancı Dil : İngilizce

### İş Tecrübesi

2007- : Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri  
Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD

