

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**KANSER HÜCRELERİNE HEDEFLİ
BİYOMİMETİK İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİNİN
HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE
BİYOPOTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

Güliz AK

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Biyokimya Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 10.03.2016

Bornova-İZMİR

2016

GÜLİZ AK tarafından doktora tezi olarak sunulan “**KANSER HÜCRELERİNE HEDEFLİ BİYOMİMETİK İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOPOTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	:		
Raportör Üye	:		
Üye	:		
Üye	:		
Üye	:		

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “KANSER HÜCRELERİNE HEDEFLİ BİYOMİMETİK İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE BİYOPOTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

10/03/2016

Güliz AK

ÖZET**KANSER HÜCRELERİNE HEDEFLİ BİYOMİMETİK İLAÇ TAŞIMA
SİSTEMLERİNİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE
BİYOPOTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

AK, Güliz

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Mart 2016, 157 sayfa

Epitelyal over kanseri kadınlarda jinekolojik kanserlerden en fazla ölüme neden olan türdür. Manyetik ajanlar tümörlü dokuya dışarıdan uygulanan manyetik alan yoluyla direk olarak yönlendirilerek ilaç preparatlarının yan etkilerinin azaltılmasına yardımcı olurlar. Antineoplastik bir ilaç olan doksorubisin klinikte meme, over gibi birçok kanserin tedavisinde kullanılmaktadır. Eritrosit vezikülleri kişinin kendi hücrelerinden hazırlanması dolayısıyla ilaç taşıyıcı sistem olarak biyouyumluluk sorunu ortadan kaldırmaktadır.

Çalışma kapsamında doksorubisin yüklü, nişasta ve PEGdiasit kaplı manyetik nanopartiküller sentezlendi. Nanopartiküller, folat ligandı takılı eritrosit ghost hücrelerinden extruder ile oluşturulan veziküller içerisine yüklendi. Hazırlanan nanoboyutlu ilaç taşıyıcı biyomimetik sistemin *in vitro* ilaç salım çalışmalarının ardından biyouyumluluk testleri ve over kanseri hücreleri üzerinde sitotoksite çalışmaları yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre biyomimetik ilaç taşıma sisteminin kontrollü ilaç salımı yaptığı, biyouyumlu olduğu ve folat reseptörü ile etkileşerek hücrelerde sitotoksite yarattığı bulundu. Dişi fareler üzerinde gerçekleştirilen biyodağılım çalışması ve *ex vivo* analizlerde ilaç taşıyıcısının folat reseptörü aracılığıyla ve manyetik olarak hedef dokuda birikebildiği saptandı.

Sonuç olarak, biyomimetik tasarlı doksorubisin taşıma sisteminin over kanserinde kişiselleştirilmiş tedavi sağlama potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Doksorubisin, folat reseptör hedefli ilaç, manyetik ilaç taşıma sistemleri, eritrosit veziküller, kişiselleştirilmiş kanser tedavisi.



ABSTRACT**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CANCER CELL
TARGETED BIOMIMETIC DRUG CARRIER SYSTEMS AND
RESEARCH THEIR BIOPOTENTIAL**

AK, Güliz

PhD in Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

March 2016, 157 pages

Epithelial ovarian cancer is the most leading of cause of death in women with gynecological cancer. Magnetic agents help to reduce the side effects of pharmaceutical preparations by externally applied magnetic field to tumor tissue. As an antineoplastic agent, doxorubicin is used for treatment of many cancers such as breast, ovarian etc. Erythrocyte vesicles prepared from the body's own cells can eliminate the problem of biocompatibility as a drug delivery system.

In this study, doxorubicin loaded and starch and PEGdiacid coated magnetic nanoparticles were synthesized. Magnetic nanoparticles were encapsuled into vesicles that formed by the extruder device from erythrocyte ghost cells that was folate ligand anchored to. Followed by the *in vitro* drug release studies of nano sized biomimetic drug delivery system, biocompatibility tests and cytotoxicity studies on ovarian cancer cell lines were performed. Based on the data, it was found that biomimetic drug delivery system has a controlled drug release profile, biocompatible and causes cytotoxicity in cells by interacting with folate receptor. In the biodistribution studies carried out on female mice and *ex vivo* analysis, drug carriers were found to accumulate in the target tissues via folate receptor and magnetic field application.

As a result, it is thought that the designed biomimetic doxorubicin transport systems have the potential to provide personalized treatment in ovarian cancer.

Keywords: Doxorubicin, folate receptor targeted drug, magnetic drug delivery system, erythrocyte vesicles, personalized cancer therapy.



TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca her türlü bilgi, tecrübe ve manevi desteği ile yanımda olan, bana her zaman emek veren ve karakterinden ilham aldığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Şenay Şanlıer' e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Tez izleme toplantılarında kıymetli görüşlerinden yararlandığım hocalarım Sayın Prof. Dr. Seçil Önal ve Prof. Dr. Fatma Yurt Onaran'a, ARGEFAR imkanlarını sonuna kadar açarak bana büyük destek veren hocam Sayın Prof. Dr. Ercüment Karasulu'ya, deneylerimde bana yardımcı olan tüm Biyokimya Bölümü ve ARGEFAR çalışanlarına, çalışmalarımız boyunca hep yan yana olduğumuz ve katkılarını unutamayacağım Habibe Yılmaz'a ve çok değerli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Herzaman benimle beraber olup bana her konuda destek veren sevgili annem, babam ve ablama en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2012 FEN 028 numaralı proje olarak desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
TABLolar DİZİNİ.....	xxx
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxxi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Over Kanseri	1
1.1.1 Over kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları.....	1
1.2 Nanopartiküler İlaç Taşıma Sistemleri	5
1.2.1 Polimerik nanopartiküller.....	6
1.2.2 Biyomimetik ilaç taşıma sistemleri	10
1.3 İlaç Taşıma Sistemlerinin Kansere Tedavisine Yönelik Hedeflendirilmesi.....	13
1.3.1 Pasif hedefleme.....	14
1.3.2 Aktif hedefleme	14
1.3.3 Fiziksel hedefleme	17

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2. MATERYAL VE METOT	20
2.1 Materyal.....	20
2.2 Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu	20
2.2.1 Magnetit nanoyapıların polimer içeren ortamda sentezlenmesi	21
2.2.2 Magnetit nanoyapıların polimer içermeyen ortamda hazırlanması	22
2.3 Manyetik Nanopartiküllerin Polimer ile Kaplanması ve Karakterizasyonu	23
2.3.1 Magnetit nanoyapıların nişasta ile kaplanması.....	23
2.3.2 Nişasta kaplı magnetit nanoyapıların PEG diasit ile modifikasyon çalışmaları	25
2.3.3 Magnetit nanoyapıların nişasta ve PEG diasit ile aynı anda kaplanması	26
2.4 Doksorubisinin Polimer Kaplı Manyetik Nanopartiküllere Yüklenmesi	28
2.4.1 Doksorubisinin manyetik nanopartiküllere enkapsülasyon yoluyla yüklenmesi	28
2.4.2 Doksorubisinin manyetik nanopartiküllere adsorpsiyon yoluyla yüklenmesi ..	29
2.5 Eritrosit Membran Veziküllerinin Oluşturulması	31
2.6 Eritrosit Veziküllerine Doksorubisin İçeren Nişasta ve PEG diasit Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Yüklenmesi.....	32
2.6.1 Eritrosit ghost hücrelerine doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin yüklenmesi ve vezikül formuna dönüştürülmesi	32

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.6.2 Doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin hazırlanan eritrosit membran veziküllerine yüklenmesi.....	34
2.7 Eritrosit Ghost Hücrelerine Folat Ligandının Takılması ve Folat Ligandı Bağlı ve Doksorubisin İçeren Nanopartikül Yüklü Eritrosit Veziküllerinin Oluşturulması	34
2.7.1 Eritrosit ghost hücrelerine folat ligandının takılması	34
2.7.2 Folat ligandı bağlı ve doksorubisin içeren nanopartikül yüklü eritrosit veziküllerinin oluşturulması	35
2.8 Manyetik Taşıyıcı Sistemin <i>in Vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları	35
2.9 Biyomimetik İlaç Taşıma Sistemin Biyouyumluluk Araştırmaları	36
2.9.1 Serum proteinlerine bağlanma miktarının araştırılması	36
2.9.2 Hemoliz oranının belirlenmesi	36
2.9.3 Makrofaj hücrelerince alımın incelenmesi	37
2.10 Biyomimetik İlaç Taşıma Sisteminin Over Kanseri Hücre Hatlarında Sitotoksosite Analizleri	38
2.10.1 Hücre kültürü	38
2.10.2 Sitotoksosite analizleri	38
2.10.3 Morfolojik inceleme.....	39
2.11 Biyomimetik İlaç Taşıma Sisteminin <i>in Vivo</i> Koşullarda Biyopotansiyelinin Araştırılması.....	40

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.11.1 İlaç taşıyıcı sistemin dişi farelerdeki biyodağılım çalışmaları	40
2.11.2 İlaç taşıyıcı sistemin <i>ex vivo</i> analizleri	41
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	43
3.1 Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu	43
3.1.1 Magnetit nanoyapıların polimer içeren ortamda sentezlenmesi	44
3.1.2 Magnetit nanoyapıların polimer içermeyen ortamda hazırlanması	49
3.2 Manyetik Nanopartiküllerin Polimer ile Kaplanması ve Karakterizasyonu	55
3.2.1 Magnetit nanoyapıların nişasta ile kaplanması.....	55
3.2.2 Nişasta kaplı magnetit nanoyapıların PEG diasit ile modifikasyon çalışmaları	60
3.2.3 Magnetit nanoyapıların nişasta ve PEGdiasit ile aynı anda kaplanması.....	67
3.3 Doksorubisinin Polimer Kaplı Manyetik Nanopartiküllere Yüklenmesi	73
3.3.1 Doksorubisinin manyetik nanopartiküllere enkapsülasyon yoluyla yüklenmesi	73
3.3.2 Doksorubisinin manyetik nanopartiküllere adsorpsiyon yoluyla yüklenmesi.....	75
3.4 Eritrosit Membran Veziküllerinin Oluşturulması	86
3.5 Eritrosit Veziküllerine Doksorubisin İçeren Nişasta ve PEG diasit Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Yüklenmesi.....	90
3.5.1 Eritrosit ghost hücrelerine doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin yüklenmesi ve vezikül formuna dönüştürülmesi	90

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.5.2 Doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin hazırlanan eritrosit membran veziküllerine yüklenmesi.....	93
3.6 Eritrosit Ghost Hücrelerine Folat Ligandının Takılması ve Folat Ligandı Bağlı ve Doksorubisin İçeren Nanopartikül Yüklü Eritrosit Veziküllerinin Oluşturulması	95
3.6.1 Eritrosit ghost hücrelerine folat ligandının takılması	95
3.6.2 Folat ligandı bağlı ve doksorubisin içeren nanopartikül yüklü eritrosit veziküllerinin oluşturulması	97
3.7 Manyetik Taşıyıcı Sistemin <i>in Vitro</i> İlaç Salım Çalışmaları	99
3.8 Biyomimetik İlaç Taşıma Sistemin Biyouyumluluk Araştırmaları	101
3.8.1 Serum proteinlerine bağlanma miktarının belirlenmesi	101
3.8.2 Hemoliz oranının belirlenmesi	103
3.8.3 Makrofaj hücrelerince alımın incelenmesi	104
3.9 Biyomimetik İlaç Taşıma Sisteminin Over Kanseri Hücre Hatlarında Sitotoksikite Analizleri	106
3.9.1 Morfolojik inceleme.....	114
3.10 Biyomimetik ilaç taşıma sisteminin <i>in vivo</i> koşullarda biyopotansiyelinin araştırılması	117
3.10.1 İlaç taşıyıcı sistemin dişi farelerde biyodağılım çalışmaları.....	117
3.10.2 İlaç taşıyıcı sistemin <i>ex vivo</i> analizleri.....	124

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4. GENEL DEĞERLENDİRME..... 134

KAYNAKLAR DİZİNİ 136

ÖZGEÇMİŞ 146



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Doksorubisinin kimyasal yapısı.	3
1.2 Dokorubisinin DNA baz çiftleri arasına girmesinin 2D NMR ile gösterimi.	3
1.3 Doksorubisinin metabolik aktivasyonundaki serbest radikal reaksiyonları.	4
1.4 Nanopartiküler ilaç sistemlerinin tarihsel gelişimi.	5
1.5 Nişastanın kimyasal yapısı: (a) Amiloz birimi (b) Amilopektin birimi.	8
1.6 a) Polietilen glikol b) Polietilen glikol diasitin kimyasal yapısı.	9
1.7 Ekstrüzyon yoluyla hücre membran veziküllerinin hazırlanışı.	12
1.8 Eritrosit membran vezikülleri kaplı nanopartiküllerin oluşturulma işlemi.	12
1.9 Hedeflendirme türleri.	13
1.10 Pasif ve aktif hedefleme: a) Partiküller endotel hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşebilen ligand içerir ve hedef vasküler doku veya hücrelere ilaç salımı gerçekleşir, b) Partiküller hedef dokuya geçtikten sonra partikül yüzeyindeki ligand hedef hücredeki reseptör ile etkileşir ve hücre içine alınır, c) Partiküller EPR etkisiyle tümör dokusunda birikerek ilaç ekstrasellüler matrikste salınabilir ve hücre içine alınabilir.	15
1.11 Folat konjugatlarının reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alımı.	17
1.12 Manyetik nanopartiküllerin tümöre hedeflendirilmesi.	18
2.1 Magnetit nanopartiküllerin hazırlanışı a) 60°C'ye ısıtılan reaktörde azot gazı altında 3000 rpm hızda mekanik karıştırıcı aracılığıyla karıştırma düzeneği, b) elde edilen siyah renkli manyetik yapılar.	23

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.2 Karışım içerisindeki manyetik ve manyetik olmayan yapıların manyetik seperatör ile birbirinden ayrılması.	24
2.3 Magnetit/PEG diasit oranı (w/w) 1/10 olarak gerçekleştirilen a) nişasta ve PEG diasit kaplama reaksiyonu karışımı, b) reaksiyon sonunda elde edilen ürün.	27
2.4 a) Magnetit/PEG diasit oranı (w/w) 1/10 olarak gerçekleştirilen reaksiyonda elde edilen nanopartiküllerin disperse görüntüsü, b) Mıknatıs varlığında mıknatısa karşı toplanması.	27
2.5 Doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküller.	30
2.6 Extruderden geçirilerek eritrosit membran veziküllerinin oluşturulması.	31
2.7 Folat ligandı takılı doksorubisin yüklü manyetik nanopartikülleri içeren eritrosit vezikülleri.	35
2.8 Farelerin over bölgesinin hedeflenmesi amacıyla a) abdomen bölgesine mıknatıs yerleştirilmesi b) mıknatısın flaster ile sabitlenmesi.	41
3.1 Oda sıcaklığında ve 600 rpm karıştırma hızında hazırlanan A örneğinin SEM görüntüsü.	44
3.2 Nişastanın termal proseslerdeki faz geçişlerin şematik gösterimi.	45
3.3 60°C sıcaklıkta ve 600 rpm karıştırma hızında hazırlanan a) B örneği, b) C örneği, c) D örneğinin SEM görüntüsü.	46
3.4 60°C sabit sıcaklıkta ve 3000 rpm karıştırma hızında hazırlanan E örneğinin a) 1 µm skalada, b) 1 µm skalada, c) 2 µm skalada SEM görüntüleri.	47
3.5 60°C sabit sıcaklıkta ve 3000 rpm karıştırma hızında hazırlanan F örneğinin a) 3 µm skalada, b) 1 µm skalada SEM görüntüleri.	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.6 E örneğine ait FTIR spektrumu.	48
3.7 Sentezlenen yapılara ait FTIR spektrumu.	49
3.8 Sentezlenen yapıların XRD faz diyagramı.	50
3.9 Yapıların XRD match analiz sonucu.	50
3.10 Magnetit nanoyapılara ait a) ve b) 300 nm skalalardaki SEM görüntüleri.	51
3.11 Magnetitlerin a) 0,1 μm , b) 50 nm, c) 20 nm, d) 5 nm skaladaki HR-TEM görüntüleri.	52
3.12 Magnetit nanopartiküllerin artan manyetik alan altındaki manyetizasyonu.....	53
3.13 Sentezlenen magnetitlerin boyut dağılımları.	54
3.14 Magnetitlerin termogram eğrisi.	54
3.15 Nişastanın FTIR spektrumu.	55
3.16 Manyetik dekantasyon ile saflaştırılan ve % 0,5 nişasta konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin FTIR spektrumu.	56
3.17 MACS ile saflaştırılan ve %0,5 nişasta konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin FTIR spektrumu.	57
3.18 Değişen nişasta (NİŞ) konsantrasyonunda hazırlanan ve MACS ile saflaştırılan magnetitlerin (MAG) termogram eğrileri.	58
3.19 % 0,5 nişasta konsantrasyonunda hazırlanan karbohidrat yapı kaplı magnetitlere ait a) ve b) 300 nm skaladaki SEM görüntüleri.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.20 Sentezlenen nişasta kaplı magnetitlerin boyut dağılımları.	59
3.21 Nanopartiküllerin a) 400 nm por çaplı membrandan geçirilen kısmı, b) 100 nm por çaplı membrandan geçirilen kısmı, c) Başlangıç formu d) 400 nm por çaplı membranda kalan nanopartiküller.	60
3.22 PEG diasite ait FTIR spektrumu.	61
3.23 ICP-MS ile demir içeriği üzerinden PEG diasit ile bağlanan nişasta kaplı magnetitlere ait FTIR spektrumu.	62
3.24 Magnetit/PEGdiasit oranının 1/1 olarak kullanıldığı reaksiyon sonucu elde edilen nanoyapıların FTIR spektrumu.	62
3.25 Magnetit/PEG diasit oranının 1/10 olarak kullanıldığı reaksiyon sonucu elde edilen nanoyapıların FTIR spektrumu.	63
3.26 Magnetit/PEG diasit oranının 1/100 olarak kullanıldığı reaksiyon sonucu elde edilen nanoyapıların FTIR spektrumu.	63
3.27 Magnetit/PEG diasit oranının 1/100 olarak kullanıldığı ve 6 saatlik reaksiyon sonucu elde edilen nanoyapıların FTIR spektrumu.	64
3.28 PEG diasite ait termogram eğrisi.	65
3.29 Magnetit/PEG diasit oranının 1/100 olarak kullanıldığı ve 6 saatlik reaksiyon sonucu elde edilen nanoyapıların termogram eğrisi.	65
3.30 PEG diasit kaplı magnetitlere ait FTIR spektrumu.	66
3.31 PEG diasit kaplı magnetitlere ait termogram eğrisi.	67
3.32 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlere ait FTIR spektrumu.	68

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.33 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlere ait termogram eğrisi.....	69
3.34 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin artan manyetik alan altındaki manyetizasyonu.....	70
3.35 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin a) 100 nm, b) 50 nm, c) 20 nm, d) 5 nm skaladaki HR-TEM görüntüleri.	71
3.36 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin AFM görüntüsü.....	72
3.37 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin boyut dağılımları.	72
3.38 Farklı koşullarda inkübe edilen doksorubisin çözeltilerine ait spektrofotometrik tarama (pH 7-0: pH 7 olan kontrol tüpü başlangıç anı; pH 11-0: pH 11 olan tüp başlangıç anı; pH 11-0,5: pH 11 olan tüp 30. dakika; ; pH 11-1: pH 11 olan tüp 1. saat; pH 11-2: pH 11 olan tüp 2. saat; pH 11-2-7: pH 11 olan ve 2. saat sonunda pH'ı 7 ye getirilen tüp; pH 11-3: pH 11 olan tüp 3. saat).	74
3.39 Farklı koşullarda inkübe edilen doksorubisin çözeltilerine ait florimetrik tarama (pH 7-0: pH 7 olan kontrol tüpü başlangıç anı; 60-pH 7-2: pH 7 olan ve 60 °C'de 2 saat bekletilen tüp; oda-pH 11-2: pH 11 ve oda sıcaklığında 2 saat bekletilen tüp; 60-pH 11-2: pH 11 olan ve 60 °C'de 2 saat bekletilen tüp).	75
3.40 Doksorubisin yapısı: (*) Proton verebilen grup (**) Proton alabilen grup (Manocha and Margaritis, 2010).	76
3.41 Doksorubisin standart grafiği.	76
3.42 Değişen ilaç konsantrasyonlarında nanopartiküllere bağlı ilaç miktar ve verimleri.	77
3.43 Farklı pH ortamlarındaki nanopartiküllere bağlı ilaç miktar ve verimleri.	78

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.44 Farklı sürelerde nanopartiküllere bağlı ilaç miktar ve verimleri.....	79
3.45 25 ve 37 °C sıcaklıkta nanopartiküllere bağlı ilaç miktar ve verimleri.....	80
3.46 Doksorubisine ait FTIR spektrumu.	81
3.47 Doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküllere ait FTIR spektrumu.	82
3.48 Doksorubisine ait termal bozunma eğrisi.	83
3.49 Doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküllere ait termal bozunma eğrisi.	83
3.50 Doksorubisin içeren nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin artan manyetik alan altındaki manyetizasyonu.....	84
3.51 Doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin a) 100 nm, b) 50 nm, c) 20 nm ve d) 5 nm skalasındaki TEM görüntüleri.....	85
3.52 Doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin boyut dağılımları.	86
3.53 Eritrosit ghost hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.....	86
3.54 Eritrosit ghost hücresinin EF-TEM cihazındaki görüntüsü.....	87
3.55 Eritrosit membranlarından hazırlanan veziküllerin AFM görüntüsü.	87
3.56 Boş eritrosit veziküllerine ait boyut analizi.....	88
3.57 Eritrositlerin a) 4x, b) 16x büyütmedeki görüntüleri; Ghost hücrelerin c) 4x, d) 16x büyütmedeki görüntüleri, e) Eritrosit membran veziküllerinin 400x büyütmedeki görüntüleri.....	89

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.58 Manyetik nanopartiküllerin sırasıyla %0,9 sodyum klorür, %10 süktroz + 10 mM histidin, %4,66 histidin, %10 süktroz, ve %5 glukoz çözeltisi içindeki dispersiyonu. ..	90
3.59 Değişen sıcaklıklarda ghost hücelere yüklenen nanopartikül miktar (µg) ve verimleri (%).	91
3.60 Değişen ghost hücre:nanopartikül oranlarında nanopartikül yüklenme miktar (µg) ve verimleri (%).	92
3.61 1:5 (Ghost/Manyetik nanopartikül) oranında hazırlanan ghost hücre.....	92
3.62 1:1 (Ghost/Manyetik nanopartikül) oranında hazırlanan ghost hücre.....	93
3.63 Nanopartikül yüklü eritrosit membran vezikülünün EF-TEM analiz görüntüsü. .	94
3.64 Nanopartikül yüklü eritrosit membran veziküllerinin AFM analiz görüntüsü.	94
3.65 Nanopartikül yüklü eritrosit membran veziküllerinin boyut dağılımı.....	95
3.66 Folat-PEG-DSPE bileşiğinin kimyasal yapısı.	95
3.67 1x PBS içerisinde hazırlanan folat-PEG-DSPE standart grafiği.....	96
3.68 Folat-PEG-DSPE bileşiğinin ghost hücelere bağlanma miktar ve verimleri.	97
3.69 Folat-PEG-DSPE bileşiği takılı ve doksorubisin yüklü manyetik nanopartikülleri içeren eritrosit membran vezikülleri.	98
3.70 Folat-PEG-DSPE bileşiği takılı takılı ve doksorubisin yüklü manyetik nanopartikülleri içeren eritrosit membran veziküllerinin boyut dağılımları.	98
3.71 Serbest doksorubisinin pH 5,5 ve 7,4 ortamlarındaki salım yüzdeleri.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.72 Nişasta/PEGdiasit kaplı manyetik nanopartiküllere yüklü doksorubisinin pH 5,5 ve 7,4 ortamlarındaki salım yüzdeleri.	100
3.73 a) Kontrol grupları, b) DSPM ve c) FVDSPM grubu örneklerin hemoliz deneyi fotoğrafları.	103
3.74 Makrofaj hücrelerinin başlangıç anı görüntüsü, hücre ve floresans sayımı.	104
3.75 DSPM ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin görüntüsü, hücre ve floresans sayımı.	105
3.76 VDSPM ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin görüntüsü, hücre ve floresans sayımı.	105
3.77 FVDSPM ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin görüntüsü, hücre ve floresans sayımı.	106
Şekil 3.78 Artan konsantrasyonlardaki ilaç gruplarının A2780 hücreleri üzerinde a) 24 saatlik, b) 48 saatlik, c) 72 saatlik inkübasyon sonunda yarattığı sitotoksosite.	108
3.79 Artan konsantrasyonlardaki ilaç gruplarının OVCAR3 hücreleri üzerinde a) 24 saatlik, b) 48 saatlik, c) 72 saatlik inkübasyon sonunda yarattığı sitotoksosite.	110
3.80 Artan konsantrasyonlardaki ilaç gruplarının SKOV3 hücreleri üzerinde a) 24 saatlik, b) 48 saatlik, c) 72 saatlik inkübasyon sonunda yarattığı sitotoksosite.	111
3.81 PBS (kontrol) ile 2 saat inkübe edilen A2780 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin karşılaştırılmasıyla elde edilen görüntüler.	115
3.82 DOX ile 2 saat inkübe edilen A2780 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin karşılaştırılmasıyla elde edilen görüntüler.....	115

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

3.83 FVDSPM ile 2 saat inkübe edilen A2780 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler..... 115

3.84 PBS (kontrol) ile 2 saat inkübe edilen OVCAR3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler..... 116

3.85 DOX ile 2 saat inkübe edilen OVCAR3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler. 116

3.86 FVDSPM ile 2 saat inkübe edilen OVCAR3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler..... 116

3.87 PBS (kontrol) ile 2 saat inkübe edilen SKOV3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler..... 117

3.88 DOX ile 2 saat inkübe edilen SKOV3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler. 117

3.89 FVDSPM ile 2 saat inkübe edilen SKOV3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler..... 117

3.90 İlaç çekilmiş enjektör ile IVIS cihazında elde edilen örnek bir görüntü. 118

3.91 FVDSPM verilen farelerin a) 1. saatteki, b) 3. saatteki biyodağılım görüntüleri. 119

3.92 VDSPM verilen farelerin a) 1. saatteki, b) 3. saatteki biyodağılım görüntüleri. . 120

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.93 DSPM verilen farelerin a) 1. saatteki, b) 3. saatteki biyodağılım görüntüleri.....	121
3.94 DOX verilen farelerin a) 1. saatteki, b) 3. saatteki biyodağılım görüntüleri.	122
3.95 FVDSPM verilen fare organlarının görüntüleri.	123
3.96 VDSPM verilen fare organlarının görüntüleri.	123
3.97 DSPM verilen fare organlarının görüntüleri.	124
3.98 DOX verilen fare organlarının görüntüleri.	124
3.99 HPLC analizinde elde edilen doksorubisin standart grafiğı.	125
3.100 Standart doksorubisin çözeltilerinin HPLC analizinden elde edilen örnek bir kromatogram.....	126
3.101 Dokulardan ekstrakte edilmiş doksorubisinin HPLC analizinden elde edilen örnek bir kromatogram.	127
3.102 FVDSPM uygulanmış farelerin doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları (%dağılım/ mg).....	128
3.103 VDSPM uygulanmış farelerin doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları (%dağılım/ mg).....	129
3.104 DSPM uygulanmış farelerin doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları (%dağılım/ mg).....	130
3.105 DOX uygulanmış farelerin doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları (%dağılım/ mg).....	131
3.106 İlaç gruplarının mg over dokusu başına % dağılımı.	132

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.107 İlaç gruplarının mg böbrek dokusu başına % dağılımı.	133
3.108 İlaç gruplarının mg akciğer dokusu başına % dağılımı.	133
4.1 Hazırlanan biyomimetik doksorubisin taşıyıcısı ile over kanserinde hedefe yönelik ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejisi.	135



TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Tekrarlayan over kanserinde uygulanan ilaçlar ve bu ilaçlara yanıt veren hasta yüzdesi.....	2
1.2 Doğal ve yapay polimerler kullanılarak hazırlanan bazı polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler.....	7
1.3 Piyasada bulunan PEGlenmiş ürünler	9
1.4 Demir oksit nanopartiküllerinin hayvan ve insandaki uygulama dozları, kullanım amaçları ve kandaki yarılanma ömürleri.....	19
3.1 Değişen nişasta konsantrasyonunda hazırlanan ve manyetik dekantasyon ile saflaştırılan magnetitlerin nişasta ile kaplanma yüzdeleri.....	57
3.2 Değişen nişasta konsantrasyonunda hazırlanan ve MACS ile saflaştırılan magnetitlerin nişasta ile kaplanma yüzdeleri	58
3.3 Değişen başlangıç konsantrasyonlarında ghost hücrelere bağlanan folat-PEG-DSPE miktarları	58
3.4 Değişen oranlarda SPM, DSPM, VDSPM ve FVDSPM nanotaşıyıcılarına bağlanan serum protein miktar ve yüzdeleri.....	102
3.5 Doksorubisin ve doksorubisin taşıyan ilaç gruplarının A2780, OVCAR3 ve SKOV3 hücreleri üzerindeki IC ₅₀ değerleri	112
3.6 İnsan dokularındaki folat reseptörü seviyeleri	132

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
<i>Da</i>	Dalton
<i>mM</i>	Milimolar
<i>M</i>	Molar
<i>g</i>	Gram
<i>mL</i>	Mililitre
<i>°C</i>	Derece
<i>dak</i>	Dakika
<i>T</i>	Tesla
<i>w</i>	Ağırlık
<i>v</i>	Hacim
<i>%</i>	Yüzde
<i>mg</i>	Miligram
<i>mV</i>	Milivolt
<i>μm</i>	Mikrometre
<i>μg</i>	Mikrogram
<i>μL</i>	Mikrolitre
<i>g</i>	Gram
<i>mOsm</i>	Miliosmol

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
λ_{ex}	Eksitasyon dalga boyu
λ_{em}	Emisyon dalga boyu
emu	Elektromanyetizma birimi
M_s	Doygunluk manyetizasyon değeri
L	Litre
nm	Nanometre
sa	Saat
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ARGEFAR	Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi
$FeCl_3$	Demir (III) klorür
$FeCl_2$	Demir (II) klorür
NH_4OH	Amonyum hidroksit
$NaOH$	Sodyum hidroksit
PEG	Polietilen glikol
PEG diasit	Polietilen glikol diasit
Folat-PEG-DSPE	Folat-polietilen glikol- 1,2-distearoil- <i>sn</i> -glisero-3-fosfoetanolamin
FBS	Fetal sığır serumu

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
PBS	Fizyolojik tamponlu çözelti veya fosfat tamponlu tuz çözeltisi
DMSO	Dimetil sülfoksit
MTT	3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
RBC	Eritrosit
ICP-MS	İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi
DOX	Doksorubisin
MACS	(Magnetic activated cell sorting) Manyetik seperatör
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ECACC	European collection of cell cultures
ATCC	American type culture collection
Fe ₃ O ₄	Magnetit
HCl	Hidroklorik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
XRD	X-ışını kırınım cihazı
HR-TEM	Yüksek çözünürlüklü geçirimli elektron mikroskobu
VSM	Titreşimli örnek manyetometresi
TGA	Termogravimetrik analiz
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
EF-TEM	Enerji filtreli geçirimli elektron mikroskobu
NaCl	Sodyum klorür
KCl	Potasyum klorür
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojen fosfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen fosfat
SPM	Nişasta ve PEG diasit kaplı manyetik nanopartiküller
DSPM	Doksorubisin yüklü, nişasta ve PEG diasit kaplı manyetik nanopartiküller
VDSPM	Vezikül ile kaplı, doksorubisin yüklü, nişasta ve PEG diasit kaplı manyetik nanopartiküller
FVDSPM	Folat ligandı takılı, vezikül ile kaplı, doksorubisin yüklü, nişasta ve PEGdiasit kaplı manyetik nanopartiküller
NP	Nanopartikül

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CO ₂	Karbondiyoksit
A2780	İnsan over kanseri epitelyal hücre hattı
SKOV3	İnsan over adenokarsinoma epitelyal hücre hattı
OVCAR3	İnsan over adenokarsinoma epitelyal hücre hattı
RAW 264.7	Mus musculus lösemik monosit/makrofaj hücreleri
IC ₅₀	Hücre büyümesini %50 azaltan konsantrasyon değerleri
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
IVIS Spectrum	<i>İn vivo</i> görüntüleme cihazı
AC	Akciğer
KC	Karaciğer
BOB	Böbrek
DAL	Dalak
KB	Kalın barsak
OVER	Over
KAS	Kas
KAN	Plazma
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TCA	Trikloroasetik asit
RES	Retiküloendotelyal sistem
PLGA	Polilaktik-ko-glikolik asit
FR	Folat reseptörü

1. GİRİŞ

1.1 Over Kanseri

Overler kadınlarda ovum üretilen organlar olup premenopozal dönemdeki kadınların progesteron ve östrojen hormonlarının ana kaynağıdır. Over kanseri dünya çapında kadınlarda en sık rastlanan 7. kanser türüdür ve 2012 yılında yaklaşık 239000 over kanseri vakası bildirilmiştir. Bu rakam her yıl en az %4 oranında artmaktadır. (World Cancer Research Fund and American Institute For Cancer Research, 2016). Bununla birlikte over kanseri kadınlarda jinekolojik kanserler arasında en fazla ölüme neden olan türdür. Hastaların % 70' inden fazlası ileri evrede teşhis edilir ve ölüm oranı yüksek olur (Itamochi and Kigawa, 2012).

Over kanserleri genellikle ovumu saran epitelyal hücre, hormonları üreten stromal hücre ve ovumu oluşturan germ hücreleri olmak üzere üç tip hücreden gelişebilmektedir. Over kanserlerinin yaklaşık %90-95'i epitelyal dokudan kaynaklanmaktadır. Epitelyal over kanseri, yüksek dereceli seröz karsinoma (%70), düşük dereceli seröz karsinoma (%5), berrak hücreli karsinoma (%11), entometrioid karsinoma (%11) ve müsinöz karsinoma (%3) olmak üzere farklı türlerden oluşur. Epitelyal over kanserlerindeki histolojik alt sınıfların tümör gelişimindeki biyolojik farklılıklar ve tedaviye yanıtındaki farklılıkları baz alındığında tek bir tedavi türünün tüm alt sınıflar için uygun olmadığı görülmüştür (Groen et al., 2014).

Klinik semptomlarının anlaşılması zor olduğundan over kanserini erken evrede teşhis etmek kolay olmamaktadır. Erken evrede teşhis edildiğinde 5 yıllık sağ kalım süresi yaklaşık %92 olarak belirlenmiştir. Over kanserinin teşhisi için transvajinal ultrasound, manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi ve pozitron emisyon tomografisi gibi yöntemler kullanılır ve bazı biyokimyasal taramalar yapılır. Over kanser hücreleri farklı histolojik sınıflardan oluştuğu için hücrelerden farklı biyobelirteçler eksprese edilebileceğinden çoklu tümör biyobelirteci taraması yapılarak over kanseri teşhis edilmelidir. CA125 proteini ve kullanımı henüz yaygınlaşmayan HE4 proteini over kanseri biyobelirteçlerindendir (Su et al., 2013).

1.1.1 Over kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları

Over kanseri tedavisinde evreye göre tedavi yaklaşımlarında farklılıklar mevcuttur. Günümüzde erken evredeki over kanserlerinin tedavisinde platin bileşikleri ve taksanlar kombine olarak kullanılmaktadır. Tedavide karboplatin ve paklitaksel

kombinasyonu her üç haftada bir altı döngü olacak şekilde uygulanmaktadır. Ancak bu tedavi modelinin yanı sıra, intraperitoneal uygulama, idame tedavi ve başka ilaçlarla da tedavi modelleri araştırılmaktadır (Harries and Gore 2002; Donato et al., 2006).

Erken evrede teşhis edilip tedavi görmüş olmasına rağmen gerek cerrahi girişim gerekse de daha önce uygulanan kemoterapiden yeterince faydalanılamaması sonucunda over kanserinde tekrarlama durumu söz konusu olabilir. Tekrarlayan over kanseri tedavisine yaklaşım ise ilk kez tespit edilenden daha farklıdır. Bu yaklaşımda platin ve taksanlardan yanıt alınamamış olmasına bağlı olarak topotekan, etoposid, PEG bağlı lipozomal doksorubisin, gemitabin, epirubisin, oksaliplatin, vinorelbin, hormon replasman tedavisi, monoklonal antikorlar ile kombine tedavi ve gen tedavisi gibi farklı tedavi modelleri denenmektedir (Harries and Gore, 2002; Donato et al., 2006). Önceki tedaviden 6 ay sonra tekrarlayan over kanserinde uygulanan platin ve taksan dışı yeni ilaçlara cevap yüzdesi Tablo 1.1’de verilmektedir. İlaçlara yanıtın düşük olması nedeniyle ileri evre ve tekrarlayan over kanseri için yeni tedavi stratejileri geliştirilmelidir (Itamochi and Kigawa, 2012).

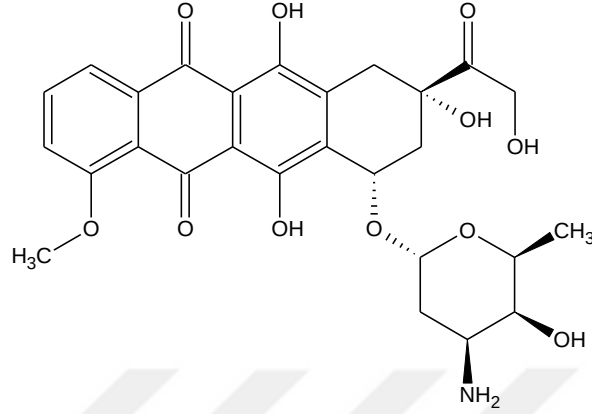
Tablo 1.1 Tekrarlayan over kanserinde uygulanan ilaçlar ve bu ilaçlara yanıt veren hasta yüzdesi (Harries and Gore, 2002).

İlaç	İlaçlara cevap yüzdesi (%)
Etoposid	16-27
Topotekan	12-16
Lipozomal doksorubisin	19-26
Gemitabin	13-22
Epirubisin (düşük ve yüksek doz)	14-20
Dosetaksel	28
Oksaliplatin	17
Vinorelbin	21

1.1.1.1 Doksorubisin

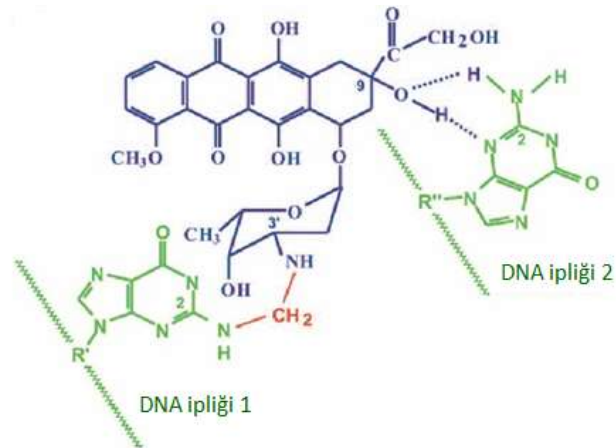
Antrasiklin bir ilaç olan doksorubisin meme, akciğer, gastrik, over, tiroid, yumuşak doku kanserleri, non-Hodgkin’s ve Hodgkin’s lenfoma, multipl miyeloma, ve pediyatrik kanserler dahil olmak üzere pek çok kanser hastalığının tedavisinde gerek

tekli gerek kombinasyonlu biçimde kullanılmaktadır (Thorn et al., 2011). Şekil 1.1’de gösterildiği gibi yapısında tetrasiklin halkası ve bu halkaya glikozidik bağ ile bağlı daunozamin şekeri içerir. Doksorubisin *Streptomyces peucetius* türünden elde edilebilmektedir.



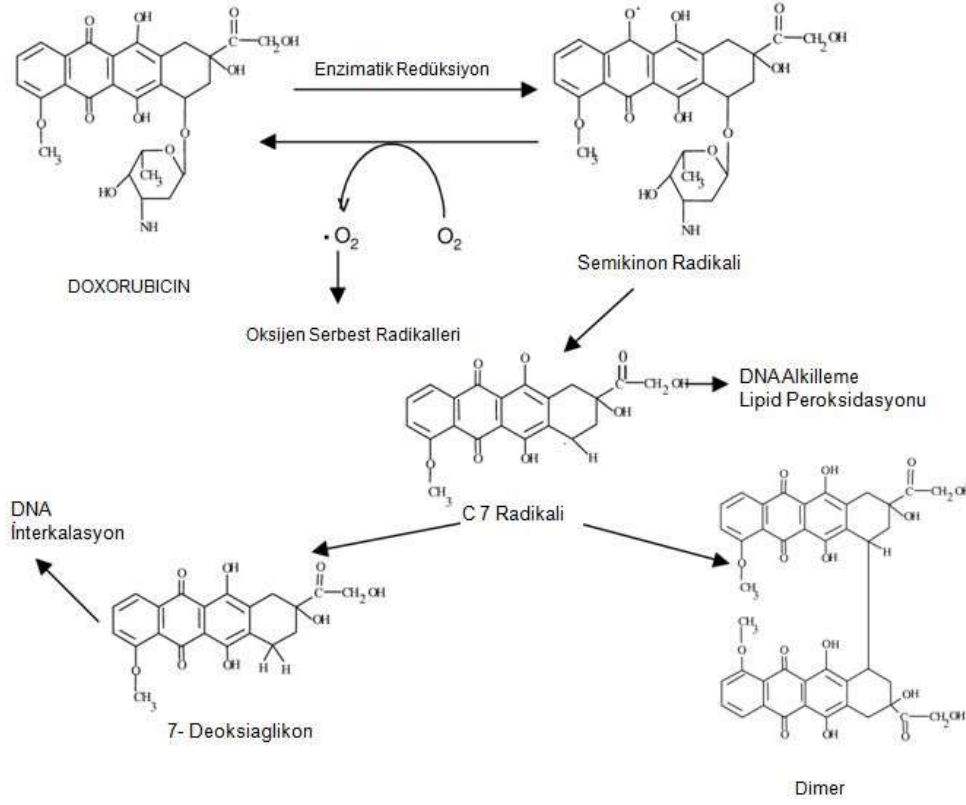
Şekil 1.1 Doksorubisinin kimyasal yapısı.

Doksorubisinin kanser hücreleri üzerinde temel iki etki mekanizması vardır. Bunlardan ilki ilacın DNA baz çiftleri arasına girmesi ve topoizomerez-II aracılı DNA tamirinin bozulmasıdır (Thorn et al., 2011). Doksorubisin, Şekil 1.2’de görüldüğü gibi her iki iplikteki guanin bazının NH_2 artışıyla etkileşir, bir iplikteki guanin bazıyla kovalent bağ kurarken diğer iplikteki baz ile hidrojen köprüleri kurar ve kovalent bağı stabilize eder. İnterkalasyon tekli ve ikli ipliklerin kırılmasına yol açar (Waterhouse et al., 2001).



Şekil 1.2 Doksorubisinin DNA baz çiftleri arasına girmesinin 2D NMR ile gösterimi (doksorubisin yapısı mavi, metilen bağı kırmızı ve komplementer DNA iplikleri yeşil ile gösterilmektedir.) (Cutts et al., 2005).

İlacın ikinci etki mekanizması ise serbest radikal oluşumuna yol açmasıyla hücrede membran, DNA ve protein hasarına neden olmasıdır. Dokсорubisin stabil olmayan semikinon bileşiğine okside olup ardından dokсорubisin formuna geri dönerken serbest oksijen radikalleri yaratır (Şekil 1.3). Serbest radikaller, lipid peroksidasyonu, membran ve DNA hasarı ve oksidatif strese neden olur. Ayrıca hücre apoptotik yolağı tetiklenir (Thorn et al., 2011).



Şekil 1.3 Dokсорubisinin metabolik aktivasyonundaki serbest radikal reaksiyonları (Jung and Reszka, 2001).

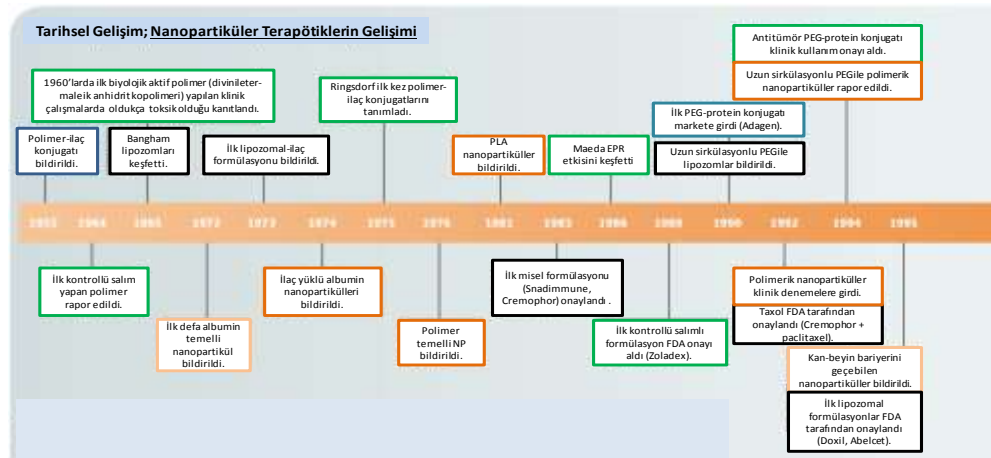
Dokсорubisinin kardiyotoksisite, myelosupresyon gibi istenmeyen birçok yan etkisi vardır ve bu durum ilacın oldukça dar bir terapötik indekse sahip olmasına yol açar. El ayak sendromu, ağız enflamasyonu, gastrointestinal problemler, saç dökülmesi diğer yan etkileri arasındadır. İstenmeyen bu etkilerin yanı sıra bir diğer önemli konu ilaç dirençliliğidir. Birçok kanser hücresi bir P-gp substratı olan dokсорubisine duyarlıdır. İlacın terapötik aktivitesini artıran ve sağlıklı dokular üzerindeki yan etkilerini azaltan formülasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Lipozomal dokсорubisin (Myocet™) ve PEG bağlı lipozomal dokсорubisin (Doxil®, Caelyx®) klinik kullanım için onay almış formülasyonlardır. Çok sayıda araştırma gerek prelinik gerekse faz çalışmaları içerisinde yer almaktadır. (Ak, 2010).

1.2 Nanopartiküler İlaç Taşıma Sistemleri

Son 30 yılda nanoteknolojide yaşanan gelişmeler neticesinde ilaç taşıyıcısı olarak nanopartiküler sistemler öne çıkmıştır. Nanopartiküller genel anlamda boyutları 1-1000 nm arasında değişen taşıyıcı sistemlerdir. Terapötik ve diyagnostik tanı amacıyla kullanılmalarının yanı sıra teranostik amaçla da kullanılabilirler (Petros and DeSimone, 2010; Mukerjee et al., 2012).

Kanser tedavisinde kullanılan konvansiyonel ilaçların seçiciliklerinin düşük olmasına bağlı olarak kanserli dokunun yanı sıra sağlıklı dokulara zarar verdiği bilinmektedir. Öte yandan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler tümör dokunun artan geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisine bağlı olarak tümörde birikmeye eğilimlidir. Taşıyıcı sistem tümörlü dokuda ilaç konsantrasyonunu artırırken sağlıklı dokuya daha az ilaç ulaşmasına bağlı olarak yan etkileri azaltabilmektedir. Nanopartiküller yüksek terapötik etki sağlayabilme, toksisiteyi azaltabilme ve zor çözünen ilaçları hedef bölgeye taşıyabilme gibi üstün özelliklere sahiptir (Wang et al., 2011).

FDA tarafından onay alan ilk nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem lipozomal sistemler olmuştur. 1995 yılında lipozomal doksorubisin (Doxil) HIV ile ilişkili Kaposi Sarkoma ve sonrasında over kanseri ve multipl miyelom tedavisi amacıyla onay almıştır. Ardından fungal enfeksiyonlara yönelik lipozomal Amfoterisin B (AmBisome) ve cerrahi girişim sonrasında analjezik amacıyla lipozomal morfinin (DepoDur) kullanımı onaylanmıştır. Lipozomal sistemlerin yanı sıra polimer ilaç konjugatları da ilaç pazarına sunulmuştur (Petros and DeSimone, 2010). Nanopartiküllerin tarihsel gelişimine ilişkin bazı bilgiler özet halinde Şekil 1.4'te görülmektedir.



Şekil 1.4 Nanopartiküler ilaç sistemlerinin tarihsel gelişimi (Petros and DeSimone, 2010).

Kanser tedavisine yönelik ilaç taşıyıcı sistemler farklı şekillerde tasarlanabilmektedir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler arasında lipozomlar, miseller ve dendrimerler ile polimerik, metal (inorganik), solid lipid, silika ve karbon nanopartiküller gibi yapılar yer almaktadır (Wang et al., 2012; Wilczewska et al., 2012). Bunların dışında immün sistemden kaçarak daha biyouyumlu yapılar elde edilmesi amacıyla son yıllarda önem kazanmış biyomimetik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerle de çalışılmaktadır (Meyer et al., 2015).

Lipozomlar, fosfolipid, steroid ya da sürfaktanlar kullanılarak sulu ortamda lipit çift tabaka halinde hazırlanan ve boyutları genellikle 80- 300 nm arasında değişen nano/mikropartiküler veya kolloidal sistemlerdir. Lipozomlar ilaçların çözünürlüğünü ve terapötik indeksini arttırabilmektedir. Solid lipid nanopartiküller, çeşitli sürfaktanlar ile stabilize edilmiş yüksek saflıkta trigliseritler, kompleks gliserit karışımları ya da vakslar kullanılarak sentezlenmektedir. Fiziksel stabiliteleri oldukça yüksek olan solid lipid nanopartiküller ilaçları degradasyona karşı korumakta ve ilacın kontrollü salımını sağlayabilmektedir. Miseller amfifilik moleküllerin iç kısımda hidrofobik grup dış kısımda ise hidrofilik grup olacak şekilde kendiliğinden tabakalaşan yapılarıdır. Miseller ile özellikle hidrofobik ilaçların taşınımı sağlanır. Dendrimerler yüksek derecede dallanmış monodispers özellikteki yapılardır. Fonksiyonelleştirilebilen uçlarına ilgili moleküller bağlanarak hedef dokuya yönlendirilebilir. Metalik nanotaşıyıcılar genellikle altın, titanyum veya demir gibi inert materyallerden sentezlenmektedir. Ancak bu yapılar biyouyumlu ve inert olmasına karşın tekrarlı uygulamalarda vücut içerisinde birikme eğiliminde olabilirler. (Wilczewska et al., 2012; Steichen et al., 2013; Wang et al., 2012). Polimerik nanopartiküller daha ayrıntılı biçimde aşağıdaki başlıkta (1.2.1) açıklanmaktadır.

1.2.1 Polimerik nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, biyouyumlu ve biyobozunur polimerler kullanılarak sentezlenmekte ve boyutları genellikle 10-100 nm arasında değişmektedir (Wilczewska et al., 2012). Polimerik nanopartiküller, karakteristikleri ve yüzey kimyası değiştirilerek kontrollü ilaç salımı ve hastalığa spesifik lokalizasyon sağlaması amacıyla üretilebilir (Singh and Lillrad, 2009). İlaçlar polimerik nanopartiküllerin yüzeyine kimyasal olarak bağlanabilir ya da nanopartikül içerisine enkapsüle edilebilir ve hedef dokuda desorpsiyon, difüzyon ya da yüzey erozyonu yoluyla salınabilir (Wilczewska et al., 2012).

Polimerlerde genel olarak aranılan biyolojik özellikler, polimerin biyolojik çevreye uyumlu olması, dokuyla temas ettiğinde inflamasyona yol açmaması, kanserojen veya teratojen etki göstermemesi ve toksik olmamasıdır. Polimer sistemlerde bulunması istenilen özelliklerin başında gelen biyolojik uyum, polimerin vücutta kaldığı sürece bulunduğu yerde olumsuz etki göstermemesidir. Polimerin toksisite sorunu ise, genellikle üretimi ve işlenmesi sırasında kullanılan (katalizörler, yüzey etkin maddeler, stabilizörler vb.) veya yapıya katılan (plastikleştiriciler ve diğer katkı maddeleri) maddeler, çevreden karışan kirlilikler ve yapıda polimerleşme sırasında kalan monomerlerden kaynaklanmaktadır. Protein bazlı polimerlerin sakıncası antijenik yanıtlar iken, biyolojik olarak parçalanmayan sentetik polimerlerin en önemli sakıncaları ise kronik toksisite riskidir. Hazırlama sırasında sentezlenen polimerler toksik özellikte olan monomerlerin kalabilme olasılığı nedeniyle çok fazla tercih edilmezler (Ağabeyoğlu; Gürsoy'dan 2002).

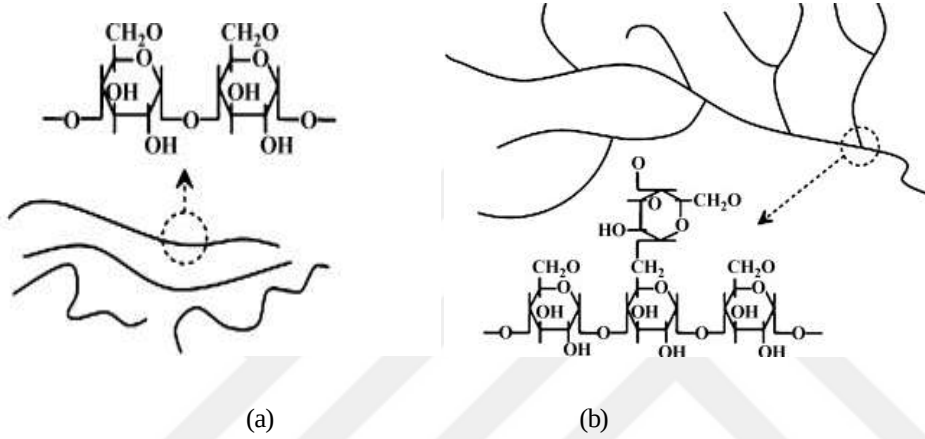
Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında doğal ve sentetik polimerler kullanılmaktadır. Doğal polimerler, proteinler (albumin, jelatin vb.) ve polisakkaritler (aljinat, kitosan, dekstran, nişasta vb.) olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Sentetik polimerler ise önceden sentezlenen (polianhidrit, polikaprolakton, poli(laktik asit), poli(laktik-ko-glikolik asit) vb.) veya hazırlama sırasında sentezlenen polimerleri (poli(siyanoakrilat) vb.) içermektedir (Kaş; Gürsoy'dan, 2002). Tablo 1.2'de literatürde yer alan bazı polimerik nanopartiküllere ait örnekler verilmektedir (Wilczewska et al., 2012).

Tablo 1.2 Doğal ve sentetik polimerler kullanılarak hazırlanan bazı polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler (Wilczewska et al., 2012).

İlaç	Terapötik aktivite	Nanotaşıyıcı
5-Fluourasil	Antikanser ilaç	Kitosan-g-poli(N-vinil kaprolaktam)
Doksorubisin	Antineoplastik ajan	PEGlenmiş polilaktik-ko-glikolik asit
Mitomisin C	Kemoterapötik ajan	Kitosan, kitosan-polikaprolakton, poli L-lizin-polikaprolakton
Rifampisin	Antitüberküler ilaç	Jelatin
Siklosporin A	Siklik polipeptid	Gliseril monooleat/poloksamer 407 kübik nanopartiküler
Takrin	Anti Alzheimer ilaç	Kitosan

1.2.1.1 Nişasta

Nişasta bitkilerde en bol bulunan depo polisakkarit olup besinlerle vücuda en fazla alınan karbohidrat kaynağıdır. Nişasta bitkilerin yeşil yapraklarındaki kloroplastlarda veya tohum amiloplastlarında granüller halinde bulunur. Kimyasal olarak glukoz halkalarının α -D-(1-4) bağı ile bağlı olduğu amiloz birimi ve glukoz halkalarının α -D-(1-4) ve α -D-(1-6) bağları ile bağlı olan dallı amilopektin biriminden oluşmaktadır (Şekil 1.5). Doğal nişasta vücutta pankreas enzimleri tarafından parçalanabilmektedir (Rodrigues and Emeje, 2012).



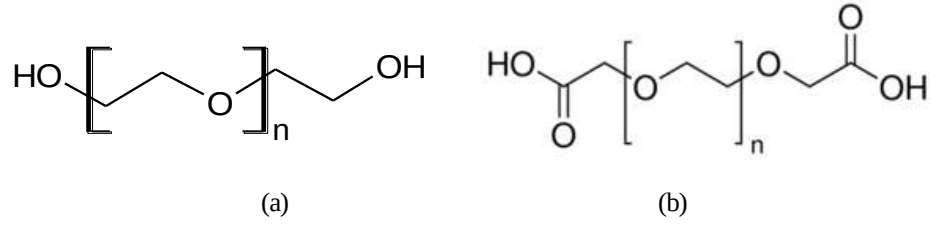
Şekil 1.5 Nişastanın kimyasal yapısı: (a) Amiloz birimi (b) Amilopektin birimi (Liu et al., 2009).

Nişasta biyobozunur ve biyoyumlu özellikte olup ilaç formülasyonlarında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Mikropartikül, mikrokapsül ve nanopartikül yapısında ilaç taşıyıcı olarak kullanıldığı gibi diğer polimerle beraber veya nişasta doku iskeleleri olarak kullanımları da mevcuttur. Düşük maliyetli bir biyopolimer olan nişastanın asit ortamında parçalanabilir olması hazırlama sırasında kullanımını sınırlandıran bir durumdur (Rodrigues and Emeje, 2012).

1.2.1.2 Polietilen glikol

Polietilen glikol (PEG), etilen oksit monomerlerinden oluşan bir polimer olup yapısı Şekil 1.6a'da gösterilmektedir. Polietilen glikol suda ve birçok organik çözügede yüksek oranda çözünür ve her bir etilen oksit ünitesi 2-3 tane su molekülü ile koordine olarak aynı molekül ağırlığındaki globuler bir proteine göre hidrodinamik açıdan 5-10 kat daha fazla büyüyebilir. Hidrate form sayesinde bağlandığı ürünün çözünürlüğünü artırır, agregasyon ve immunojeniteyi azaltır. PEG bağlama için piyasada monofonksiyonel, homo-/heterobifonksiyonel farklı PEGilasyon ajanları

bulunmaktadır (Kolate et al., 2014). Şekil 1.6b’de yapısı gösterilen PEG diasit homobifonksiyonel PEG bileşiğine bir örnektir.



Şekil 1.6 a) Polietilen glikol b) Polietilen glikol diasitin kimyasal yapısı.

Toksik özellikte olmayan polietilen glikolün insanlarda kullanımı FDA tarafından onaylıdır (Kolate et al., 2014). Polietilen glikolün vücut içerisindeki metabolizması hakkında sınırlı bilgi olmakla beraber, bir dereceye kadar sitokrom P-450 oksidasyonuna uğrayarak keton, ester ve aldehit grupları oluşturduğu tahmin edilmektedir (Ak, 2010). Biyomedikal ve farmasötik alanda PEG sıklıkla kullanılmaktadır. Tablo 1.3’te piyasada bulunan PEG ile bağlanmış bazı ürünler gösterilmektedir. PEG veya PEG bazlı taşıyıcı sistemler vücut içerisinde bazen istenmeyen etki olarak hipersensitivite reaksiyonlarına neden olabilmektedir (Kolate et al., 2014).

Tablo 1.3 Piyasada bulunan PEGlenmiş ürünler (Kolate et al., 2014).

Ticari Adı	Firma	Endikasyon	İçerik
Adagen	Enzon	Kombine immunoyetersizlik	PEGlenmiş adenosin deaminaz
Doxil/caelyx	Ortho Biotech/ Schering-Plough	Kanser	PEGlenmiş lipozomal doksorubisin
Mircera	Roche	Anemi bağımlı kronik böbrek hastalığı	PEGlenmiş eritropoetin
Oncaspar	Enzon	Akut lenfoblastik lösemi	PEGlenmiş L-asparaginaz
PEGASYS	Hoffman-La Roche	Hepatit B ve Hepatit C	PEGlenmiş interferon alfa
Pegloticase	Savient	Gut hastalığı	PEGlenmiş ürikaz
Somavert	Pfizer	Agromegali	PEGlenmiş insan büyüme hormonu mutein antagonisti

1.2.2 Biyomimetik ilaç taşıma sistemleri

Biyomimetik sistemler biyolojik fonksiyonu taklit edebilen ve terapötik amaçla dizayn edilebilen yapılardır. Biyomimetik partiküller hücre fonksiyonunu düzenleyebilir, doku rejenerasyonuna katkıda bulunabilir veya geleneksel partiküllere göre daha fazla ilaç taşınımı sağlayabilir. Biyomimetik sistemler kimyasal kompozisyon, üç boyutlu yüzey protein sunumu ve membran akışkanlığı dahil olmak üzere biyolojik yüzeylerin doğal kimyasal ve biyolojik özelliklerini taklit edebilen yapılardır. Apoferritin nanokafesler ve insan serum albumini nanopartikülleri biyomimetik sistemlere örnektir. Bu gibi yapıların dışında yapay hücre membranlarının geliştirilmesi ve uygun yüzey modifikasyonlarının gerçekleştirilmesi gelecekte beklenen teknolojik gelişmeler arasındadır (Meyer et al., 2015).

Biyomimetik tasarlı terapötiklerin dizaynında bottom-up ve top-down yaklaşımları kullanılmaktadır. Bottom-up yaklaşımında partikül yüzeyinin biyouyumlu materyallerle kaplanması ve/veya lipid tabaka içerisine partiküllerin enkapsüle edilmesi yöntemleri ile biyolojik yapı taklit edilmeye çalışılmaktadır. Öte yandan daha yeni olan top-down yaklaşımında partiküller hücre membranları içerisine enkapsüle edilmektedir. Eritrosit veya lökosit hücreleri içerisine terapötik partiküllerin enkapsülasyonu bu yaklaşıma örnek olarak verilebilir (Meyer et al., 2015).

1.2.2.1 Eritrositler ve eritrosit membran vezikülleri

Eritrosit, lökosit, platelet, hepatosit ve fibroblastlar ilaç ve diğer biyoaktif ajanlar için potansiyel hücresel taşıyıcılar olarak önerilmektedir. Bu taşıyıcılar endojen hücreler olduğundan vücutta antijenik cevap yaratmamaktadırlar. Taşıyıcı hücrelerin hasar görmesi veya yaşlı olması durumunda ise doğal prosesle makrofajlar tarafından sirkülasyondan uzaklaştırılırlar. Ayrıca depolama koşulu ve ilaç yükleme metoduna bağlı olarak kişiye tekrar verilmeden önce birkaç saat yada gün 4°C’de saklanabilirler (Hamidi et al., 2007).

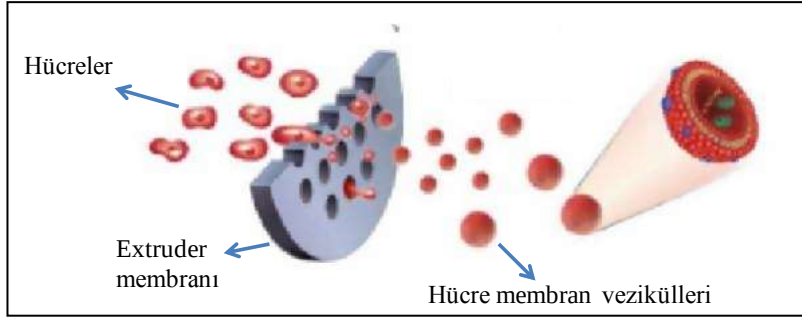
İlaç taşıma potansiyeli açısından bugüne kadar yapılan çalışmalarla özellikle eritrositler dikkati çekmektedir. Küçük hacimlerdeki eritrositlere yüksek miktarlarda ilaç yüklenebilmekte ve retiküloendotelyal sistem organları veya diğer bölgelere hedeflendirilebilmektedir. Eritrositlerin sirkülasyondaki ömrünün 120 gün olduğu bilinmektedir. Uygun koşullarda ilaç ile yüklenen taşıyıcı eritrositlerin ömrü normal eritrositler ile kıyaslanabilecek kadar uzun olabilmektedir. Ancak hazırlama sırasında eritrosit yapısında meydana gelebilecek modifikasyon taşıyıcının sirkülasyondan hızlıca

uzaklaştırılmasına neden olur. Ayrıca hücreler kan orijinli olduğundan taşıyıcının hazırlanması sırasında kontaminasyon riski de vardır (Hamidi et al., 2007).

Farmasötik ajanlar eritrositler içerisine temel olarak enkapsülasyon veya membran yüzeyine bağlama yoluyla yüklenebilmektedir. Enkapsülasyon metodunda daha çok osmoz, kimyasal veya elektroporasyon bazı teknikler uygulanmakta, membran yüzeyine bağlama metodunda ise genellikle avidin-biyotin teknolojisi kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda eritrositlere peptitler, proteinler, nükleotidler ve birçok terapötik ajanın yüklendiği bildirilmiştir (Hamidi et al., 2007).

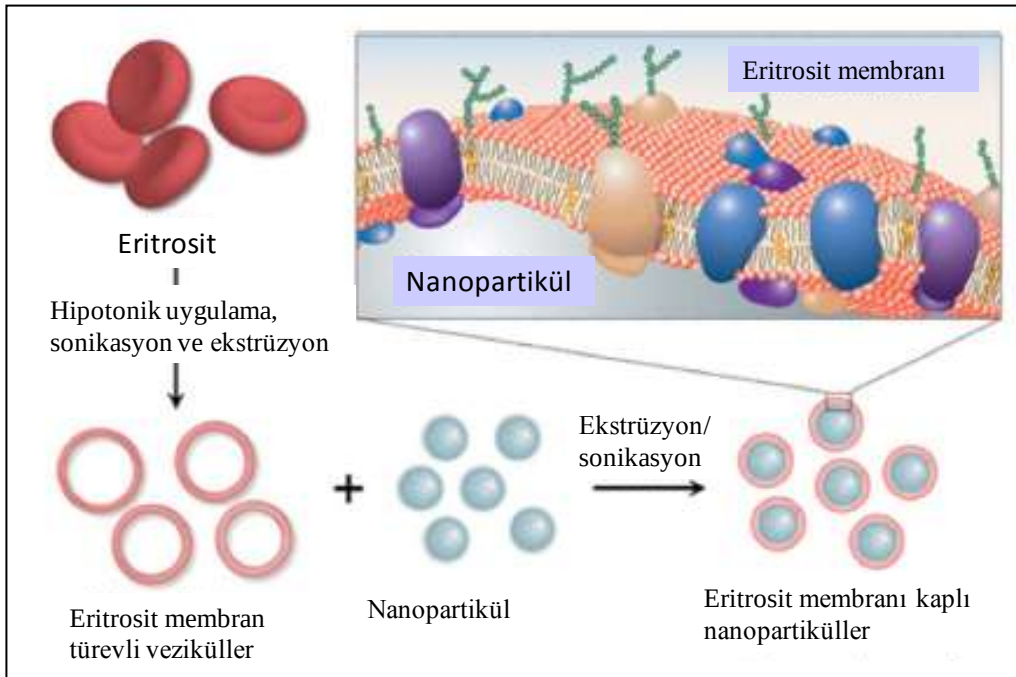
Moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler ile araştırmacılar tarafından eritrosit fonksiyonlarını ve yapısını taklit edebilen taşıyıcı sistemler dizayn edilmeye başlanmıştır. Eritrosit hücrelerinin mekanobiyolojik olarak bikonkav şeklini ve esnekliğini yansıtabilen çalışmalar yapılmaktadır (Hu et al., 2012). Ayrıca eritrositlerin biyokimyasal karakteristiği dikkate alınarak da yapılan çalışmalar mevcuttur. Bir transmembran proteini olan CD47 proteinleri bulunduğu eritrosit veya kanser hücrelerinin fagositozunu engeller, antienflamatuar özellik taşımasını sağlar ve *in vivo* dolaşımında kalmasına katkıda bulunur. Biyomimetik özellik kazandırma amacıyla rekombinant CD47 proteininin sentetik yüzeylere bağlandığı çalışmalarda uygun olmayan yüzey protein yoğunluğu ve oryantasyonunun partiküllerin biyomimetik özelliğini kaybettirdiği görülmektedir (Hu et al., 2013).

Hücre membran türevli veziküllerin nanoboyutlu ve doğal yapıda olduğu bilinmektedir. Memeli hücrelerinden ekstrasellüler sinyalleme amacıyla salınan 40-100 nm boyutlu ekzosomların ilaç taşıyıcı gibi farklı biyolojik amaçlar için kullanılabileceği öne sürülmektedir. Ayrıca hücre membranlarından da yapay olarak membran vezikülleri hazırlanabilmektedir. Doğal olarak salınan veziküllere kıyasla yapay olarak hazırlanan membran vezikülleri daha büyük ölçekte elde edilebilmektedir ve yapay olarak hazırlanan veziküllere büyük bir avantaj sağlamaktadır. Eritrosit membran vezikülleri, eritrosit hücre membranlarının kolaylıkla elde edilebilir olması ve eritrositlerin önemli biyolojik özellikleri nedeniyle en çok dikkati çeken veziküllerdir. Bir diğer adı nanoeritrozomlar olan eritrosit membran vezikülleri fiziksel yoldan belirli por çaplı membranlar kullanılarak ekztrüzyon yoluyla hazırlanabilmektedir (Gao et al., 2013). Nanoeritrozomlar eritrositlere göre yüzey alanı/hacim oranının daha fazla olması ve içerisine daha yüksek oranda farmasötik ajan yüklenebilmesi gibi avantajlara sahiptir. Ekztrüzyon yoluyla hücre membran veziküllerinin hazırlanışı Şekil 1.7'de şematize edilmektedir.



Şekil 1.7 Ekstrüzyon yoluyla hücre membran veziküllerinin hazırlanışı.

Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda nanopartiküllerin eritrosit membran vezikülleri içerisine enkapsüle edilmesiyle hem eritrosit taşıyıcılarının hem de nanopartiküllerin avantajlarını kapsayan yeni biyomimetik hibrid nanotaşıyıcılar geliştirilmiştir (Şekil 1.8). Elde edilen bu nanoyapıların ilaç taşıyıcısı olarak büyük potansiyele sahip olduğu bildirilmektedir. Ayrıca hücre membran vezikülleri ve nanopartiküllerin ayrı hazırlanıyor olması da teknolojik açıdan bir avantajdır (Gao et al., 2013). Biyomimetik sistem biyolojik materyal içerdiğinden kontaminasyona engel olunması için sterilizasyona dikkat edilmelidir (Hu et al., 2012). İlk defa 2011 yılında yapılan bir çalışmada PLGA nanopartikülleri eritrosit membran vezikülleri ile kaplanmıştır ve sirkülasyonda uzun süre kalabildiği belirtilmiştir (Hu et al., 2011). İlerleyen zamanlarda eritrosit membran türevli nanotaşıyıcıların daha geniş uygulama alanına sahip olacağı düşünülmektedir (Hu et al., 2012).

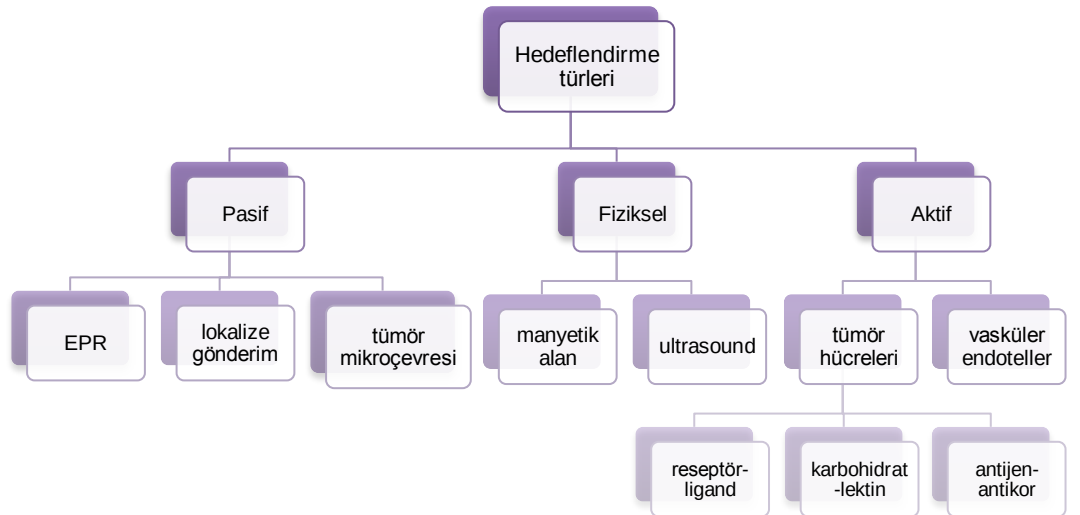


Şekil 1.8 Eritrosit membran vezikülleri kaplı nanopartiküllerin oluşturulma işlemi (Gao and Zhang, 2015).

1.3 İlaç Taşıma Sistemlerinin Kanser Tedavisine Yönelik Hedeflendirilmesi

Nanoboyutlu ilaç taşıma sistemleri antikanser ilaçların çözünürlük ve kimyasal stabilite problemlerini ortadan kaldırarak biyoyararlanımlarını artırır ve ilaçların farmakokinetiklerini değiştirerek biyodegradasyonu ve vücuttan kısa süre içerisinde atılımını engeller. İlaç taşıma sistemleri yapısındaki ilacı uyarı (pH, ultrases vb.) duyarlı olarak salacak şekilde tasarlanabilir. Ayrıca nanotaşıyıcılara yüklenen antikanser ilaç direnç mekanizmalarından kaçabilmektedir (Wicki et al., 2015).

Nanotaşıyıcılar pasif, aktif ve fiziksel hedefleme stratejileri ile ilacı hedef dokuya taşıyabilmektedir. İlacın vücuttaki dağılımı nanotaşıyıcının fizikokimyasal özelliklerine ve tümör dokuya penetrasyonuna ile ilişkilidir (Wicki et al., 2015). Hedeflendirme türleri Şekil 1.9’ da şematize edilmektedir. Hedeflendirmenin amacı genel olarak konvansiyonel tedavide gözlenen olumsuzlukları elimine etmek ya da en aza indirmek, ilaçların dolaşımda ya da diğer biyolojik sıvılardaki konsantrasyonunu artırmak, ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini değiştirmek, düşük ya da yüksek dozlarda etkin ve güvenli tedavi sağlamaktır. Ayrıca toksik ve immunojenik özellikleri gidermek ya da en aza indirmek ve vücudun diğer bölgelerinde istenmeyen herhangi bir etkiye neden olmadan hedef bölgede uygun düzeyde farmakolojik yanıt elde etmek amacıyla hedeflendirme yapılmaktadır (Kaş ve Eldem; Gürsoy’dan 2002).



Şekil 1.9 Hedeflendirme türleri.(Ak G, 2010).

1.3.1 Pasif hedefleme

Pasif hedefleme yaklaşımında normal ve tümör damar sistemi arasındaki anatomik ve fonksiyonel farklılıklardan yararlanılarak ilacın tümör bölgesinde birikimi sağlanır. Tümör fizyoloji ve yapısındaki bu anormal durum artan geçirgenlik ve alıkonma etkisi (EPR) ile açıklanır. Malign dokuda kapiller endoteller boşluklu sıralıdır, bu yüzden normal endotellere göre makromoleküllere daha çok geçirgendir. Tümörün anatomik lokasyonuna göre komşu endoteller arası 100-800 nm boşluk vardır. Bu durum dolaşımdaki nanopartiküllerin boşluklardan tümör hücreleri arası dokuya geçişine izin verir. Ayrıca tümör dokusundaki zayıf lenfatik drenaj nedeniyle ilacın burada birikimi gerçekleşir (Vasir and Labhasetwar, 2005). İlaç sistemi EPR etkisiyle tümör dokuda 70 kat daha fazla birikebilmektedir. Nanotaşıyıcıların sirkülasyon süresi ve biyolojik bariyerleri geçebilmesi partikül şekli, boyutu ve yüzey karakteristiği gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır (Steichen et al., 2013).

Klinikte kullanılan PEGlenmiş lipozomal doksorubisin (Doxil/Caelyx) ve albumin nanopartiküllerine bağlı paklitaksel (Abraxane) gibi nanotaşıyıcı bazlı kanser terapötikleri pasif olarak hedefleme yapan ilk jenerasyon ilaç taşıma sistemleridir. Bu sistemler değişen fizikokimyasal özellikler nedeniyle yapıdaki ilacın farmakokinetiği ve biyodağılımını farklılaştırmaktadır (Wicki et al., 2015).

1.3.2 Aktif hedefleme

Aktif hedefleme nanotaşıyıcı yüzeyine yüksek affiniteli ligand bağlanarak sağlanır. Ligand molekülü hedef hücredeki reseptöre seçimli olarak bağlanır ve ilacın hücre veya intraselüler organellerde birikimini sağlar. Antikanser ilaç vasküler endotel hücreleri veya tümör hücrelerine aktif hedefleme yaklaşımı ile taşınabilir (Wicki et al., 2015). Şekil 1.10'da pasif ve aktif hedefleme yaklaşımları gösterilmektedir.

Vasküler endoteller anatomi ve hücre yüzeyindeki fonksiyonel reseptörler bakımından solid tümörlerden farklıdır. Tümör dokusu büyüme amacıyla yeni damar oluşumuna gereksinim duyar ve anjiyogeneze sayesinde metastaz yapabilir. Tümör hücreleri epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, vasküler endotelyal büyüme faktörü, vasküler endotelyal cadherin, interlökin-8 gibi çok sayıda anjiyogenik faktör salgılar ve bunların bazıları endotel hücre yüzeyindeki reseptörlere yüksek ilgi ile bağlanır. Anjiyogenik faktörlerin ligand olarak kullanılmasıyla endotel hücrelere aktif hedefleme yapılabilir (Ak, 2010).

Over kanserinde endotel hücre ve tümör hücre hedefli çeşitli nanotaşıyıcı sistemler ile araştırmalar yapılmaktadır. Bevacizumab vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörüne hedefli monoklonal antikör olup over kanseri kemoterapisinde standart kemoterapi yanında kullanımı onay almıştır. Ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü, epidermal büyüme faktörü reseptörü ve folat reseptörü hedefli bazı monoklonal antikörlerin faz çalışmaları devam etmektedir (Tomasina et al., 2013).

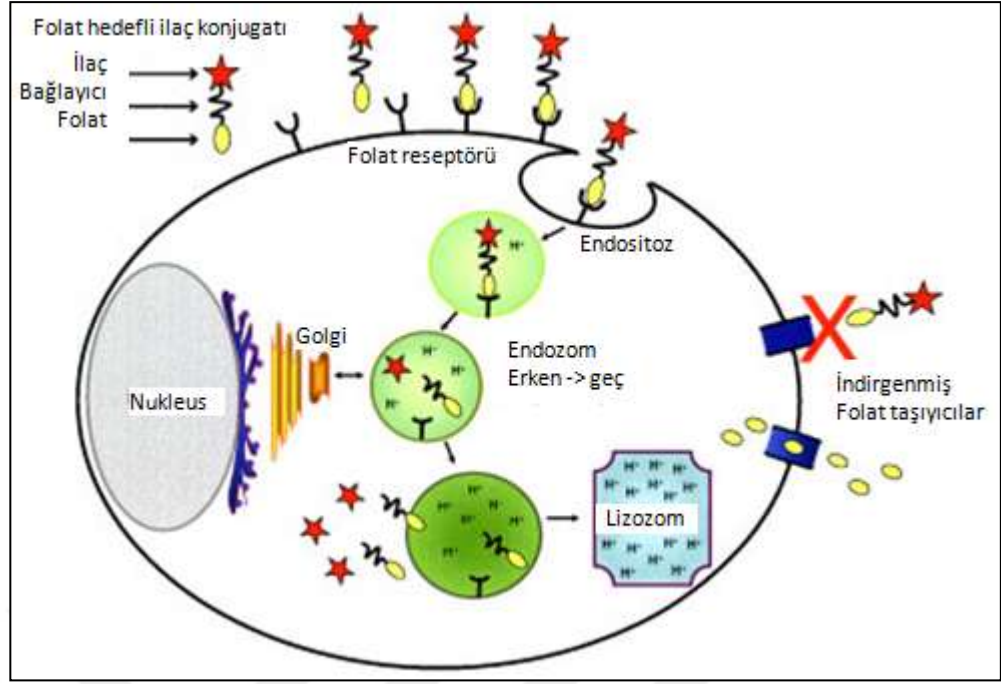
1.3.2.1 Folat reseptörü

Folat, hedefli ilaç taşıma sistemlerinde en çok yararlanılan ligandlardan biridir (Steichen et al., 2013). Küçük molekül kütlesi (441 g/mol), reseptörüne yüksek ilgi ile bağlanması, çeşitli solventlere olan dayanıklılığı, immunojenitesinin düşük olması ve bol bulunması nedeniyle çalışmalarda tercih edilmektedir (Tomasina et al., 2013).

Folatın hücre içine alımı düşük affiniteli indirgenmiş folat taşıyıcıları ($K_m \sim 1 \mu M$) ve yüksek affiniteli ($K_D \sim 100 \text{ pM}$) glikozil fosfatidil inozitol bağlı folat reseptörleri (FR) ile gerçekleşir. İndirgenmiş folat taşıyıcıları vücut içerisinde tüm hücrelerde bulunurken FR'leri sınırlı bir dağılım gösterir. İndirgenmiş folat taşıyıcıları folik asitin indirgenmiş formlarını taşıırken FR'leri folik asit ve folat bağlı yapıları (kemoterapötikler, görüntüleme ajanları, lipozomlar, nanopartiküller vb.) hücre içine geçirebilir (Hilgenbrink and Low, 2005).

Folat reseptörünün α -izoformu çeşitli epitelyal hücrelerin apikal yüzeylerinde bulunur. FR- α kanser türlerinin % 40'ında aşırı miktarda eksprese edilir ve folat bağlı yapılara tamamen geçirgendir. FR- β aktive makrofajlarda ve hematopoietik orijinli malign hücre yüzeylerinde bulunur. Nukleotid biyosentezi için esansiyel bir vitamin olan folik asit proliferen hücrelerde fazla miktarda tüketildiğinden kanser hücrelerinde folat reseptörleri yüksek oranda eksprese edilir. Meme bezi, kolon, akciğer, prostat, burun, boğaz ve beyin kanser epitel hücrelerinde aşırı miktarda sentezlenen folat reseptörleri özellikle over kanserinde ilaç taşınması için oldukça uygun bir hedeftir (Ak, 2010; Tomasina et al., 2013).

Folat bağlı yapıların reseptör aracılı endositozu birkaç adımdan oluşmaktadır. Öncelikle konjugat reseptöre bağlanır, membran çöküntüsü oluşur ve endositik vezikül oluşturmak üzere sitoplazmaya girer. Endozomal kompartmanında asidifikasyon (pH ~ 5) gerçekleşir ve reseptörün konformasyon değiştirmesiyle konjugat reseptörden ayrılır, bilinmeyen bir mekanizma ile konjugat sitoplazmaya geçer. Reseptör membrana doğru yeniden kullanılmak üzere yol alır (Şekil 1.11). Kanser hücrelerinde FR'lerinin *in vivo* geri dönüşme süresi bir tur için 4 saatten 12 saate kadar değişebilir (Hilgenbrink and Low, 2005).



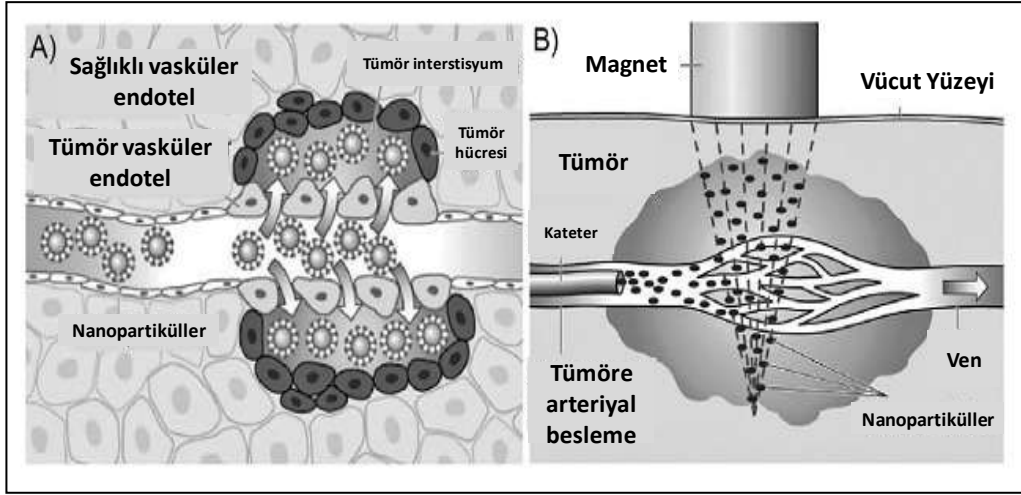
Şekil 1.11 Folat bağlı yapıların reseptör aracılı endositoz ile hücre içine alımı (Hilgenbrink and Low, 2005).

1.3.3 Fiziksel hedefleme

Uyarı duyarlı sistemler kanserli dokuda internal veya eksternal uyaranlara yanıt olarak yapısındaki ilacı saldığında ilacın belirli bir bölgeye hedeflenmesini sağlar. İnternal uyarılar pH, redoks ve iyonik şiddet olabilirken eksternal ya da fiziksel uyarılar sıcaklık, ışık, ultrasound, manyetik veya elektriksel alan olabilir. Bu sistemlerin avantajı kanserli dokuda oluşan veya bu dokuya uygulanan bir etkiye karşı yapısındaki ilacı salması ve ilacın sistemik dolaşıma kaçışının minimum düzeyde olmasıdır. Uyarı duyarlı sistemler ile bir çok çalışma ve faz araştırması mevcut olup hipertermi duyarlı lipozomal bir doksorubisin taşıyıcısının (ThermoDox) faz araştırmaları devam etmektedir (Wicki et al., 2015).

1.3.3.1 Manyetik alan ile hedefleme

Manyetik hedeflendirme yaklaşımı manyetik ilaç taşıyıcısına bağlı veya taşıyıcıya enkapsüle edilmiş bir terapötik ajanın intravenöz enjeksiyonu ve dışarıdan lokalize manyetik alan uygulamasıyla tümör dokusuna yönelmesini kapsar. Manyetik cevap veren ilaç taşıyıcıları genellikle magnetit, demir, nikel, kobalt vb. gibi materyaller içerir. (Ak, 2010). Şekil 1.12’de manyetik hedeflendirme yaklaşımı görülmektedir.



Şekil 1.12 Manyetik nanopartiküllerin tümöre hedeflendirilmesi (Arami et al., 2015).

Demir oksit nanopartiküllerinin bozunma ürünleri vücutta hemoglobinin, miyoglobinin ve ferritin yapısına katılabilmekte ve böylece demir metabolik yolu üzerinden elimine edilebilmektedir. Manyetik nanopartiküllerin hücre içi toksisitelerinin pek çoğu bozunma ürünlerinin reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturmaya bağlıdır. Yüksek ROS miktarı lipid peroksidasyonuna, DNA ve protein hasarına neden olabilir ve hücre apoptozu/ölümüne yol açar (Hajba and Guttman, 2016). Manyetik nanopartiküllerin toksisitesi ve biyoyumluluğu yüksek oranda yapısal özellikleri, dozajı, yüzey kimyası, uygulama yolu, biyobozunurluğu, farmakokinetiği ve biyodağılımı gibi parametrelere bağlıdır. İnsanlarda kullanımı FDA tarafından onaylı olan magnetit nanopartiküllerin biyoyumluluğu diğer manyetik nanopartiküllere kıyasla çok daha yüksek olup toksisitesi oldukça düşüktür (Arami et al., 2015).

Manyetik nanopartiküller farklı amaçlar için çeşitli metotlar kullanılarak hazırlanabilmektedir. Bunlar fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik metotlar olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Kimyasal metotlar kopresipitasyon, termal dekompozisyon, hidrotermal sentez ve poliol sentezi gibi teknikleri içermektedir (Arami et al., 2015).

Manyetik nanopartiküller biyomedikal uygulamalar için monodispers boyut dağılımına ve hedef bölgeye yönlendirmek amacıyla yüksek manyetik duyarlılığa sahip olmalıdır. Ayrıca manyetik alan uygulaması sonrasında manyetik karakteristiklerini yitirmeleri (süperparamanyetiklik) önemlidir (Arami et al., 2015). Tablo 1.4'te piyasada mevcut bulunan veya geliştirilmekte olan çeşitli manyetik demir oksit nanopartiküllerinin uygulama dozları, kandaki yarılanma ömürleri ile kullanım amaçları görülmektedir.

Tablo 1.4 Demir oksit nanopartiküllerinin hayvan ve insandaki uygulama dozları, kullanım amaçları ve kandaki yarılanma ömürleri (Arami et al., 2015).

Kaplama ajanı	İsim	Yük (mV)	Model	Doz (mg Fe/kg)	t _{1/2}	Uygulama
Dekstran	SPIO (AMI25)	-	Sıçan	0,224	6 dak	Genel MR uygulamaları
Dekstran (endorem)	Ferumoxides veya endorem	-	İnsan	0,56-0,84	2 sa	Karaciğer MR
Dekstran (sinerem)	USPIO sinerem	-	Sıçan	11,2	4,5 sa	Tümör MR
Dekstran 20 kDa	Amino-dextran SPIO micromod	-4,95 ile - 0,77 arası	Fare	4	5-60 dak	Protein adsorpsiyon analizleri
Karboksidedekstran	SHU 555 C (Resovist)	Anyonik	Sıçan	5,6	56± 7 dak	Enflamasyonlu barsak görüntülenmesi
Karboksidedekstran	Ferumoxitol (AMI7228)	Anyonik	İnsan Sıçan	<4 2,24	10-14 sa 67 dak	MR anjiyografi
Nişasta	FeO-BPA	-	Domuz Kemirgen	4 1-3	150 dak 45-100 dak	Abdominal MR anjiyografisi

2 . MATERYAL VE METOT

2.1 Materyal

Çalışmada kullanılan demir (III) klorür (FeCl_3) Riedel-de Haen (Hannover, Almanya); demir (II) klorür (FeCl_2), amonyum hidroksit (NH_4OH), sodyum hidroksit (NaOH), polietilen glikol (PEG) diasit [polietilen glikol bis(karboksi metil) eter] (Mn: 600 Da), sodyum hipofosfit, sükröz, triton X-100 Sigma (St. Louis, MO, ABD); nişasta Merck (Darmstadt, Almanya); doksorubisin (DOX) Chemos GmbH & Co. KG (Regenstauf, Almanya); folat-polietilen glikol- 1,2-distearoil-*sn*-glisero-3-fosfoetanolamin (folat-PEG-DSPE) (PEG Mn: 2000 Da) Nanocs Inc. (NewYork, ABD); fetal sıgır serumu (FBS) Biowest (Nuaille, Fransa); manyetik seperasyon kolonları (LS kolon) ve manyetik seperatör (Magnetic-activated cell sorting, MACS) Miltenyi Biotech (California, ABD) adlı firmalardan sağlandı. Deneylerde Millipore Q-POD (Burlington, MA, ABD) cihazından ultrasaf su temin edildi ve kullanılan diğer kimyasallar analitik saflıktadır.

Hücre kültürü deneylerinde kullanılan Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) ortamı, Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) ortamı, fizyolojik tamponlu çözelti (PBS) Lonza (Basel, İsviçre); %10 fetal sıgır serumu, %1 Penisilin-Streptomisin, 200 mM L-glutamin, % 0,25 Tripsin- EDTA Gibco (NewYork, ABD), dimetil sülfoksit (DMSO) Sigma (St. Louis, MO, ABD); 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ise Amresco (Ohio, ABD) markalarından temin edildi. A2780 (kat no. 93112519) insan over kanseri epitelyal hücre hattı ECACC; OVCAR3 (HTB-161TM) insan over adenokarsinoma epitelyal hücre hattı, SKOV3 (HTB-77TM) insan over adenokarsinoma epitelyal hücre hattı ve RAW 264.7 (TIB-71TM) *Mus musculus* lösemik monosit/makrofaj hücreleri ATCC'den satın alındı.

In vivo deneyler için 4-6 haftalık sağlıklı dişi CD1 fareler Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş. (Ankara, Türkiye)'den temin edildi.

2.2 Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Çalışmada manyetik hedeflemenin sağlanması amacıyla ilk olarak magnetit nanoyapılar sentezlendi. Magnetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin sentezi kopresipitasyon yöntemine göre gerçekleştirildi ve oluşan yapılar karakterize edildi. Sentez için biyopolimer (nişasta) içeren ve içermeyen ortamlarda denemeler yapıldı.

2.2.1 Magnetit nanoyapıların polimer içeren ortamda sentezlenmesi

Magnetit nanoyapıların nişasta içeren ortamda sentezlenmesi için Jiang ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışmadan (Jiang et al., 2009) yararlanıldı ve magnetit sentezi ve aynı anda nişasta ile kaplanması amaçlandı. Buna göre 6 g/ 40 mL konsantrasyondaki nişasta 80°C 'de ısıtılarak çözüldü. 24 mL 0,8 M FeCl₃ ve 0,4 M FeCl₂ tuzu azot gazı geçirilmekte olan 4 boyunlu balonda çözüldü. Demir iyonları çözüldükten sonra ortama karıştırma esnasında nişasta çözeltisi eklendi. Ardından 1,5 M NaOH çözeltisi damlatılarak pH 10-11 olacak şekilde ayarlandı. Başlangıçta elde edilen kiremit rengi karışım pH'nın alkali bölgeye gelmesi ile koyu kahve-siyah renge dönüştü. Nanopartiküllerin sentezlenmesi için 2 saat azot gazı altında reaksiyona bırakıldı. Süre sonunda 100 mL 0,1 M HCl çözeltisi ile yıkama işlemleri yapıp karışımın pH'ı 7 civarına getirilerek nötrale edildi.

2.2.1.1 Sıcaklık ve karıştırma hızının optimizasyonu

Nişasta varlığında magnetit sentezi için ilk olarak oda sıcaklığında ve 600 rpm karıştırma hızında reaksiyon kuruldu. Süre sonunda nötrale edilen örnek ultrasaf su ve etanol ile de yıkandıktan sonra 60°C'de etüvde (Mettler) kurutuldu. Örneğin morfolojik yapısı İzmir Yüksek Teknoloji Malzeme Araştırma Merkezi'nde bulunan taramalı elektron mikroskopunda (SEM) (Philips XL 30S FEG) hizmet alımı yoluyla incelendi (A örneği).

Magnetit sentez reaksiyonlarında sıklıkla sıcaklığın 60°C olarak uygulandığı görülmektedir. İkinci denemede reaksiyon sıcaklığı su banyosu kullanılarak 60 °C' de sabit tutulmuştur. Süre sonunda pH'ı 7 civarına getirilen karışım 5000 rpm'de 15 dak santrifüj edilerek pellet ve süpernatant B örneği ayrıldı. Pelletin bir kısmı ultrasaf su C örneği, bir kısmı da ultrasaf su ve etanol D örneği, ile yıkanarak tüm örnekler 60°C'de etüvde kurutuldu. Örnekler SEM ile incelenerek yapıları analiz edildi.

Elde edilen sonuçların değerlendirilmesiyle sonraki sentez işlemleri sabit sıcaklık sağlayan su sirkülatörü (Daihan WiseCircu), yüksek hızda karıştırma yapan mekanik karıştırıcı (Daihan WiseStir) ve ceketli, dört boyunlu reaksiyon kabının (Rettberg) birbirine bağlandığı sistem kullanılarak gerçekleştirildi. 60°C'ye getirilen reaksiyon kabı içerisinde azot gazı altında ve 3000 rpm karıştırma hızında reaksiyon gerçekleştirildi. Süre sonunda yapıdan bir miktar ayrılıp herhangi bir yıkama işlemi yapmadan oda sıcaklığında 15 saat jelleşme prosesi için bırakıldı. Süre sonunda pH'ı

nötral olduğu görülen örneğin bir kısmı kurutuldu (E örneği). Reaksiyon sonu (jelleşmeye bırakılmayan) üründen bir kısım alınıp içerisine ultrasaf su eklenerek 5000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi ve alt ve üst faz ayrıldı. Alt faz büyük agregatlar içerdiği düşünüldüğünden kullanılmadı. Üst fazın pH'ı yaklaşık 7 olarak bulunduğundan yıkama işlemi yapılmadan kurutuldu (F örneği). Kuruyan örneklerin SEM görüntüleri alındı. Ayrıca E örneğinin magnetit yapısını değerlendirmek için Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde bulunan fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR) ile analiz yapıldı. FTIR analizleri potasyum bromür pelletleri hazırlanarak gerçekleştirildi.

2.2.2 Magnetit nanoyapıların polimer içermeyen ortamda hazırlanması

Çalışmada magnetit nanoyapılar, alkali ortamda gerçekleştirilen kopresipitasyon yöntemine göre sentezlendi. İlk olarak çalışmada kullanılacak ultrasaf su, deoksijenlenmesi için azot gazından geçirildi. 0,1 M $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve 0,2 M $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ içerecek şekilde uygun tartımlar alınarak 60°C 'ye ısıtılan reaktöre aktarıldı ve 250 ml ultrasaf su eklendi. Çözelti azot gazı altında 3000 rpm'de mekanik karıştırıcı aracılığıyla karıştırılarak hazırlandı. Demir tuzlarının çözünmesiyle kahve-kiremit renkli çözelti elde edildi. Çözeltiye 1,5 M NH_4OH çözeltisi damlatılarak pH'ı 10-11 civarına getirildi. Bu esnada çözelti rengi koyu siyah hale geldi. Aynı koşullarda (60°C , 3000 rpm, azotlu ortam) 2 saat reaksiyona bırakıldı. Deney düzeneği ve elde edilen siyah renkli presipitat Şekil 2.1'de fotoğraflanmıştır. Süre sonunda içerik yaklaşık 0,1 Tesla kuvvetteki magnete tutularak dekanete edildi ve pH'ı nötrleşene kadar ultrasaf su ile yıkama yapıldı. Ardından etanol ile de yıkandı ve 60°C 'deki etüvde kurumaya bırakıldı. Kuruyan ve katılaştıran içerik havanda öğütülerek toz haline getirildi ve havayla temas etmeyecek şekilde oda sıcaklığında depolandı. Oluştan partiküllerin bağ ve fonksiyonel grupları FTIR ile; kristal yapıları İzmir Yüksek Teknoloji Malzeme Araştırma Merkezi'nde bulunan X-ışını kırınım cihazı (XRD) (Philips X'Pert Pro) ile; morfoloji ve boyutları ise SEM ile; core bölgeleri ve yine morfolojileri daha detaylı olarak Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan yüksek çözünürlüklü geçirimli elektron mikroskobu (HR-TEM) (JEOL JEM 2100F) ile analiz edildi. Ayrıca yapıların oda sıcaklığında ve 1,5 T manyetik alandaki manyetizasyonu TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü'nde bulunan titreşimli örnek manyetometresi (VSM) (LDJ Electronics 9600) ile; hidrodinamik çap ve sulu ortamdaki zeta potansiyeli Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD'da bulunan zetasizer cihazı (Malvern Zetasizer Nano SZ) ile; termal bozunma eğrisi ise Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya

Bölümü'nde bulunan termogravimetrik analiz (TGA) (Perkin Elmer Diamond TA/TGA) cihazı ile belirlendi.



(a)



(b)

Şekil 2.1 Magnetit nanopartiküllerin hazırlanışı a) 60°C' ye ısıtılan reaktörde azot gazı altında 3000 rpm hızda mekanik karıştırıcı aracılığıyla karıştırma düzeni, b) elde edilen siyah renkli manyetik yapılar.

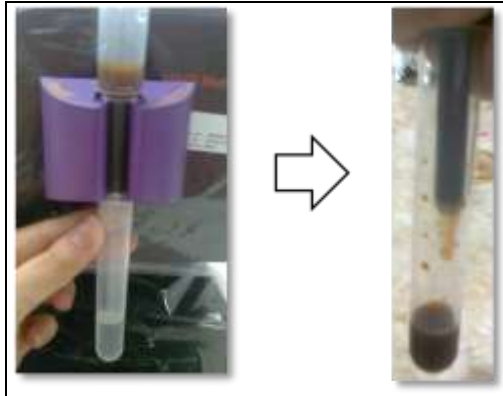
2.3 Manyetik Nanopartiküllerin Polimer ile Kaplanması ve Karakterizasyonu

2.3.1 Magnetit nanoyapıların nişasta ile kaplanması

Magnetit nanopartiküllerin nişasta ile kaplanması Kim et al., (2006) tarafından uygulanan yöntemle gerçekleştirildi. Yöntemde nişasta konsantrasyonu optimizasyonu için gerekli denemeler ve analizler yapıldı.

% 0,5, 1, 2, 3 (w/v) konsantrasyonlarında olacak şekilde nişasta tartılarak 120 mL ultrasaf su içerisinde 80°C' ye ısıtılarak çözüldü. Magnetitler 15 mL hacimde ve 50 mg/ml derişimde olacak şekilde sonik banyo (Elma Sonic) kullanılarak disperse edildi. Ardından nişasta çözeltisi 60°C' deki reaktöre alındı ve 3000 rpm hızda karıştırılmaya başlandı. Disperse edilen magnetit, nişasta içerisine eklendi. Karışım içerisine 75 mL 0,1 M NaOH çözeltisi ilave edilerek pH'ı 10-11 civarına getirildi. 2 saat reaksiyona bırakıldıktan sonra karışım beher içerisine alındı ve 15 saat oda sıcaklığında bekletildi.

Süre sonunda magnet aracılığıyla dekantasyon yapılarak karışım içerisindeki manyetik ve manyetik olmayan yapılar ayrılmaya çalışıldı. Elde edilen karakterizasyon sonuçları temel alınarak bu aşamaya dekantasyon yerine manyetik seperatör (MACS) kullanılarak devam edildi (Şekil 2.2). Yaklaşık 0,5 Tesla kuvvette ve 0,5-2 µm boyutlu manyetik beadler doldurulmuş kolon ayırma işlemine başlamak için düzenekteki magnet yüzeyine yerleştirildiğinde kuvvetinin birkaç kat arttığı bilinmektedir. Dolayısıyla kolon içerisinden geçirilen örnekteki manyetik olmayan yapılar ultrasaf su ile yapılan elüsyonda kolondan elüe olurken manyetik özellikli yapılar kolonda tutuldu. Kolon magnet yüzeyinden uzaklaştırıldığında ve yine elüsyon amacıyla su kullanıldığında kolonda tutulu manyetik nanopartiküller elüe olmuş oldu. Manyetik nanopartiküller eppendorf tüplerine toplandı ve 13000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Süre sonunda süpernatant atıldı ve pellet üzerine ultrasaf su eklenerek yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işlemi yine aynı koşullarda gerçekleştirildi. İşlem bittiğinde üst fazlar atıldı, pH 'nın nötr olup olmadığı kontrol edildi ve pellet bir araya getirilip toplandı. Nanopartiküllerin yapısındaki fonksiyonel grup analizi FTIR ve nişasta içeriği TGA analizi ile belirlendi. Optimum nişasta konsantrasyonunda hazırlanan örneğin morfolojisi SEM ve sulu ortamdaki hidrodinamik çapı zetasizer ile analizlendi.



Şekil 2.2 Karışım içerisindeki manyetik ve manyetik olmayan yapıların manyetik seperatör ile birbirinden ayrılması.

2.3.2 Nişasta kaplı magnetit nanoyapıların PEG diasit ile modifikasyon çalışmaları

Nişasta kaplı manyetik nanopartiküllerin hem çapraz bağlanması hem hidrofilik polimer ile dispersiyonun artırılması hem de sonraki aşamada doksorubisinin nanoyapılara bağlanması için spacer oluşturulması amacıyla nanopartiküller PEG diasit (M_n : 600 Da) ile reaksiyona sokulmaya çalışıldı. Bu amaçla Dastidar ve Netravali tarafından 2012 yılında yayınlanan nişastanın malonik asit ile çapraz bağlanması yöntemi modifiye edilerek kullanıldı (Dastidar and Netravali, 2012). % 0,5 (w/v) başlangıç konsantrasyonundaki nişasta ile kaplanan ve kolondan saflaştırılan magnetit dispersiyonunun demir içeriği Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme & Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi'nde bulunan indüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi (ICP-MS) ile belirlendi. Demir analizi üzerinden magnetit solüsyonunun konsantrasyonu hesaplandı. Nanopartikül: PEG diasit: Sodyum hipofosfit oranı 1:1:0,5 (w/w/w) oranını koruyacak şekilde nanopartikül solüsyonu reaktöre 70°C' deki reaktöre alındı ve 20 dakika boyunca karıştırıldı. Üzerine sodyum hipofosfit ilave edildi. 1 saat aynı koşullarda reaksiyona bırakıldı. Süre sonunda içerik 13000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi ve yıkama yapılması amacıyla pellet üzerine ultrasaf su ilave edilerek tekrar santrifüjlendi. Çöken nanoyapılarda PEG diasit varlığı FTIR ile belirlenmeye çalışıldı.

Elde edilen sonuçlarda PEG diasit varlığı görülmemesi üzerine nanopartiküllerin reaksiyona katı tartım şeklinde yani daha fazla miktarda ilavesine karar verildi. Nanopartikül:PEG diasit oranı 1:1 tekrar olmak üzere, 1:10 ve 1:100 oranları olacak şekilde reaksiyonlar kuruldu. Yukarıda anlatıldığı gibi işlemlere devam edildi ve FTIR analizi yapıldı. PEG diasit varlığını gösteren herhangi bir pik görülmemesi üzerine bir sonraki aşamada reaksiyon süresinin uzatılmasına karar verildi. Nanopartikül : PEG diasit oranı 1:100 seçilerek 6 saatlik reaksiyon gerçekleştirildi. FTIR ve TGA analizi ile yapıdaki PEG diasit varlığı tespit edilmeye çalışıldı. Gerek elde edilen nanopartiküllerin su içerisindeki dispersibilitesinin ekstruder uygulamalarında neredeyse değişmediğinin belirlenmesi gerekse FTIR ve TGA analizi sonuçlarında PEG diasitin oldukça düşük miktarda görülmesi üzerine uygulanan yöntemin değiştirilmesine karar verildi.

Magnetitlerin PEG diasitle etkileşebilirliğinin kontrolü amacıyla magnetitler nişasta ile kaplanmadan direk olarak PEGdiasit ile etkileştirildi. Bunun için Radovic ve arkadaşlarının kullandığı prodsedür uygulandı (Radovic et al., 2014) ve magnetit sentezi sırasında ortama eklendi. Daha önceki magnetit sentezinde kullanılan $FeCl_3$ ve $FeCl_2$ oranları sabit olmakla beraber ortama literatürde belirtilen $FeCl_3$ /PEG diasit: 10/1

mol oranını koruyacak şekilde PEG diasit ilave edildi. 1,5 M NH_4OH çözeltisi ile pH'nın 10 civarına getirilmesinin ardından karışım 60°C 'de ve 3000 rpm'de 2 saat karıştırıldı. Magnetitin karakteristiği olarak elde edilen siyah renkli presipitat manyetik dekantasyon yardımıyla ultrasaf su ile yıkandı. Yapının bir kısmı 60°C 'deki etüvde kurutuldu ve FTIR ve TGA analizi gerçekleştirildi. Kurutulmayan yapının ise su içerisindeki dispersiyonu ve extruder membranı ile filtrasyonu incelenerek bir sonraki aşama değerlendirildi.

2.3.3 Magnetit nanoyapıların nişasta ve PEG diasit ile aynı anda kaplanması

Nişasta ve PEG diasitin ortama aynı anda eklenmesinin magnetit partiküllere istenen özelliklerin kazandırılmasında etkili olup olmayacağının araştırıldı. Nişastanın magnetitlere optimum bağlandığı koşullarda ortama bir de PEG diasit eklendi. 0,6 g nişasta 120 mL ultrasaf suda çözüldü. 60°C 'deki reaktöre alınan nişastanın üzerine 5 g/10 mL ultrasaf su içerisindeki PEG diasit eklendi. 3000 rpm' de 10 dakika karıştırıldıktan sonra 10 mL magnetit solüsyonu eklendi. Ortamın pH'ı NaOH ile 10-11 civarına getirilerek 2 saat reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon sonunda nişastanın yapısal olarak yeniden düzenlenmesi için partiküller oda sıcaklığında 15 sa bekletildi. Ardından içerik 5000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek büyük agregatlardan uzaklaştırıldı. Ardından süpernatant manyetik ayırma kolonundan geçirildi ve manyetik olmayan yapılar karışımdan ayrıldı. Manyetik nanopartiküllere pH'ı 7 civarına gelene kadar 13000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek ultrasaf su ile yıkama yapıldı.

2.3.3.1 Magnetit miktarı optimizasyonu

Nişasta ve PEG diasit ile kaplanabilecek optimum magnetit miktarının belirlenmesi için reaksiyon karışımına 50 mg/mL konsantrasyondaki magnetit dispersiyonundan farklı hacimlerde eklendi. Magnetit/PEG diasit oranı (w/w) 1,5/10 olarak seçilerek 15 mL (750 mg) magnetit dispersiyonu ile gerçekleştirilen denemede yoğun agregat olduğu görüldü. Nişasta ile kaplanan magnetit miktarına denk gelen bu oran yerine magnetit/PEG diasit oranı (w/w) 1/10 olacak şekilde değiştirilip ortama 10 mL (500 mg) magnetit solüsyonu eklendi. pH 10-11 civarına getirilerek reaksiyona devam edildi. Reaksiyon karışımı Şekil 2.3'te fotoğraflanmıştır.



(a) (b)

Şekil 2.3 Magnetit/PEG diasit oranı (w/w) 1/10 olarak gerçekleştirilen a) nişasta ve PEG diasit kaplama reaksiyonu karışımı, b) reaksiyon sonunda elde edilen ürün.

Reaksiyon sonunda oluşan nanopartiküllerin dispersiyonu ve extruder membranı ile filtrasyonu araştırıldı. Nanopartiküllerin kolaylıkla disperse olduğu ve 100 nm por çaplı membrandan geçebiliyor olduğu bulundu ve daha yüksek ya da düşük magnetit miktarı ile optimizasyona devam edilmedi. Nanoyapıların mıknatıs varlığında ortamdan toplanabildiği Şekil 2.4'te fotoğraflanmıştır. Magnetit/PEG diasit oranı (w/w) 1/10 olarak gerçekleştirilen reaksiyonda elde edilen nanopartiküller FTIR, TGA, VSM, TEM ve zetasizer ile karakterize edildi. Ayrıca nanoyapılar mika yüzeye damlatılarak İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'ndeki atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (Digital Instruments-MMSPM Nanoscope IV) ile görüntülendi.



(a)



(b)

Şekil 2.4 a) Magnetit/PEG diasit oranı (w/w) 1/10 olarak gerçekleştirilen reaksiyonda elde edilen nanopartiküllerin disperse görüntüsü, b) Mıknatıs varlığında mıknatısa karşı toplanması.

Bir sonraki adım olan ilaç bağlama aşaması için fazla miktarda hazırlanan nanopartiküller extruder düzeneğinin kapasitesi dolayısıyla 0,22 µm por çaplı filtreden

geçirildi. Liyofilize edilen örneklerin suda dağılımı iyi olmadığı saptandığı için nanopartiküller filtre edildikten sonra sulu formda +4°C’ de depolandı.

2.4 Doksorubisinin Polimer Kaplı Manyetik Nanopartiküllere Yüklenmesi

Doksorubisinin nişasta ve PEG diasit kaplı manyetik nanopartiküllere yüklenmesi için enkapsülasyon ve adsorpsiyon olmak üzere iki farklı metot denendi.

2.4.1 Doksorubisinin manyetik nanopartiküllere enkapsülasyon yoluyla yüklenmesi

2.4.1.1 Doksorubisinin manyetik nanopartiküllere enkapsülasyonu

Doksorubisinin manyetik nanopartiküllere enkapsülasyon yoluyla yüklenmesi amacıyla magnetitlerin polimer ile kaplanması sırasında ortama eklendi. 0,6 g nişasta ile başlanan reaksiyona 2.3.3.1 numaralı başlıkta belirtildiği gibi devam edildi. 50mg/ 2,5 mL konsantrasyondaki sulu doksorubisin çözeltisi ortama eklendi. Ardından ortam pH’ı 10-11 civarına getirildiğinde doksorubisinin renginden ötürü kırmızı renge yakın olarak görünen karışımın mor renge döndüğü görüldü ve 2 saat reaksiyona bırakılıp diğer işlemleri devam ettirildi.

Karışım manyetik ayırma kolonundan geçirilirken manyetik olmayan ve enkapsüle olmamış doksorubisini içeren kısım toplandı. Yıkama adımı da yine süpernatantlar ayrıldı. Elde edilen bu fazlarda ve başlangıç doksorubisin çözeltisinde spektrofotometrik (Perkin Elmer Lambda 35) olarak ilacın maksimum absorbans verdiği dalga boyu olan 486 nm’de ilaç tayini yapıldı.

2.4.1.2 Doksorubisinin reaksiyon koşullarına stabilite araştırmaları

Doksorubisinin enkapsülasyon koşullarında yapısını koruyup korumadığı spektrofotometrik ve florimetrik taramalar yapılarak saptanmaya çalışıldı. 0,03 mg/mL konsantrasyonda doksorubisin çözeltisi hazırlanarak pH’ ı 0,1 M NaOH ile 11 civarına getirildi ve bir seri tüpe paylaştırıldı. Ayrıca kontrol grubu olarak pH’ ı 7 olan doksorubisin çözeltisi kullanıldı. Birinci tüp oda sıcaklığında, ikinci tüp 60°C’de 30 dak, üçüncü tüp 60°C’de 1 saat, dördüncü tüp 60°C’de 2 saat, beşinci tüp 60°C’de 2

saat bekletilmesinin sonrasında pH 7'ye getirilerek oda sıcaklığında, altıncı tüp ise 60°C'de 3 saat inkübe edildi. Örneklerin 400-750 nm arasında spektrum taramaları yapıldı. Doksorubisinin stabilitesi ayrıca spektrofotometri (Varian Cary Eclipse) kullanılarak da belirlenmeye çalışıldı. Aynı konsantrasyondaki doksorubisin çözeltisi ile yine bir seri çalışma tüpü ve kontrol olarak pH'ı 7 olan çözelti hazırlandı. Birinci tüp 60°C'de 2 saat, ikinci tüp içeriği pH 11'e ayarlanarak oda sıcaklığında 2 saat, üçüncü tüp içeriği de pH 11'e ayarlanarak 60°C de 2 saat bekletildi. Doksorubisin çözeltileri 480 nm'de uyarılarak 500-700 nm arasında emisyon taramaları yapıldı.

2.4.2 Doksorubisinin manyetik nanopartiküllere adsorpsiyon yoluyla yüklenmesi

Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetit nanoyapıların yüzeyine doksorubisinin bağlanması için literatürde belirtilen ilaç-polimer iyonik kompleksleme yöntemleri modifiye edilerek kullanıldı (Manocha and Margaritis, 2010; Lanz-Landazuri et al., 2014). Manyetik nanopartikül solüsyonunun demir içeriği ICP-MS ile belirlenip nanopartikül miktarına geçildi. Doksorubisinin sulu ortamda 5-50 µg/mL konsantrasyon aralığında standart grafiği çizilerek çalışmalarda kullanıldı. İlacın nanopartiküllere değişen koşullarda adsorpsiyon yoluyla yüklenerek optimum koşulları araştırıldı.

2.4.2.1 İlaç konsantrasyonu optimizasyonu

Sulu ortam içerisinde hazırlanan 0,1- 1 mg/mL konsantrasyondaki doksorubisin çözeltileri manyetik nanopartiküller ile karanlık ortamda 25°C sıcaklıkta 16 sa boyunca çalkalamalı inkübatörde 250 rpm hızda karıştırıldı. Süre sonunda içerik 13000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenip üst faz ayrıldı. Pellet ultrasaf su ile yıkanarak santrifüjlendi. Üst faz ve yıkama suyunda 486 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ilaç tayini yapıldı. Nanopartiküllere bağlı ilaç miktar (1) ve yüzdeleri (2) hesaplandı.

$$\text{Bağlı ilaç miktarı } (\mu\text{g}/\text{mg}) = \frac{\text{Başlangıç ilaç miktarı } (\mu\text{g}) - \text{Süpernatantlardaki ilaç miktarı } (\mu\text{g})}{\text{Nanopartikül kütlesi } (\text{mg})} \quad (1)$$

$$\text{Bağlanma yüzdesi } (\%) = \frac{\text{Başlangıç ilaç miktarı } (\mu\text{g}) - \text{Süpernatantlardaki ilaç miktarı } (\mu\text{g})}{\text{Başlangıç ilaç miktarı } (\mu\text{g})} \times 100 \quad (2)$$

2.4.2.2 pH optimizasyonu

Manyetik nanopartiküller farklı pH ortamlarındaki tamponlarda hazırlanmış 0,25 mg/mL doksorubisin çözeltisi ile 25°C sıcaklıkta 16 saat boyunca çalkalamalı

inkübatörde 250 rpm hızda karıştırıldı. Sulu ortamın dışında 10 mM konsantrasyondaki pH 4; 5; 6 asetat tamponu ve pH 6; 6,5 fosfat tamponu kullanılarak denemeler gerçekleştirildi. 10 mM pH 7; 7,4; 8 ve 8,2 fosfat tamponunda doksorubisinin çözünürlüğü çok az olduğundan deneylerde kullanılamadı. Reaksiyon süresi sonunda santrifüj edilip ilaç tayinleri yapıldı ve ilacın nanopartiküllere bağlandığı en uygun ortam belirlendi.

2.4.2.3 Süre optimizasyonu

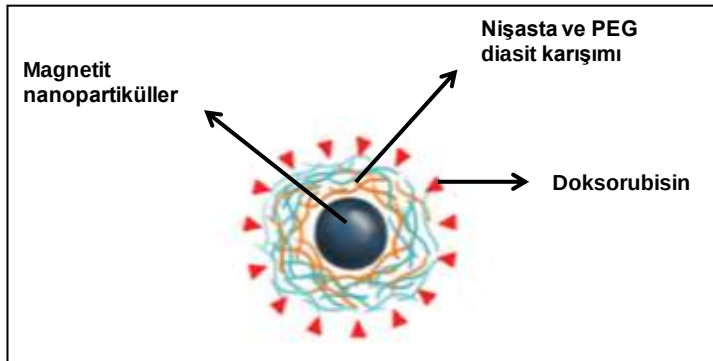
Sulu ortamda hazırlanan 0,25 mg/mL doksorubisin çözeltisi manyetik nanopartiküller ile 25°C sıcaklıkta 8-48 sa aralığında değişen sürelerde çalkalamalı inkübatörde 250 rpm hızda karıştırıldı. İnkübasyon sonunda santrifüj ve ilaç tayinleri yapılarak optimum bağlanma süresi saptandı.

2.4.2.4 Sıcaklık optimizasyonu

Manyetik nanopartiküller ile sulu ortamda hazırlanan 0,25 mg/mL DOX çözeltisi 25 ve 37°C sıcaklıkta 16 sa boyunca çalkalamalı inkübatörde 250 rpm hızda karıştırıldı. Reaksiyon sonunda ilaç miktarları belirlenerek en uygun bağlanma sıcaklığı saptandı.

2.4.2.5 Doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküllerin karakterizasyonu

Optimum koşullarda ilaç bağlı nanopartiküllerin yüzey fonksiyonel grupları, termal bozunma sıcaklığı, manyetizasyonu, morfolojisi, hidrodinamik boyutu ve zeta potansiyeli sırasıyla FTIR, TGA, VSM, HR-TEM ve zeta sizer ile karakterize edildi. Doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküller Şekil 2.5' te şematize edilmektedir.



Şekil 2.5 Doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküller.

2.5 Eritrosit membran veziküllerinin oluşturulması

Eritrosit (RBC) hücre membranından nanoboyutlu veziküller hazırlanması için Hu ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem kullanıldı (Hu et al., 2008). EDTA'lı tüpe alınan kan 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Plazma ve buffy coat eritrositlerden ayrıldı. Eritrositler üzerine yıkama amacıyla yavaşça 1x PBS (fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi, (1x PBS: 137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,46 mM KH₂PO₄) eklenerek plastik tüplere alındı ve 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Hemoliz işlemi için yıkanan hücreler üzerine 1:5 (v:v) oranında soğuk 0,1x PBS tamponu ilave edip birkaç defa yavaşça alt-üst edilerek 20 dakika buz banyosunda inkübe edildi. Süre sonunda tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Elde edilen ghost hücrelerine bağlı hemoglobinin uzaklaştırılması amacıyla 2 defa 0,1x PBS tamponu ile yıkama yapıldı. Elde edilen ghost hücreler Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bulunan ışık mikroskobunda görüntüldü. Daha detaylı inceleme için ghost hücreler formvar bakır grid üzerine damlatıldı ve kuruduktan sonra membran yapısının boyanması için %1 lik uranil asetat çözeltisi ile 15 dak muamele edildi. Kuruyan örnekler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı'nda bulunan enerji filtreli geçirimli elektron mikroskobu (EF-TEM) (Carl Zeiss Libra 120 kV) ile görüntülenerek morfolojileri ve membran tabakası belirlendi.

Eritrosit membran vezikülleri elde etmek amacıyla ghost hücreler 1x PBS tamponunda dağıtılarak ve 3 dakika sonik banyoda tutuldu. Mini-extruder sistemi (Avanti Polar Lipids, Inc.) vezikül işlemleri için hazırlandı; filtre destek materyalleri 1x PBS tamponunda ıslatıldı ve ilk önce 400 nm por çaplı polikarbonat membran yerleştirilerek sistem kuruldu. Hücreler enjektöre çekildi ve membrandan 15 defa geçirildi. Ardından extrudera 100 nm por çaplı polikarbonat membran yerleştirildi ve hücreler bu membrandan da 15 defa geçirildi. Şekil 2.6' da extruderden geçirilerek vezikül oluşturma işlemi fotoğraflanmıştır.



Şekil 2.6 Extruderden geçirilerek eritrosit membran veziküllerinin oluşturulması.

Elde edilen membran yapıları seyreltilip mika yüzeye damlatıldı ve kuruyan örnekler İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'ndeki atomik kuvvet mikroskobu (AFM) (Digital Instruments-MMSPM Nanoscope IV) ile görüntüledi. Görüntülemenin yanında membran veziküllerinin hidrodinamik çapı ve zeta potansiyeli zetasizer cihazı ile belirlendi.

Eritrosit hücreleri ve ghost hücreler ayrıca hücre kültürü çalışmalarında kullanılan görüntüleme ve floresans sayım cihazında (Arthur, NanoEntek), eritrosit membran vezikülleri ise daha yüksek büyütmeye sahip hücre sayım cihazında (JuLiBr, NanoEntek) görüntülenerek incelendi.

2.6 Eritrosit Veziküllerine Doksorubisin İçeren Nişasta ve PEG diasit Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Yüklenmesi

Nişasta ve PEG diasit kaplı olan manyetik nanopartiküllere doksorubisin yüklenmesinin ardından ilaç taşıyıcısının eritrosit membran vezikülleri içerisine yüklenmesi amaçlanmıştır. İlk olarak eritrosit ghost hücrelere nanopartiküller yüklenmiş ve ardından vezikül formuna dönüştürülmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar üzerine yöntem değiştirilerek nanopartiküller önceden hazırlanan eritrosit membran vezikülleri ile kaplanmıştır.

2.6.1 Eritrosit ghost hücrelerine doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin yüklenmesi ve vezikül formuna dönüştürülmesi

Doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin eritrosit ghost hücreleri içerisine yüklenmesi için Sternberg ve arkadaşları (2012) ile ve Gupta ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları çalışmalardan yararlanıldı. İlk olarak EDTA'lı tüpe alınan kan 1x PBS ile iki defa yıkanarak 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. %70 hematokrit elde edilecek şekilde eritrosit yığın hacmi üzerine 1x PBS ilave edildi. Ardından hemoliz işlemi gerçekleştirildi. Süre sonunda tüpler 3000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenerek 2 defa yıkama yapıldı. Ghost hücrelere nanopartiküllerin yüklenmesi için farklı sıcaklık ve farklı nanopartikül konsantrasyonlarında deneyler gerçekleştirildi.

İlaç içeren nanopartiküllerin PBS içerisinde yeterince iyi dağılmadığı görüldüğünden izotonisitesi plazma osmolaritesine eşit ~300 mOsm/L ve pH'ı fizyolojik pH civarındaki farklı çözeltiler kullanılarak nanopartiküllerin dağılılırılığı

incelendi. %0,9 NaCl; %5 glukoz, %10 süktroz, %4,66 histidin ve %10 süktroz içeren 10mM histidin çözeltileri kullanılarak çözücü sistem optimizasyonu gerçekleştirildi.

2.6.1.1 Sıcaklık optimizasyonu

Manyetik nanopartiküller 2 mg/mL konsantrasyonda ve hipotonik ortam olan %1' lik süktroz çözeltilisi içerisinde sonike edilerek dağıtıldı. 1 mL RBC yığından elde edilen ghost hücreler 2 mL hacimde ve %1 lik süktroz çözeltilisi içerisinde süspanse edildi. Ghost hücreler ve nanopartiküller eşit hacimde 1:1 (v:v) karıştırılarak 0-5°C, 24°C, 37°C ve 45°C sıcaklıklarda 160 rpm'de 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda hücre membranlarında oluşan gözeneklerin kapatılması için ghost ve nanopartikül karışımlarına hipertonik çözeltiden (%25'lik süktroz) eklenerek ortam izotonik hale getirildi. 37°C'de 1 saat inkübasyonun ardından karışımlar 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant ayrıldı. Pelletler 1 mL %10 süktroz ile yıkanıp tekrar 1000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.

Elde edilen bu iki süpernatant birleştirilerek ICP-MS ile demir analizi yapıldı ve demir içeriğinden nanopartikül miktarı hesaplanarak ghost hücrelere yüklenen nanopartikül miktarı belirlendi.

2.6.1.2 Nanopartikül konsantrasyonu optimizasyonu

Nanopartikül konsantrasyonu optimizasyonu için doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküller ile ghost hücreler 1:0,05; 1:0,1; 1:0,2; 1:0,5; 1:1; 1:3 ve 1:5 oranlarında 0-5 °C' de karıştırıldı ve yukarıda belirtilen (2.6.1.1) nanopartikül yükleme prosedürü uygulandı. Hücrelere yüklenmeyen nanopartikül miktarı ICP-MS verileri ile belirlendi ve optimum nanopartikül miktarı saptandı. Nanopartikül yüklü ghost hücreler EF-TEM ile incelenerek elde edilen yapılar analizlendi. Nanopartikül yüklü ghost hücreler formvar bakır grid üzerine damlatıldıktan ve kuruduktan sonra membran yapısının boyanması için %1 lik uranil asetat çözeltilisi ile 15 dk muamele edildi. Ardından morfolojileri ve membran tabakası mikroskopta incelendi.

Elde edilen ilaç yüklü eritrosit ghost hücrelerinin boyutlarının küçültülmesi için extruder cihazı kullanıldı. Extrude edilen içerikte ICP-MS ile demir analizi yapıp nanopartikül miktarı belirlendi. Fakat yapılan analizler sonucunda ilaç yüklü nanopartikülün membranda takılı kaldığı, nanopartikül yükleme veriminin oldukça düştüğü belirlendi.

2.6.2 Doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin hazırlanan eritrosit membran veziküllerine yüklenmesi

Ghost hücrelerine yüklü ilaç bağlı nanopartiküllerin extruder ile boyutlarının küçültülememesinin saptanmasıyla 2011 yılında Hu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan yararlanıldı (Hu et al., 2011). 1 mL kırmızı kan hücresinden elde edilen eritrosit ghost hücreleri 1 mL 1 x PBS'te dağıtıldı. 3 dakika sonik banyoda tutulduktan sonra sırasıyla 400 nm ve 100 nm'lik membranlardan extruder cihazı ile 15 defa geçirildi. Elde edilen eritrosit veziküllerinden 500 µL alınıp 500 µg nanopartiküle denk gelecek şekilde 2,5 mL 0,2 mg/mL konsantrasyondaki manyetik nanopartiküller ile karıştırıldı. Örnekler 37°C' ye ısıtılan tabla üzerinde ve 100 nm'lik membranlarda 7 defa extrude edildi. ICP-MS analizi ile demir içerikleri, demir içeriklerinden ise nanopartikül ve ilaç miktarları belirlendi.

İlaç bağlı manyetik nanopartikül ile yüklenen eritrosit veziküllerinin morfolojileri EF-TEM ve AFM ile hidrodinamik çapları ise zetasizer karakterize edildi.

2.7 Eritrosit Ghost Hücrelerine Folat Ligandının Takılması ve Folat Ligandı Bağlı ve Doksorubisin İçeren Nanopartikül Yüklü Eritrosit Veziküllerinin Oluşturulması

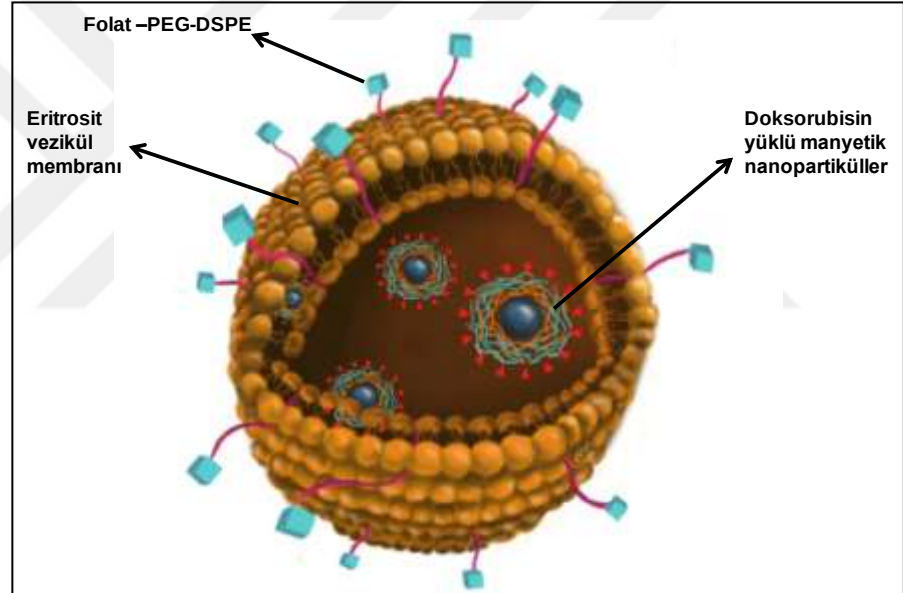
2.7.1 Eritrosit ghost hücrelerine folat ligandının takılması

Eritrosit ghost hücrelerine folat bağlı yapının takılması amacıyla Shmeeda ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınlanan ve Fang ve arkadaşlarının 2013 yılında yayınlanan çalışmalarından yararlanıldı (Shmeeda et al., 2010; Fang et al., 2013). Folat ligandı olarak folat-PEG(2000)-DSPE kullanıldı. 1 x PBS içerisinde 10; 25; 50; 75; 100 µg/mL konsantrasyonlarında folat-PEG-DSPE çözeltileri hazırlandı. Hazırlanmış ghost hücrelerinin 1 mL'si belirlenen konsantrasyonlardaki 4 mL folat-PEG-DSPE içinde karıştırılarak ve 30 dakika 140 rpm karıştırma hızında 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek ghost hücreleri çöktürüldü ve 2 kez 2 mL 1x PBS ile yıkanıp santrifüjlendi. Süpernatantlarda spektrofotometrik olarak 284 nm dalga boyunda folat-PEG-DSPE tayini yapıldı ve yapılara bağlanan folat-PEG-DSPE miktarları ve bağlanma yüzdeleri hesaplandı. Bağlanma miktarını artırabilmek için inkübasyon süresi değiştirilerek denemeler yapıldı.

Folat ligandı takılı ghost hücreler extruder ile membran veziküllerine dönüştürülüp zeta potansiyeli incelendi ve vezikülün yük durumunda değişiklik olup olmadığı analiz edildi.

2.7.2 Folat ligandı bağlı ve doksorubisin içeren nanopartikül yüklü eritrosit veziküllerinin oluşturulması

Optimum koşullarda hazırlanarak elde edilen folat ligandı takılmış ghost hücreler vezikül haline getirilip yapıya 2.6.2 numaralı başlıkta açıklandığı gibi doksorubisin içeren manyetik nanopartiküller yüklendi. Folat ligandı bağlı ve doksorubisin içeren nanopartikül yüklü eritrosit veziküllerinin morfolojileri AFM ile hidrodinamik çapları ise zetasizer ile belirlendi. Tasarlanan yapı aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Folat ligandı takılı doksorubisin yüklü manyetik nanopartikülleri içeren eritrosit vezikülleri.

2.8 Manyetik Taşıyıcı Sistemin *in Vitro* İlaç Salım Çalışmaları

Taşıyıcıya bağlı olmayan (serbest) doksorubisin ve manyetik nanopartiküllere yüklü doksorubisinin fizyolojik ortam (pH 7,4) ve asidik ortamda (pH 5,5) diyaliz membranı kullanılarak *in vitro* salım karakterleri belirlendi. Doksorubisin ve doksorubisin içeren manyetik nanopartiküller diyaliz membranı (Sigma Aldrich, MWCO: 14.000 Da) içerisine koyulup 10 mM pH 7,4 fosfat ve pH 5,5 asetat tamponuna karşı 37°C 'deki çalkalamalı su banyosunda (Memmert) diyalizlendi. Belirli sürelerde diyaliz ortamı alınıp yerine aynı sıcaklık ve pH'daki tampon eklendi. Alınan

ortamlarda spektrofotometrik olarak dokсорubisin tayini gerçekleştirilip salınan ilaç miktarları (%) aşağıdaki formüle (3) göre hesaplandı. Nanopartikle yüklü ilaç ve serbest ilacın zamana bağılı % salımı birbirleri ile kıyaslandı.

$$\text{İlaç salımı (\%)} = \frac{\text{Ortama salınan ilaç (\mu\text{g})}}{\text{Diyaliz membranına koyulan ilaç (\mu\text{g})}} \times 100 \quad (3)$$

2.9 Biyomimetik İlaç Taşıma Sisteminin Biyouyumluluk Araştırmaları

2.9.1 Serum proteinlerine bağılanma miktarının belirlenmesi

İlaç taşıyıcı sisteme protein bağılanma oranlarının belirlenmesi için Cole ve arkadaşlarının yaptığı alışma (Cole et al., 2010) ile Semete ve arkadaşlarının (Semete et al., 2011) uyguladığı yöntem modifiye edilerek kullanıldı. ICP-MS ve TGA sonuçlarından yararlanılarak nişasta ve PEG diasit kaplı manyetik nanopartiküller (SPM) ve dokсорubisin yüklü nişasta ve PEG diasit kaplı manyetik nanopartiküller (DSPM) literatürde belirtildiğı gibi 4 mgFe/mL (7,16 mg NP/mL) oranına seyreltilirken vezikül ile kaplı dokсорubisin yüklü manyetik nanopartiküller (VDSPM) ve folat ligandı takılı vezikül ile kaplı dokсорubisin yüklü manyetik nanopartiküller (FVDSPM) herhangi bir deriştirme işlemi yapmadan içerdiği en yüksek nanopartikül konsantrasyonunda (10 μg NP/mL) alışıldı.

Örneklerden toplam hacim 600 μL olacak şekilde 10:90, 20:80, 40:60 ve 60:40 (v/v) oranlarında fetal sığır serumu (FBS): nanopartikül karışımı hazırlandı. Karışım 160 rpm hızda 37°C’ de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 13000 rpm’de 15 dak santrifljenip st faz ayrıldı. Pellet 600 μL pH 7,5 McIlvaine’s tamponu (91,7 mL 0,1 M Na₂HPO₄ + 8,3 mL 0,2 M sitrik asit) ile yıkandı ve 13000 rpm’de 15 dak santrifüjlendi. Başlangıç FBS rneğı ve süpernatantlarda Bradford metoduna (Bradford, 1976) göre protein tayini yapılarak nanotaşıyıcılara bağılanan protein miktarları ve yüzdeleri belirlendi.

2.9.2 Hemoliz oranının belirlenmesi

Nanopartiküllerin yaratabileceğı hemoliz miktarlarının belirlenmesi için Mayer ve arkadaşlarının (Mayer et al., 2009) alışması ve Yallapu ve arkadaşlarının uyguladığı yöntemden (Yallapu et al., 2015) yararlanıldı. İlk olarak EDTA’lı tüpe alınan kan 1000 rpm’de 10 dak santrifüj edilerek plazma ve buffy coat kısmı uzaklaştırıldı. Eritrositler 1 x PBS ile 2 defa yıkandı. Çalışmada 0,5, 1, 1,5, 2

mg NP/mL konsantrasyondaki SPM ve DSPM örnekleri ile 1, 2, 5, 10 µg NP/mL konsantrasyonundaki VDSPM ve FVDSPM örnekleri kullanıldı.

Hemoliz oranının belirlenmesinde eritrositler nanopartiküllerin dağıtıldığı çözücü sistem olan izotonik %10'luk süktroz ve veziküler yapıların çözgen sistemi olan 1x PBS çözeltisinde ayrı ayrı %2 hematokrite ayarlanarak hazırlandı ve ilgili örnek grubu için kullanıldı. Taşıyıcı sistem ile eritrositler 1:1 (v/v) oranda karıştırılarak 37°C' de 2 saat inkübe edildi. Negatif kontrol gruplarının oluşturulması için eritrositler nanopartiküller yerine sırasıyla %10 luk süktroz ve veziküllerin yerine 1x PBS ile; pozitif kontrol gruplarının oluşturulması için ise %1'lik Triton X-100 ile karıştırıldı. Süre sonunda hücreler 1000 rpm'de 10 dak santrifüjlenerek karışımdan ayrıldı. Süpernatant içeriğindeki nanopartiküllerin çöktürülmesi için 13000 rpm'de 15 dak santrifüjlendi. Üst faz örnekte 540 nm de spektfotometrik olarak hemoglobin tayini yapıldı. Hemoliz yüzdesi elde edilen absorbanslar kullanılarak aşağıdaki eşitlik (4) yardımıyla hesaplandı (Yallapu et al., 2015):

$$\text{Hemoliz (\%)} = \frac{\text{Absorbans (örnek)} - \text{Absorbans (negatif kontrol)}}{\text{Absorbans (pozitif kontrol)}} \times 100 \quad (4)$$

2.9.3 Makrofaj hücrelerince alımın incelenmesi

2.9.3.1 Makrofaj hücre kültürü

RAW 264.7 hücreleri % 10 FBS, % 1 Penisilin-Streptomisin, 2 mM L-glutamin içeren DMEM ortamında % 5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde kültüre edildi. Hücreler kazıyıcı ile kaldırılarak pasajlamaları devam ettirildi. Hücrelerin canlılığının devamı ve çoğaltılması için % 80 kültür kabını kapladıktan sonra tripsin-EDTA ile kaldırılıp pasajlama yapıldı.

2.9.3.2 Makrofaj hücrelerince alımın analizi

Flasktaki makrofaj hücrelerinden 25 µl alındı ve slayta uygulanıp floresans olarak hücre görüntüleyebilen ve sayım yapabilen cihazda (Arthur, NanoEntek) başlangıç hücre sayıları ve morfolojileri belirlendi. Besi ortamı içerisindeki 1 mL hücre üzerine 10 µg NP/mL konsantrasyondaki DSPM, VDSPM ve FVDSPM örneklerinden 100 µL eklenip 5 saat 37 °C deki inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda karışımdan 25 µL alınarak slayta uygulandı. Cihaza yerleştirilen örnekte doksorubisinin verdiği floresanstan yararlanarak ışımaya yapan hücreler görüntülendi ve sayımı yapıldı.

Nanopartiküller ve vezikül yapılarının makrofaj hücreleri ile etkileşimi morfolojik olarak incelenerek makrofaj hücrelerince % alımı belirlendi.

2.10 Biyomimetik İlaç Taşıma Sisteminin Over Kanseri Hücre Hatlarında Sitotoksiste Analizleri

In vitro sitotoksiste analizleri Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Faz Öncesi Araştırmalar Birimi'nde gerçekleştirilmiş olup A2780, SKOV3 ve OVCAR3 over kanser hücre hatları aşağıda belirtilen şekilde kültüre edilmiş ve biyomimetik ilaç taşıyıcı sistem ve kontrol gruplarının bu hücreler üzerinde sitotoksiste deneyleri gerçekleştirilmiştir.

2.10.1 Hücre kültürü

A2780 ve OVCAR3 hücreleri % 10 FBS, % 1 Penisilin-Streptomisin, 2 mM L-glutamin içeren RPMI 1640 ortamında % 5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde (Esco) kültüre edildi. SKOV 3 hücreleri ise % 10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM ortamında %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde kültüre edildi. Hücrelerin canlılığının devamı ve çoğaltılması için % 80 kültür kabını kapladıktan sonra tripsin-EDTA ile kaldırılıp pasajlama yapıldı.

2.10.2 Sitotoksiste analizleri

Biyomimetik ilaç taşıyıcısının ve kontrol gruplarının hücreler üzerinde yaratacağı toksisiteyi belirleyebilmek amacıyla mitokondriyal enzim aktivitesine bağlı ölçüme imkan sağlayan MTT testi uygulandı. Bu test, yaşayan hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzim kapasitesine bağlı suda çözünen sarı renkli MTT substratının suda çözünmeyen koyu mavi renkli formazan bileşiğine dönüştürülmesi esasına dayanır. Üretilen formazan miktarı direk olarak canlı hücre sayısı ile orantılıdır (Mosmann, 1983; Freshney, 1994).

MTT testi için 96 kuyulu plakalara kuyucuk başına 10⁴ hücre olacak şekilde 100 µL A2780, OVCAR3 ve SKOV3 hücreleri ekildi. Hücreler 24 saat kültüre edilerek yüzeye tutunmaları (adhere olmaları) sağlandı ve süre sonunda hücrelerin üst fazları uzaklaştırıldı. Besiyeri ile 5; 10; 25; 100; 500; 1000 ng/mL doksorubisin konsantrasyonlarına seyreltilen ilaç gruplarından kuyucuklara 100 µL şer eklendi. İlaç grupları olarak DOX, DSPM, VDSPM ve FVDSPM'ler kullanıldı. Ayrıca folat çapalı vezikül ile kaplı doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküller folik asit içermeyen

RPMI 1640 ortamlarında seyreltilerek (FVDSPM, folat (-)) yine folik asit içermeyen RPMI 1640 besi ortamındaki A2780 ve OVCAR3 hücreleri üzerine eklendi. Bu ilaç gruplarının dışında belirtilen ilaç konsantrasyonlarındaki taşıyıcı miktarına denk gelen ve ilaç içermeyen manyetik nanopartiküller (SPM) ile sükröz ve PBS içeren besi ortamı ve sadece besi ortamı içeren kontrol grupları da oluşturuldu. İlaç grupları ile muamele edilen hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde kültüre edildi.

Test için 5 mg/mL konsantrasyonda PBS içerisinde MTT solüsyonu hazırlandı ve filtrelendi. MTT çözeltisi kullanım öncesine kadar -20°C'de saklandı. Hücrelerin inkübasyon süreleri sonunda kuyucuklardaki üst fazlar toplanarak üzerlerine taze hazırlanan besi ortamı : MTT karışımından (10:1) (v:v) 110 µL ilave edildi. RPMI 1640, DMEM ve folik asit içermeyen RPMI 1640 büyüme ortamı ve MTT karışımları ayrı olarak hazırlandı. Hücreler inkübatörde 4 saat bekletildikten sonra içerilerinde 25 µL bırakacak kadar üst fazları uzaklaştırıldı. Oluşan kristaller 100 µL DMSO eklenerek plaka çalkalayıcı (Stuart SSM5) üzerinde karıştırılarak çözüldü ve plaka okuyucuda (BMG Labtech Polarstar Omega) 540 nm dalga boyunda absorbanlar alındı. GraphPad Prism Software 5.0 programı kullanılarak laboratuvar koşullarında hücre büyümesini %50 azaltan konsantrasyon değerleri (IC₅₀) belirlendi ve standart sapmaları hesaplandı.

2.10.3 Morfolojik inceleme

Doksorubisin içeren ilaç sisteminin hücrelerce alımının görüntülenmesi ve sistemin hücre içerisindeki lokalizasyonu belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla ilaç taşıyıcısını izlemek için doksorubisinin floresans özelliğinden yararlanıldı ve nükleusun boyanması amacıyla floresans özellikli 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) kullanıldı. İlk olarak 6 kuyucuklu plate içerisine yerleştirilen steril lameller üzerine 50.000 hücre/mL konsantrasyondaki A2780, OVCAR3 ve SKOV3 hücrelerinden 100 µL eklendi. 3 saat sonra hücreler üzerine 2 mL ortam eklenerek gece boyu tutunmaları için %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. İlaç uygulamaya başlamadan önce ortamları uzaklaştırıldı ve her bir hücreye ayrı ayrı olmak üzere PBS, 2 µg/mL ilaç konsantrasyonundaki serbest doksorubisin ve folat çapalı vezikül ile kaplı doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküllerden 250 µL ilave edildi. 2 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde inkübe edildikten sonra bu ortamlar uzaklaştırılarak 4 defa 500 µL PBS ile yıkama yapıldı. Fiksasyon amacıyla % 2 lik formaldehit çözeltisinden 200 µL ilave edildi ve 15 dakika oda sıcaklığında beklendi. Süre sonunda 4 defa 500 µL PBS ile yıkama yapıldı. Lameller mikroskop lamaları üzerine 15 µL gliserol

damlatılarak kapatıldı. Morfolojik inceleme çalışmaları Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan floresans mikroskop (Olympus BX51) ile gerçekleştirildi. Preparatlar üzerine incelemeyi hemen önce 10 µL DAPI damlatıldı. Floresans mikroskopun kırmızı filtresinde doksorubisin analizi, DAPI ayarında ise DNA boyasının analizi yapıldı ve hücrelerin görüntüleri alındı.

2.11 Biyomimetik İlaç Taşıma Sisteminin *in Vivo* Koşullarda Biyopotansiyelinin Araştırılması

Biyomimetik ilaç taşıma sisteminin *in vivo* araştırmaları için gerekli etik kurul izni Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'dan (2013-009 nolu etik kurul belgesi) alındı ve çalışmalar Ege Üniversitesi ARGEFAR Faz Öncesi Araştırmalar Birimi'nde yapıldı.

2.11.1 İlaç taşıyıcı sistemin dişi farelerdeki biyodağılım çalışmaları

Folat çapalı vezikül kaplı biyomimetik özellikli ilaç taşıma sisteminin biyodağılım çalışmaları için 4-6 haftalık CD1 dişi fareler kullanıldı. Çalışma süresince farelerin bulunduğu ortam da kontrollü şartlar sağlanarak $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık, $50 \pm 10\%$ nem, 12/12 saat ışık/karanlık periyodu uygulandı ve fareler uygun yem ve su ile *ad libitum* beslendi.

Biyodağılım izlenmesi için steril pH 7,4 PBS tamponunda hazırlanan ve 3 µg/ 100 µL doxorubicin içeren DOX, DSPM, VDSPM ve FVDSPM formülasyonları fare kuyruk veninden enjekte edildi (n=5). Serbest ilaç haricinde manyetik özellikli ilaç taşıyıcısı enjeksiyonu yapılan farelerin over bölgesinin hedeflenmesi amacıyla abdomen bölgesine 0,1 T kuvvette 20 mm çap ve 3 mm kalınlıkta neodimyum mıknatıs yerleştirildi ve flaster ile sabitlendi (Şekil 2.8). Enjeksiyon sonrasındaki 60. ve 180. dakikalarda fareler izofluran gazı anestezisi altında *in vivo* görüntüleme cihazına (IVIS Spectrum) (Caliper Perkin Elmer) cihazına yerleştirildi ve 465 nm'de eksitasyon ve 600 nm'de emisyon uygulanarak doksorubisinin floresansı izlendi. 3. Saatte görüntülenmesi tamamlanan farelere intraperitoneal olarak ketamin/ksilazin ötenazi dozu (300/30 mg/kg) enjekte edildi. Fareler kurban edildik lityum heparinli tüpe kan alındı ve akciğer (AC), karaciğer (KC), böbrek (BOB), dalak (DAL), kalın barsak (KAL), over (OVER) ve kas (KAS) organ/dokuları çıkartıldı. Çıkartılan organ/dokulardaki

doksorubisin yine IVIS Spectrum cihazında floresans olarak görüntülendi. Ayrılan plazma (KAN) ve organ/dokular ilaç analizi yapılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.



Şekil 2.8 Farelerin over bölgesinin hedeflenmesi amacıyla a) abdomen bölgesine mıknatıs yerleştirilmesi b) mıknatısın flaster ile sabitlenmesi.

2.11.2 İlaç taşıyıcı sistemin *ex Vivo* analizleri

Çıkarılan organ/dokular 2012 yılında yayınlanan bir çalışmaya (Alhareth et al., 2012) göre homojenize edildi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapıdaki doksorubisin tayin edildi. Homojenizasyon için ilk olarak organlar soğuk ultrasaf su ve soğuk pH 7,4 PBS tamponunda yıkandı. Tartımı alınan organlardan en fazla 100 mg olacak şekilde örnekler ayrılıp üzerine 100 µL 0,1 M sodyum dodesil sülfat (SDS) ve 100 µL pH 8,8 1 M Tris tamponu eklenerek sonikatör (Sonics VC 130) aracılığıyla homojenize edildi. Homojenize organlar üzerine hazırlanan sulu doksorubisin standart çözeltisinden (100 µg/mL) 100 µL ilave edildi. Plazma örnekleri (100 µL) üzerine ise sadece 100 µL Tris tamponu ve 100 µL doksorubisin standart çözeltisi eklendi. Ardından tüm örnekler üzerine 300 µL metanol ve 2,7 mL kloroform eklenip 3 dakika boyunca karıştırıldı. Örnekler 5 dakika +4°C'de 9000 rpm'de santrifüjlenerek kloroform fazı (alt faz) ayrıldı. Ayrılan kloroform fazları azot gazı altında kurutuldu. Elde edilen pellet HPLC analizinin mobil fazı olan 1 mL pH 2,5 0,05 M trikloroasetik asit (TCA) ve asetronitril (60/40, v/v) karışımında çözöldü ve 0,45 µm por çaplı filtreden süzöldü.

Doksorubisin analizi Ege Üniversitesi ARGEFAR Biyobenzer Ürünler Laboratuvarında bulunan HPLC sistemi (Shimadzu Prominence HPLC System) ile C18

(Inertsil ODS 3-3 (15 cm x 4.0 mm)) kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Doksorubisin içeren standart çözelti ve organ homojenatlarından 20 µL enjekte edilerek 1 mL/dak akış hızında, 30 °C sıcaklıkta ve trikloroasetik asit (TCA) ve asetonytril (60/40, v/v) mobil fazı kullanılarak uygulama yapıldı. İlaç floresans (λ_{ex}: 480 nm, λ_{em}: 558 nm) olarak dedekte edildi. İlacın başlangıç formu ile standart grafiği çizildi ve tayinleri yapıldı. Herbir ilaç grubundaki doksorubisinin mg organ/doku başına dağılımı yüzdesel olarak hesaplandı ve 3 saat süre sonundaki biyodağılımı belirlenmiş oldu.



3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1 Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Demir oksit nanoyapılarından biri olan magnetit (Fe_3O_4); kopresipitasyon metoduna göre oksijensiz ortamda 1:2 mol oranlarındaki Fe^{+2}/Fe^{+3} klorür tuzlarının sulu çözeltisine baz ilavesiyle elde edilmesi amaçlandı. Oksijenin ortamdaki uzaklaştırılması magnetitin kimyasal ve fiziksel özellikleri farklı diğer türevlerine oksidasyonun önlenmesi için önemlidir. Reaksiyon ortamından azot gazının geçirilerek oksijenin uzaklaştırılması aynı zamanda partikül boyutlarının küçülmesini sağlar (Gupta ve Gupta, 2005). Kimyasal kopresipitasyon yöntemi ile magnetit sentezi reaksiyonun tümü aşağıdaki şekilde yazılabilir (Sadighian et al., 2014):



Partiküler agregasyonun minimize edilmesi veya ortadan kaldırılması manyetik nanopartikül oluşturulmasında en önemli kriterlerden biridir. Manyetik nanopartiküllerin yüzey alanı/hacim oranının fazla olması dolayısıyla nanopartiküller sahip oldukları yüksek yüzey enerjisini düşürmek için dipol dipol çekimleri ile biraraya gelme eğilimindedir (Easo and Mohanan, 2013; Nicolas et al., 2013). Polimerler ile modifikasyon stabil yapıda ve agregat olmayan yapıları elde etmek için önemlidir (Nicolas et al., 2013).

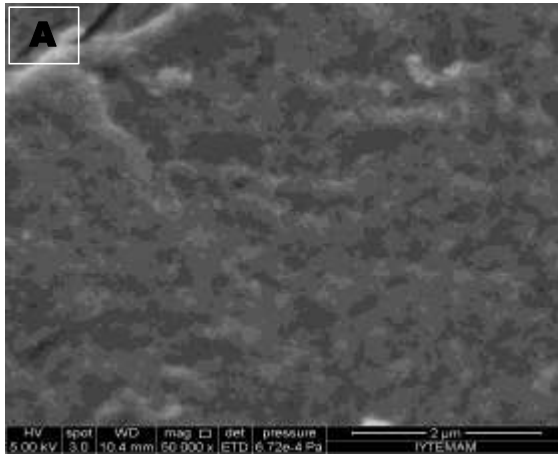
Partiküllerin dinamik boyutu vücuttan eliminasyonunu belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Partiküller monodispers özellikte ve uygun boyutta olmalıdır. Partiküllerin boyutu > 200 nm olduğunda retikuloendotelial sistem (RES) tarafından uzaklaştırılabilir; boyutu $< \sim 5,5$ nm olduğunda ise renal filtrasyon ile hızlıca elimine olabilir. Partikül boyutlarının 10-100 nm arasında olması ideal olarak tanımlanabilmektedir çünkü bu boyuttaki partiküller renal sistemden kaçamayacak kadar büyükken aynı zamanda RES proteinlerince adsorplanma yüzey alanı da küçüktür. Ayrıca boyutları 10-100 nm arasındaki partiküllerin çok küçük kapillerden de geçebilme imkanı vardır (Rosen et al., 2012; Easo and Mohanan, 2013).

Manyetik partiküllerin core çapı < 20 nm olduğunda süperparamanyetik özellikli hale gelmektedir. Süperparamanyetik nanopartiküller manyetik alan uzaklaştırıldığında manyetik tepki yaratmadıkları için önemli ve tercih sebebidir (Rosen et al., 2012).

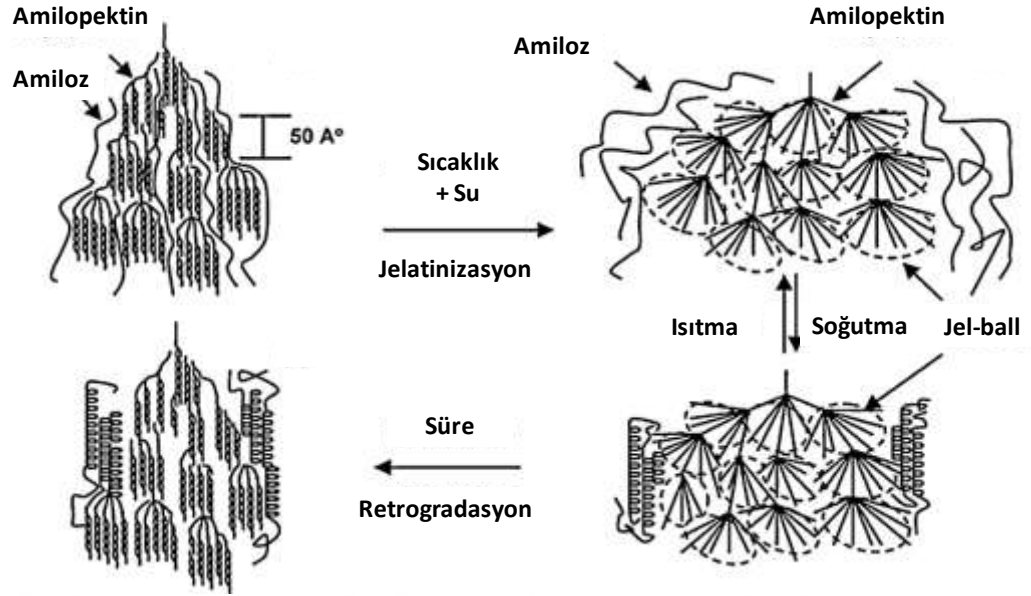
3.1.1 Magnetit nanoyapıların polimer içeren ortamda sentezlenmesi

Magnetitlerin nişasta matriksi içinde hazırlanarak nişasta ile kaplanması amaçlandı. Karbohidrat yapının manyetik nanoparçacıklar ile polar ve Van der Waals çekimleri gibi etkileşimler ile sarıldığı ve nanoparçacıkların stabilizasyonunu sağladığı literatür verilerinden bilinmektedir (Easo and Mohanan, 2013; Jiang et al., 2009). Sıcaklık ve karıştırma hızı değiştirilerek nişasta varlığında magnetitlerin sentezi gerçekleştirildi.

Oda koşullarında (yaklaşık 23-25°C’de) gerçekleştirilen denemede elde edilen nanoyapıların (A örneği) SEM görüntüsü Şekil 3.1’de verilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi nişastanın çözündükten sonra oda sıcaklığında katılaşması nedeniyle birbirinden ayrılmamış yapılar oluşmuştur. Şekil 3.2’de gösterildiği gibi nişasta molekülleri sulu ortamda ısıtıldığında su moleküllerinin difüzyonu ile jelatinize olur ve granül yapısı genişler. Dekompoze olan yapı soğutulduğunda ve bir süre sonra başka bir kristal hale gelir (retrogradasyon) (Liu et al., 2009). Nişastanın retrogradasyon nedeniyle manyetik yapılarla uygun şekilde sarılamadığı düşünülmektedir. Beklenen yapının görülmemesi sebebiyle bir sonraki denemede sıcaklığın artırılmasına karar verilmiştir.

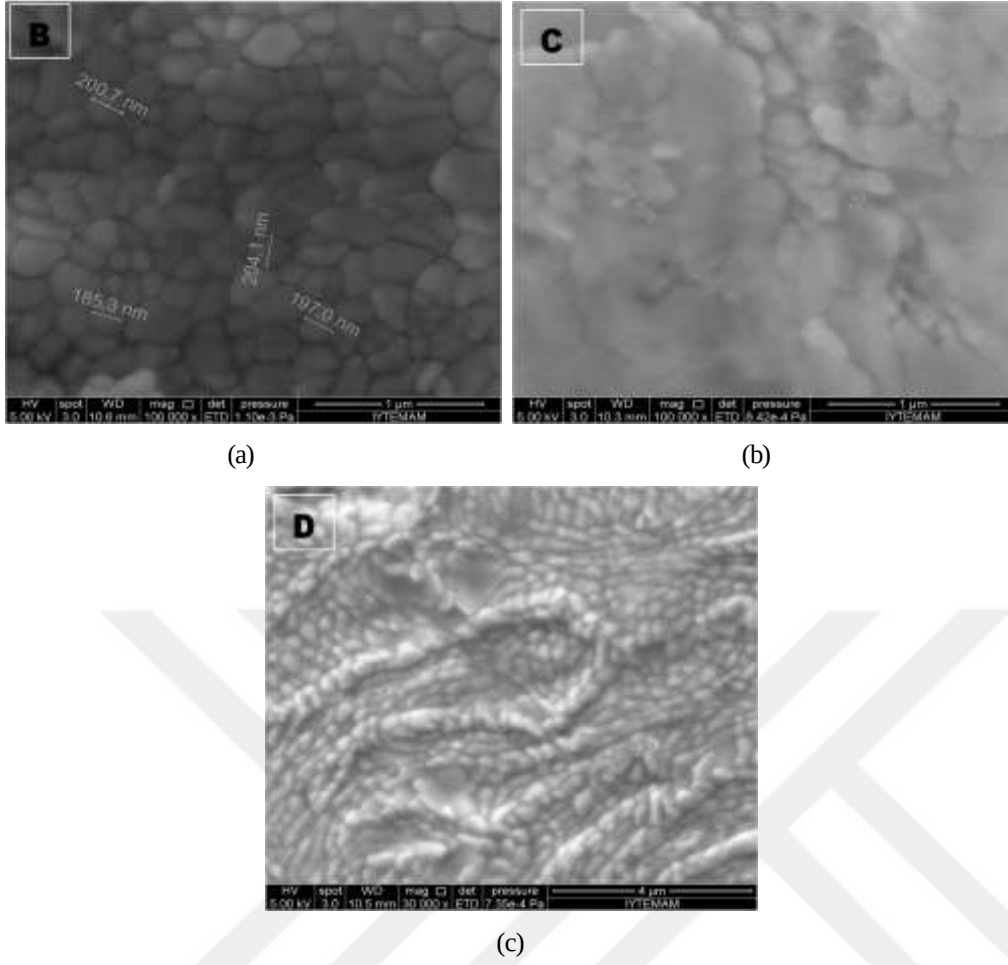


Şekil 3.1 Oda sıcaklığında ve 600 rpm karıştırma hızında hazırlanan A örneğinin SEM görüntüsü.



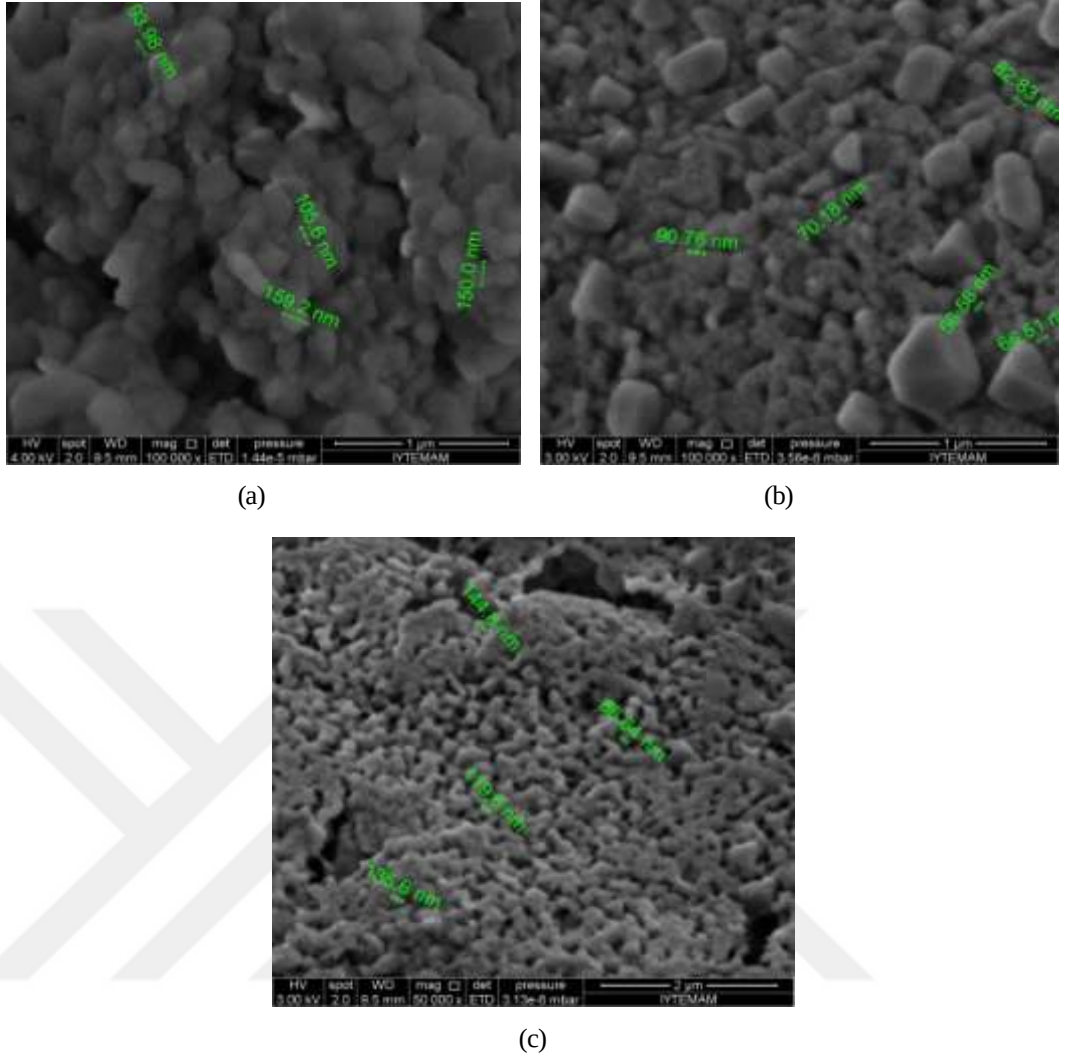
Şekil 3.2 Nişastanın termal proseslerdeki faz geçişlerin şematik gösterimi (Liu et al., 2009).

Şekil 3.3' te 60°C' de sentezlenen nanopartiküllere dair SEM görüntüleri yer almaktadır. B örneğinde (süpernatant) büyük partiküllerin (yaklaşık 200 nm) olduğu bulunmuştur. Ayrıca süpernatantın (açık renkli karışım) pellete göre manyetik yapıları daha az, nişastayı ise yoğun olarak içermesi nedeniyle magnete karşı cevabı oldukça az olarak saptanmıştır. C örneğinde hemen hemen tüm manyetik yapıların bir arada ve birbirinden tam olarak ayrılmamış yapılar halinde olduğu görülmektedir. Yapı oldukça polidispers özelliktedir. Etanol ile yıkama işlemi ortamdaki suyu uzaklaştırdığından D örneğindeki yapılar birbirinden biraz daha ayrılmış olarak görülmektedir. Ancak partikül boyut dağılımı yine heterojendir. Sentez esnasında kuvvetli karıştırma ile partikül boyutunun küçüldüğü bilindiğinden bundan sonraki sentez işleminde çözeltinin kuvvetli karıştırılması gerektiğine karar verilmiştir.



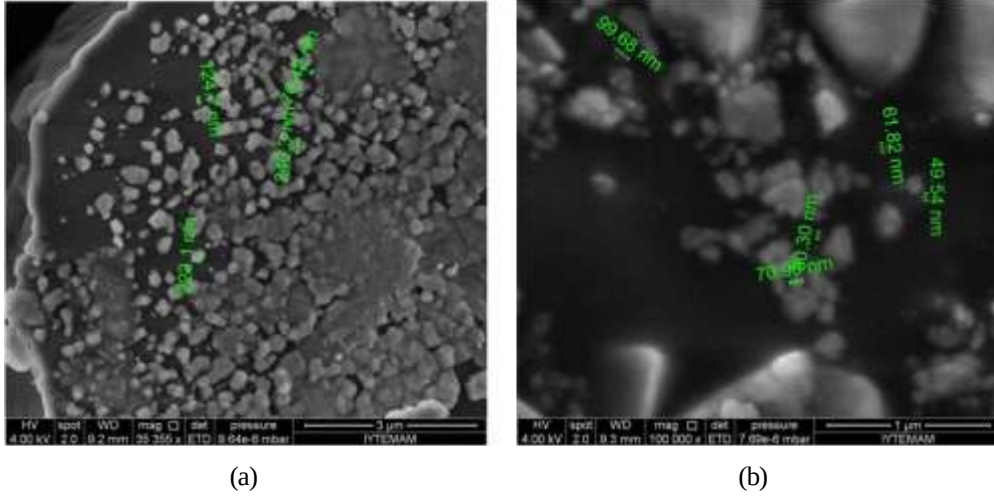
Şekil 3.3 60°C sıcaklıkta ve 600 rpm karıştırma hızında hazırlanan a) B örneği, b) C örneği, c) D örneğinin SEM görüntüsü.

3000 rpm karıştırma hızında ve 60°C sabit sıcaklıkta yapılan sentez sonunda diğer sentezlerden oldukça farklı katı-jel bir yapı elde edilmiştir. Jelleşme ve retrogradasyon sonrasında yeni bir forma dönüşen örneğin (E) magnete daha iyi cevap verdiği belirlenmekle beraber büyük ve küçük tüm manyetik yapıları içerdiği mikroskop görüntüsünden anlaşılmıştır. 50-70 nm çapında ve küreye yakın yapıların olduğu görülmektedir. Ortamdaki fazla miktarda nişastadan kaynaklandığı tahmin edilen büyük agregatların bundan sonraki çalışmalarda ortamdan uzaklaştırılması gerektiği düşünülmektedir. Nanopartiküllerin birbirini çekmeleri sonucunda oluşan agrega yapılar da görülebilmektedir (Şekil 3.4)



Şekil 3.4 60°C sabit sıcaklıkta ve 3000 rpm karıştırma hızında hazırlanan E örneğinin a) 1μm skalada, b) 1 μm skalada, c) 2 μm skalada SEM görüntüleri.

F örneğinde magnete karşı cevap daha az olmakla beraber yapıda 50-70 nm çapındaki nanopartiküller görülmektedir (Şekil 3.5). Jelleşmeye bırakılmayan bu örnekten büyük agregatların santrifüj ile uzaklaştırıldığı düşünülmektedir. Fakat yapıların manyetik özelliği ile birbirini çekmesi dolayısıyla büyük partiküller yine göze çarpmaktadır.

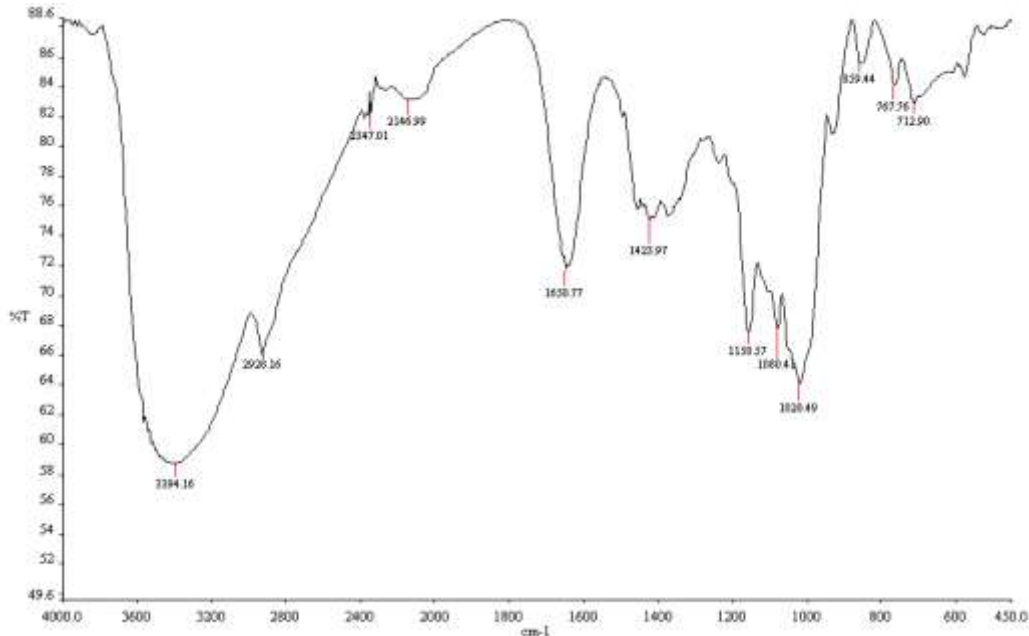


(a)

(b)

Şekil 3.5 60°C sabit sıcaklıkta ve 3000 rpm karıştırma hızında hazırlanan F örneğinin a) 3 µm skalada, b) 1 µm skalada SEM görüntüleri.

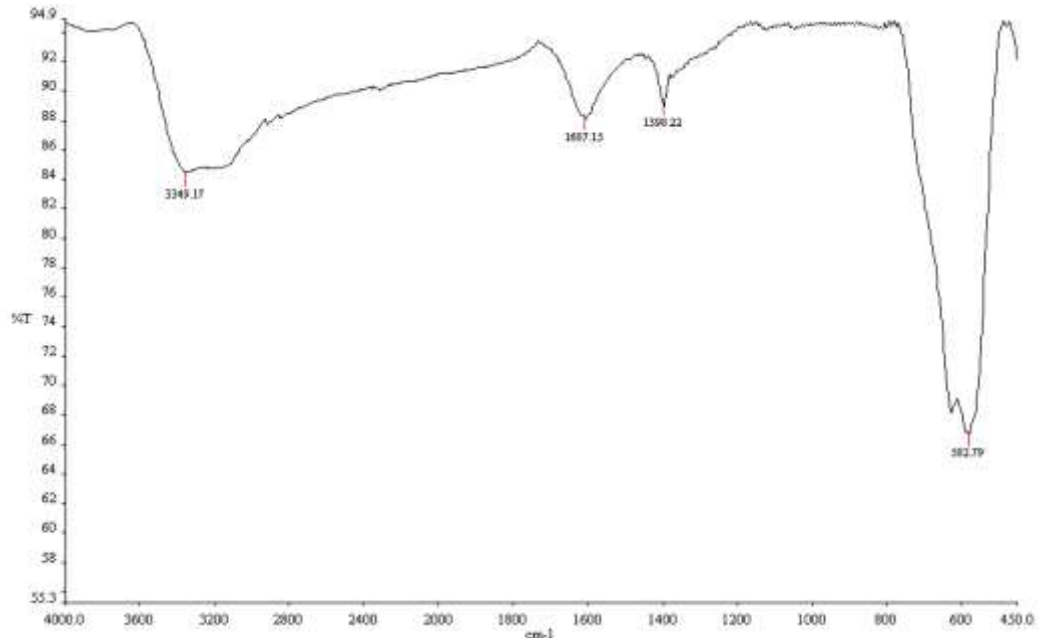
E örneğine ait FTIR spektrumu Şekil 3.6’da verilmektedir. Magnetit yapılarında görülmesi beklenen 560-600 cm^{-1} ’deki band saptanmamıştır. Dolayısıyla yapıda magnetitten söz edilememektedir. Nişasta varlığında magnetit sentezi başarılı olmadığından bundan sonraki denemelerde polimer içermeyen ortamda magnetit sentezlenmesi uygun görülmüştür. Sentez sırasında 60°C sabit sıcaklık ve 3000 rpm karıştırma hızı uygulanması ve magnete duyarlılığı artırdığı düşünüldüğünden jelleşmeye bırakma işlemi uygulanması gerekli bir adım olarak düşünülmektedir.



Şekil 3.6 E örneğine ait FTIR spektrumu.

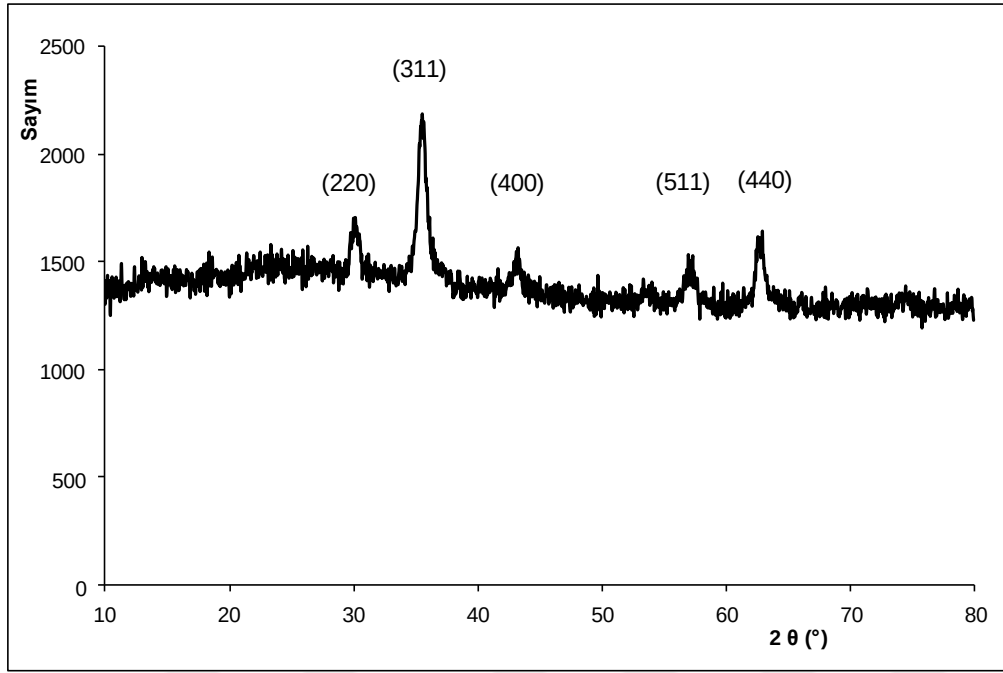
3.1.2 Magnetit nanoyapıların polimer içermeyen ortamda hazırlanması

Nişasta içermeyen ortamda yapılan sentez sonrasında oluşan yapılar siyah çökelek olarak görüldü. Sentezlenen yapılar ilk olarak FTIR ile karakterize edilerek yapıdaki demir-oksijen bağları tarandı. Şekil 3.7’de yapılara ait FTIR spektrumu görülmektedir. Fe-O titreşimlerinin FTIR spektrumunda 560-600 cm^{-1} ’deki band aralığında belirlendiği (Dashnyam et al., 2014) bilinmektedir, dolayısıyla manyetik nanoyapıların FTIR spektrumunda görülen 582 cm^{-1} ’deki pikin manyetik çekirdekdeki Fe-O titreşimlerine denk geldiği söylenebilmektedir.



Şekil 3.7 Sentezlenen yapılara ait FTIR spektrumu.

Demir-oksijen bağının karakterizasyonundan sonra yapıların XRD analiziyle faz kompozisyonu analizlendi. Elde edilen XRD diyagramı ve pattern analizi sırasıyla Şekil 3.8 ve 3.9’da verilmektedir.



Şekil 3.8 Sentezlenen yapıların XRD faz diyagramı.

Pattern List: (Bookmark 4)

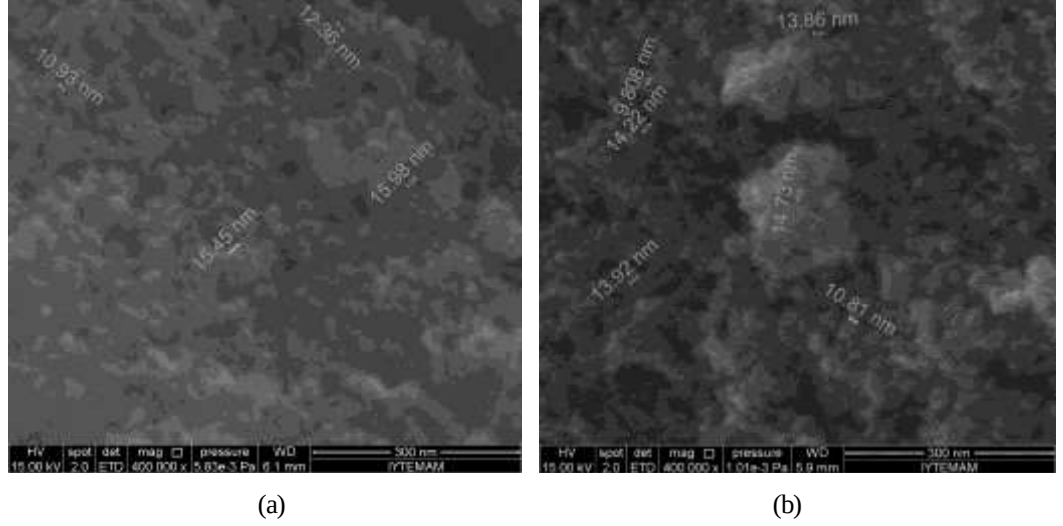
Visible	Ref. Code	Score	Compound Name	Displacement [°2Th.]	Scale Factor	Chemical Formula
*	01-076-0955	67	iron diiron(III) oxide, magnetite, low	0,000	0,977	Fe ₃ O ₄

Name and formula

Reference code:	01-076-0955
Common name:	iron diiron(III) oxide, magnetite, low
PDF index name:	Iron Oxide
Empirical formula:	Fe ₃ O ₄
Chemical formula:	Fe ₃ O ₄

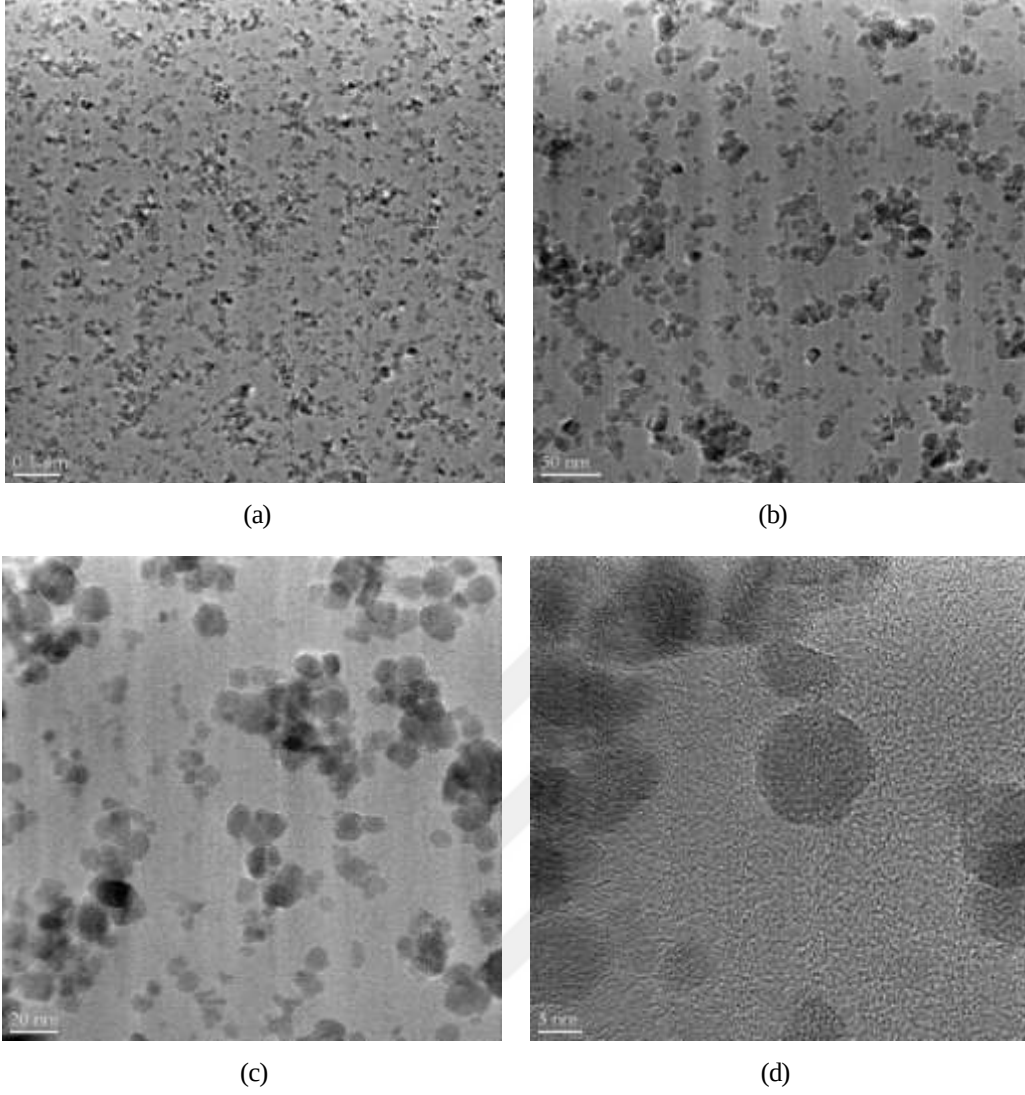
Şekil 3.9 Yapıların XRD match analiz sonucu.

Sentezlenen yapıların magnetit kristal yapısında olduğu saptandıktan sonra SEM ile görüntülenerek morfolojik yapısı ve boyutları hakkında bilgi edinildi. Elde edilen görüntüler Şekil 3.10 'da verilmektedir. Sonuçlara göre magnetit nanopartiküller hemen hemen küresel yapı ve 10-15 nm boyutludur. Nanopartiküllerin boyutlarının 20 nm' den küçük olması sebebiyle süperparamanyetik özellik gösterdiği söylenebilmektedir.



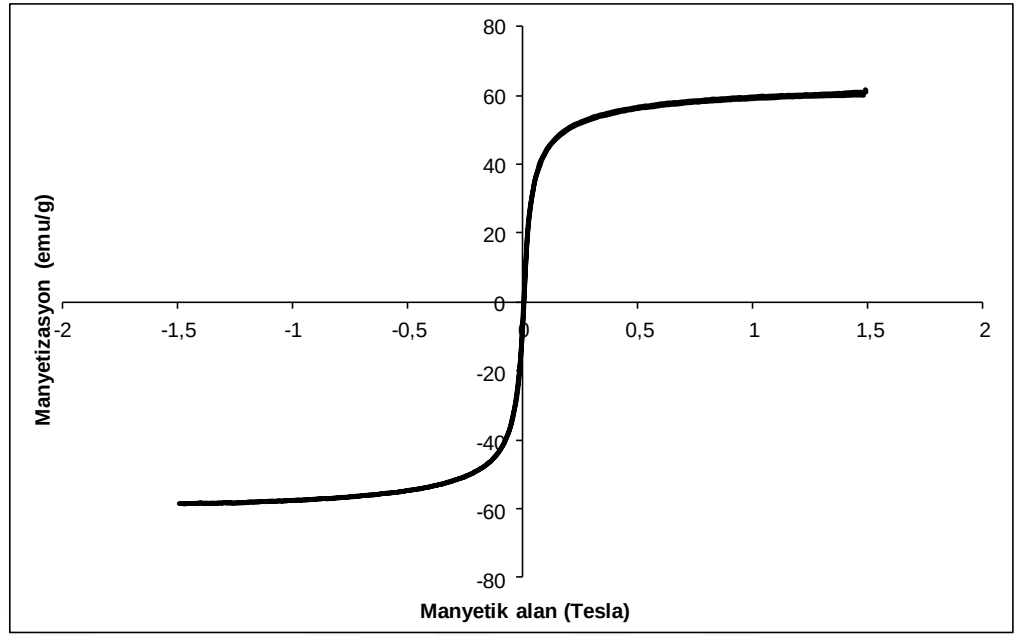
Şekil 3.10 Magnetit nanoyapılara ait a) ve b) 300 nm skalalardaki SEM görüntüleri.

Magnetitler SEM görüntüleme yanında HR-TEM ile de incelendi. Partikül boyutlarının SEM verilerine uygun olarak 10-15 nm arasında ve yapılarının küresel şekilli olduğunu görülmektedir (Şekil 3.11). Literatürde de kopresipitasyon yöntemi ile sentezlenen magnetit boyutlarının ~10 nm olduğu bildirilmiştir (Cheraghipour et al., 2013).



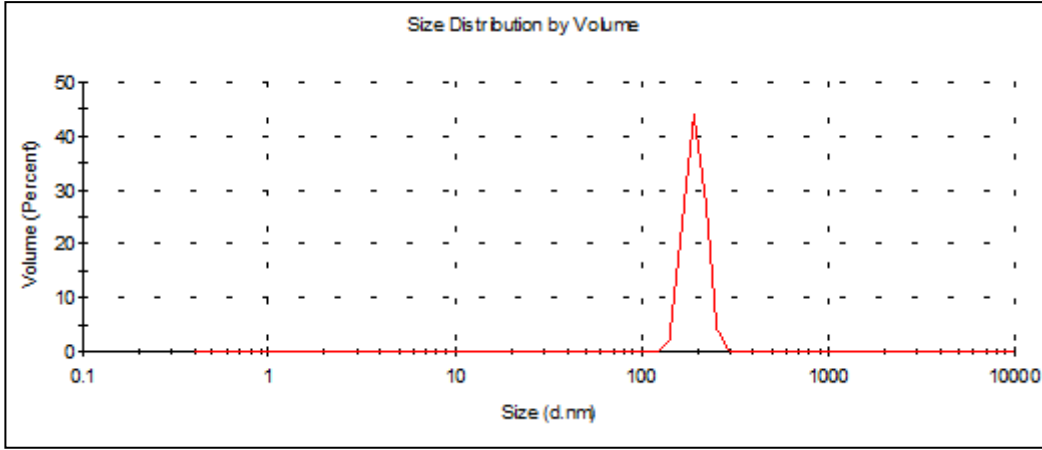
Şekil 3.11 Magnetitlerin a) 0,1 μm , b) 50 nm, c) 20 nm, d) 5 nm skaladaki HR-TEM görüntüleri.

Magnetitlerin titreşimli örnek manyetometresi ile yapılan manyetizasyon analiz sonucu Şekil 3.12’de verilmektedir. Elde edilen sonuçlar uygulanan manyetik alana karşı gram nanopartikül başına moment (emu) hesaplanarak gösterilmektedir. Magnetitlerin 1 Tesla alan altında ~ 59 emu/g; 1,5 Tesla alan altında ise ~ 60 emu/g değerinde manyetik cevap oluşturduğu bulunmuştur ayrıca doygunluk manyetizasyon değeri (M_s) de yine ~ 60 emu/g olarak belirlenmiştir. Yapıların kalıcı manyetizasyonu saptanmadığından süperparamanyetik özellikte olduğu sonucuna varılmıştır. Sadighian ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada magnetit nanopartiküllerin M_s değeri 56,8 emu/g olarak saptanmış olup (Sadighian et al., 2014) bulunan sonuca oldukça yakın olduğu görülmektedir.



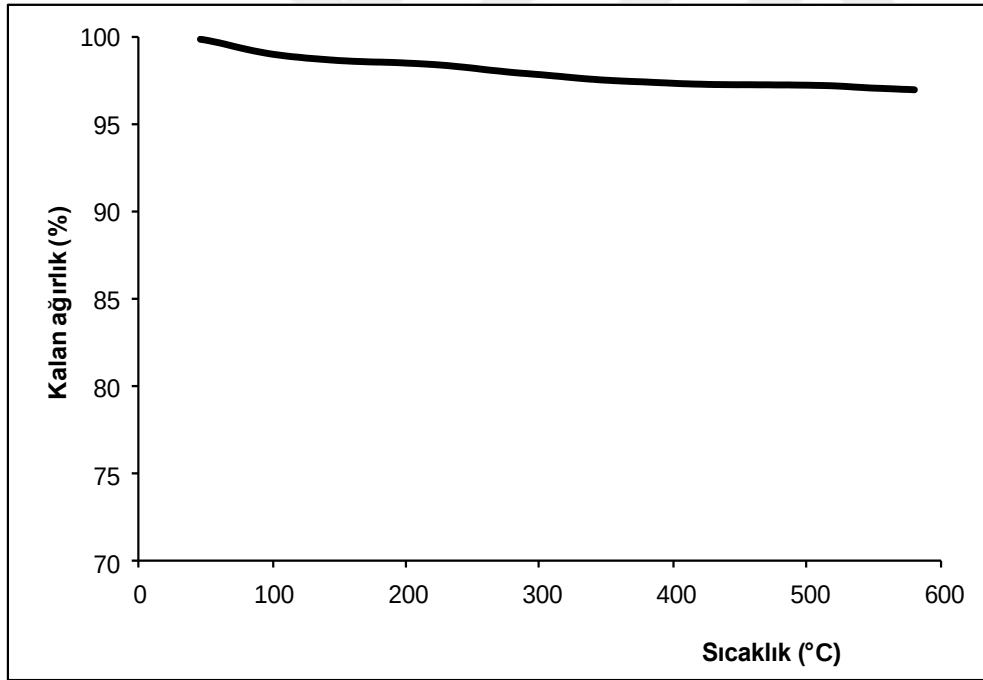
Şekil 3.12 Magnetit nanopartiküllerin artan manyetik alan altındaki manyetizasyonu.

Magnetitlerin kuru formdaki boyutlarının mikroskop ile incelenmesinin yanında hidrodinamik çapları da zetasizer cihazı ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlarda magnetitlerin hidrodinamik çapının $194,1 \pm 24,69$ nm olduğu bulunmuştur (Şekil 3.13). Manyetik yapıların literatürde de (Nicolas et al., 2013) hidrodinamik çaplarının kuru formlarına göre daha yüksek çıkabildiği görülmektedir. Manyetik nanopartiküllerin yüzey alanı/hacim oranının fazla olması nedeniyle sahip oldukları yüksek yüzey enerjisini düşürmek için dipol dipol çekimleri ile biraraya gelme eğiliminde olduğu bilindiğinden (Easo and Mohanan, 2013; Nicolas et al., 2013) boyutların yüksek çıktığı tahmin edilmektedir.



Şekil 3.13 Sentezlenen magnetitlerin boyut dağılımları.

Magnetitlerin TGA analiz sonucu Şekil 3.14'te gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlarda literatür verilerine (Petcharoen and Sirivat, 2012) uygun olarak yapının 600°C'ye kadar bozunmadığı görülmektedir. 100°C civarında meydana gelen % 2-3'lük ağırlık kaybının yapıya adsorbe suyun uzaklaşması ile açıklanmaktadır.



Şekil 3.14 Magnetitlerin termogram eğrisi.

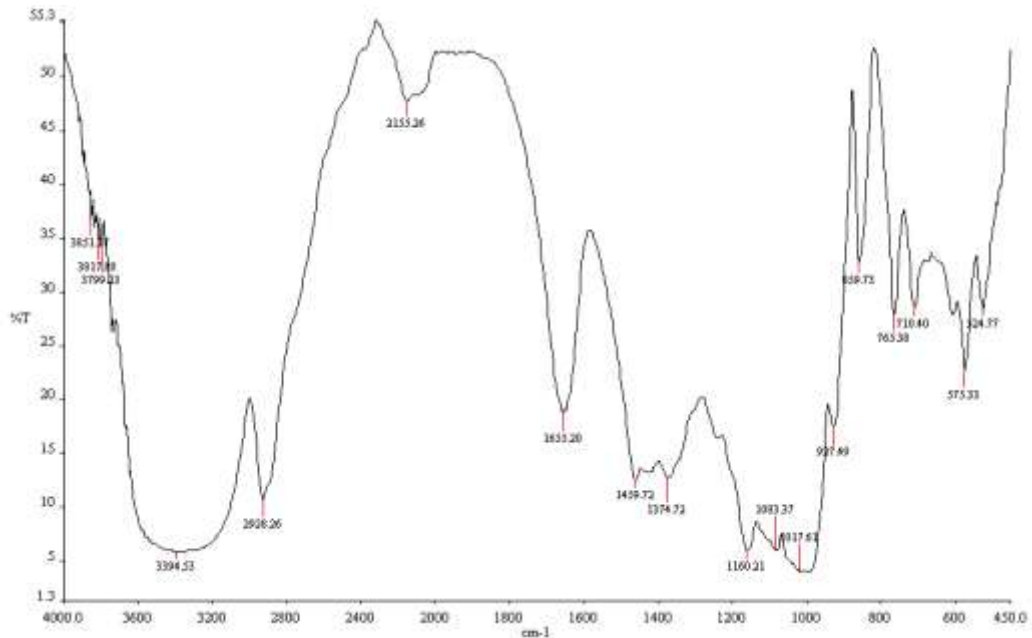
Magnetitlerin sulu ortamdaki zeta potansiyeli $-26,8 \pm 1,76$ mV olarak saptandı. Magnetitlerin sahip olduğu hidroksil gruplarının pH 6,3 civarındaki iyonizasyonundan ötürü (Singh et al., 2012) potansiyelin negatif değerde çıkması beklenen bir sonuçtur. Magnetit yapısındaki Fe-OH grupları amfoterik özellik göstermekle birlikte ortam pH'ına göre pozitif (Fe-OH_2^+) veya negatif (Fe-O^-) yük taşıyabilir (Singh et al., 2012).

Wu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da magnetitlerin zeta potansiyel değeri -33,3 mV olarak belirlenmiştir (Wu et al., 2014).

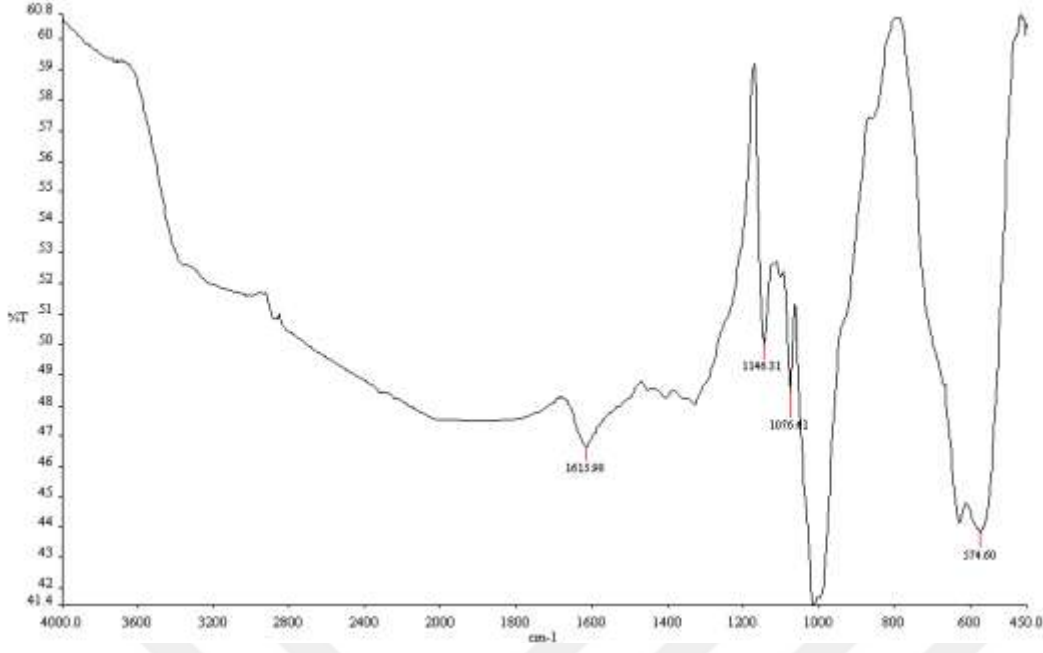
3.2 Manyetik Nanopartiküllerin Polimer ile Kaplanması ve Karakterizasyonu

3.2.1 Magnetit nanoyapıların nişasta ile kaplanması

Magnetitlerin herhangi bir biyopolimer ile kaplanması bir araya gelerek partiküllerin agregatlaşmasını önler ve stabilizasyonunu artırır (Nicolas et al., 2013). Çalışmada bu amaçla biyoyumlu polisakkarit yapı tercih edilmiştir. Hidroksil gruplarının Fe atomları ile etkileşimi dolayısıyla nişastanın magnetit nanopartikül yüzeyine kemisorbe olabileceği bilinmektedir (Dung et al., 2009). Reaksiyon sonunda oda sıcaklığındaki 15 saatlik bekleme süresi ise nişasta moleküllerinin yapısal olarak tekrar düzenlenmesini sağlamaktadır. Magnetitlerin nişasta ile kaplanmasında ilk olarak değişen nişasta konsantrasyonlarında bir seri deneme yapıldı. Magnet aracılı dekantasyon ile yapılan ayırma ve yıkama işlemlerinde elde edilen nanopartiküllerde FTIR analizi yapılarak nişastanın varlığı tespit edilmeye çalışıldı. Nişastaya ait FTIR spektrumu Şekil 3.15'te; örnek olarak verilen % 0,5 nişasta konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllere ait FTIR spektrumu ise Şekil 3.16'da verilmektedir.



Şekil 3.15 Nişastanın FTIR spektrumu.



Şekil 3.16 Manyetik dekantasyon ile saflaştırılan ve % 0,5 nişasta konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin FTIR spektrumu.

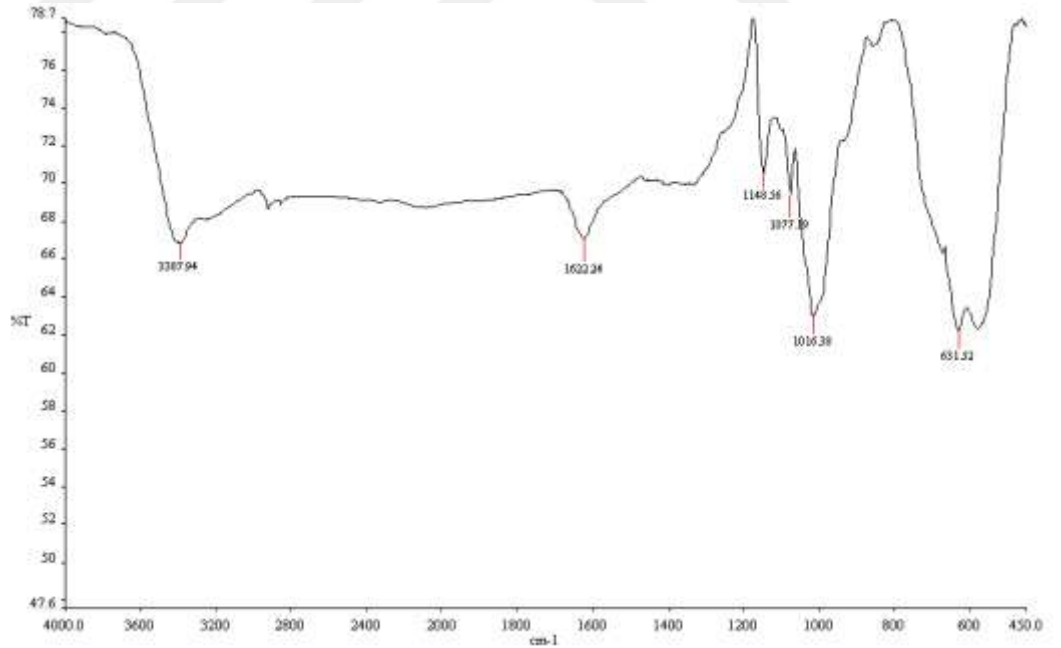
Nişastanın IR spektrumunda literatür verisine (Dung et al., 2009) uygun olarak 3394 cm^{-1} 'deki yayvan pik -OH grubuna, 2928 cm^{-1} 'deki pik C-H gerilmesine ve 1655 cm^{-1} 'deki pik ise C=O bağına denk gelmektedir (Şekil 3.16). Ayrıca $1017\text{-}1160\text{ cm}^{-1}$ 'deki bantlar yapıdaki C-O bağı gerilmelerine denk gelmektedir (Chang et al., 2011). Nişasta kaplı magnetitlere ait IR spektrumuna bakıldığında ise saf magnetit spektrumunda görülen 580 cm^{-1} 'deki bant yine görülmektedir (Şekil 3.16). 1615 cm^{-1} 'deki pik karbonil yapısını ve 3300 cm^{-1} civarında ve şiddeti az olan yayvan bant da yapıdaki hidroksil gruplarını göstermektedir. Sonuç olarak yapıda hem magnetit hem de nişasta varlığından söz edilebilmektedir.

Nişasta varlığı FTIR analiziyle belirlenen nanopartiküllerde TGA analizi ile nişastanın miktar tayini yapıldı. Artan nişasta konsantrasyonunda manyetik dekantasyonun zorlaşması ve net bir ayırım olmaması sebebiyle miknatısa giden ve gitmeyen fazlar ayrı olarak toplandı ve ayrı ayrı TGA ölçümü alındı. Bulunan sonuçlar Tablo 3.1'de verilmektedir. Özellikle %2 ve %3 nişasta konsantrasyonunda görülen bu durum için iki ayrı fazın nişasta kaplanma yüzdesi tabloda toplam aralık olarak verilmektedir.

Tablo 3.1 Değişen nişasta konsantrasyonunda hazırlanan ve manyetik dekantasyon ile saflaştırılan magnetitlerin nişasta ile kaplanma yüzdeleri.

Nişasta konsantrasyonu (%)	Nişasta ile kaplanma yüzdesi (%)
0,5	20
1	18
2	16-22
3	14-33

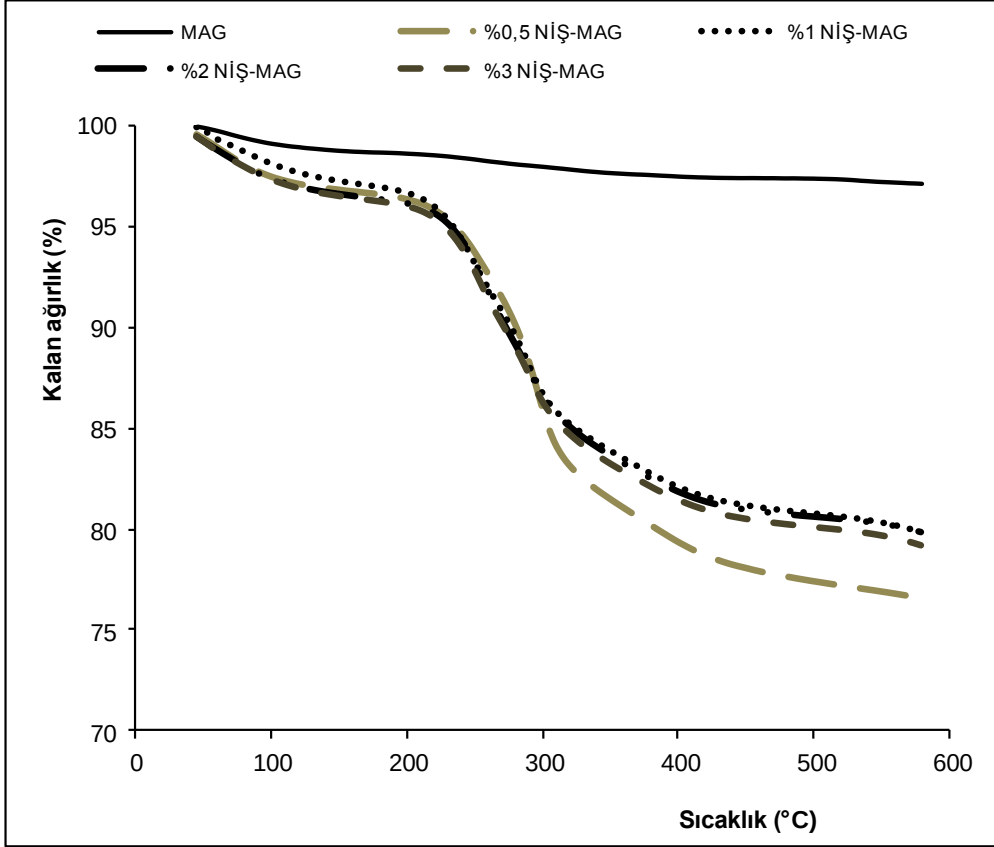
Karışım içindeki manyetik olan ve olmayan fazların net bir şekilde ayrılması için denemelere MACS kullanılarak devam edilmiş ve nişasta konsantrasyonu tekrar incelenmiştir. Örnek olarak % 0,5 nişasta konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllere ait FTIR spektrumu Şekil 3.17’de görülmektedir. Önceki denemede elde edilen sonuçlara yakın olarak magnetit piki görülmekle beraber 1622 cm^{-1} ’de karbonil piki ve 3380 cm^{-1} civarında hidroksil grupları da yine bulunmuştur.



Şekil 3.17 MACS ile saflaştırılan ve %0,5 nişasta konsantrasyonunda hazırlanan nanopartiküllerin FTIR spektrumu.

Değişen nişasta konsantrasyonlarında elde edilen nanoyapıların TGA ölçümleri ile yapıdaki % nişasta içeriği analizlendi. Nanopartiküllerin termogram eğrileri Şekil 3.18’de ve nişasta ile kaplanma yüzdeleri ise Tablo 3.2’de verilmektedir. Değişen

konsantrasyonlara karşın magnetitlerin nişasta ile kaplanma yüzdesinin neredeyse değişmediği bulunmuştur. Magnetit nanopartiküllerin karbohidrat polimerleri ile kaplanma yüzdeleri literatür verilerinde benzer olduğu görülmektedir (Jiang et al., 2009). Dolayısıyla çalışmanın bundan sonraki aşamalarında % 0,5 konsantrasyondaki nişasta ile devam edilmiştir.

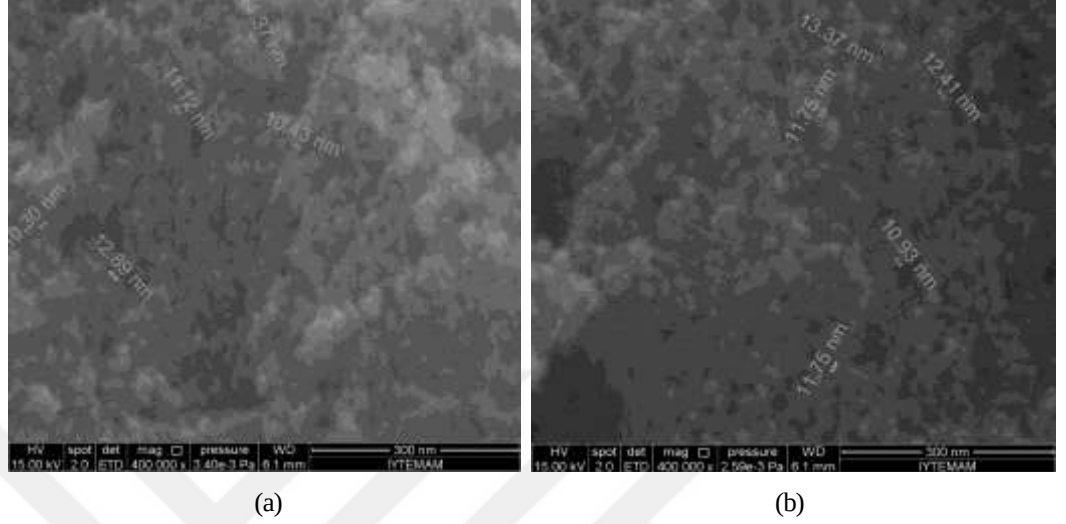


Şekil 3.18 Değişen nişasta (NiŞ) konsantrasyonunda hazırlanan ve MACS ile saflaştırılan magnetitlerin (MAG) termogram eğrileri.

Tablo 3.2 Değişen nişasta konsantrasyonunda hazırlanan ve MACS ile saflaştırılan magnetitlerin nişasta ile kaplanma yüzdeleri.

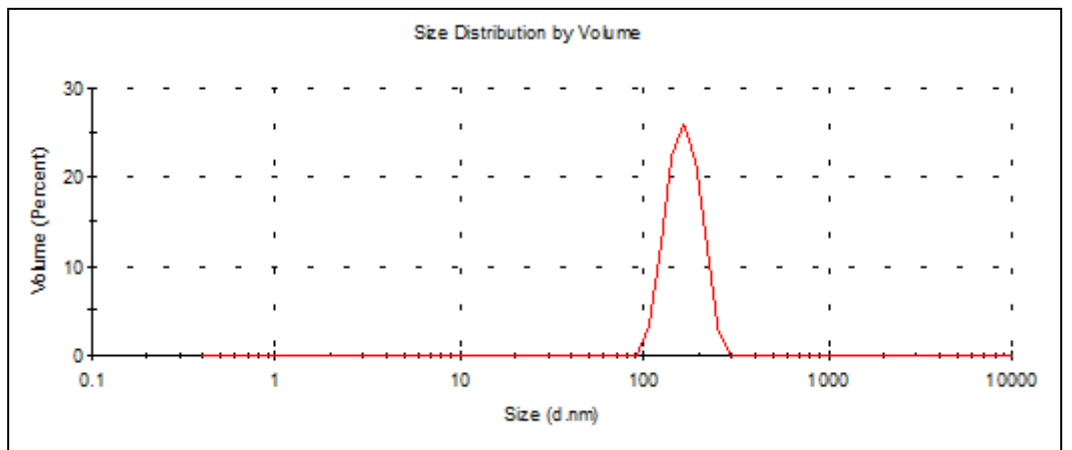
Nişasta konsantrasyonu (%)	Nişasta ile kaplanma yüzdesi (%)
0,5	20
1	17
2	17
3	17

%0,5 nişasta konsantrasyonunda hazırlanan nişasta kaplı magnetitlere ait SEM görüntüleri Şekil 3.19'da gösterilmektedir. Nanopartiküllerin morfolojileri incelendiğinde küresel yapının bozulmadığı ve boyutunun neredeyse aynı kaldığı dikkati çekmektedir.

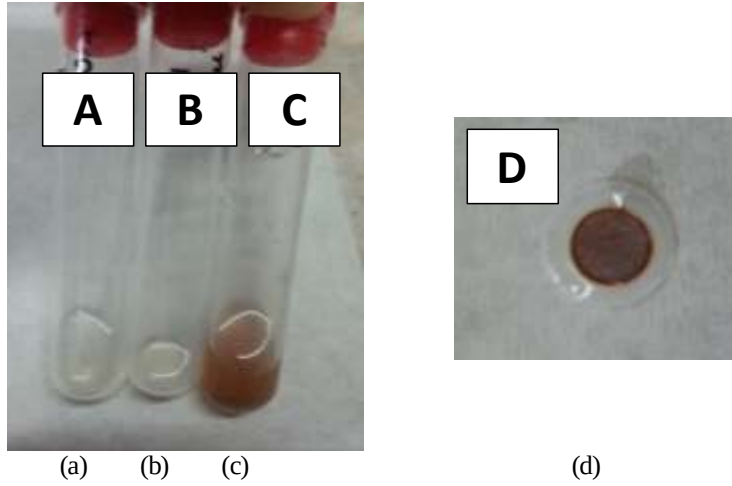


Şekil 3.19 % 0,5 nişasta konsantrasyonunda hazırlanan karbohidrat yapı kaplı magnetitlere ait a) ve b) 300 nm skaladaki SEM görüntüleri.

Şekil 3.20' de nişasta kaplı magnetitlerin boyut analizi sonucu görülmektedir. Nanoyapıların hidrodinamik çapı $166,6 \pm 34,27$ nm olarak saptanmıştır. Nişasta ile kaplanan magnetitlerin agregasyon probleminin aşlamadığı yapılan analiz sonuçlarından görülmektedir. Ayrıca 400 ve 100 nm por çaplı ekstruder membranı ile gerçekleştirilen filtrasyonda da nanopartiküllerin filtrede takılı kaldığı bulunmuştur. (Şekil 3.21) Dolayısıyla yapıya ek bir polimer ile modifikasyona ihtiyaç duyulmuştur.



Şekil 3.20 Sentezlenen nişasta kaplı magnetitlerin boyut dağılımları.

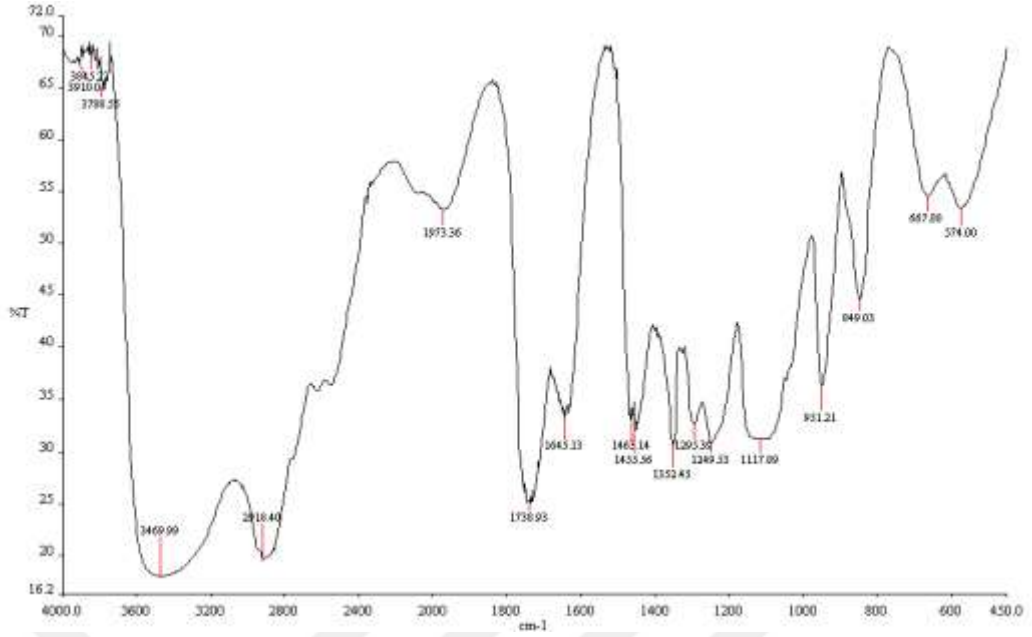


Şekil 3.21 Nanopartiküllerin a) 400 nm por çaplı membrandan geçirilen kısmı, b) 100 nm por çaplı membrandan geçirilen kısmı, c) Başlangıç formu d) 400 nm por çaplı membranda kalan nanopartiküller.

3.2.2 Nişasta kaplı magnetit nanoyapıların PEG diasit ile modifikasyon çalışmaları

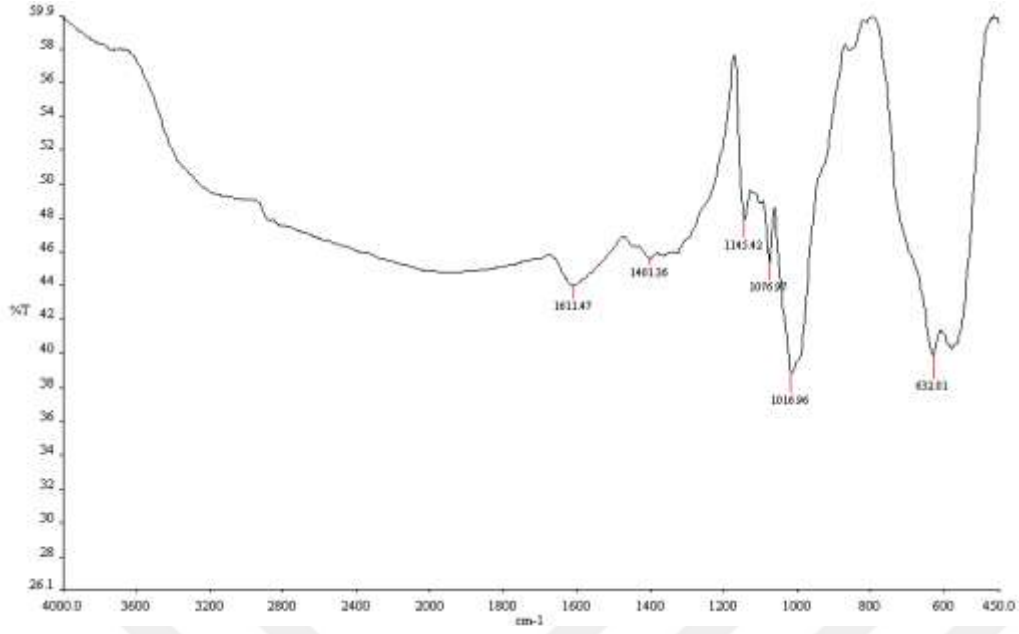
Nişasta kaplı manyetik nanopartiküllerin sulu ortamdaki dispersiyonunu artırmak ve yapının stabilizasyonunu sağlamak amacıyla nişasta kaplı magnetitler PEG diasit ile modifiye edilmeye çalışıldı. PEG diasitin yapısındaki karboksilik asit gruplarının nişasta ve/veya magnetit yüzeyindeki hidroksil grupları ile esterifikasyon reaksiyonuna girmesi ve ester bağı oluşturmasıyla yapıların birbiri ile bağlanması sağlanabilir. Ayrıca doksorubisin yapısında da yine hidroksil grubu bulunduğu için, PEG diasit ilacın bağlanması için bir spacer görevi görebilir veya ilacın amino grubu ile iyonik etkileşime imkan verebilir. Reaksiyon sırasında ortama eklenen sodyum hipofosfit ise bir katalizör olarak reaksiyonu hızlandırır (Dastidar and Netravali, 2012).

PEG diasite ait FTIR spektrumu Şekil 3.22' de görülmektedir. Elde edilen sinyallerden $3469,99\text{ cm}^{-1}$ 'deki yayvan pik hidrojen bağı yapmış olan $-\text{OH}$ grubuna aittir. $2918,40\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen sinyal alifatik karbon zincirine ait $-\text{CH}$ gerilmesini temsil etmektedir. $1738,93\text{ cm}^{-1}$ 'de karboksil grubuna ait gerilme görülmektedir. Yine $1645,13\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen gerilme karbonil grubuna denk gelmektedir ve karboksil grubuna ait pikle örtüşmektedir. $1464,14\text{ cm}^{-1}$, $1455,56\text{ cm}^{-1}$ ve $1352,45\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler alifatik karbon zincirine ait $-\text{CH}$ gerilmesini göstermektedir. $1295,39\text{ cm}^{-1}$, $1249,53\text{ cm}^{-1}$ ve $1117,89\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen sinyaller PEG diasit üzerindeki eter bağı yapmış olan karbonlara ait $-\text{CO}$ gerilmelerine aittir.

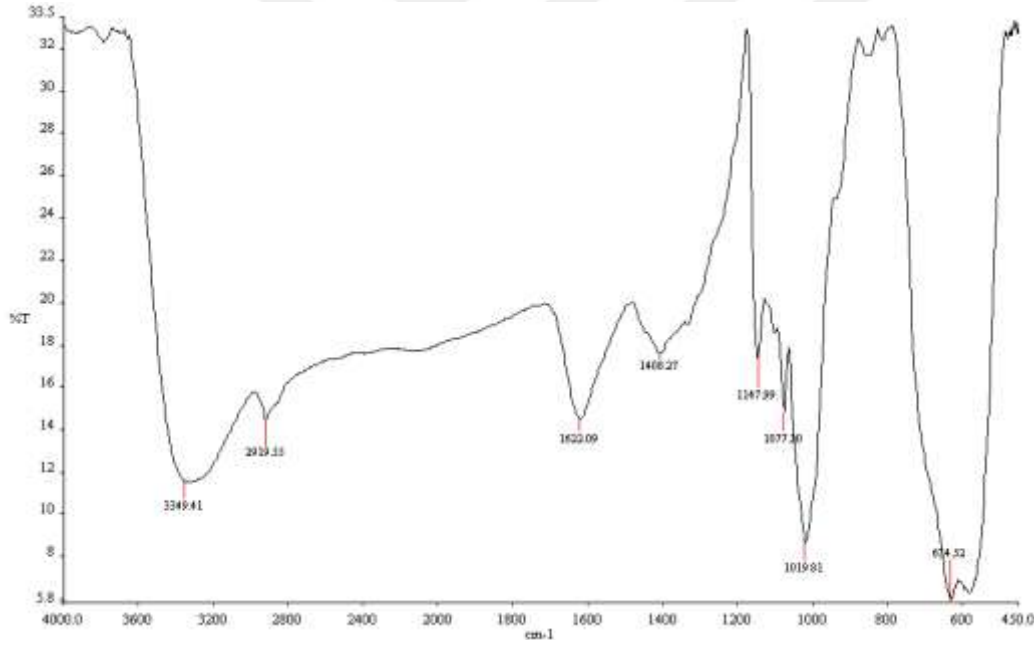


Şekil 3.22 PEG diasite ait FTIR spektrumu.

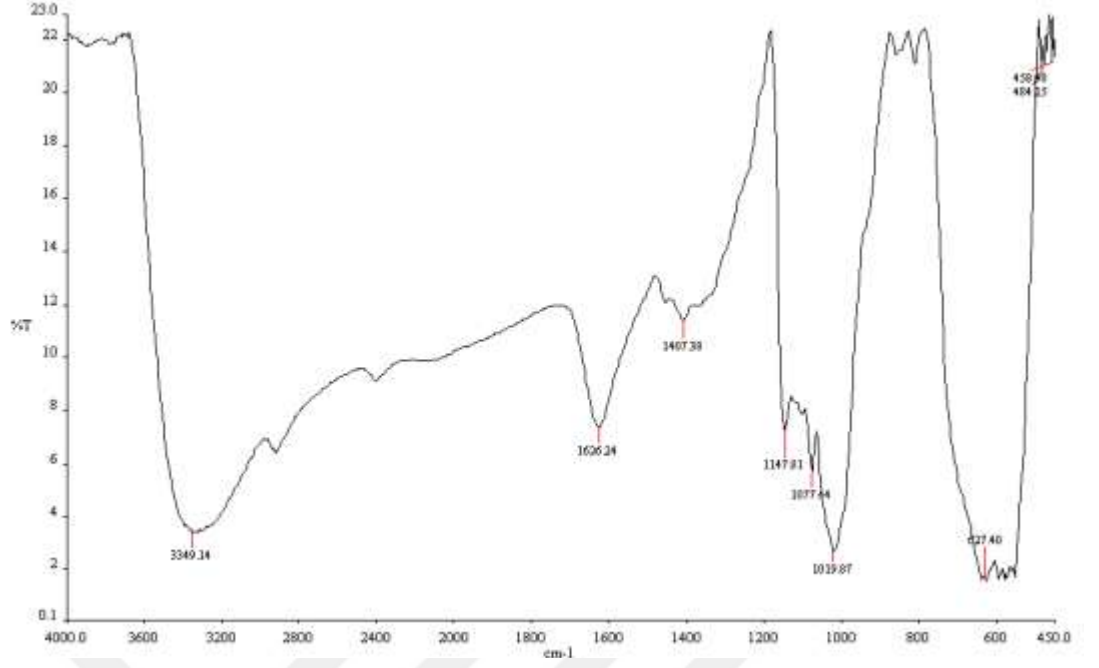
ICP-MS analizi temel alınarak magnetit/PEG diasit oranının 1/1 olduğu ve magnetitlerin sıvı formda kullanılmasıyla elde edilen manyetik nanopartiküllere ait FTIR sonucu Şekil 3.23'te gösterilmektedir. Magnetit/PEG diasit oranının 1/1; 1/10; 1/100 kullanılarak elde edilen nanopartiküllere ait FTIR sonuçları sırasıyla Şekil 3.24, 3.25 ve 3.26'da verilmektedir. Spektrum sonuçlarına bakıldığında 1/100 sentez oranındaki nanopartiküllerde bile PEG diasitin karboksil grubuna karşılık gelen sinyal görülmemektedir. Ayrıca hazırlanan bu nanopartiküllerin sulu ortamdaki dispersiyonu iyi değildir, dolayısıyla PEG diasitin bağlanması için reaksiyon koşullarının değiştirilmesi gerektiği düşünülmüştür.



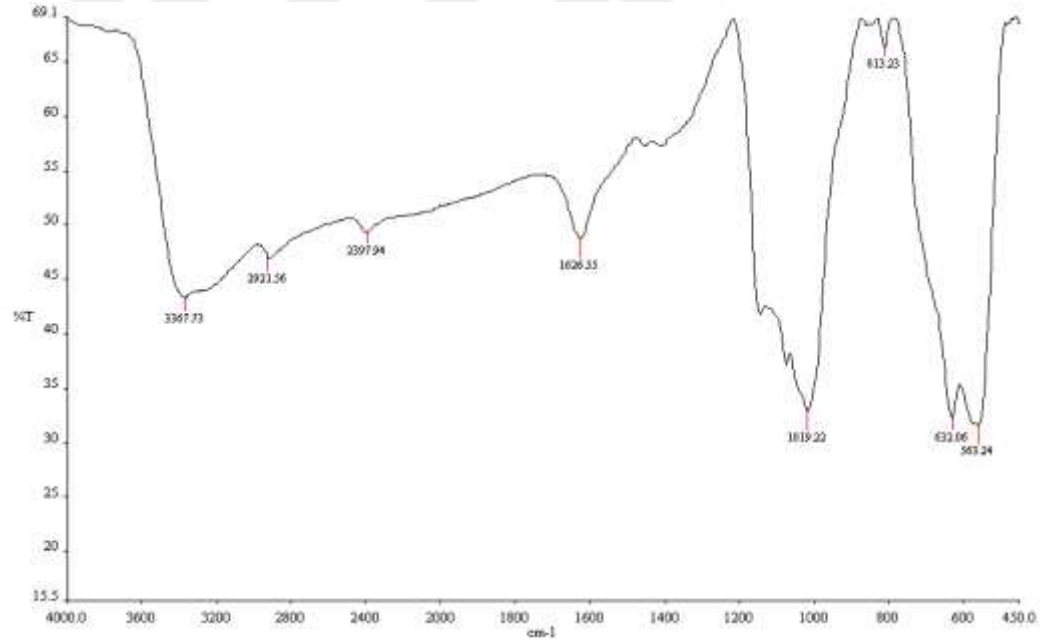
Şekil 3.23 ICP-MS ile demir içeriği üzerinden PEG diasit ile bağlanan nişasta kaplı magnetitlere ait FTIR spektrumu.



Şekil 3.24 Magnetit/PEGdiasit oranının 1/1 olarak kullanıldığı reaksiyon sonucu elde edilen nanoyapıların FTIR spektrumu.

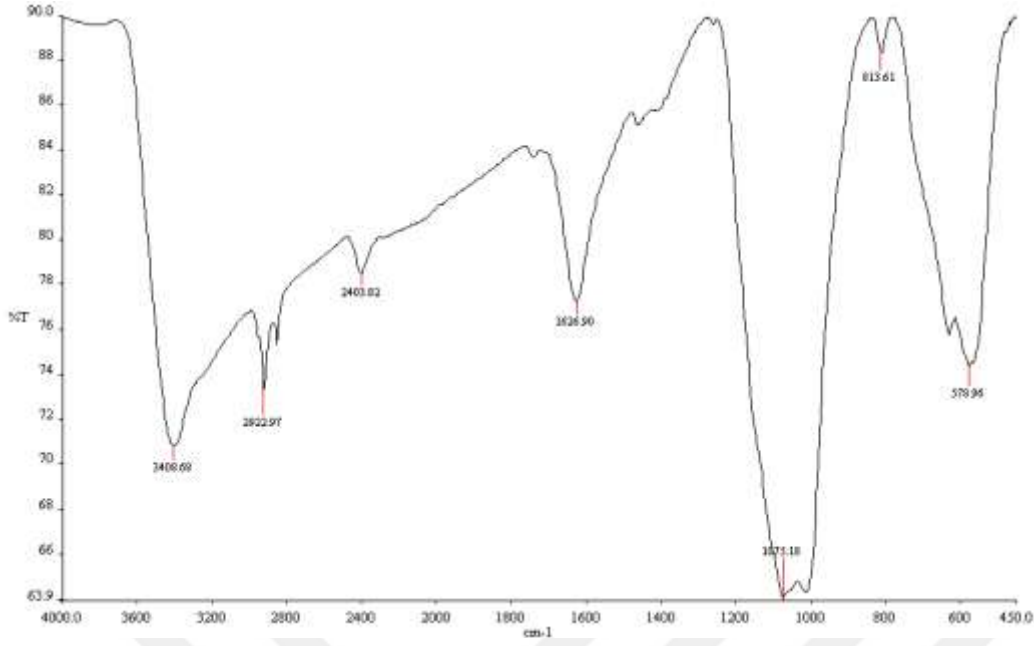


Şekil 3.25 Magnetit/PEG diasit oranının 1/10 olarak kullanıldığı reaksiyon sonucu elde edilen nanoyapıların FTIR spektrumu.



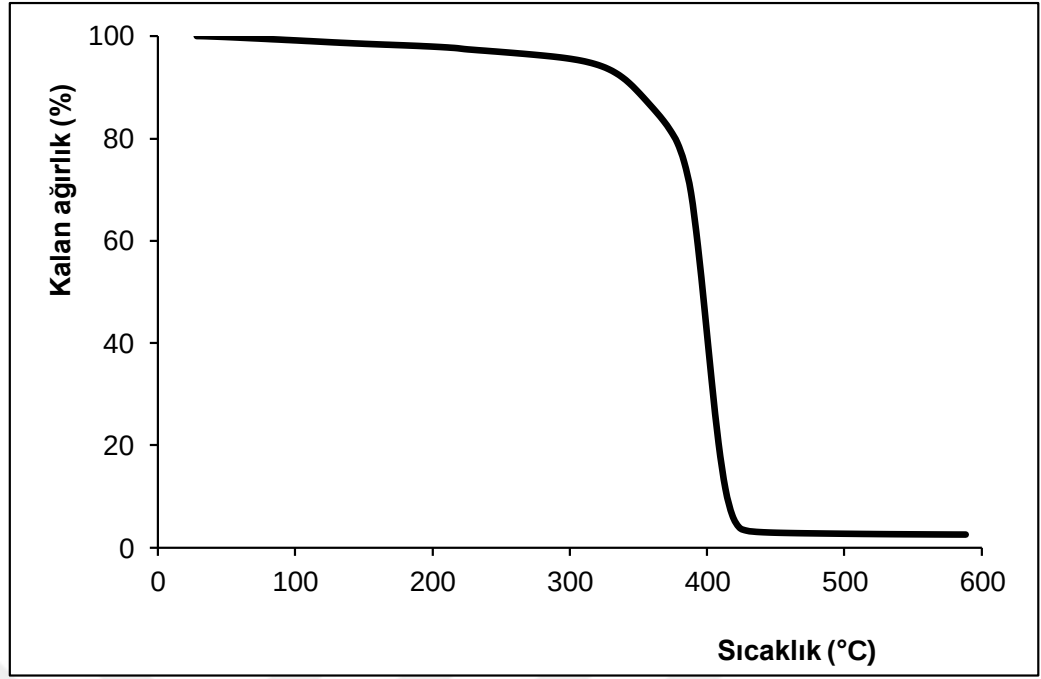
Şekil 3.26 Magnetit/PEG diasit oranının 1/100 olarak kullanıldığı reaksiyon sonucu elde edilen nanoyapıların FTIR spektrumu.

Bir sonraki denemede magnetit/PEG diasit oranı 1/100 olarak devam edilip reaksiyon süresi uzatılarak 6 saate çıkarılmıştır. Oluşan partiküllerin FTIR sonucunda çok düşük olmakla birlikte karboksil grubuna ait olan 1700 cm⁻¹'lerdeki pik görülmüştür, bu nedenle yapıya PEG diasitin bağlanmış olabileceği düşünülmektedir (Şekil 3.27).

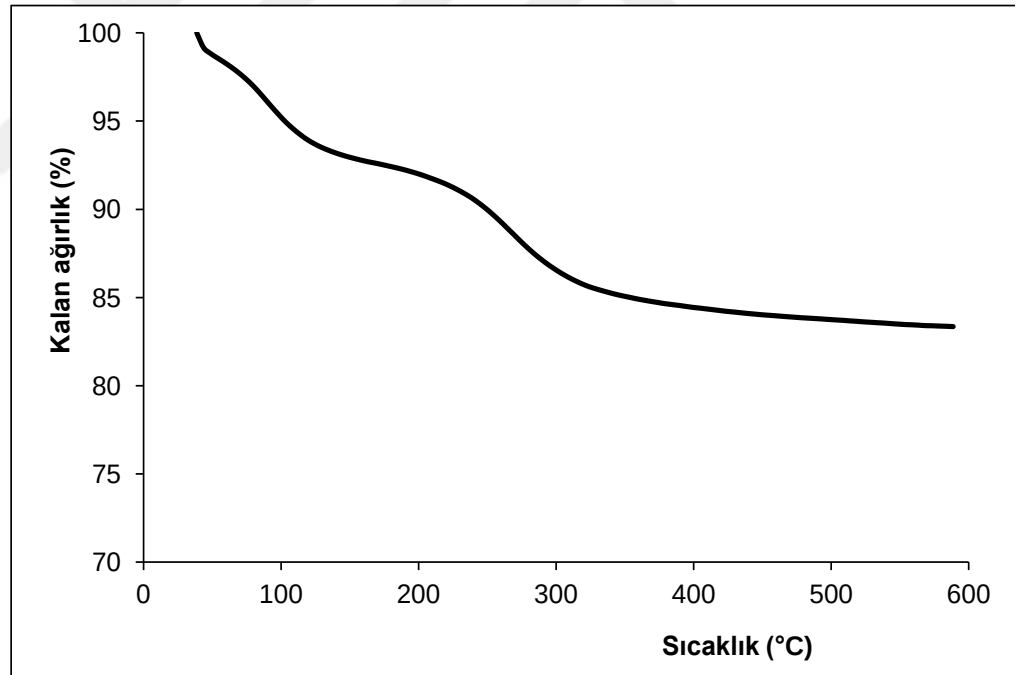


Şekil 3.27 Magnetit/PEG diasit oranının 1/100 olarak kullanıldığı ve 6 saatlik reaksiyon sonucu elde edilen nanoyapıların FTIR spektrumu.

Magnetitlere bağlı organik yapı yüzdesi TGA ile bulunmaya çalışıldı. PEG diasite ait TGA analiz sonucu Şekil 3.28’de görülmektedir. Yapıdaki suyun uzaklaşmasıyla PEG diasit, literatürde de (Feng et al., 2008) belirtildiği gibi 200°C üstünde bozunmaya başlamaktadır. 400 °C civarında ise tamamen bozunmaktadır. Şekil 3.29’da partiküllere ait termogram eğrisi verilmektedir. Nanopartiküllerde yine ağırlıkça yaklaşık % 20 oranında organik yapı vardır. Sonuç olarak oldukça düşük miktarda PEG diasitin yapıda olduğu tespit edilmekle beraber nanopartiküllerin suda dispersiyonu açısından bir farklanma görülmemektedir.



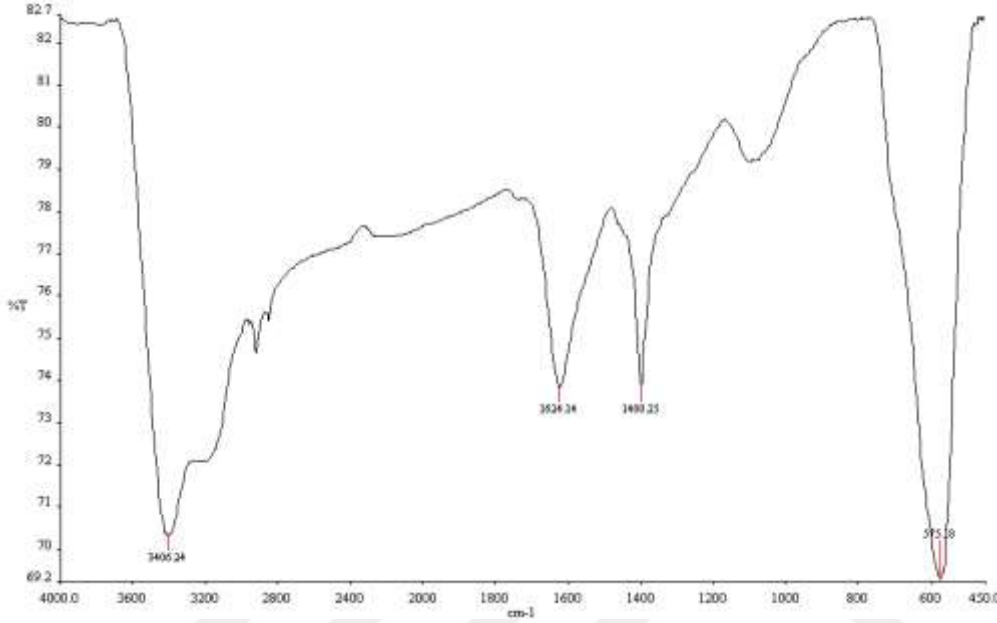
Şekil 3.28 PEG diasite ait termogram eğrisi.



Şekil 3.29 Magnetit/PEG diasit oranının 1/100 olarak kullanıldığı ve 6 saatlik reaksiyon sonucu elde edilen nanoyapıların termogram eğrisi.

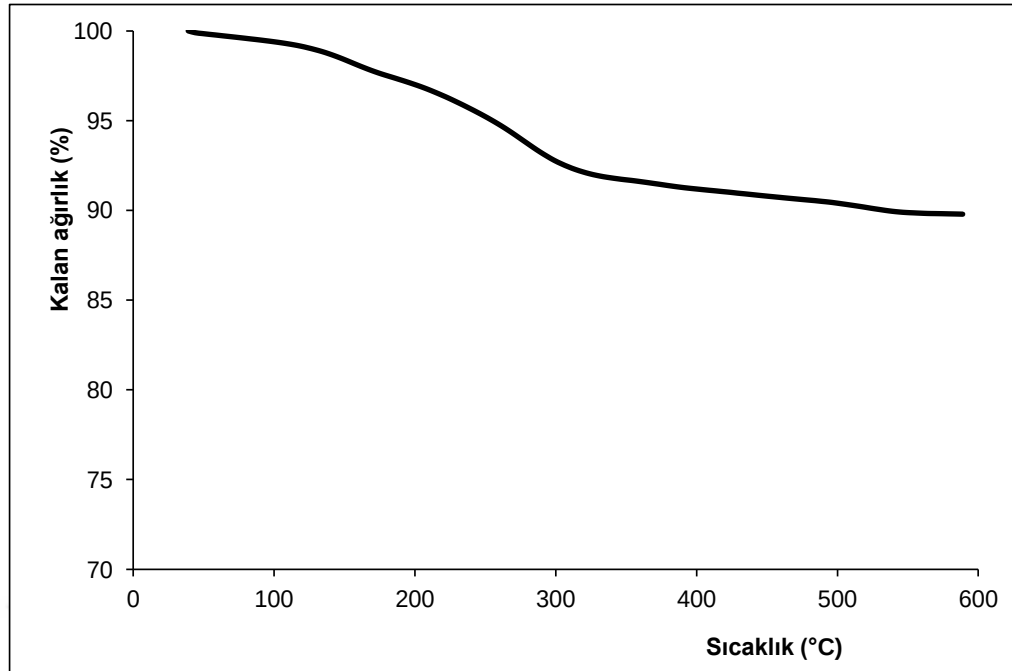
PEG diasitin magnetitlere bağlanabilirliğinin tespitini kontrol amacıyla magnetitlerin PEG diasit ile kaplanması denenmiştir. Hazırlanan yapılara ait FTIR sonucu Şekil 3.30'da gösterilmektedir. $3406,24\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen sinyal H bağı yapmış olan -OH grubuna aittir. 2900 cm^{-1} dolaylarında görülen sinyal alifatik zincirdeki -CH gerilmelerini temsil etmektedir. Yine $1400,25\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen sinyal alifatik zincirdeki

–CH gruplarına aittir. PEG diasit ile yapılan deneme sonucunda zayıf da olsa 1700 cm^{-1} dolaylarında karboksil grubuna ait sinyal alınmıştır. Ancak $1624,14\text{ cm}^{-1}$ 'de karbonil grubu sinyali görülmektedir ve bu karbonil grubu sinyalinin PEG diasidin karboksilinin koordinasyona katılmayan karbonil gruplarına ait olduğu sonucuna varılmıştır. $1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$ aralığında görülen yayvan sinyalin yapıda bulunan eter bağı bağlı olarak C-O gerilmelerine ait olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 3.30 PEG diasit kaplı magnetitlere ait FTIR spektrumu.

Yapıda PEG diasit görüldükten sonra TGA analizi ile PEG diasitin miktarı belirlenmeye çalışıldı. PEG diasit kaplı magnetitlere ait TGA analiz sonucu Şekil 3.31'de görülmektedir. Radovic ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmaya uygun olarak partikül içerisinde PEG diasit miktarı ağırlıkça %10 olarak bulunmuştur (Radovic et al., 2014). PEG diasit yapısındaki karboksilat grubunun demir katyonları ile güçlü biçimde koordinasyon yaptığı bilinmektedir.



Şekil 3.31 PEG diasit kaplı magnetitlere ait termogram eğrisi.

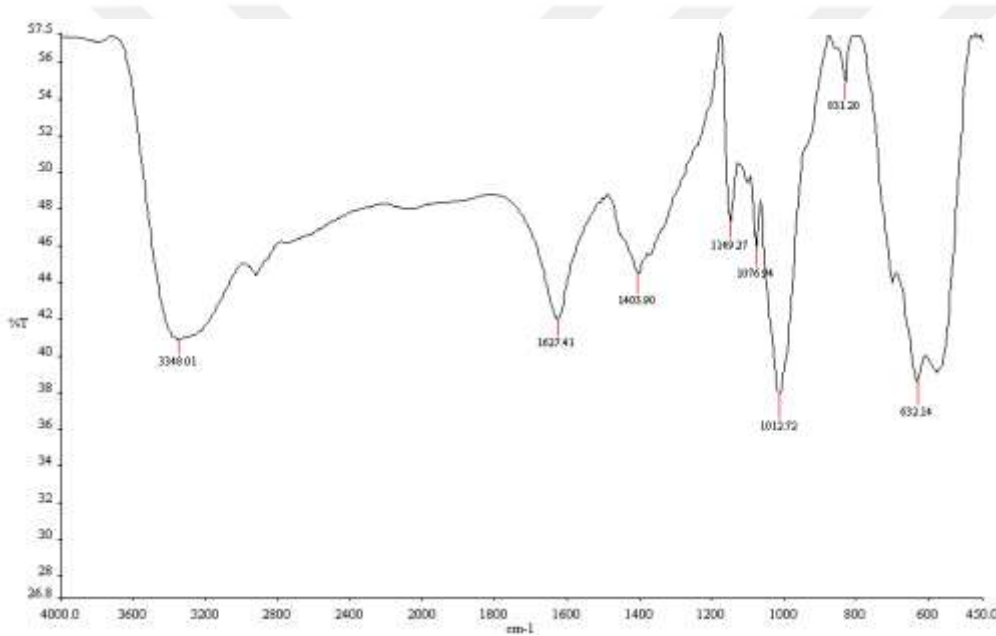
PEG diasit kaplı nanopartiküllerin suda dağılımını incelendiğinde partiküllerin sonik banyoda dispersiyonu sırasında yoğun agregat oluştuğu belirlendi. Sonike edilmeyen nanopartiküllerin extruder membranında filtre edilmeye çalışıldığında ise neredeyse tamamının membranda takılı kaldığı görüldüğünden magnetitlerin nişasta ve PEG diasit ile farklı bir yöntemle kaplanması gerektiği düşünüldü.

3.2.3 Magnetit nanoyapıların nişasta ve PEG diasit ile aynı anda kaplanması

3.2.3.1 Magnetit miktarı optimizasyonu

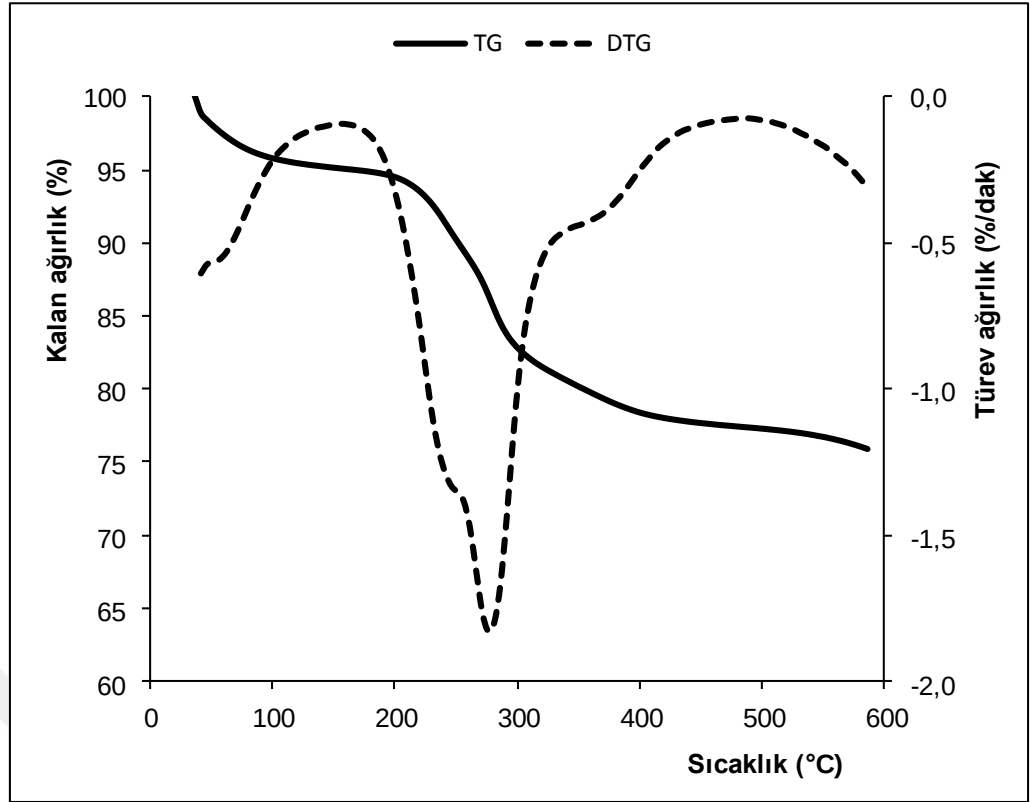
Nişasta ve PEG diasit ile kaplanabilecek optimum magnetit miktarının belirlenmesi için magnetit/PEG diasit oranı (w/w) 1,5/10 ve 1/10 olarak seçilerek denemeler yapılmıştır. 1,5/10 oranı kullanıldığında yoğun agregat tespit edilerek polimer karışımının yeterli gelmediği düşünülmüştür. Dolayısıyla daha yüksek magnetit miktarı ile agregasyon artacağından çalışılmamış ve 1/10 oranı denenmiştir. Bu oran ile elde edilen nanopartiküllerin dispersiyonunun oldukça iyi olduğu ve extruder membranından geçebildiği bulunmuştur ve ileri karakterizasyonları yapılmıştır. Sonraki aşamalarda eritrosit vezikülleri içerisine yükleneceğinden nanopartiküllerin filtre olabilmesi çok önemli bir faktördür.

PEG diasit ve nişastanın aynı anda katılarak kaplama işleminin yapıldığı örneklerde yapılan FTIR analizi Şekil 3.32 'de gösterilmektedir. Elde edilen piklerden $3348,01\text{ cm}^{-1}$ 'deki sinyal H bağı yapmış olan --OH grubuna aittir. 2900 cm^{-1} dolaylarında görülen sinyal alifatik zincirdeki --CH gerilmelerini temsil etmektedir. Yine $1403,90\text{ cm}^{-1}$ 'deki sinyal alifatik zincirdeki --CH gruplarına aittir. 1700 cm^{-1} 'lerde beklenen karboksil grubuna ait pik görülmemiştir. Bunun nedeni olarak PEG diasitin manyetik çekirdek ile içeri kısımlarda bağ yapması, nişasta ile etkileşmesi ve yüzeyde boşta karboksil grubunun kalmaması olarak düşünülebilir. $1627,41\text{ cm}^{-1}$ 'de karbonil grubu sinyali görülmektedir ve bu sinyalin nişasta ve/veya PEG diasidin karboksilinin koordinasyona katılmayan karbonil gruplarına ait olduğu düşünülebilir. $1010\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ 'lerde glukoz halkasındaki ve/veya PEG diasit yapısındaki C-O gerilmelerine ait olması şeklinde yorumlanabilir.



Şekil 3.32 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlere ait FTIR spektrumu.

PEG diasit ve nişastanın aynı anda katılmasıyla reaksiyona sokulan manyetik nanopartiküllere dair TGA analizi sonucu Şekil 3.33 'te verilmektedir. Termogram sonucuna göre yapıda ağırlıkça yaklaşık olarak % 3 oranında su, % 20 oranında organik yapı (nişasta ve PEG diasit karışımı) ve % 77 oranında magnetitler vardır. Ayrıca türev termogravimetrik ağırlık (DTG) verilerine göre nanoyapının ilk maksimum bozunma sıcaklığı yaklaşık $276\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' dir.

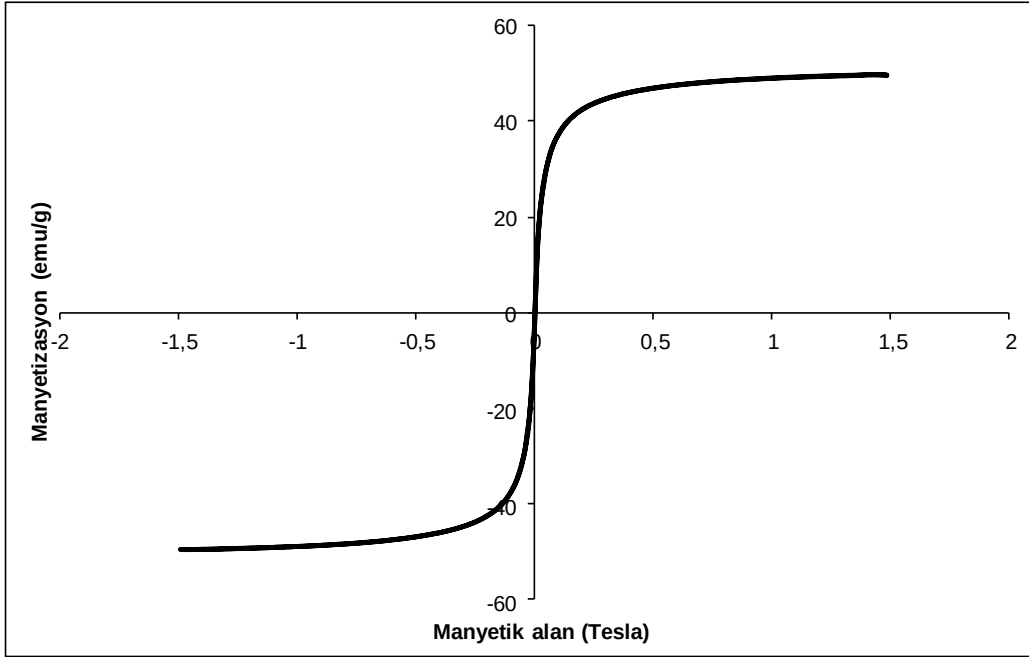


Şekil 3.33 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlere ait termogram eğrisi.

TGA sonucuna göre magnetitler ağırlıkça yaklaşık % 20 oranında polimer karışımı ile sarılı olduğundan 0,6 g nişasta ve 5 g PEG diasit ile 0,5 g magnetit oranından daha düşük miktarda magnetit bileşeni içeren reaksiyon kurulmamıştır. Çünkü bu durumda polimer karışımının aşırı geleceği ve bunun da maliyeti artıracakı düşünülmektedir. Dolayısıyla magnetit/PEG diasit oranı optimum 1/10 olarak kabul edilmiştir.

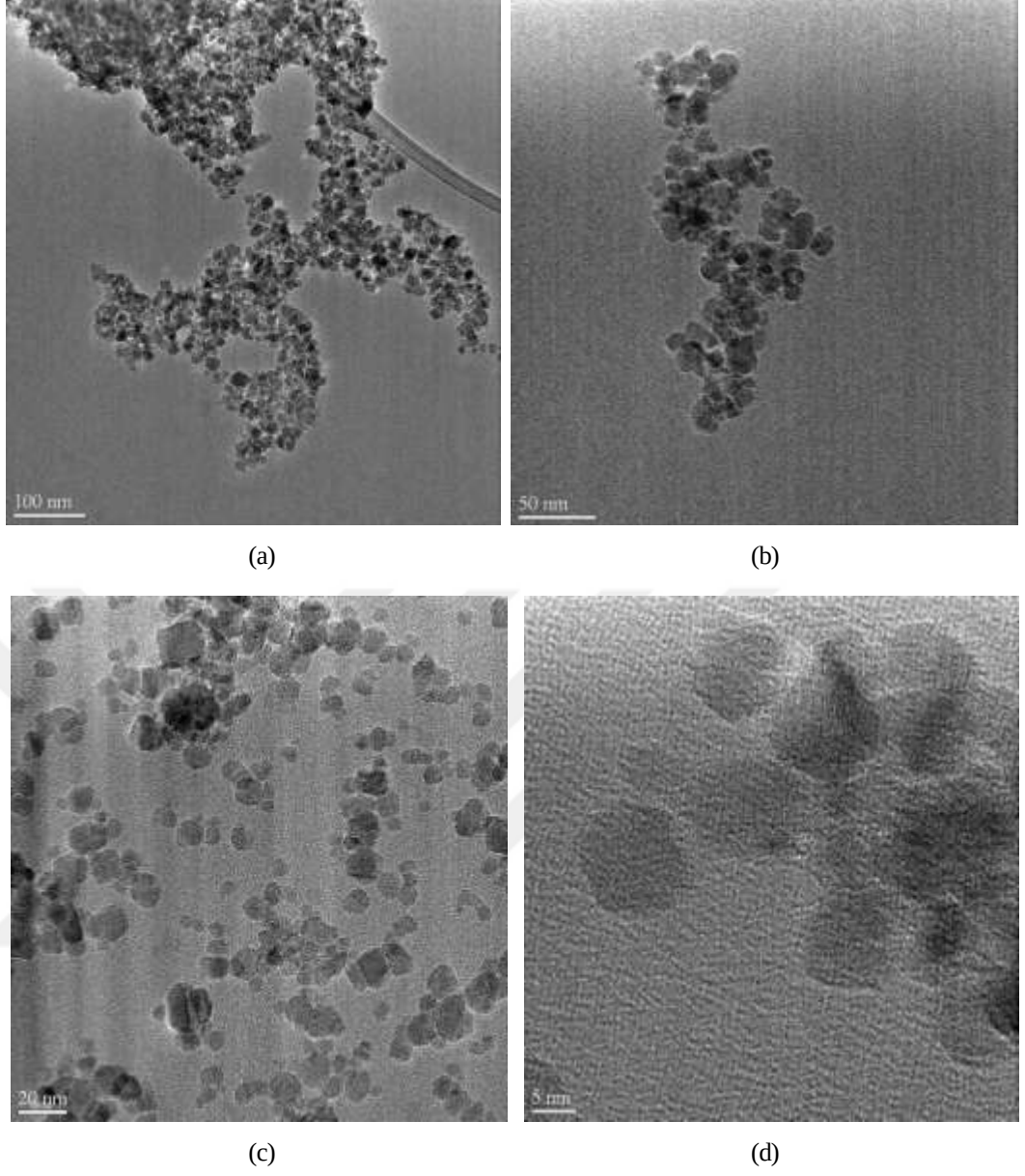
Biyopolimer ile kaplama, magnetitlerin manyetizasyonunu birim kütle başına manyetik yapı miktarının azalması sebebiyle düşürmektedir (Zhang and Misra 2007). Dolayısıyla biyopolimer ile kaplama sonrasında manyetizasyon cevabı mutlaka kontrol edilmelidir. Şekil 3.34'te nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin manyetizasyon eğrisi görülmektedir. Nanopartiküllerin 1 Tesla alan altında ~49 emu/g; 1,5 Tesla alan altında ise ~50 emu/g değerinde manyetik cevap oluşturduğu bulunmuştur ayrıca M_s değeri de yine ~50 emu/g olarak belirlenmiştir. Manyetizasyon eğrisine göre yapıların süperparamanyetizma özelliğinin değişmediği saptanmıştır. Saf magnetitlerin M_s değeri ~60 emu/g olarak bulunmuşken polimer kaplı magnetitler için bu değer ~50 emu/g' a düşmüştür. Wu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada saf magnetitlerin M_s değeri ~74,79 emu/g iken fonksiyonelleştirilip polimer ile kaplanan magnetitler için M_s değeri

~62,02 emu/g ' a düştüğü görölmektedir (Wu et a., 2014). Polimer ile kaplandığında manyetizasyonun azalması beklenen bir durumdur.

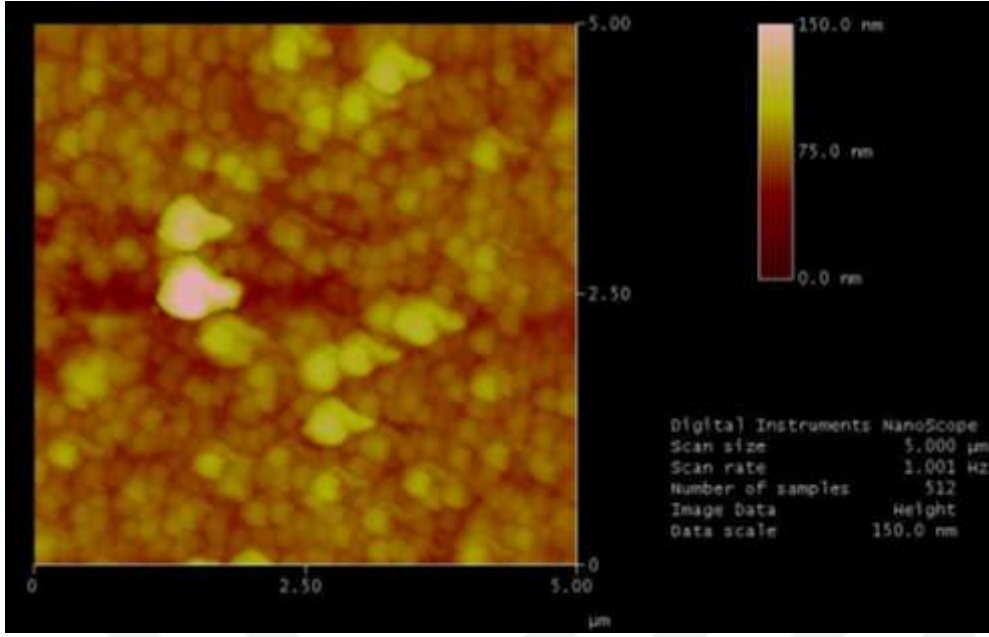


şekil 3.34 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin artan manyetik alan altındaki manyetizasyonu.

Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin farklı skalalardaki TEM görüntüleri şekil 3.35'te; AFM görüntüsü ise şekil 3.36'da verilmektedir. Sonuçlara göre nanopartikül yapılarının küresel olduğu ve boyutlarının da çok değişmemekle beraber 15-20 nm arasında olduğu görölmüştür.

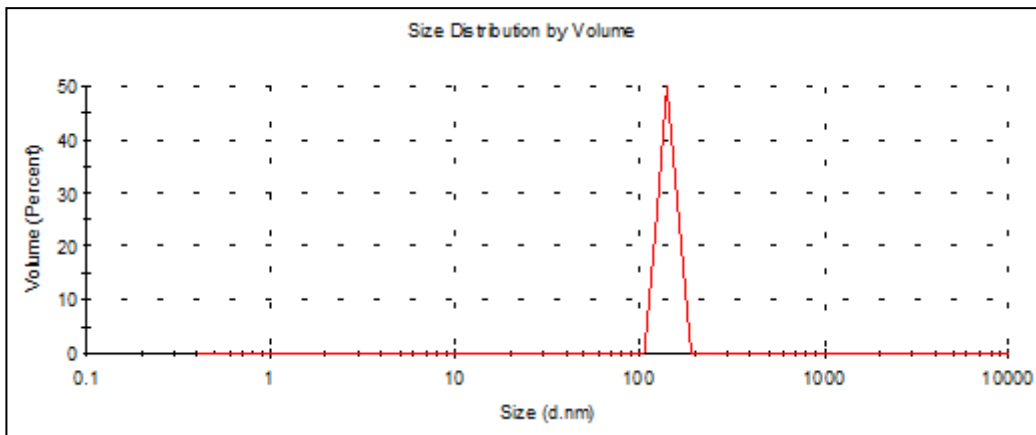


Şekil 3.35 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin a) 100 nm, b) 50 nm, c) 20 nm, d) 5 nm skaladaki HR-TEM görüntüleri.



Şekil 3.36 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin AFM görüntüsü.

PEG diasit ve nişasta kaplı manyetik nanopartiküllerin sulu ortamdaki boyut dağılımları Şekil 3.37’de verilmektedir. Analiz sonuçlarına göre PEG diasit ve nişasta kaplı manyetik nanopartiküllerin hidrodinamik çapı $142,5 \text{ nm} \pm 14,79$ ve zeta potansiyeli ise $-6,69 \text{ mV} \pm 0,508$ olarak bulunmuştur. Hidrodinamik çapın magnetit ve nişasta kaplı magnetitlerin hidrodinamik çapına göre azaldığı ve istenen değere yaklaştığı görülmektedir. PEG diasit ve nişasta kaplı manyetik nanopartiküllerin zeta potansiyelinin magnetit nanopartiküllere göre pozitif değere doğru değiştiği saptanmıştır. Magnetitlerin iyonlaşabilen serbest gruplarının PEG diasit ile etkileştiği ve magnetitlerin polimer karışımı ile sarılı olmasından dolayı yük durumunda bu sonuca ulaşıldığı düşünülmektedir.



Şekil 3.37 Nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin boyut dağılımları.

3.3 Doksorubisinin Polimer Kaplı Manyetik Nanopartiküllere Yüklenmesi

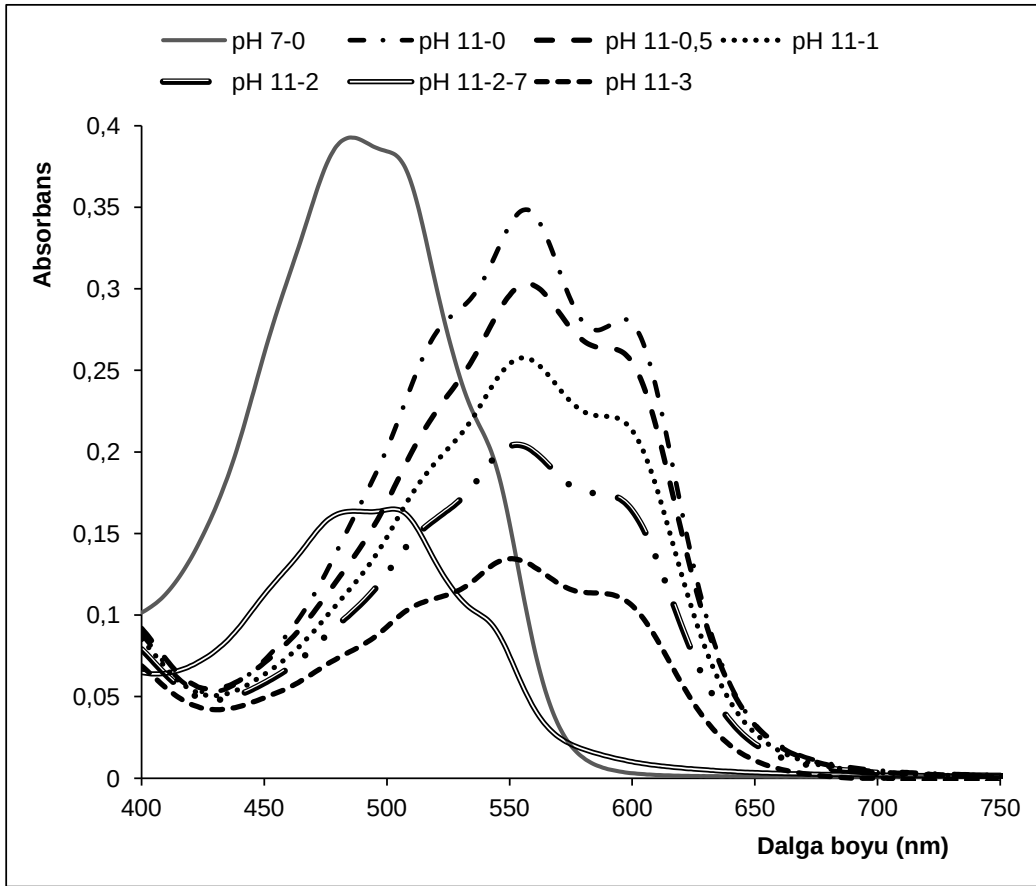
3.3.1 Doksorubisinin manyetik nanopartiküllere enkapsülasyon yoluyla yüklenmesi

3.3.1.1 Doksorubisinin manyetik nanopartiküllere enkapsülasyonu

Sentez esnasında ortama ilaç ilave etme işlemi ilacın nanoyapıda enkapsülasyonunu sağlar. İlaç yükleme işlemi sırasında ilacın karakteristik rengi olan kırmızı rengin mor renge dönüşmesi ilacın yapısının değişime uğramış olabileceğini düşündürmekle beraber örneğin absorbansı 486 nm’de ölçülmüş ve hesaplamalar yapılmıştır. Ortama eklenen ve seyrelen başlangıç ilaç konsantrasyonu 0,24 mg/mL, nanopartiküllere enkapsüle olmayan ilaç konsantrasyonu ise 0,033 mg/mL’dir. Enkapsülasyon yüzdesi %86 olarak bulunmuştur. Sonuçta enkapsüle olmayan örnekte yapılan spektrum taramasında maksimum dalga boyunun 486 nm’den kaydığı görülmüş ve detaylı stabilite çalışması gereği duyulmuştur.

3.3.1.2 Doksorubisinin reaksiyon koşullarına stabilite araştırmaları

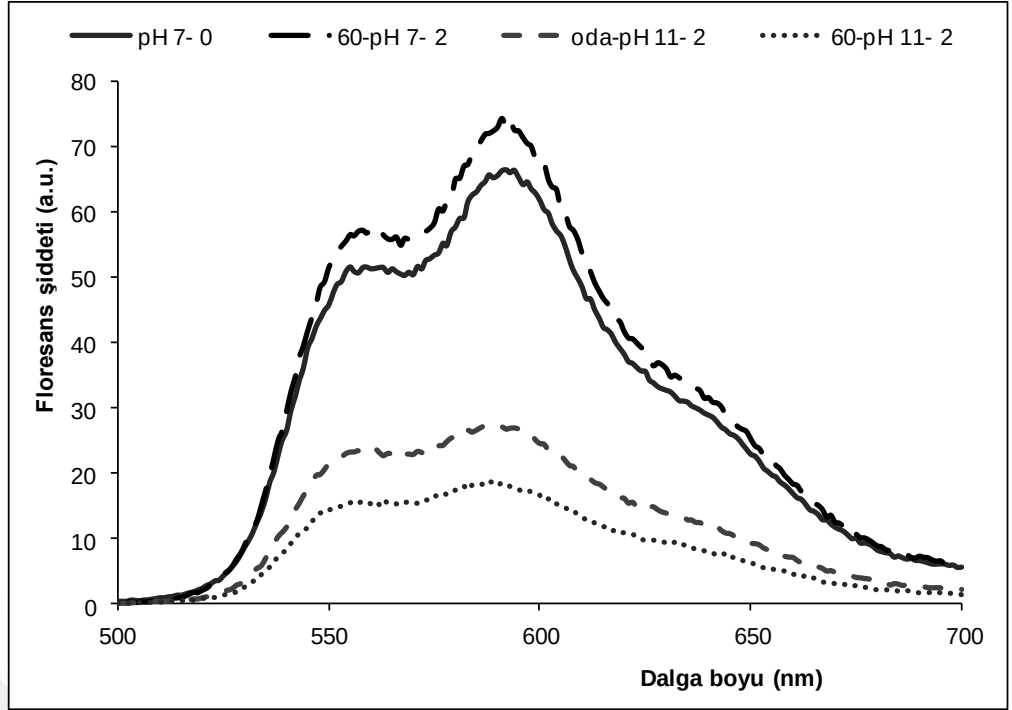
Doksorubisinin asidik, alkali koşullar, ışıklı ortam ve yüksek sıcaklıkta yapısını koruyamadığı bilinmektedir. Gupta ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, doksorubisinin 0,1 M NaOH ile pH’ı 11’e ayarlanan ve/veya sıcaklığı 70°C’ye ayarlanan koşullarda 8 saatlik inkübasyonu sonucunda floresans dedektörle yapılan ölçümler ile stabilitesi araştırılmıştır. İlacın yapısını alkali koşullar ve 70°C gibi yüksek bir sıcaklıkta koruyamadığı bulunmuştur (Gupta et al., 1988). Magnetitlerin polimerler ile kaplanması ve doksorubisin ile yüklenmesi sırasında doksorubisinin 2 saat süreyle pH’ı 11 olan ve 60°C’deki ortama maruz kalmasının ilacın yapısında değişimlere yol açıp açmadığının belirlenmesi için aynı koşullar oluşturularak spektrofotometrik ve florimetrik ölçümler alındı. Şekil 3.38’de görüldüğü gibi ortam pH’ı 7’den 11’e değiştirilince ilacın maksimum absorbans verdiği dalga boyu 486 nm’den 557 nm’ye kaymıştır. pH 11 ortamında ve 60°C sıcaklıkta inkübasyon süresi ile orantılı olarak ilacın verdiği absorbans azalmaktadır. 2 saat sonunda ortamın pH’ının tekrar 7’ye indirilmesiyle ilacın maksimum absorbans verdiği dalga boyu tekrar 486 nm’ye kaymış fakat absorbans şiddeti oldukça azalmıştır. pH 11 ve 60°C’de 3 saatlik inkübasyon sonucunda ise ilacın absorbansının fazlaca düştüğü bulunmuştur.



Şekil 3.38 Farklı koşullarda inkübe edilen dokсорubisin çözeltilerine ait spektrofotometrik tarama (pH 7-0: pH 7 olan kontrol tüpü başlangıç anı; pH 11-0: pH 11 olan tüp başlangıç anı; pH 11-0,5: pH 11 olan tüp 30. dakika; ; pH 11-1: pH 11 olan tüp 1. saat; pH 11-2: pH 11 olan tüp 2. saat; pH 11-2-7: pH 11 olan ve 2. saat sonunda pH'ı 7 ye getirilen tüp; pH 11-3: pH 11 olan tüp 3. saat).

Yapılan florimetrik ölçümlerle de benzer sonuçlar edilmiştir (Şekil 3.39). pH'ı 11'e ayarlanan ve 60°C'de 2 saat inkübe edilen örnek grubu dışındaki diğer örnekler 2 kat daha seyreltilerek ölçüm alınmıştır. Dokсорubisinin pH 7 ortamındaki emisyonunun 560 ve 592 nm'lerde olduğu saptanmıştır. Bu pH'da ve 60°C'de 2 saat bekletilen örneğin emisyon dalga boyları değişmemekle birlikte floresans şiddeti azaldığı görülmüştür. pH'ı 11'e ayarlanan oda sıcaklığı veya 60°C'de 2 saat inkübe edilen örneğin floresansı çok belirgin ölçüde azalmıştır.

İlacın yapısının bozulduğunun saptanması üzerine manyetik nanopartiküllere enkapsülasyonun bu koşullarda mümkün olmayacağı anlaşılmış ve adsorpsiyon metodunun uygulanmasına karar verilmiştir.

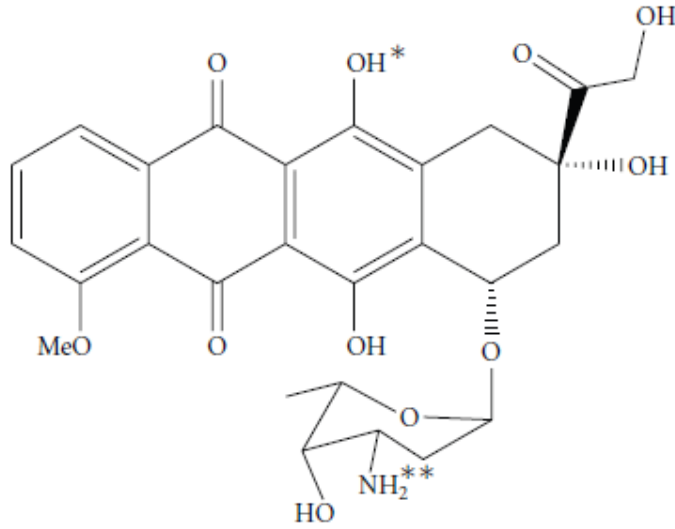


Şekil 3.39 Farklı koşullarda inkübe edilen dokсорubisin çözeltilerine ait florimetrik tarama (pH 7-0: pH 7 olan kontrol tüpü başlangıç anı; 60-pH 7-2: pH 7 olan ve 60 °C’de 2 saat bekletilen tüp; oda-pH 11-2: pH 11 ve oda sıcaklığında 2 saat bekletilen tüp; 60-pH 11-2: pH 11 olan ve 60 °C’de 2 saat bekletilen tüp).

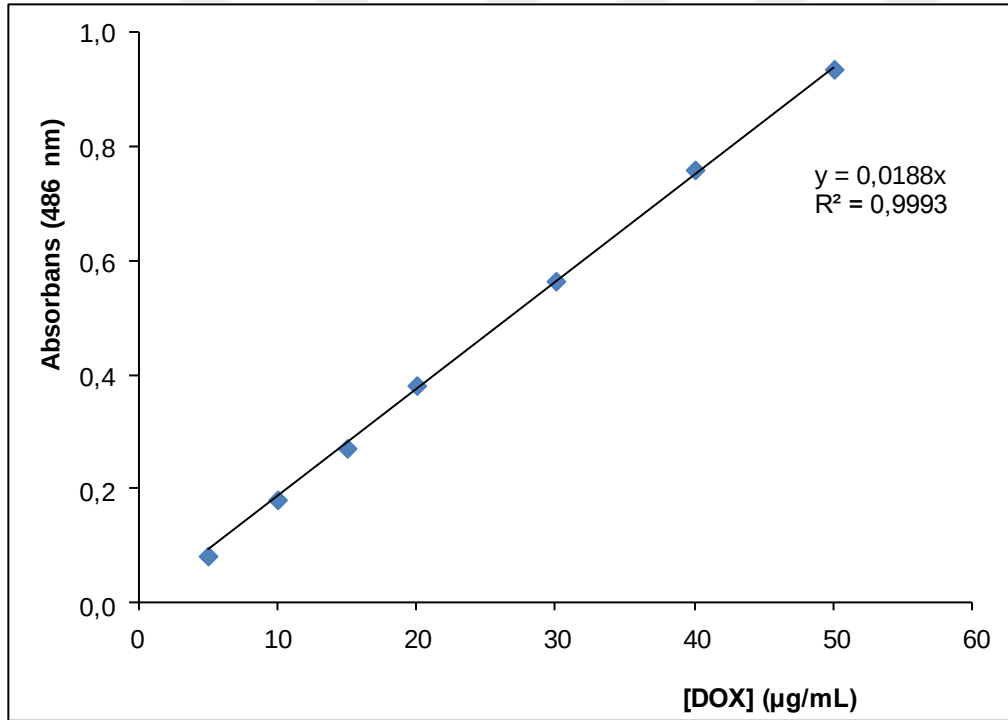
3.3.2 Dokсорubisinin manyetik nanopartiküllere adsorpsiyon yoluyla yüklenmesi

Nışasta ve PEG diasit kaplı magnetit nanoyapılara dokсорubisin adsorpsiyon yoluyla yüklenmeye çalışıldı. Şekil 3.40’ ta dokсорubisinin proton alan ve veren fonksiyonel grupları görülmektedir. pH’ya bağlı değişmekle birlikte dokсорubisin yapısındaki $-NH_3^+$ grubu ile PEG diasitin yapısında bulunan $-COO^-$ grubunun etkileşime girebileceği, dolayısıyla da iyonik etkileşimler ve diğer zayıf etkileşimler yoluyla ilacın nanopartikül yüzeyine yüklenebileceği düşünülmektedir.

Şekil 3.41’de ultrasaf su içerisinde hazırlanan 5-50 $\mu\text{g/mL}$ standart dokсорubisin çözeltilerinin absorbans şiddetlerini gösteren standart grafiği verilmektedir. Grafik bu konsantrasyon aralığında lineerdir.



Şekil 3.40 Dokсорubisin yapısı: (*) Proton verebilen grup (**) Proton alabilen grup (Manocha and Margaritis, 2010).

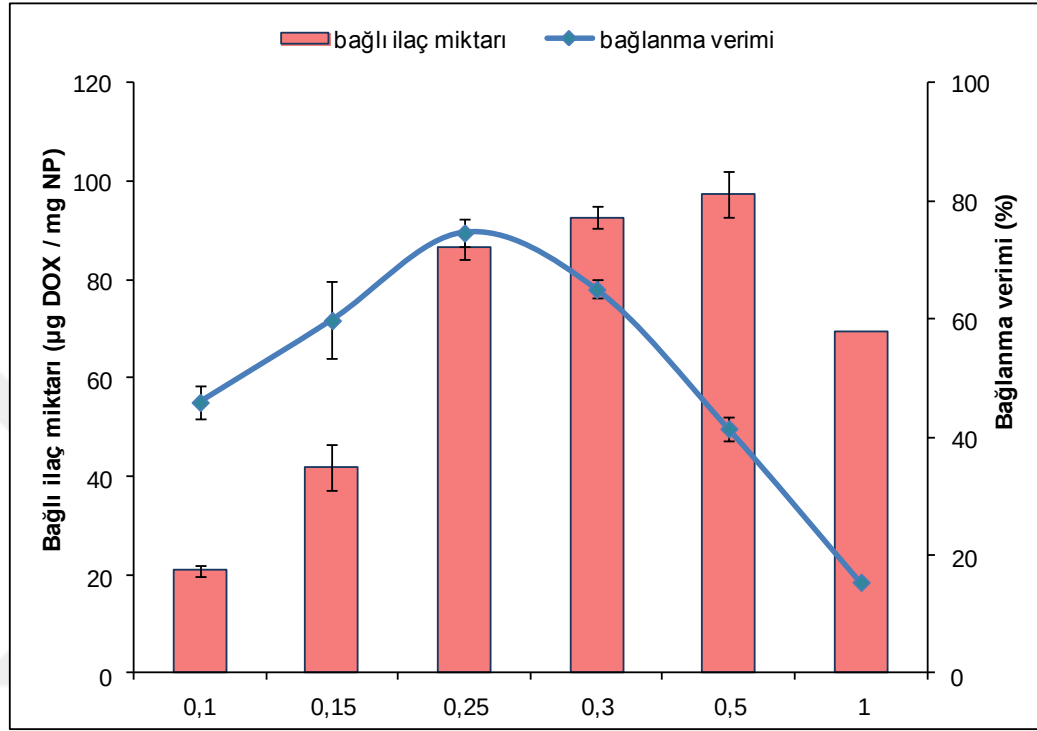


Şekil 3.41 Dokсорubisin standart grafiği.

3.3.2.1 İlaç konsantrasyonu optimizasyonu

Şekil 3.42’de değişen ilaç konsantrasyonlarında nanopartiküllere bağlı dokсорubisin miktar ve verimleri görülmektedir. Artan konsantrasyonlarda ilaç bağlanma verimi artmış ve 0,25 mg/mL konsantrasyondan sonra düşmeye başlamıştır. 0,25 mg/mL konsantrasyonda bağlanma verimi % 74,63±2,20 iken 0,3 mg/mL konsantrasyonda % 65,07 ±1,56 olarak bulunmuştur. Bağlı ilaç miktarı 0,25 mg/mL

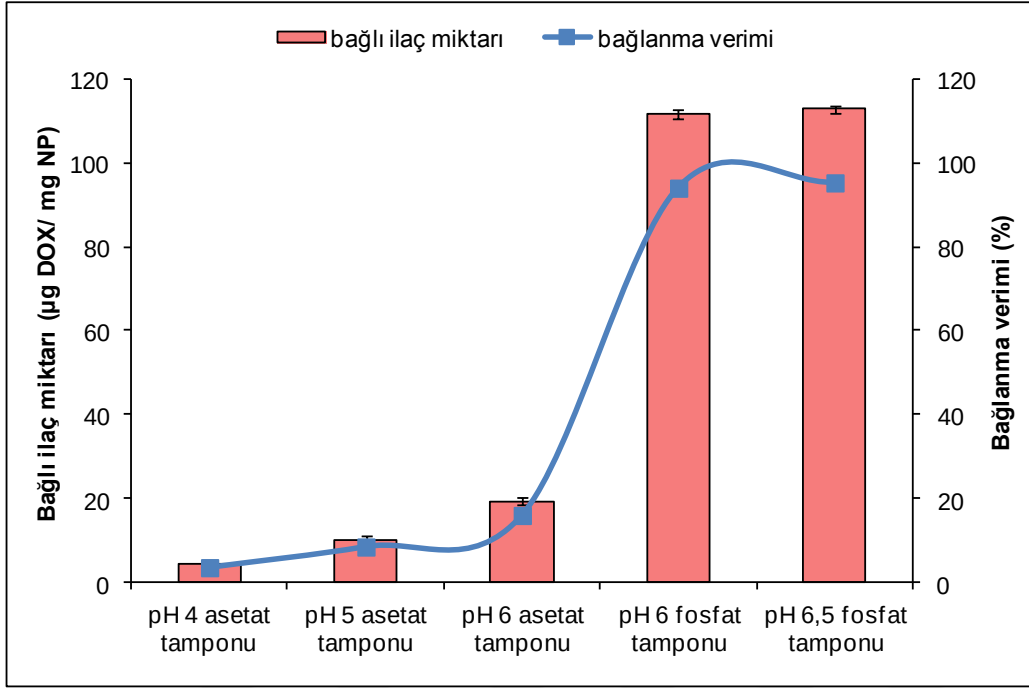
konsantrasyonda $86,71 \pm 2,53$ $\mu\text{g DOX/ mg NP}$; 0,5 mg/mL de ise $97,56 \pm 4,64$ $\mu\text{g DOX/ mg NP}$ olarak en yüksek deęer elde edilmiřtir. Fakat 0,5 mg/mL konsantrasyonda baęlanma verimi daha dūřuk ($41,47 \pm 1,93$) olduęundan optimum ilaę konsantrasyonu 0,25 mg/mL olarak belirlenmiřtir. 1 mg/mL ilaę konsantrasyonunda sterik engellerden dolayı ilacın baęlanmasının zorlařtıęı dūřünölmektedir.



Şekil 3.42 Değişen ilaç konsantrasyonlarında nanopartiköllerde bağlı ilaç miktar ve verimleri.

3.3.2.2 pH optimizasyonu

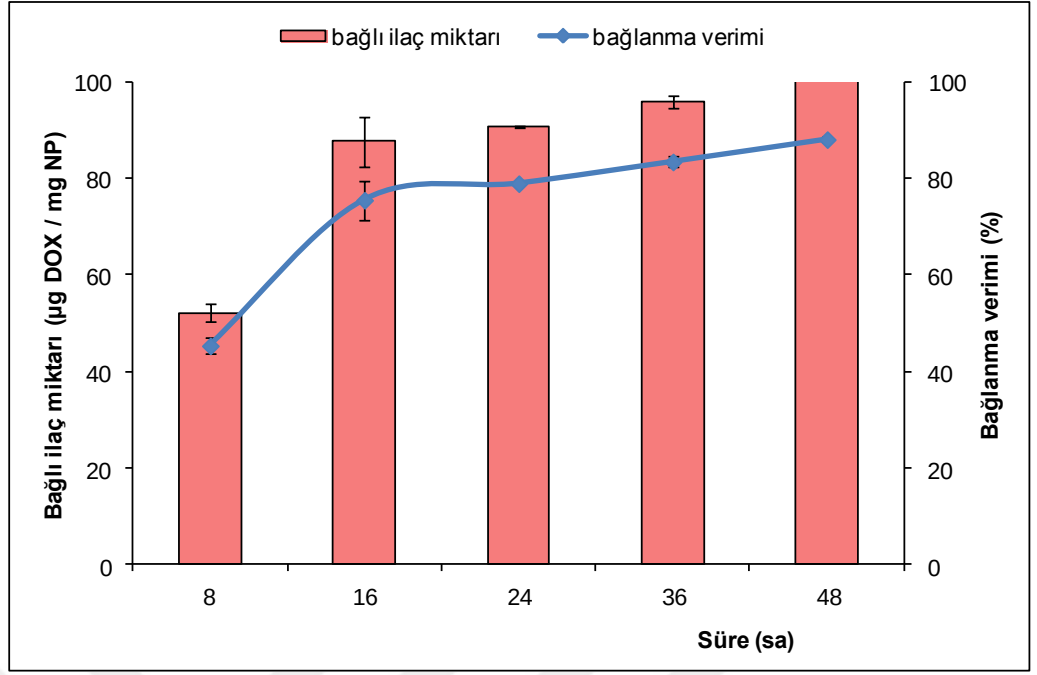
Nanopartiköller farklı pH ortamlarındaki tamponlarda hazırlanmış 0,25 mg/mL doksorubisin çözeltisi ile 25°C sıcaklıkta 16 sa boyunca çalkalamalı inkübatörde 250 rpm'de karıştırıldı. İlağ bağlanma miktar ve yüzdelerini gösteren sonuçlar Şekil 3.43'te verilmektedir. Sulu ortamın dışında pH 4; 5; 6 asetat tamponu ve pH 6; 6,5 fosfat tamponu kullanılarak geręekleřtirilen denemelerde asetat tamponunun ilacın nanopartiköllerle etkileşimini bozması dolayısıyla bu tampondaki bağlanmaların oldukça dūřük olduğu saptandı. Fosfat tamponunda yapılan denemelerde ise oldukça büyük agregatların oluştuğu gözlemlendi. Dolayısıyla sonraki çalışmalara sulu ortamda devam edilmesine karar verildi. Sulu ortamda (pH ~6) doksorubisin yapısındaki $-\text{NH}_3^+$ grubu ile nanopartiköllerin yapısındaki $-\text{COO}^-$ grubunun iyonik etkileşime girebileceği dūřünölmektedir.



Şekil 3.43 Farklı pH ortamlarındaki nanopartiküllere bağlı ilaç miktar ve verimleri.

3.3.2.3 Süre optimizasyonu

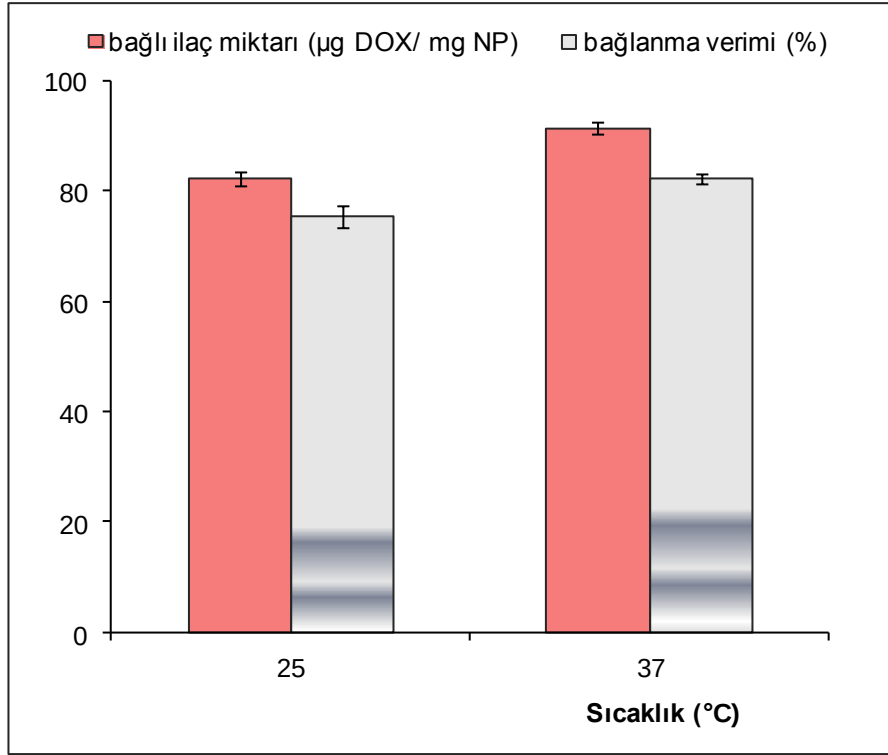
Sulu ortamda hazırlanan 0,25 mg/mL DOX çözeltisinin nanopartiküller ile 25°C sıcaklıkta ve 8-48 sa aralığında değişen sürelerde karıştırılmasıyla elde edilen bağlanma sonuçları Şekil 3.44'te gösterilmektedir. 8 saatlik inkübasyon süresinde bağlanma verimi $45,3 \pm 1,46$, bağlı ilaç miktarı $52,10 \pm 1,89$ µg DOX/ mg NP iken 16 saatte bağlanma verimi $79,0 \pm 0,1$ ve bağlı ilaç miktarı $87,76 \pm 1,13$ µg DOX/ mg NP'e ulaşmaktadır. Daha uzun sürelerde ise bağlı ilaç miktarı ve bağlanma veriminde az bir miktar artış gözlenmektedir. Fakat mikrobiyal kontaminasyon riski nedeniyle optimum süre 16 saat olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.44 Farklı sürelerde nanopartiküllere bağlı ilaç miktar ve verimleri.

3.3.2.4 Sıcaklık optimizasyonu

Nanopartiküller ile 25 ve 37°C sıcaklıkta inkübe edilen ilacın bağlanma miktar ve verimleri Şekil 3.45'te gösterilmektedir. 25°C sıcaklıkta bağlanma verimi %75,50±2,0 ve bağlı ilaç miktarı 86,76±1,16 µg DOX/ mg NP ve 37°C sıcaklıkta bağlanma verimi %82,30±1,20 ve bağlı ilaç miktarı 91,45±1,07 µg DOX/ mg NP olarak bulunmuştur. 37°C'de ilaç ve nanoyapıların etkileşiminin daha iyi olması ve bağlanmanın biraz daha fazla olması nedeniyle optimum sıcaklığın 37°C olduğu düşünülmüştür.



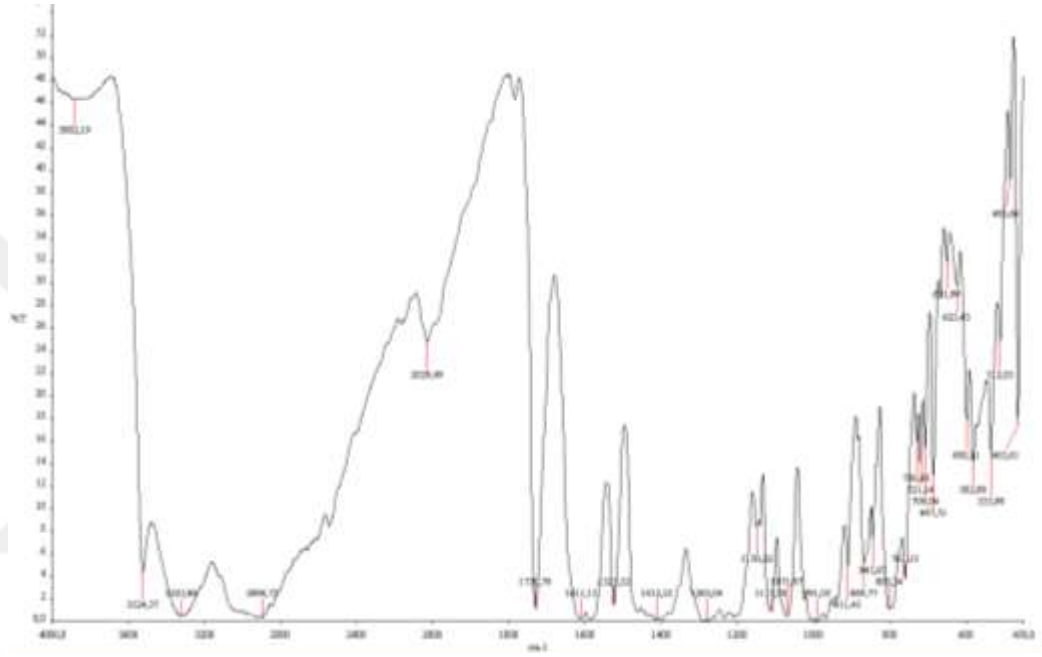
Şekil 3.45 25 ve 37°C sıcaklıkta nanopartiküllere bağlı ilaç miktar ve verimleri.

Doksorubisinin optimum ilaç bağlanma koşullarında (sulu ortam, 37°C sıcaklık ve 16 saat) stabilitesi spektrofotometrik olarak incelendiğinde ilacın maksimum absorbans verdiği dalga boyunun ve absorbans şiddetinin değişmediği görülmüştür. Dolayısıyla bu koşullarda ilacın nanopartiküllere yüklenmesinin ilaç yapısına etki etmediği belirlenmiştir. İlaç yapısının değişmesi biyolojik aktivitesini etkileyeceğinden oldukça önemlidir.

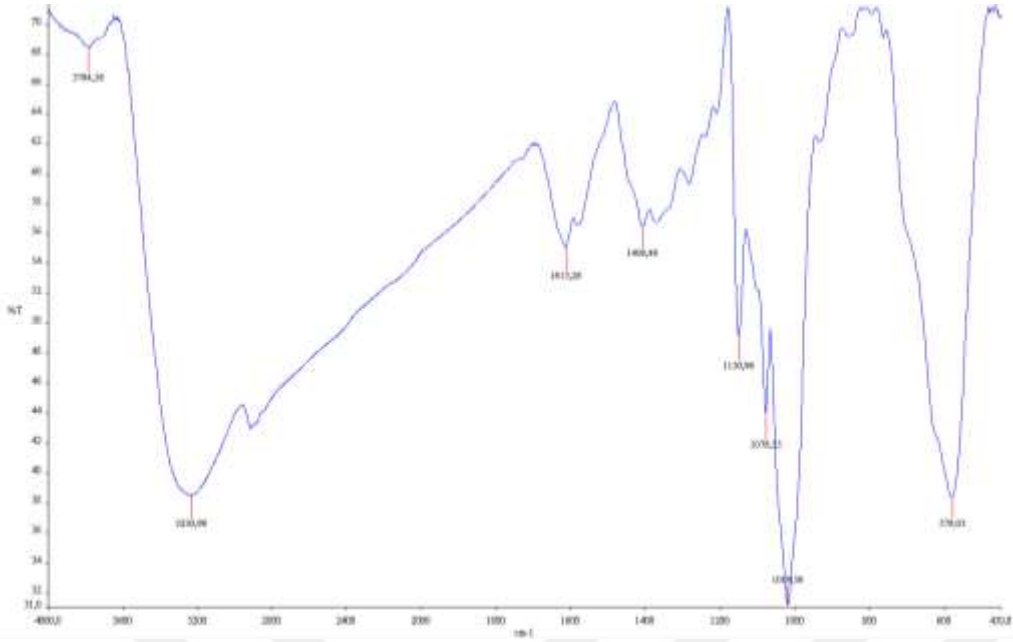
3.3.2.5 Doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküllerin karakterizasyonu

Optimum koşullarda ilaç bağlı manyetik nanopartiküller FTIR, TGA, VSM, HR-TEM ve zeta sizer ile karakterize edildi. İlk olarak yapıya bağlı doksorubisinin varlığı FTIR ile belirlenmeye çalışıldı. Şekil 3.46' da doksorubisine ait ve Şekil 3.47' de doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküllere ait FTIR spektrumu görülmektedir. Doksorubisine ait FTIR spektrumu literatür verisi (Kayal and Ramanujan, 2010) ile uyumludur. 3524,37 cm^{-1} 'deki bant N-H grubu (primer amin) gerilmesini, 3323,86 cm^{-1} 'deki yayvan bant hidrojen bağı yapmış olan O-H grupları gerilmesini, 2896,75 cm^{-1} 'deki bant aromatik halkadaki C-H grupları gerilmesini, 1730,78 cm^{-1} 'deki bant C=O grubu gerilmesini, 1412,25 ve 1525,52 cm^{-1} 'deki bantlar aromatik halkada bulunan C=C bağı gerilmesini, 1071-1280 cm^{-1} 'deki bantlar C-N veya C-O

gerilmelerini göstermektedir. Doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumunda ilaç içermeyen manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumundan farklı olarak 1576 cm^{-1} 'de bir bant görülmektedir. Doksorubisinin FTIR analizinden bilindiği gibi bu pik aromatik halkada bulunan C=C bağı gerilmesine aittir. Dolayısıyla ilacın nanopartikül yapısına katıldığı sonucuna ulaşılmaktadır. Ayrıca ilaç içeren nanopartiküllerin spektrum analizinde doksorubisinin spektrum sonucundan bilinen $3524,37\text{ cm}^{-1}$ 'deki N-H grubunu gösteren bant çıkmamıştır. Bu veri de ilacın nanopartiküller ile amino grubu üzerinden bağ yapmış olabileceğini göstermektedir.

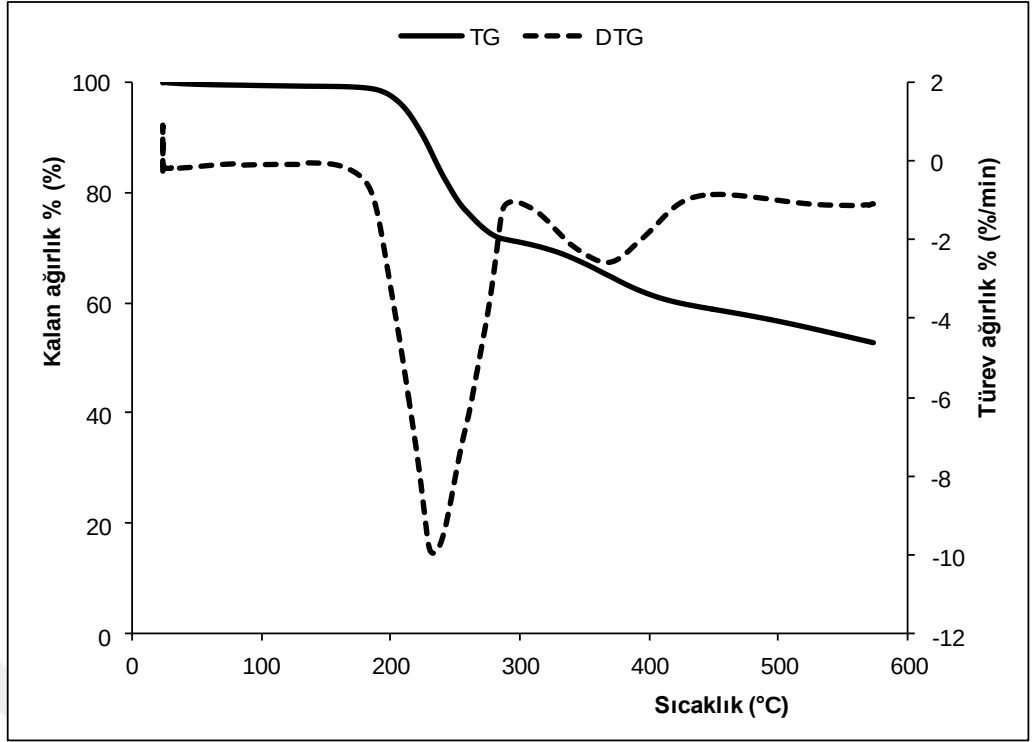


Şekil 3.46 Doksorubisine ait FTIR spektrumu.

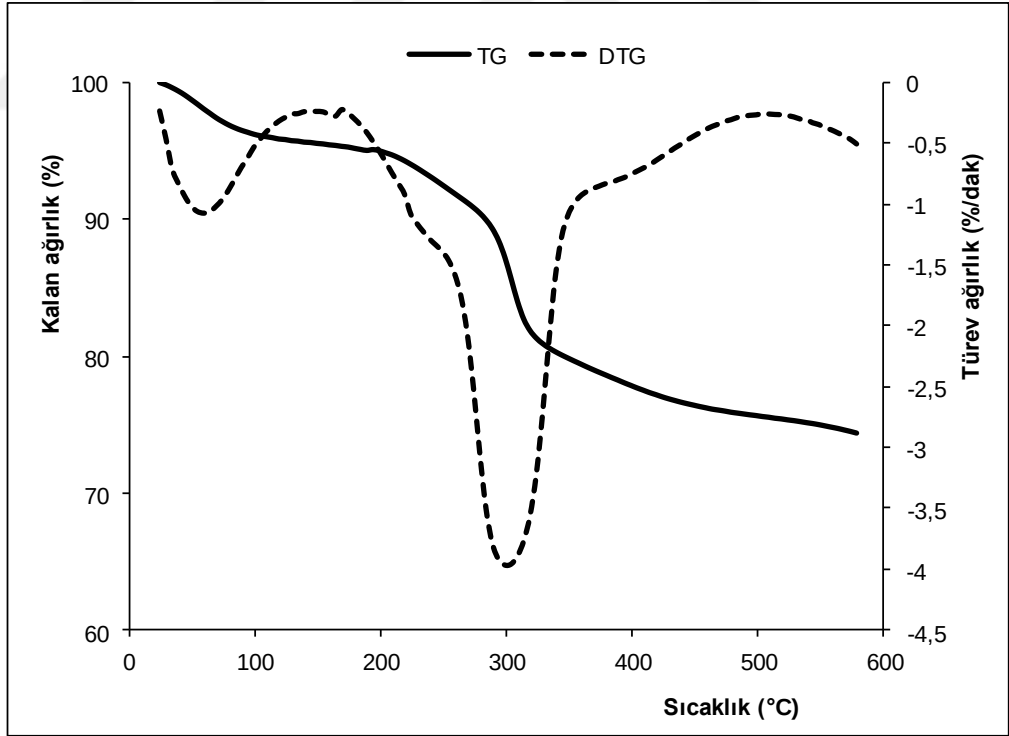


Şekil 3.47 Dokсорubisin yüklü manyetik nanopartiküllere ait FTIR spektrumu.

Dokсорubisin ve dokсорubisin içeren nanopartiküllerin termal bozunma eğrisini gösteren TGA analiz sonuçları sırasıyla Şekil 3.48 ve 3.49’da verilmektedir. Dokсорubisinin ilk bozunma basamağına ilişkin maksimum bozunma sıcaklığının 235°C olduğu saptanmıştır. Literatürde de açıklandığı gibi 600 °C’ye kadar yapısında tümüyle dekompozisyon gerçekleşmemektedir (Manocha and Margaritis, 2010). İlacın yaklaşık olarak ağırlıkça % 50’si bu sıcaklığa kadar bozunmamıştır. Dokсорubisin içeren manyetik nanopartiküllerin termogram eğrisine bakıldığında örneklerde ağırlıkça yaklaşık %20 oranında organik yapının olduğu ve yapıdaki suyun uzaklaşmasından sonra ilk bozunma basamağına ilişkin maksimum bozunma sıcaklığının yaklaşık 300°C olduğu görülmektedir. İlaç içermeyen manyetik nanopartiküllerde bu değer 276 °C iken yapıya ilaç bağlandığında maksimum bozunma sıcaklığının 300°C’ye kaydığı saptanmıştır.

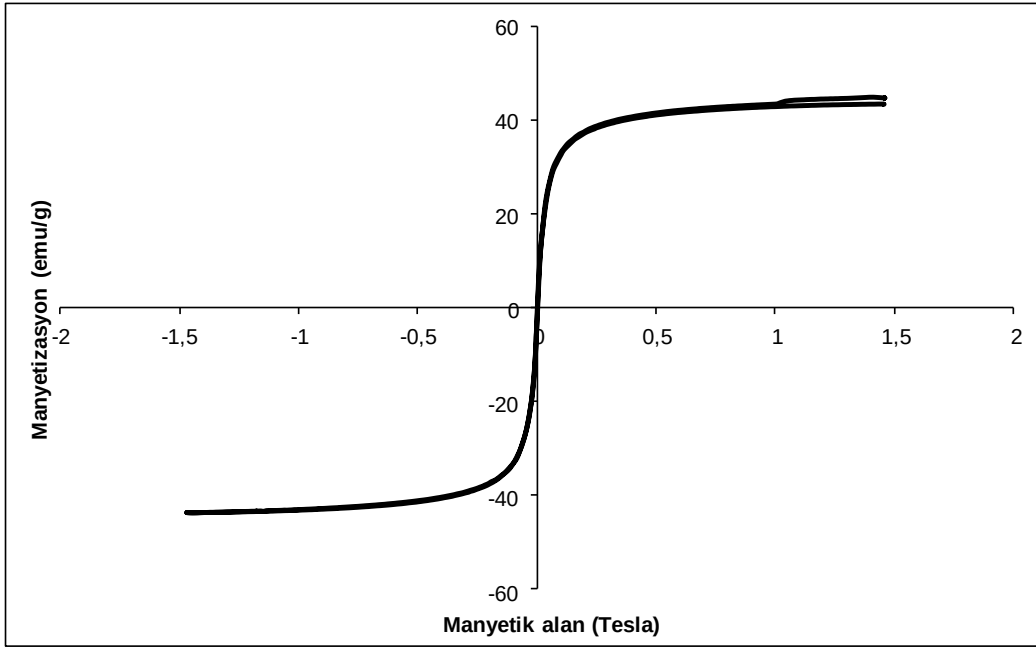


Şekil 3.48 Doksorubisine ait termal bozunma eğrisi.



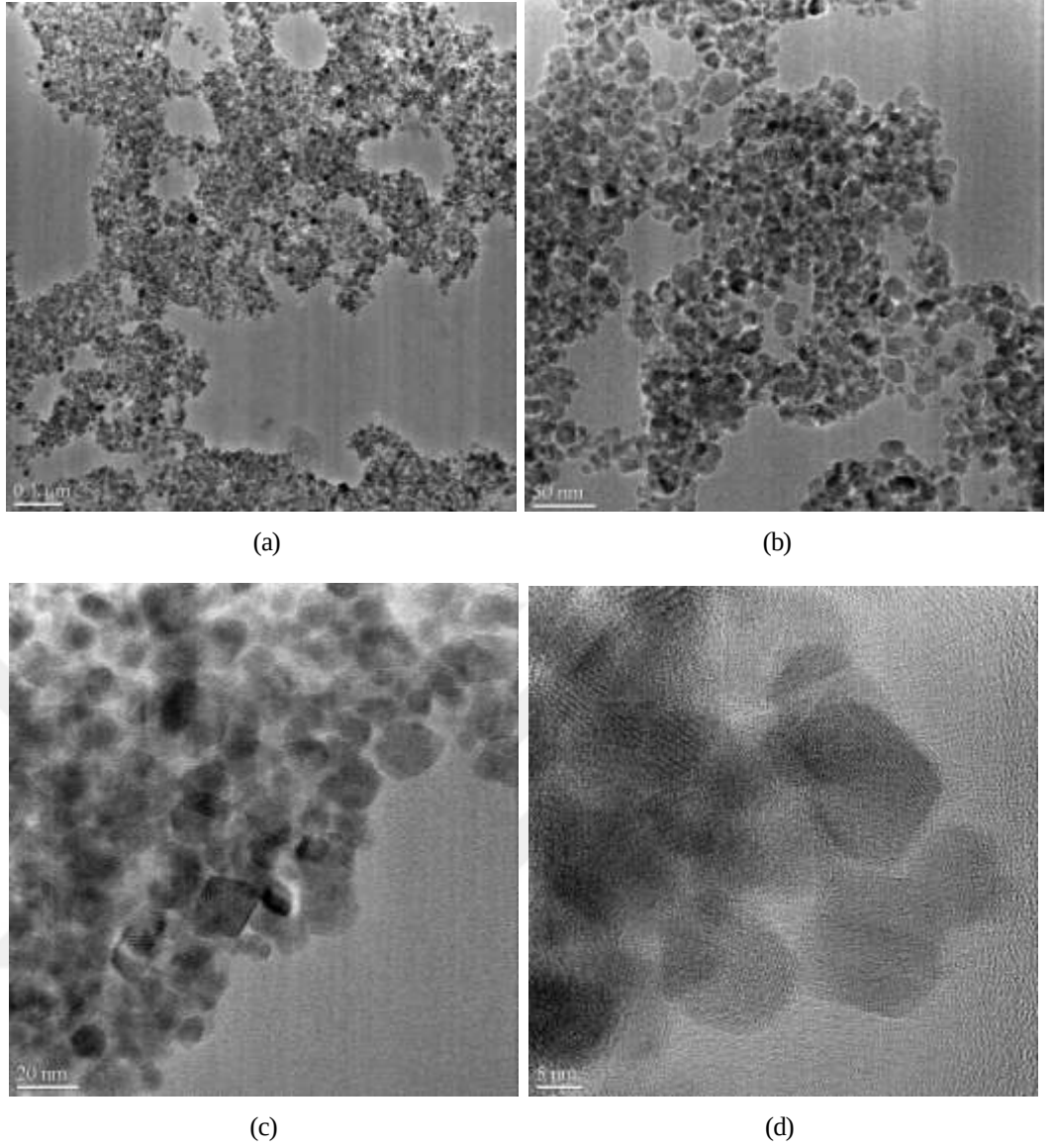
Şekil 3.49 Doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküllere ait termal bozunma eğrisi.

Doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin manyetizasyon eğrisi Şekil 3.50’de verilmektedir. İlaç içeren manyetik nanopartiküllerin 1 Tesla alan altında ~43,5 emu/g; 1,5 Tesla alan altında ise ~45 emu/g değerinde manyetik cevap oluşturduğu bulunmuştur ve M_s değeri ~45 emu/g olarak belirlenmiştir. Doksorubisin yüklü olmayan nanopartiküllerin M_s değerinin ~50 emu/g olduğu bilindiğinden ilaç taşıyan nanopartiküllerin M_s değerinin ilaç içermeyen nanopartiküllere göre ~5 emu/g kadar düştüğü görülmektedir, bu durum yapıya ilaç katılmasından dolayı birim kütle başına manyetik yapı miktarının azalmasına bağlıdır. Ayrıca doksorubisin yüklü nanoyapıların süperparamanyetik özellikte olduğu da saptanmıştır.



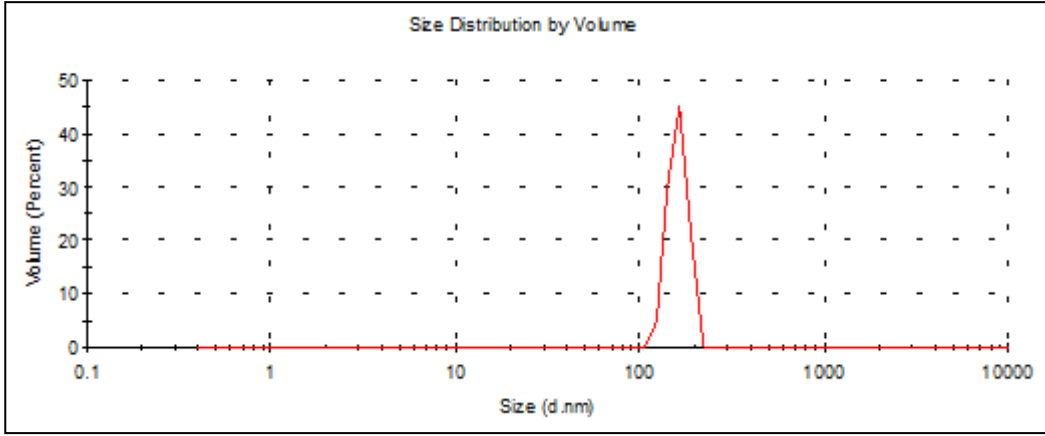
Şekil 3.50 Doksorubisin içeren nişasta ve PEG diasit kaplı magnetitlerin artan manyetik alan altındaki manyetizasyonu.

Doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin farklı skalalardaki HR-TEM görüntüleri Şekil 3.51’de verilmektedir. Nanoyapıların şeklinin bozulmadığı ve küresele yakın olduğu görülmektedir. Ayrıca ilaç içeren nanopartiküllerin boyutlarının içermeyen nanopartiküller gibi yaklaşık olarak 15-20 nm arasında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.51 Dokсорubisin içeren manyetik nanopartiküllerin a) 100 nm, b) 50 nm, c) 20 nm ve d) 5 nm skalasındaki TEM görüntüleri

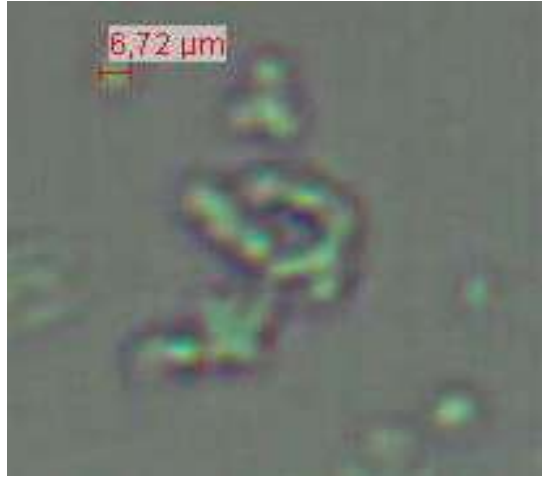
Şekil 3.52’de dokсорubisin ile yüklenen manyetik nanopartiküllerin boyut dağılımları verilmektedir. Nanopartiküllerin hidrodinamik çapı ilacın boyutundan kaynaklı olarak bir miktar artmış ve $160,6 \pm 18,94$ nm’ ye ulaşmıştır. İlaç yüklü nanopartiküllerin zeta potansiyeli ise $-6,37 \text{ mV} \pm 0,849$ olarak saptanmıştır ve ilacın bağlanması yük durumunu hemen hemen değıştirmediği belirlenmiştir.



Şekil 3.52 Doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin boyut dağılımları.

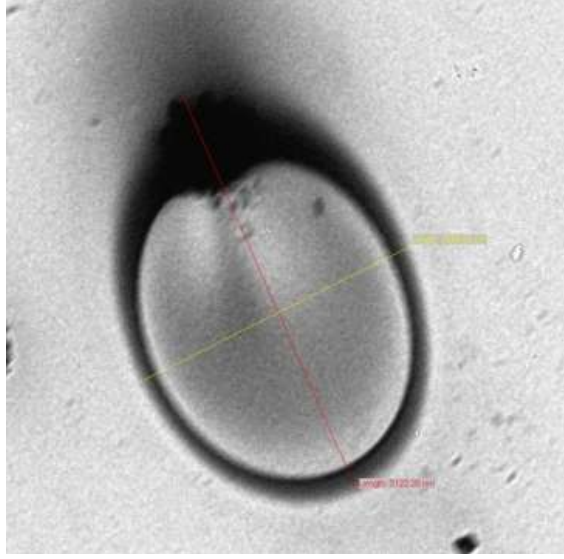
3.4 Eritrosit Membran Veziküllerinin Oluşturulması

Eritrosit membran vezikülleri elde etmek için EDTA'lı tüpe alınan kan santrifüj edilerek plazma ve buffy coat ayrılmıştır. Çöken hücreler, hücre osmolaritesine denk bir tampon ile yıkandıktan sonra hipotonik tampon varlığında buz ortamındaki inkübasyon ile içeriğinin dışarı çıkışını (hemoliz) sağlanmıştır. Elde edilen renksiz ghost hücreler ışık mikroskopunda görüntülenerek boyutları ve yapıları kontrol edilmiştir. Şekil 3.53'te görüldüğü gibi ghost hücreler yaklaşık olarak 6 μm civarındadır ve yapıları düzgündür.



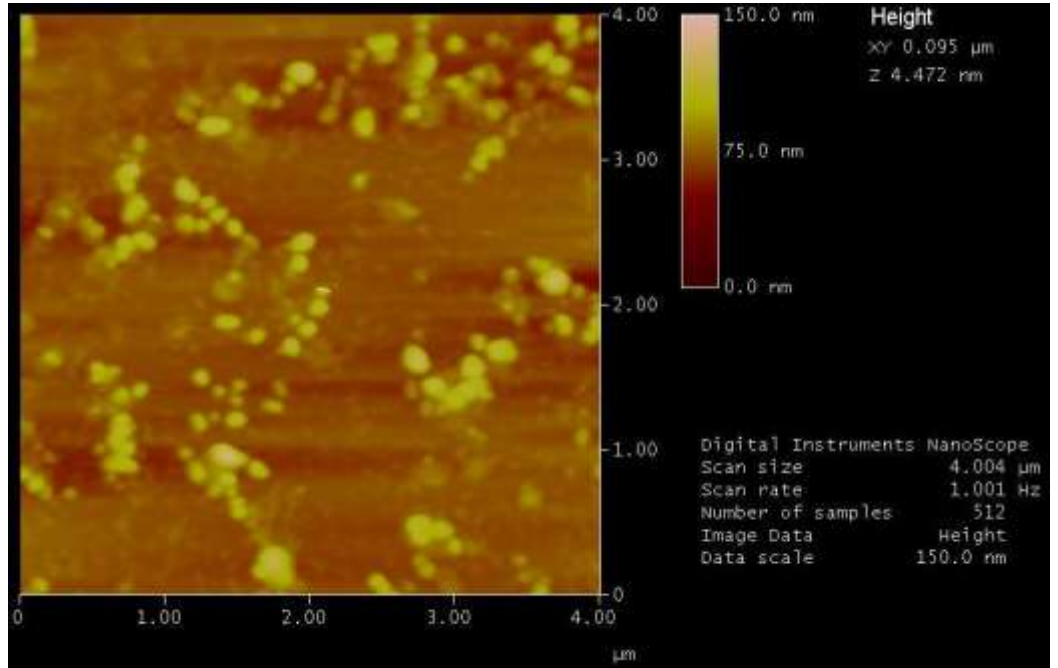
Şekil 3.53 Eritrosit ghost hücrelerinin ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.

Ghost hücrelerin EF-TEM görüntüsü Şekil 3.54'te verilmektedir. Uranil asetat ile kontrastlığın artırarak membran yapısının boyanıp belirginleştiği görülmektedir. Analiz sonucuna göre ghost hücresinin boyutu yaklaşık olarak 5-6 μm olduğu saptanmıştır.



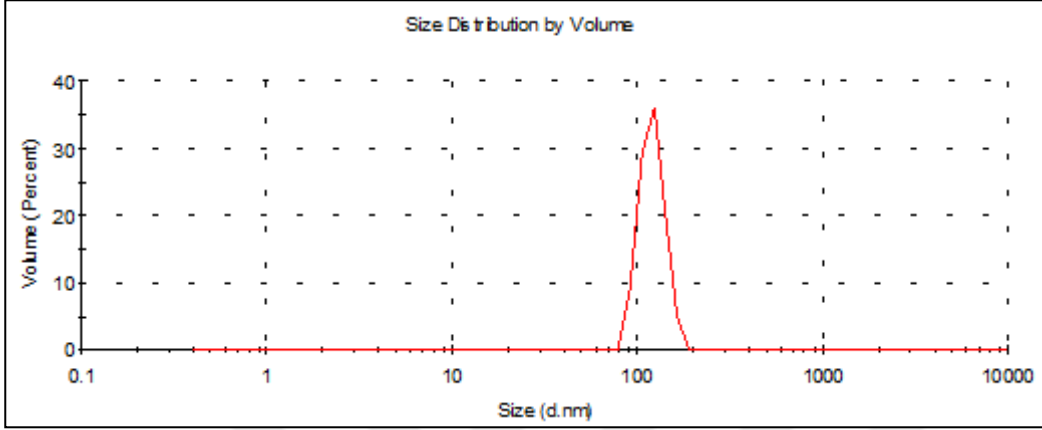
Şekil 3.54 Eritrosit ghost hücresinin EF-TEM cihazındaki görüntüsü.

Ghost hücrelerin ilk olarak 400, sonrasında ise 100 nm çaplı porlara sahip membranlardan geçirilmesiyle hazırlanan veziküllerin AFM görüntüleri Şekil 3.55'te verilmektedir. Hazırlanan veziküller yaklaşık literatür (Hu et al., 2011) ile uyumlu olarak 100 nm çaplı ve düzgün yapılıdır. Mika yüzeye damlatmadan önce örneğin sonik banyoda daha uzun süre tutulması yapıların daha iyi dağılmasını ve birbirinden daha iyi ayrılmasını sağlayabilir.



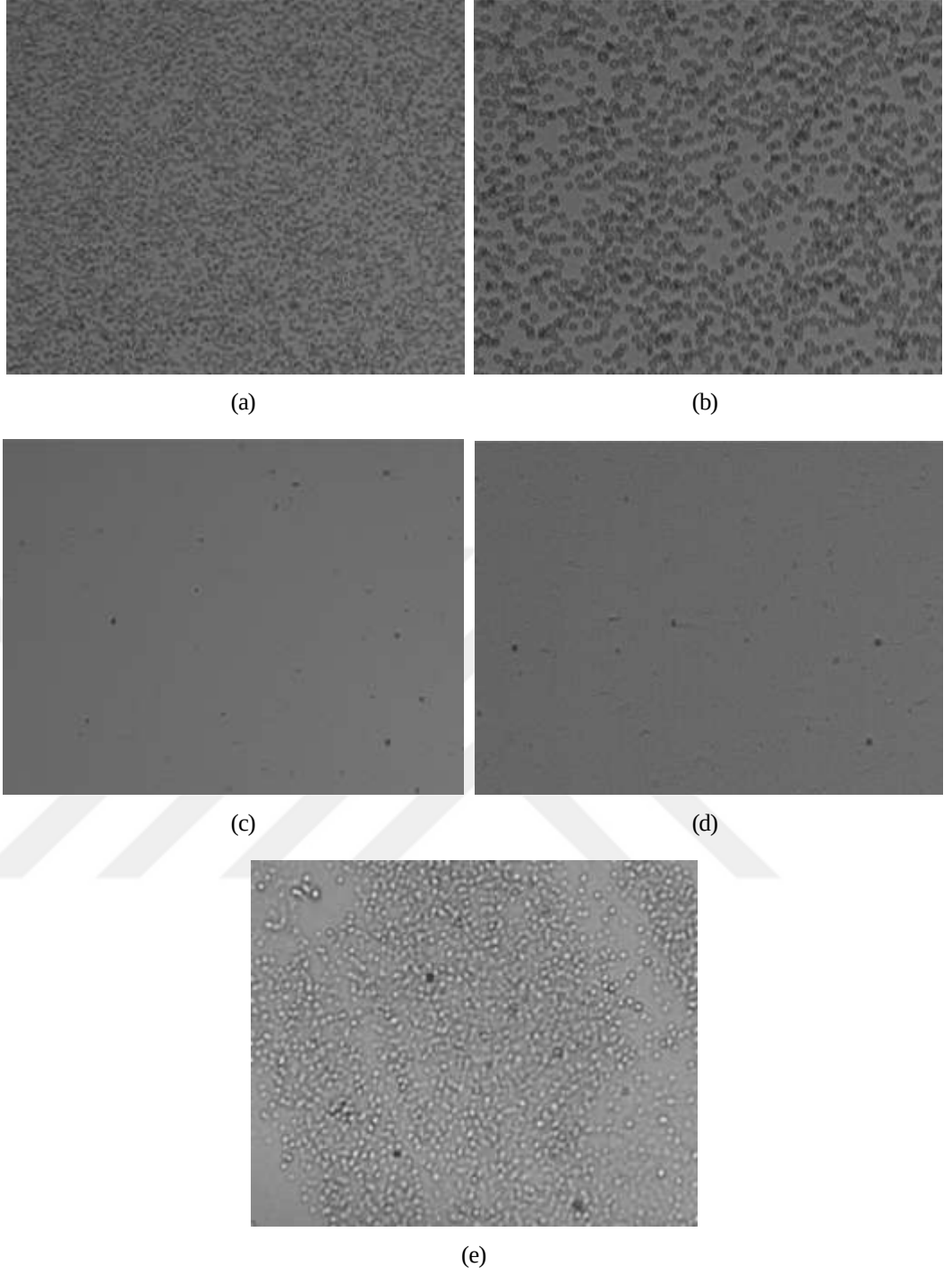
Şekil 3.55 Eritrosit membranlarından hazırlanan veziküllerin AFM görüntüsü.

Hazırlanan eritrosit veziküllerinin hidrodinamik boyut dağılımları Şekil 3.56’da gösterilmektedir. Zetasizer cihazından elde edilen verilere göre eritrosit veziküllerinin ortalama boyutu $120,7 \pm 18,18$ nm olarak saptanmıştır ve zeta potansiyelinin ise $-11,6 \pm 2,70$ mV olduğu bulunmuştur. Veziküller, hücre membranı yapılı olduğu için zeta potansiyelinin negatif değerde çıkması beklenen bir sonuçtur.



Şekil 3.56 Boş eritrosit veziküllerine ait boyut analizi.

Eritrosit hücreleri ve ghost hücreler görüntüleme ve floresans sayım cihazında; eritrosit vezikülleri ise canlı hücrelerin hareketlerini ve morfolojilerini gösteren cihazda incelenmiştir. Elde edilen görüntüler Şekil 3.57’de verilmektedir. Mikroskop üzerinde alınan görüntülerde eritrosit ve ghost hücrelerin yaklaşık $5-6 \mu\text{m}$ çaplı olduğu söylenebilmektedir. Veziküller nanoboyutlu oldukları için maksimum büyütme olan 400 katlık büyütmede ancak görüntülenebilmiş ve AFM sonuçları ile uyumlu olarak küresel oldukları belirlenmiştir.



Şekil 3.57 Eritrositlerin a) 4x, b) 16x büyütmedeki görüntüleri; Ghost hücrelerin c) 4x, d) 16x büyütmedeki görüntüleri, e) Eritrosit membran veziküllerinin 400x büyütmedeki görüntüleri.

3.5 Eritrosit Veziküllerine Doksorubisin İçeren Nişasta ve PEG diasit Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Yüklenmesi

3.5.1 Eritrosit ghost hücrelerine doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin yüklenmesi ve vezikül formuna dönüştürülmesi

Eritrosit veziküllerine doksorubisin içeren nişasta ve PEGdiasit kaplı manyetik nanopartiküllerin yüklenmesi için ilk olarak nanopartiküllerin eritrosit ghost hücrelerine yüklenmeleri ardından vezikül yapı haline getirilmeleri amaçlanmıştır, kısacası nanopartikül yüklü ghost hücrelerin boyutlarının küçültülmeleri hedeflenmiştir. Ghost hücrelere yüklemek için nanopartiküller farklı çözeltiler içinde sonike edilerek dağıtılmaya çalışılmış ve dispersiyonun en iyi olduğu çözelti belirlenmiştir. Ticari ilaç preparatlarında sulandırıcı, dağıtıcı, osmolarite ve pH ayarlayıcı olarak kullanılan katkı maddelerinden NaCl, süktroz, glukoz ve histidin ile çözeltiler hazırlanmıştır. En iyi dispersiyonun %10 süktroz ve %5 glukoz içinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.58). Glukozun indirgen özelliğinden dolayı süktroz en uygun dağıtıcı olarak seçilmiş ve çalışmalarda kullanımasına karar verilmiştir.

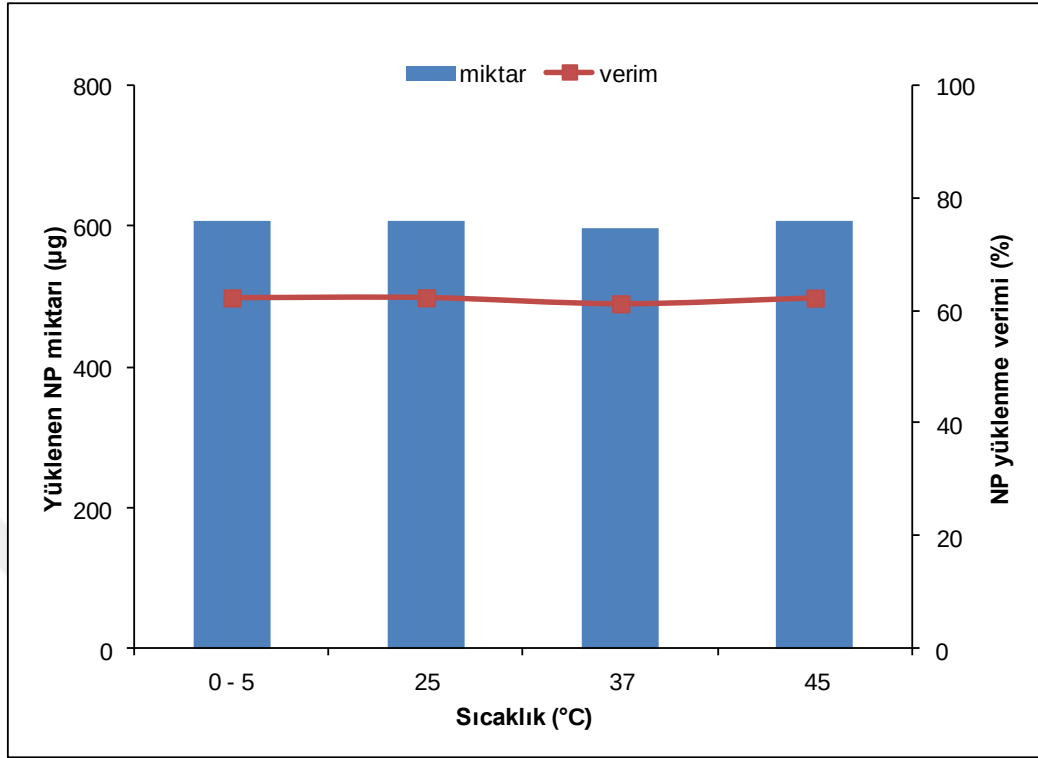


Şekil 3.58 Manyetik nanopartiküllerin sırasıyla %0,9 sodyum klorür, %10 süktroz + 10 mM histidin, %4,66 histidin, %10 süktroz, ve %5 glukoz çözeltisi içindeki dispersiyonu.

3.5.1.1 Sıcaklık optimizasyonu

Sıcaklık optimizasyonu için hipotonik ortamda membranlarda oluşan porlardan yararlanılarak nanopartiküllerin hücre içerisine yüklenmesi sağlandı. Osmolaritenin kontrol edilerek hücre yüzeyinde 10-500 nm büyüklüğünde porların oluşabileceği literatürde belirtilmektedir (Gupta et al., 2014). Nanopartiküller ile karıştırılan ghost hücrelerin gözeneklerinin kapatılması sonrasında hücrelere yüklenmeyen nanopartiküller ortamdan uzaklaştırıldı. Nanopartiküllerin hücrelere yüklenmesinde ilk olarak sıcaklığın etkisi incelendi. Şekil 3.59'da farklı sıcaklıklarda hücrelere yüklenen nanopartikül miktarı ve yüzdesi görülmektedir. Çalışmada sıcaklık değişiminin nanopartikül yüklenme verimini etkilemediği saptandığından sonraki deneylerde

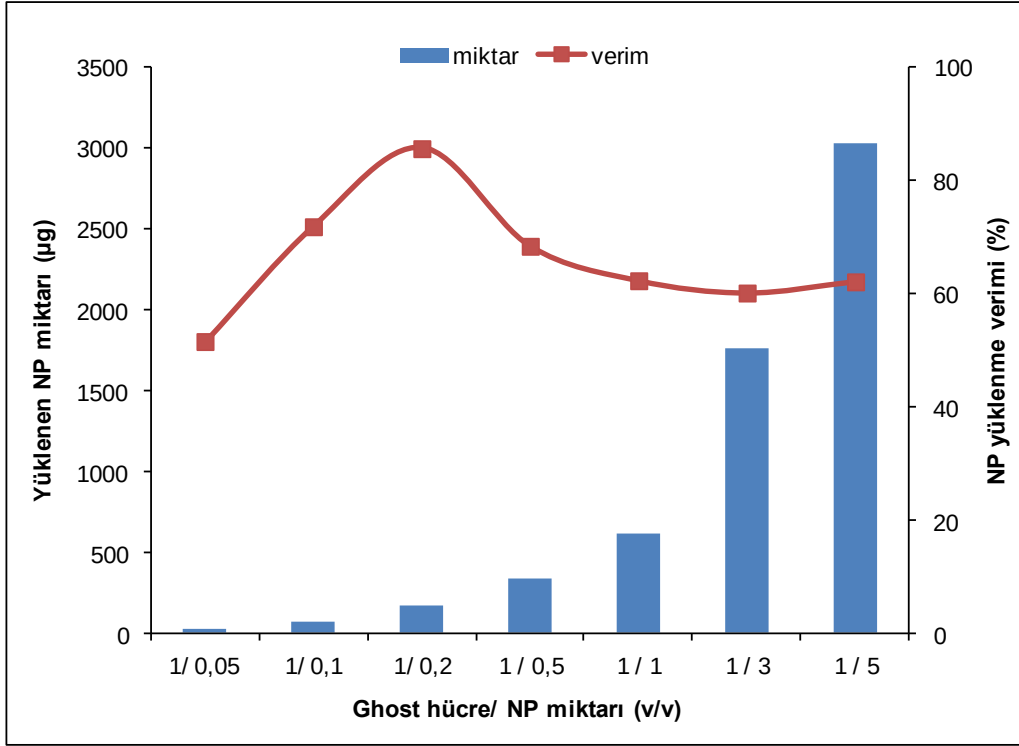
porların daha uzun süre açık kalabildiği sıcaklık olan 0-5°C (Gupta et al., 2014) optimum olarak seçildi.



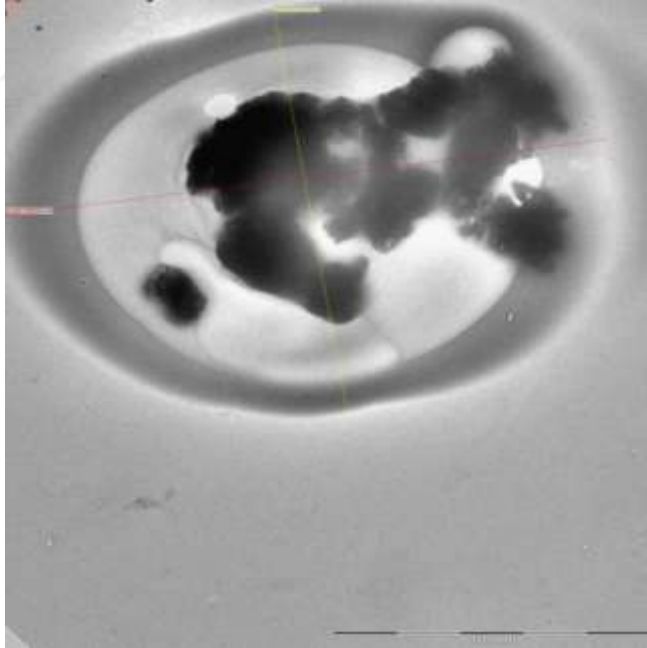
Şekil 3.59 Değişen sıcaklıklarda ghost hücelere yüklenen nanopartikül miktar (µg) ve verimleri (%).

3.5.1.2 Nanopartikül konsantrasyonu optimizasyonu

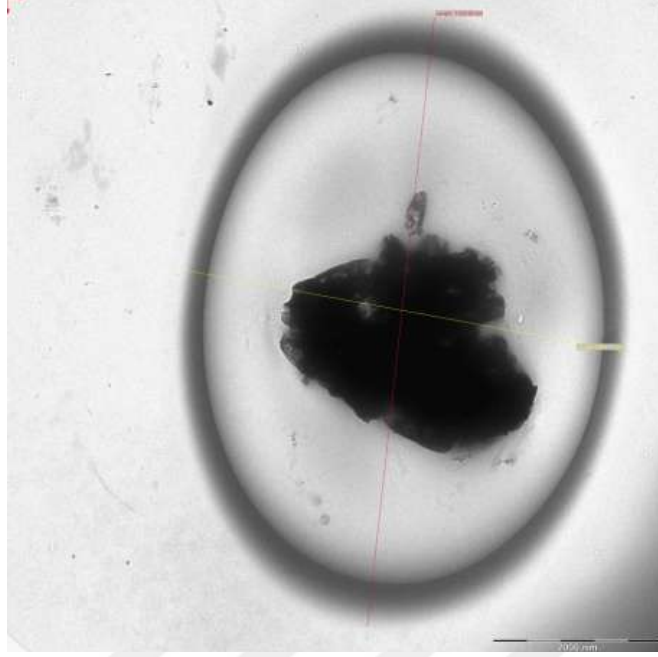
Nanopartikül konsantrasyonu optimizasyonu için 2 mg/mL konsantrasyonda ve değişen hacimlerdeki nanopartikül süspansiyonu ile 500 µL hacimde ghost hücre süspansiyonu inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda hücelere yüklenen nanopartikül miktarı ve yüzdesi Şekil 3.60'da verilmektedir. Yüklenme verimleri açısından çok fazla fark olmayan karışımlardan 1:1 oranından daha yüksek hacimde nanopartikül kullanıldığında oldukça fazla nanopartikül yığınının olduğu bulunmuştur. 1:1 oranı kullanıldığında yüklenen nanopartikül miktarı yaklaşık 606,76 µg iken 1:5 oranı kullanıldığında 3023,31 µg kadardır. Ayrıca oranın artışıyla birlikte ghost hücrelerin boyutu çok artmaktadır. Elde edilen EF-TEM görüntülerinde 5-10 µm boyutlarında ghost hücreler saptanmıştır (Şekil 3.61). 1:1 oranında hazırlanarak elde edilen nanopartikül yüklü ghost hücrelerin EF-TEM görüntüleri Şekil 3.62'de verilmektedir. Bu oranda hazırlanan ghost hücrelerin boyutunun aynı kaldığı görüldüğünden 1:1 oranı optimum olarak seçilmiştir.



Şekil 3.60 Değişen ghost hücre:nanopartikül oranlarında nanopartikül yüklenme miktar (µg) ve verimleri (%).



Şekil 3.61 1:5 (Ghost/Manyetik nanopartikül) oranında hazırlanan ghost hücre.



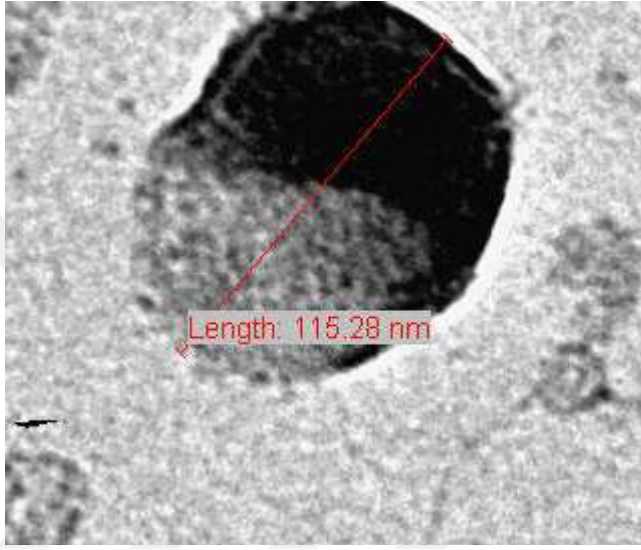
Şekil 3.62 1:1 (Ghost/Manyetik nanopartikül) oranında hazırlanan ghost hücre.

Manyetik nanopartikül içeren ghost hücrelerin boyutu sırasıyla 400 ve 100 nm por çaplı membranlar ile extruder cihazında küçültülmeye çalışılmıştır. Fakat extrude edilen yapıda ICP-MS verilerine göre oldukça düşük miktarda nanopartikül kaldığı saptandığından eritrosit vezikülleri kaplı nanopartikül oluşturulmasıyla ilgili farklı bir yöntemin kullanılması uygun bulunmuştur.

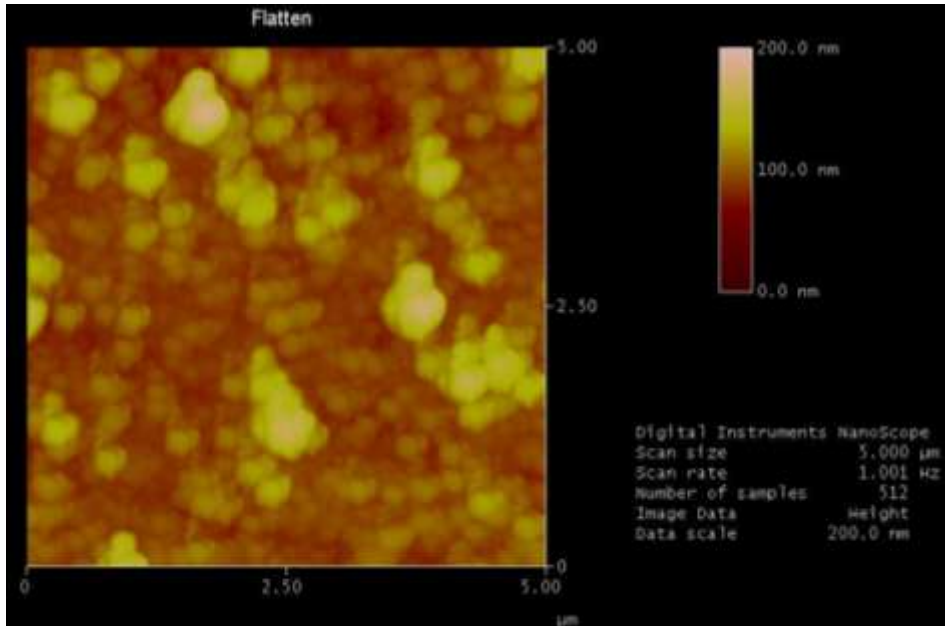
3.5.2 Doksorubisin içeren manyetik nanopartiküllerin hazırlanan eritrosit membran veziküllere yüklenmesi

Eritrosit ghost hücreleri 400 nm ve 100 nm por çaplı membranlardan geçirilerek 100 nm boyutlarında eritrosit vezikülleri elde edildi. Hu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (Hu et al., 2011) fare eritrosit ortalama yüzey alanı ($75 \mu\text{m}^2$), fare eritrosit membran kalınlığı (7 nm), fare tam kanı eritrosit konsantrasyonu (7 milyar/mL) ve araştırmacılar tarafından kullanılan nanopartikül yoğunluğu (1,34 g/mL) dikkate alınarak nanopartikül ve eritrosit karışım oranı hesaplanmıştır ve 1 mg nanopartikülün kaplaması için 1 mL kandan elde edilen eritrosit membran veziküllerinin fazla miktarda olduğu söylenmektedir. Dolayısıyla  alışmamızda bu oran temel alınarak deneme gerçekleştirildiğinden nanopartiküllerin hepsini içerisine alabilecek miktarda eritrosit hacmi ile başlanmıştır. 0,2 mg/mL konsantrasyondaki 2,5 mL ilaç yüklü nanopartikül ile 1x PBS içerisindeki 500 μL vezikül karıştırılıp 100 nm por çaplı membranlardan extrude edilmiştir. ICP-MS sonuçları ile yapılan hesaplamada manyetik nanopartiküllerin yüklenme veriminin $\sim\%90$ olduğu belirlenmiş ve sonraki denemelere bu yöntemle devam edilmesine karar verilmiştir.

Doksorubisin içeren manyetik nanopartikül yüklü eritrosit veziküllerinin EF-TEM görüntüsü Şekil 3.63'te, AFM görüntüsü ise Şekil 3.64'te verilmektedir. TEM görüntülerinde eritrosit veziküllerinin içerisinde nanopartiküllerin olduğu ve boyutlarının yaklaşık 115 nm olduğu saptanmıştır. Veziküllerin ayrıca küresel yapılı olduğu TEM ve AFM sonuçlarından görülmektedir. Nanopartikül yüklenmeyen boş veziküllerin de küresel morfolojide olduğu önceki AFM sonucundan (Şekil 3.55) bilindiğinden nanopartikül ile yüklenmesi vezikülün şekline etki etmediği sonucuna varılabilmektedir.

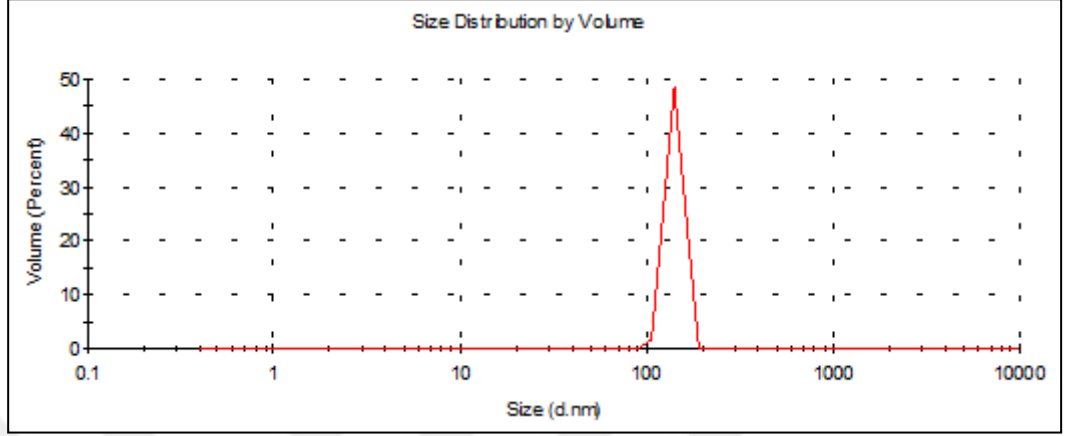


Şekil 3.63 Nanopartikül yüklü eritrosit membran vezikülünün EF-TEM analiz görüntüsü.



Şekil 3.64 Nanopartikül yüklü eritrosit membran veziküllerinin AFM analiz görüntüsü.

Şekil 3.65'te doksorubisin içeren manyetik nanopartikül yüklü eritrosit veziküllerinin hidrodinamik çapı $141,2 \pm 15,46$ nm olarak belirlenmiştir. Vezikül yapılarının sulu ortamdaki boyutlarının kuru formlarına göre bir miktar daha arttığı belirlenmiştir.

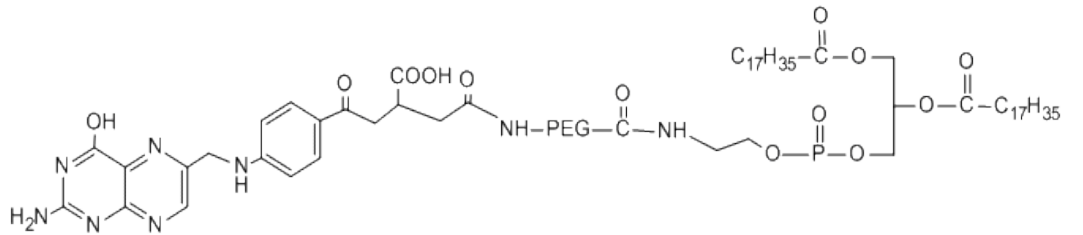


Şekil 3.65 Nanopartikül yüklü eritrosit membran veziküllerinin boyut dağılımı.

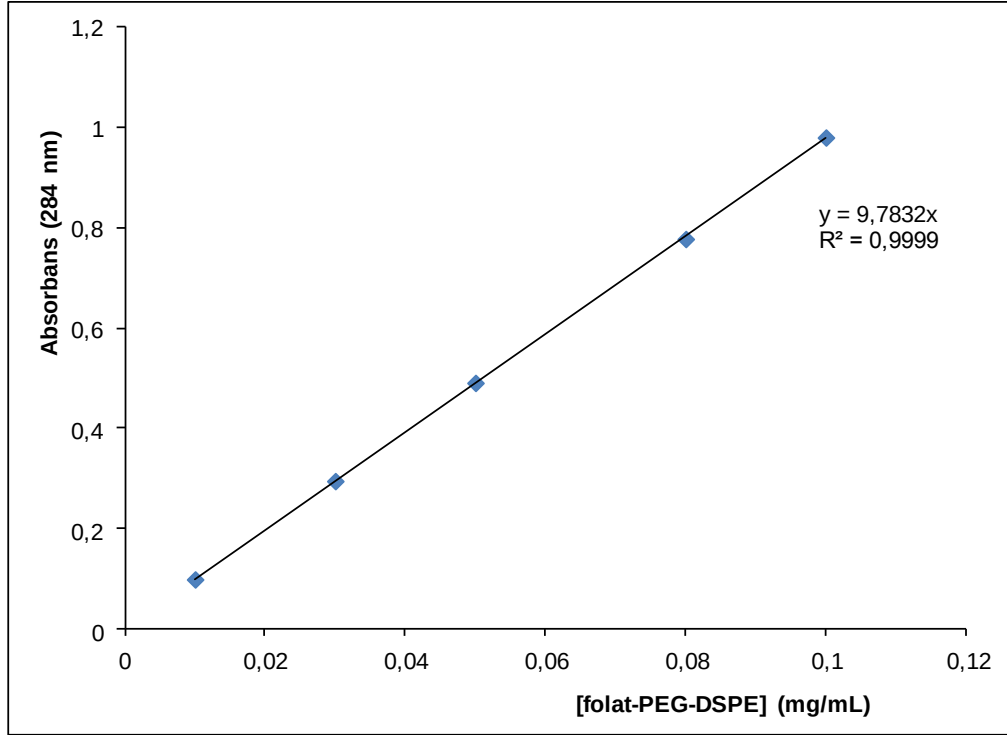
3.6 Eritrosit Ghost Hücrelerine Folat Ligandının Takılması ve Folat Ligandı Bağlı ve Doksorubisin İçeren Nanopartikül Yüklü Eritrosit Veziküllerinin Oluşturulması

3.6.1 Eritrosit ghost hücrelerine folat ligandının takılması

Folat-PEG-DSPE molekülünün 18 karbonlu fosfolipid içeriği sebebiyle membran yapısına çapa yaparak giriş sağlayabileceği ve 45 tekrarlı (M_n : 2000) ve uzun polietilen glikol zinciri sayesinde bu polimere bağlı folatın folat reseptörü ile etkileşmesinde sorun olmayacağı düşünülmektedir. Bileşiğin yapısı Şekil 3.66'da gösterilmektedir. Bu avantajlarından dolayı folat reseptörüne hedef molekül olarak folat-PEG-DSPE bileşiği folat ligandı olarak tercih edilmiştir. Bileşiğin 1x PBS tamponu içerisinde çizilen standart grafiği Şekil 3.67' de verilmektedir.



Şekil 3.66 Folat-PEG-DSPE bileşiğinin kimyasal yapısı.

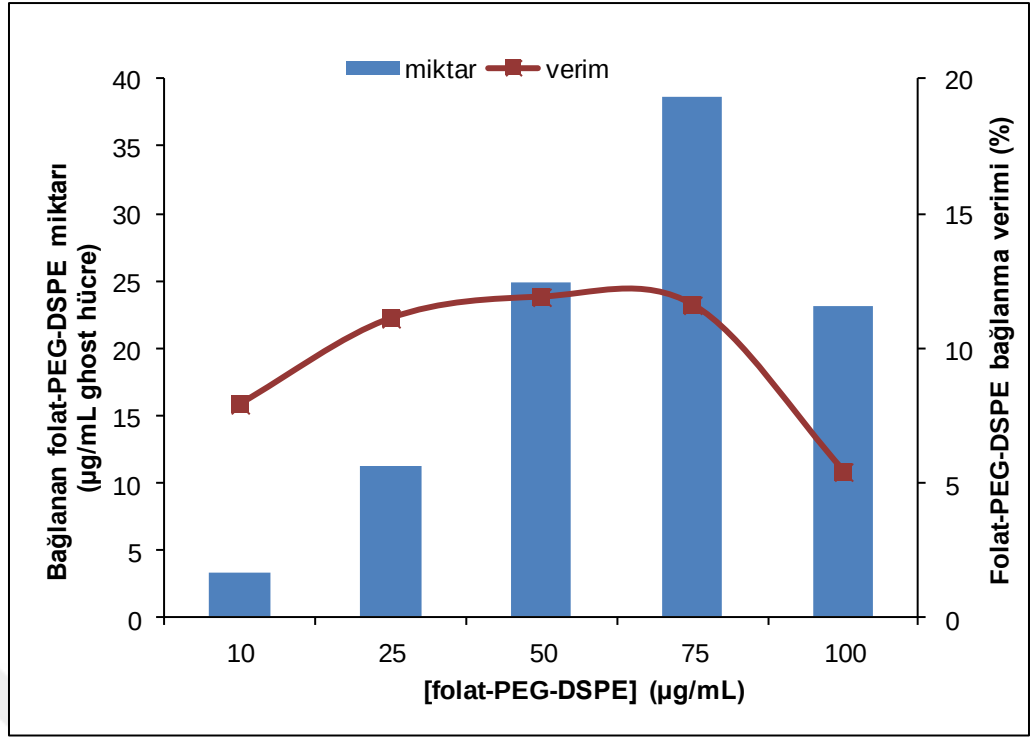


Şekil 3.67 1x PBS içerisinde hazırlanan folat-PEG-DSPE standart grafiği.

Ghost hücrelerin folat ligandı ile belirli inkübasyon koşullarında etkileşimi sonucunda hücrelere bağlanan folat-PEG-DSPE miktar ve yüzdeleri Şekil 3.68' de gösterilmektedir. Tablo 3.3' te bu veriler özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 75 $\mu\text{g/mL}$ folat-PEG-DSPE konsantrasyonuna kadar folat ligandının bağlanma miktarının arttığı, bu konsantrasyondan sonra ise azalmaya başladığı görülmektedir. Optimum olarak seçilen 75 $\mu\text{g/mL}$ folat-PEG-DSPE konsantrasyonunda ile 1 mL ghost hücresi başına bağlanan folat ligandı miktarı 38,70 μg olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuçlar literatür (Fang et al., 2013) ile uyumludur.

Tablo 3.3 Değişen başlangıç konsantrasyonlarında ghost hücrelere bağlanan folat-PEG-DSPE miktar ($\mu\text{g/mL}$ ghost hücre) ve yüzdeleri (%).

Başlangıç folat-PEG-DSPE konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)	Bağlanan folat-PEG-DSPE miktarı ($\mu\text{g/mL}$ ghost hücre)	Bağlanan folat-PEG-DSPE yüzdesi (%)
10	3,25	7,9
25	11,28	11,1
50	24,88	11,9
75	38,70	11,6
100	23,08	5,4



Şekil 3.68 Folat-PEG-DSPE bileşiğinin ghost hücrelere bağlanma miktar ve verimleri.

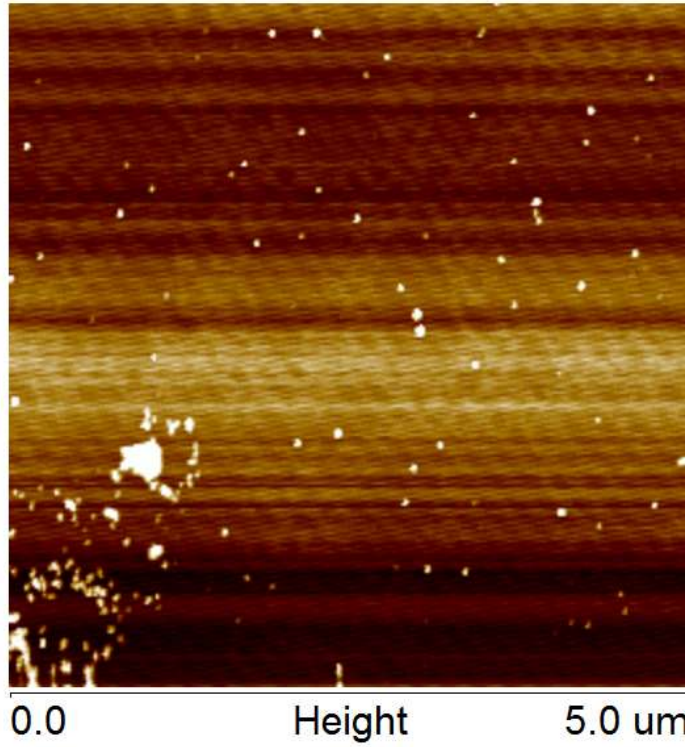
Folat ligandının bağlanma yüzdesi % 11,6 olarak düşük bir değer olduğundan bağlanmanın artması için inkübasyon süresi Shmeeda ve arkadaşlarının yaptığı gibi 2 saate çıkarılarak deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar değişmediğinden optimizasyon çalışmalarına devam edilmemiştir.

Folat ligandı takılı ghost hücreler vezikül haline getirilerek zeta potansiyeli belirlenmiş ve yapının yük durumu kontrol edilmiştir. PBS tamponu içerisinde hazırlanan folat ligandı takılı veziküllerin zeta potansiyeli $-14,1 \pm 1,42$ mV olarak bulunmuştur ve zeta potansiyelin folat takılı olmayan veziküllere göre ($-11,6 \pm 2,70$ mV) hemen hemen aynı kaldığı saptanmıştır. Şekil 3.66'dan da görüldüğü gibi folatın PEG ile bağ yapmayan bir karboksil grubu ve bir amino grubu serbest haldedir ve bu iki grubun iyonizasyonundan ötürü yük durumuna etki etmemesi beklenen bir sonuçtur.

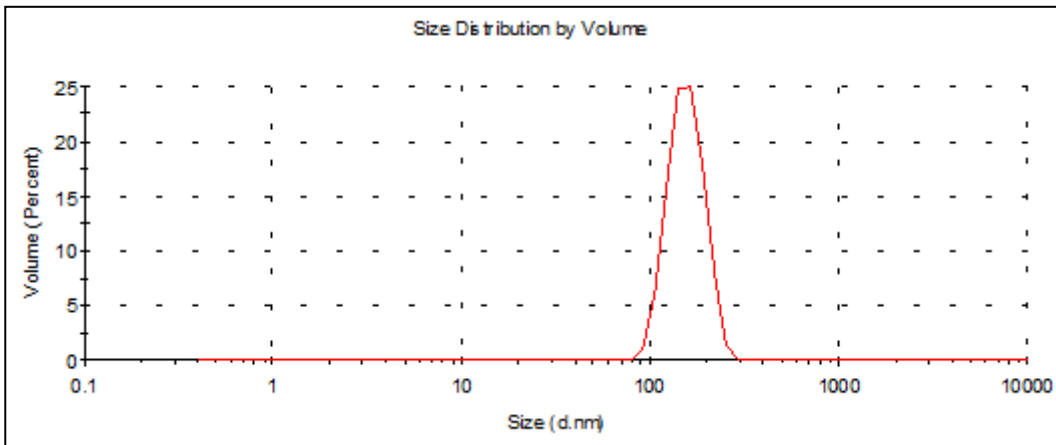
3.6.2 Folat ligandı bağlı ve doksorubisin içeren nanopartikül yüklü eritrosit veziküllerinin oluşturulması

Optimum koşullarda hazırlanarak elde edilen folat ligandı takılmış ilaç bağlı manyetik nanopartikül içeren eritrosit veziküllerin AFM görüntüsü Şekil 3.69'da gösterilmektedir. Doksorubisin içeren nanopartikül yüklü ve folat ligandı bağlı veziküllerin morfolojisinin folat ligandı bağlı olmayan gruba göre değişmediği belirlenmiştir. Yapıların boyutlarının saptanması amacıyla zetasizer ile analiz

yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre (Şekil 3.70) folat çapalı nanopartikül yüklü veziküllerin boyutunun $157,4 \pm 33,24$ nm olduğu bulunmuştur. Nanopartikül yüklü veziküllere göre folat takılı ve nanopartikül yüklü veziküllerin boyutunun az bir miktar arttığı görülmektedir. Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin boyutu hem retiküloendotelial sistem tarafından tanınmamasını sağlamak hem de sisteminin tümör mikroçevresindeki boşluklardan geçebilmesi için uygun değerdedir.



Şekil 3.69 Folat-PEG-DSPE bileşiği takılı ve doksorubisin yüklü manyetik nanopartikülleri içeren eritrosit membran vezikülleri.

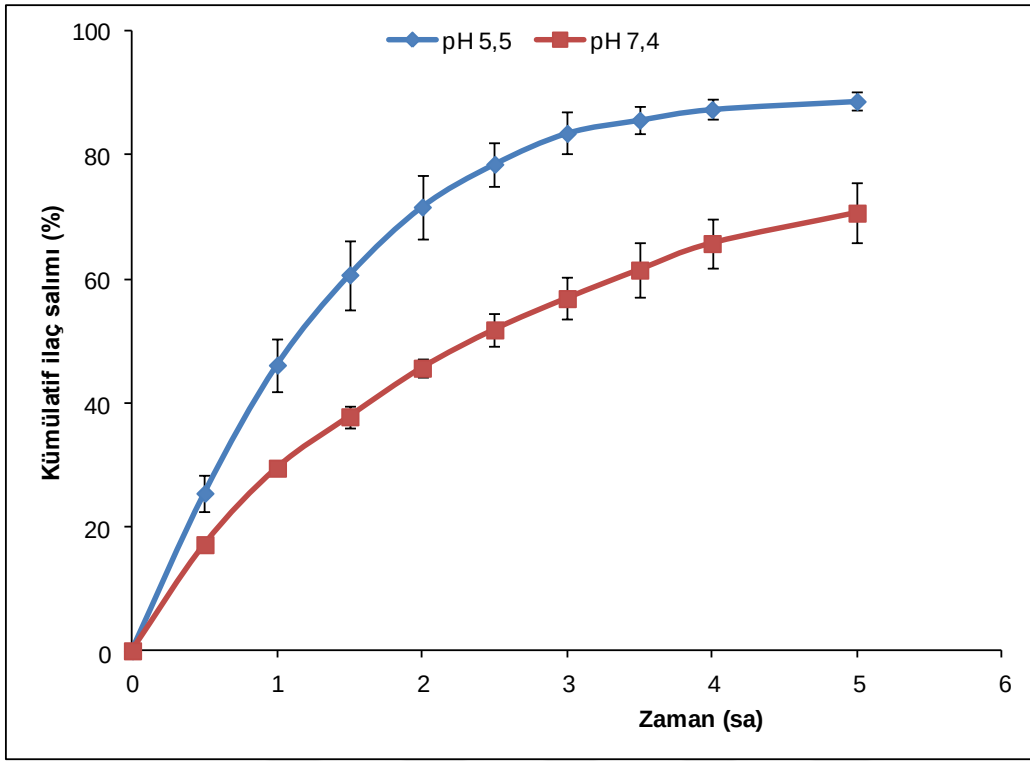


Şekil 3.70 Folat-PEG-DSPE bileşiği takılı ve doksorubisin yüklü manyetik nanopartikülleri içeren eritrosit membran veziküllerinin boyut dağılımları.

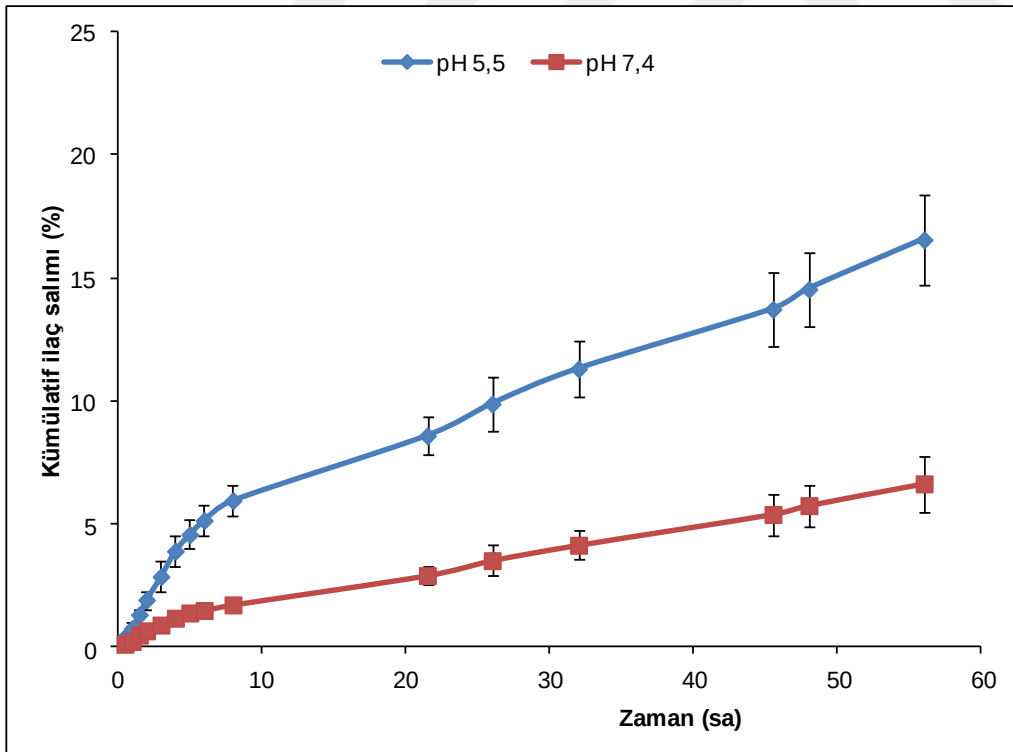
3.7 Manyetik Taşıyıcı Sistemin *in Vitro* İlaç Salım Çalışmaları

In vitro ilaç salım çalışmaları ilacın sirkülasyon sırasındaki ve kanserli bölge veya hücredeki salınan miktarlarının belirlenmesi ve kıyaslanması açısından önemlidir. Nişasta ve PEG diasit asit kaplı manyetik nanopartiküllere doksorubisin ilacı adsorpsiyon yoluyla yüklenmiştir. Folat reseptörleri ile kanser hücresi içerisine alınacağı düşünülen biyomimetik manyetik nanotaşıyıcının etrafının hücre içinde endozomal kompartmanlarla sarılacağı tahmin edilmektedir. Bu kompartmanların da tümör mikroçevresi gibi asidik karakterde olduğu bilinmektedir. Bu nedenle ilacın sirküle olacağı fizyolojik pH (7,4) dışında asidik pH (5,5) değerinde de salım profili izlenmiştir.

Şekil 3.71 ve 3.72’de sırasıyla serbest doksorubisinin ve manyetik nanotaşıyıcıya bağlı doksorubisinin pH 5,5 ve 7,4’teki zamana bağlı salım profilleri verilmektedir. Elde edilen verilere göre serbest ilacın ilk 30 dakikada pH 5,5’te $25,43 \pm 2,87$ ve pH 7,4’te $17,13 \pm 0,77$ kadarı salınırken nanopartiküllere yüklü doksorubisinin bu sürede pH 5,5’te $0,40 \pm 0,09$ ve pH 7,4’te ise $0,11 \pm 0,06$ kadarı salınmaktadır. İkinci ve dördüncü saatlerde serbest ilacın sırasıyla pH 5,5’te $71,63 \pm 5,20$ ve $88,68 \pm 1,53$; pH 7,4’te ise $45,62 \pm 1,55$ ve $65,74 \pm 4,10$ kadarı salınmaktadır. Nanotaşıyıcıya yüklü doksorubisinin ise 2. ve 4. saatlerde sırasıyla pH 5,5’te $1,91 \pm 0,37$ ve $3,89 \pm 0,59$; pH 7,4’te ise $0,65 \pm 0,02$ ve $1,17 \pm 0,07$ kadarı salınmaktadır. Serbest ilaç herhangi bir taşıyıcıya bağlı olmadığı için her iki pH değerinde de dördüncü saatte %65’inden fazlası salınmıştır. Nanopartiküllere bağlı ilaç ise bu saatte fizyolojik pH’da yaklaşık 3 kat daha az olmak üzere asidik ortamda % 4’e yakın bir oranda salınmıştır.



Şekil 3.71 Serbest dokсорubisinin pH 5,5 ve 7,4 ortamlarındaki salım yüzdeleri.



Şekil 3.72 Nişasta ve PEGdiasit kaplı manyetik nanopartiküllere yüklü dokсорubisinin pH 5,5 ve 7,4 ortamlarındaki salım yüzdeleri.

İlerleyen zaman dilimlerinde ise manyetik nanopartiküllere yüklü ilacın 26.saatte pH 5,5'te $9,88 \pm 1,08$ ve 7,4'te ise $3,51 \pm 0,62$ kadar; 48.saatte ise pH 5,5'te $14,54 \pm 1,50$ ve pH 7,4'te ise $5,75 \pm 0,84$ kadarı salınmaktadır (Şekil 3.72). Elde edilen sonuçlara göre ilaç bağlı manyetik nanopartiküllerin kontrollü salım yaptığı ve ilacın asidik ortamda fizyolojik pH değerine yaklaşık 2,5-3 kat daha fazla salındığı saptanmıştır.

İlacın asidik ortamdaki salımının fizyolojik pH ortamına göre daha yüksek oranda olması doksorubisinin pH-duyarlı olarak nanotaşıyıcıya adsorbe olduğunu göstermektedir ve literatürlerde de (Manocha and Margaritis, 2010; Lanz-Landazuri et al., 2014) benzer sonuçlar yer almaktadır. Bu durum ayrıca asidik bölgelerde (tümör mikroçevresi ve/veya endozomal kompartmanlar) ilacın yapıdan ayrılacağını dolayısıyla hedef kanser doku/hücrede daha fazla salınacağını gösterir. Bunun yanında sağlıklı dokularda ilacın salımının düşük olması da nanotaşıyıcıya bağlanan ilacın yan etkilerinin minimuma inebileceğine işaret etmektedir. Sonuç olarak sentezlenen manyetik nanotaşıyıcı manyetik alanda vereceği cevap ve folat reseptörü sayesinde hedef bölgeye gitme ve ilacı burada daha yüksek oranda bırakma, dolayısıyla da hedefli tedavi potansiyeli taşıdığı düşünülmektedir.

3.8 Biyomimetik İlaç Taşıma Sisteminin Biyouyumluluk Araştırmaları

3.8.1 Serum proteinlerine bağlanma miktarının belirlenmesi

Çalışmada SPM, DSPM, VDSPM ve FVDSPM örneklerinin 2 saat 37°C 'de FBS ile etkileştirilmesi sonunda santrifüjlenerek çöktürülmeleri ile üst fazda kalan bağlanmamış protein üzerinden serum proteinlerine bağlanma miktarları hesaplanmıştır. Damar yolu ile alınan ilaçların vücuttan yaklaşık olarak 2 saatte atıldığı bilindiği için süre 2 saat olarak ayarlanmıştır. Ayrıca inkübasyon vücut sıcaklığı olan 37°C ' de gerçekleştirilmiştir. Serum protein miktarı kişiden kişiye değişebileceği için serum : ilaç taşıyıcısı değiştirilerek (10:90, 20:80, 40:60, 60:40) denemeler yapılmıştır. Elde edilen serum proteinlerine bağlanma verimleri ve bağlanma yüzdeleri Tablo 3.4'te özetlenmiştir.

Tablo 3.4 Değişen oranlarda SPM, DSPM, VDSPM ve FVDSPM nanotaşıyıcılarına bağlanan serum protein miktar ve yüzdeleri.

İlaç taşıyıcısı	$V_{\text{Serum}} : V_{\text{Taşıyıcı}}$	Bağlı protein ($\mu\text{g protein/ mg NP}$)	Bağlanma (%)
SPM	10:90	56,65	10,1
	20:80	84,08	6,7
	40:60	143,91	4,3
	60:40	947,03	12,5
DSPM	10:90	25,09	4,5
	20:80	44,81	3,5
	40:60	100,08	3
	60:40	494,18	6,5
İlaç taşıyıcısı	$V_{\text{Serum}} : V_{\text{Taşıyıcı}}$	Bağlı protein ($\mu\text{g protein/ } \mu\text{g NP}$)	Bağlanma (%)
VDSPM	10:90	39,44	12,3
	20:80	21,25	2,9
	40:60	15,00	0,8
	60:40	617,50	14,3
FVDSPM	10:90	23,33	7,3
	20:80	3,75	0,5
	40:60	3,88	0,2
	60:40	463,00	10,7

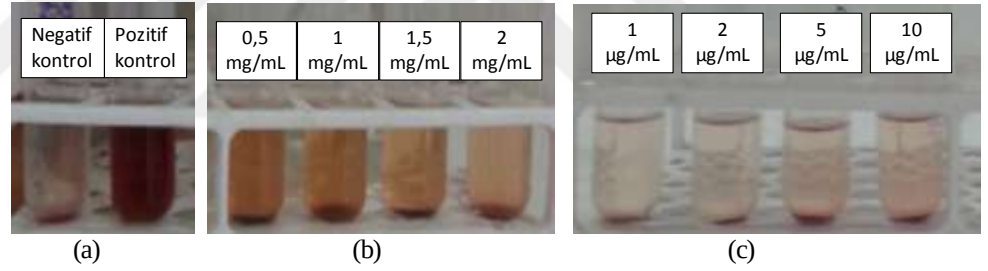
Nanoyapılara protein bağlanması tam olarak açıklanabilen bir mekanizma olmasa da protein bağlanması nanopartikülün yükünü değiştirir ve bunun sonucu olarak nanopartikülün makroajlarca alımı, biyodağılımı, biyoyumluluğu, biyolojik cevabı ve terapötik etkinliği farklı olabilir (Aggarwal et al., 2009). Plazma proteinlerine bağlanmada nanopartikülün boyutu, yüzey yükü, çözünürlüğü, yüzey modifikasyonları ve şeklinin etkili birer faktör olduğu literatürlerde belirtilmektedir.

Serum: nanotaşıyıcı oranı dikkate alındığında serum oranı artışının protein bağlanma oranı üzerinde çok etkili olmadığı Tablo 3.4’ te görülmektedir. Tüm değerler incelendiğinde ilaç içeren veya ilaç içermeyen nanopartiküller, folat takılı olan veya olmayan veziküller ile kaplı nanopartiküllerin serum proteinleri ile bağlanma yüzdeleri

çok düşüktür. Literatür verileriyle kıyaslandığında, literatürde yeralan çalışmalarda %40 lara varan bağlanma verimleri (Semete et al., 2012) saptanırken çalışmamızda en yüksek bağlanma yüzdesi vezikül kaplı ilaç içeren nanopartiküller ile 60:40 oranında saptanmış olup %14,3 gibi düşük bir değerdir.

3.8.2 Hemoliz oranının belirlenmesi

İlaç taşıyıcılarının neden olabileceği hemoliz miktarının belirlenebilmesi için ilaç grupları eritrositler ile etkileştirilerek eritrositlerin hemoliziyle ortama salınacak olan hemoglobinin spektrofotometrik olarak tayin edilmesi amaçlandı. 0,5, 1, 1,5, 2 mg NP/mL konsantrasyondaki SPM ve DSPM ve 1, 2, 5, 10 µg NP/mL konsantrasyonundaki VDSPM ve FVDSPM taşıyıcıları ile yapılan çalışmada hemoglobinin absorbansı ölçülemeyecek kadar küçük olduğu için bu taşıyıcıların hemolize neden olmadığı sonucuna varıldı. Pozitif kontrol olarak Triton X-100 kullanıldığında ise denemeye başlama anında ve yüksek düzeyde hemolizin olduğu, negatif kontrol tüplerinde de yine hemolizin olmadığı görüldü. Denemede elde edilen sonuçlara dair bazı fotoğraflar Şekil 3.73'te verilmektedir.



Şekil 3.73 a) Kontrol grupları, b) DSPM ve c) FVDSPM grubu örneklerin hemoliz deneyi fotoğrafları.

Dobrovolskaia ve arkadaşlarının bir çalışmasında nanopartiküllerin immun sistem ile etkileşimleri incelenmiş ve nanopartikül konsantrasyonu artışının eritrosit hemolizi yaratabileceği belirtilmiştir. Ayrıca eritrositlerde hemoliz etkisinin nanopartiküllerin yüzey yüküne bağlı olduğu vurgulanmıştır. Yüzeye anyonik/katyonik gruplar eklenerek yapılan çalışmalarda anyonik yüzey yüklerinin katyonik yüzey yüklerinden daha az hemoliz meydana getirdiği bildirilmiştir. Poliamidoamin, karboksilan, polipropilen imin ve polilizin gibi yapıların yer aldığı nanopartiküllerin eritrositlerde hemoliz miktarını arttırdığı belirtilmiştir (Dobrovolskaia et al., 2008). Çalışmada sentezlenen yapıların pozitif yüklü olmaması ve veziküler yapıların eritrosit membran yapısını taklit etmesi sebebiyle eritrosit hemolizine neden olmadığı düşünülmektedir, ayrıca hazırlanan ilaç taşıyıcısının biyoyumlu olduğu sonucuna varılmaktadır.

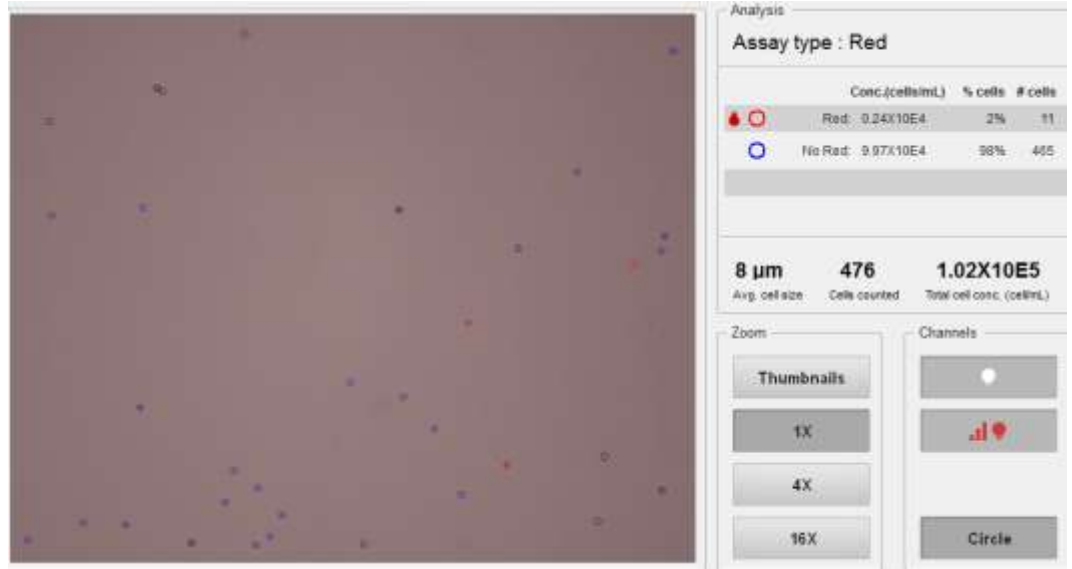
3.8.3 Makrofaj hücrelerince alımın incelenmesi

Makrofaj hücrelerinin sentezlenen örneklerle inkübasyonundan önce başlangıç hücre sayısı belirlendi. Flasktaki makrofaj hücrelerinden 25 µl alınarak slayta uygulandı ve hücre görüntüleme ve sayım cihazında analizlendi. Hücre sayılarının yanında hücrelerin kırmızı filtredaki floresans yayımı izlendi. Şekil 3.74'te gösterildiği hücrelerin 8µm çaplı olduğu ve background olarak herhangi bir floresans yayım yapmadığı (% 0) bulunmuştur. Dolayısıyla ortamdaki floresans sinyalin sadece doksorubisinden gelebileceği düşünülmektedir.



Şekil 3.74 Makrofaj hücrelerinin başlangıç anı görüntüsü, hücre ve floresans sayımı.

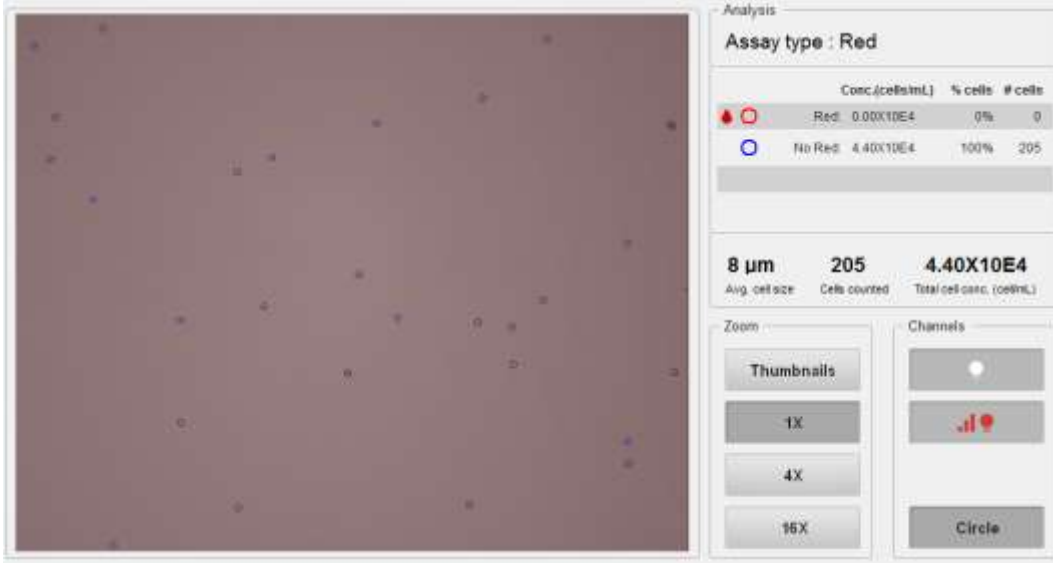
DSPM, VDSPM ve FVDSPM ilaç gruplarının makrofaj hücreleri ile etkileşimleri sonucunda elde edilen analiz görüntüleri ve floresans miktarları sırasıyla Şekil 3.75, 3.76 ve 3.77'de verilmektedir. Vezikül kaplı olmayan manyetik nanopartiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinde % 2 gibi oldukça düşük bir oranda floresans yayım yapan, yani ilaç taşıyıcısını içerisine alan hücre saptanmıştır. Folat çapalı veya çapalı olmayan eritrosit vezikülleri kaplı manyetik nanopartiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinde ise herhangi bir floresans belirlenmemiştir. Dolayısıyla makrofajlarca hücre içine alınmadığı görülen eritrosit membran veziküllerinin dolaşıma verildiğinde fagositoza uğramayacağı yani biyomimetik özellikli olduğu sonucuna varılmaktadır. Literatürde de eritrosit içerisine enkapsüle edilmiş süperparamanyetik özellikli ve karboksidekstran kaplı taşıyıcı sistemin fagosit edilmek üzere makrofajlarca hücre içerisine alınmadığı gösterilmiştir (Antonelli et al., 2008).



Şekil 3.75 DSPM ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin görüntüsü, hücre ve floresans sayımı.



Şekil 3.76 VDSPM ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin görüntüsü, hücre ve floresans sayımı.



Şekil 3.77 FVDSPM ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin görüntüsü, hücre ve floresans sayısı.

3.9 Biyomimetik İlaç Taşıma Sisteminin Over Kanseri Hücre Hatlarında Sitotoksiste Analizleri

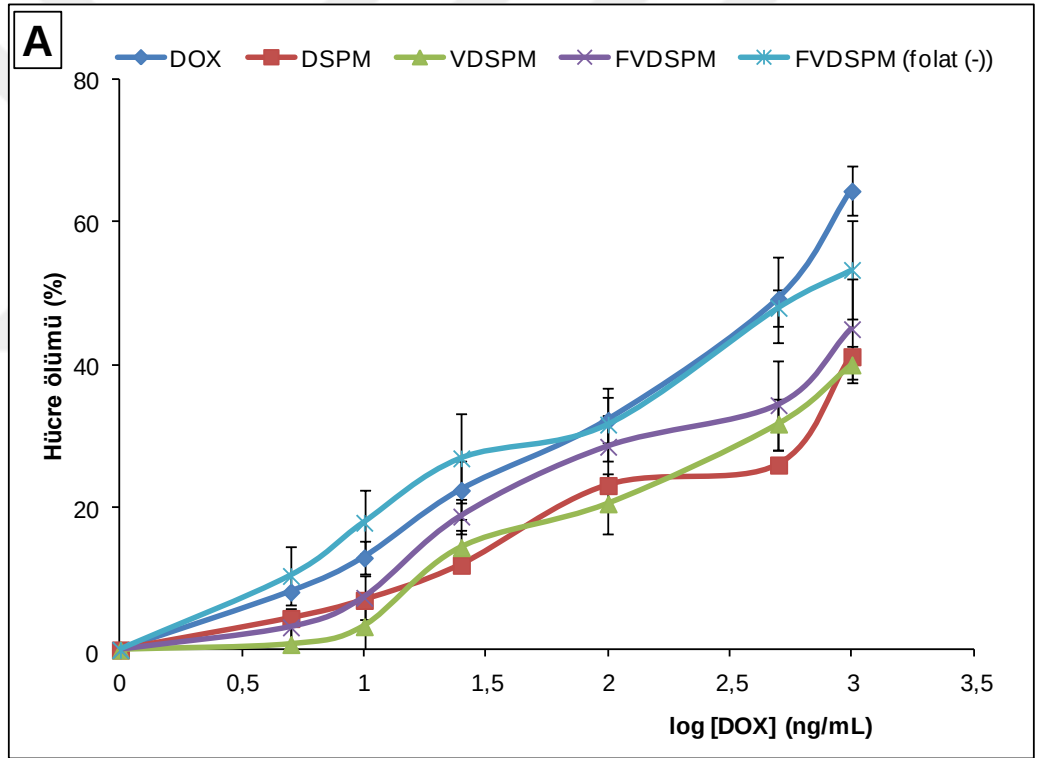
Epitelyal over kanserlerinin ~%70'inden sorumlu olan seröz over karsinomalarının en agresif alt türünün yüksek gradeli seröz over kanseri olduğu ve yüksek gradeli seröz over kanseri araştırmalarında Pubmed veritabanı atıflarına göre en sık kullanılan hücre hattı modellerinden bazılarının A2780, OVCAR3 ve SKOV3 hücre hatları olduğu bilinmektedir (Domcke et al., 2013). Dolayısıyla tez kapsamında bu üç model hücre hattı seçilerek çalışmalar yapılmıştır.

Manyetik partiküllerin seyreltilmeden önce dağıtıldığı ortam olarak kullanılan izotonik sükröz ve vezikül yapılarının ortamları olan PBS çözeltileri besi ortamları ile ilaç gruplarının hazırlanmasında kullanılan hacim kadar karıştırılarak hücrelerde canlılık testi yapılmıştır. Sonuçlara göre her üç hücre hattı için belirtilen oranlarda steril sükröz ve PBS çözeltileri ile karıştırılan besi ortamlarındaki canlılık miktarı yalnızca besi ortamı içeren ortamdaki canlılık miktarına yaklaşık olarak eşittir. İlaç içermeyen manyetik nanopartiküllerin de (SPM) belirtilen konsantrasyonlarda sitotoksiste yaratmadığı bulunmuştur. Dolayısıyla diğer ilaç gruplarının sitotoksitenin yapıdaki doksorubisinden kaynaklandığı ve taşıyıcı sistemin toksik etkisinin olmadığı sonucuna varılmaktadır. Besi ortamında inkübe edilen hücrelerde saptanan canlılık miktarı %100 olarak kabul edilerek ilaç örnekleri uygulanan hücrelerde hesaplama yapılmıştır.

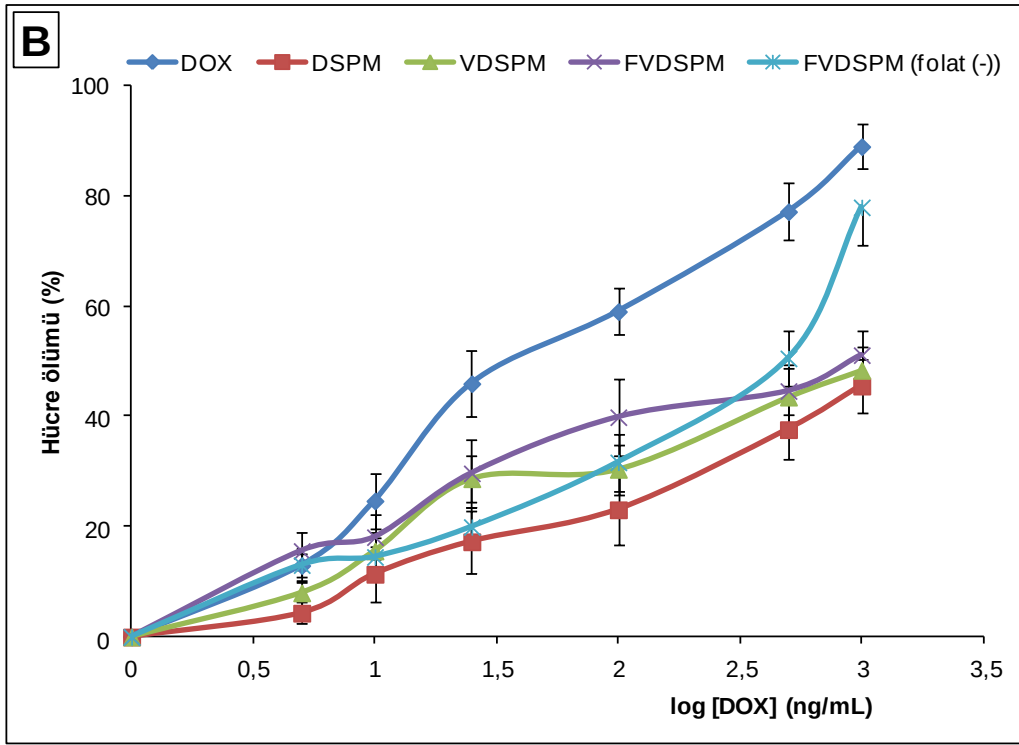
Doksorubisin ve doksorubisin içeren taşıyıcı sistemlerinin 5-1000 ng/mL (log [DOX]= 0,70-3,00 ng/mL) konsantrasyon aralığında hücrelerde yarattığı sitotoksiste

A2780, OVCAR3 ve SKOV3 hücreleri için sırasıyla Şekil 3.78, 3.79 ve 3.80’da gösterilmektedir.

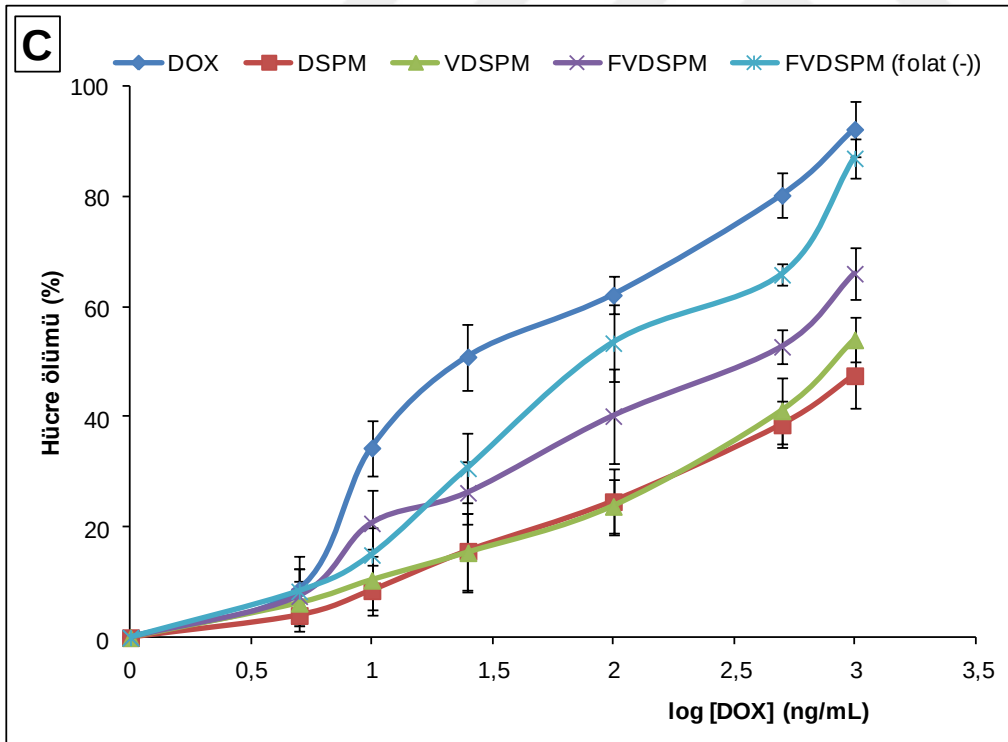
Herbir hücre için 24, 48 ve 72. saatlerde MTT testi yapılarak sitotoksiteler belirlenmiştir. Tüm ilaç gruplarının artan doksorubisin konsantrasyonu ile daha fazla sitotoksite yarattığı tespit edilmiştir. Ayrıca partikül gruplarının özellikle 48 ve 72. saatlerde daha fazla hücre ölümüne neden olduğu, dolayısıyla ilaç taşıyıcılarının etki mekanizmasının daha yavaş olduğu ve kontrollü salım yaptığından söz edilebilmektedir. Grafiklere bakıldığında A2780 ve OVCAR3 hücre hattı için serbest doksorubisinden sonra en çok sitotoksiteye FVDSPM partikülleri neden olurken SKOV3 hücre hattında FVDSPM partikülleri serbest doksorubisinden daha fazla sitotoksite yaratmıştır.



(a)

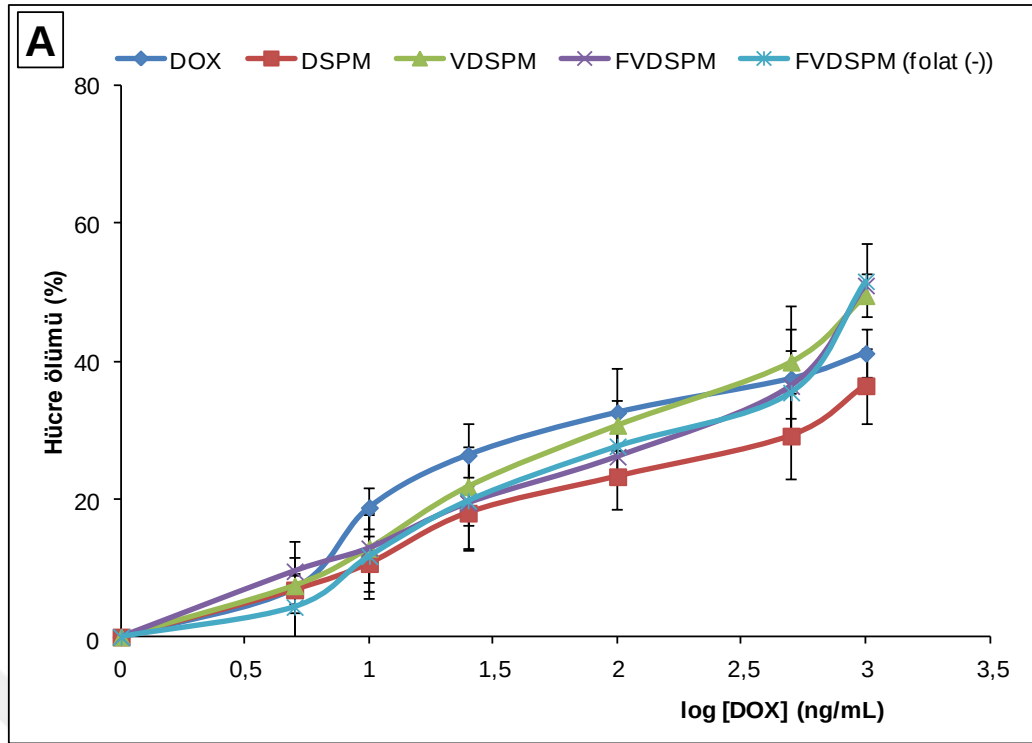


(b)

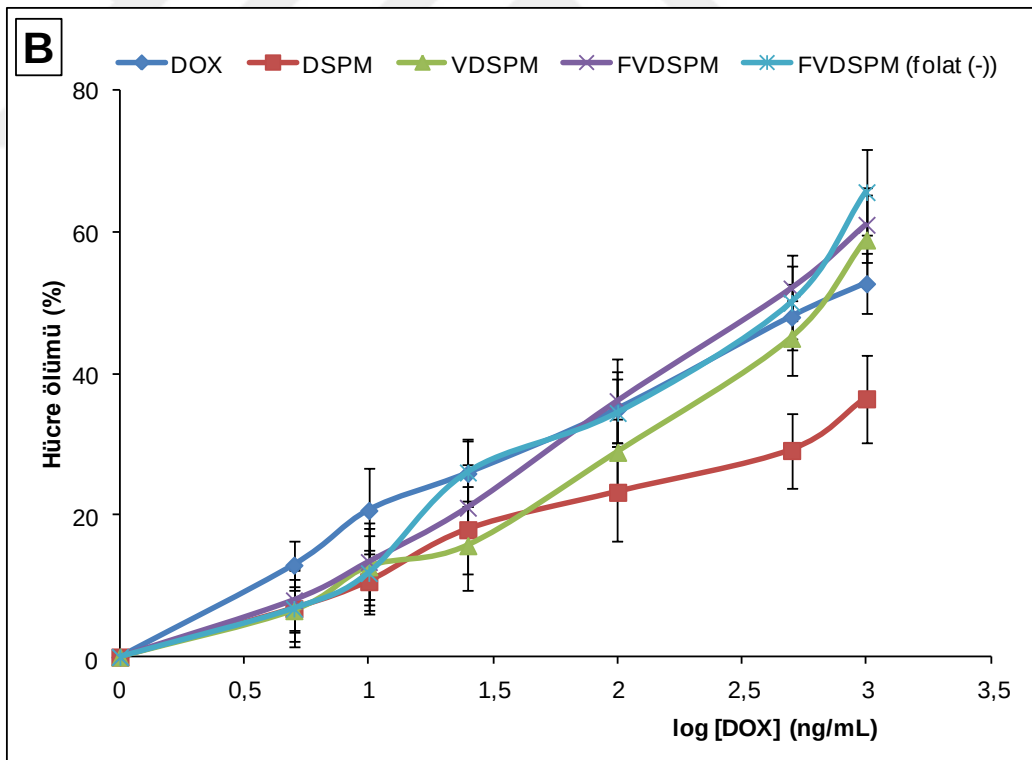


(c)

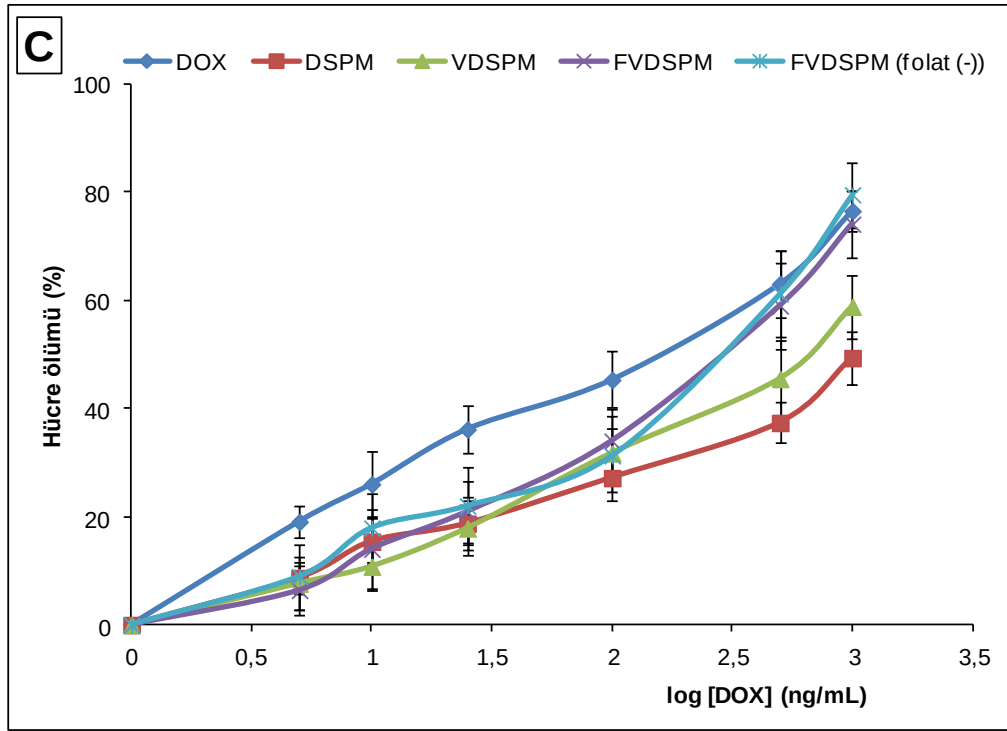
Şekil 3.78 Artan konsantrasyonlardaki ilaç gruplarının A2780 hücreleri üzerinde a) 24 saatlik, b) 48 saatlik, c) 72 saatlik inkübasyon sonunda yarattığı sitotoksosite.



(a)

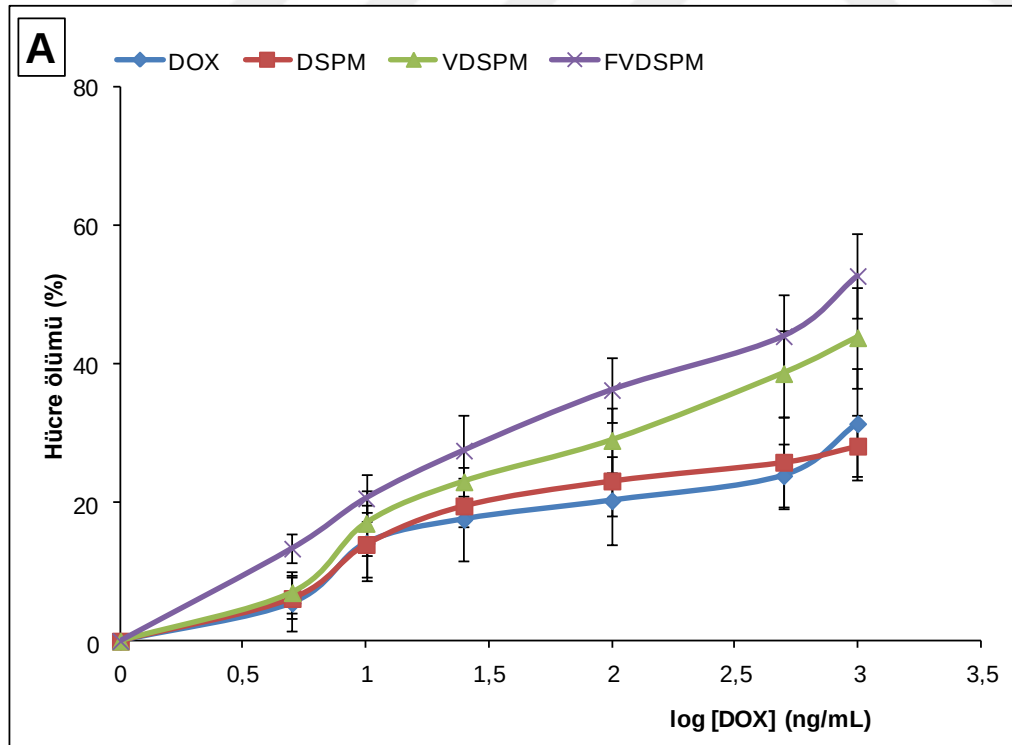


(b)

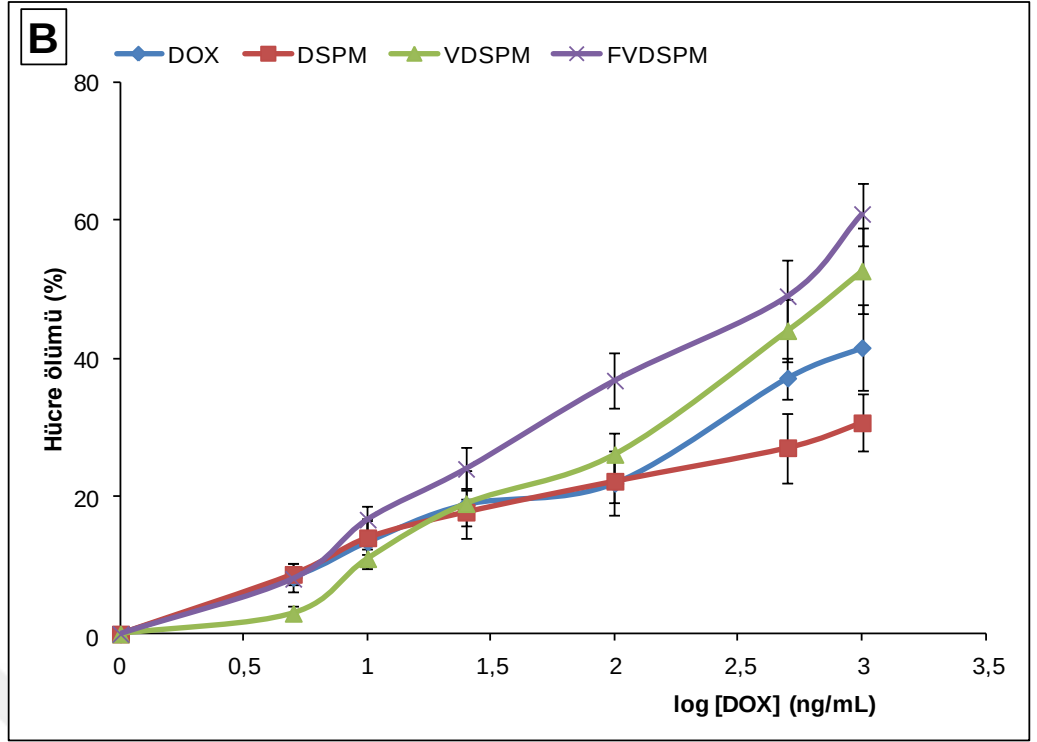


(c)

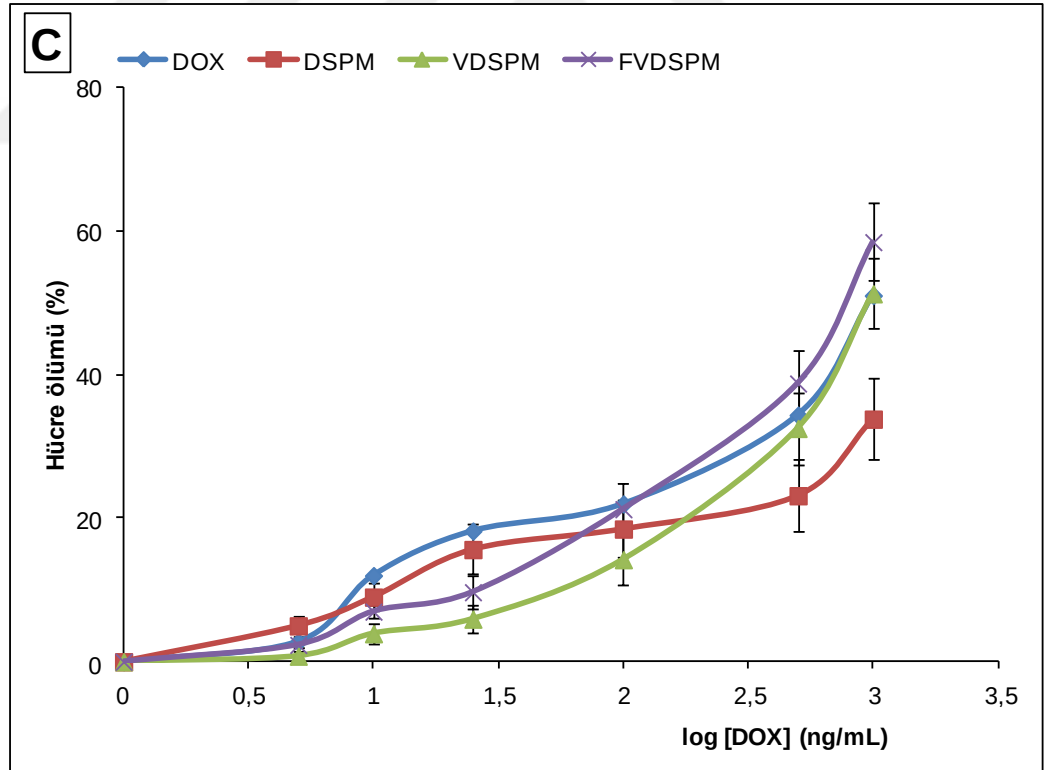
Şekil 3.79 Artan konsantrasyonlardaki ilaç gruplarının OVCAR3 hücreleri üzerinde a) 24 saatlik, b) 48 saatlik, c) 72 saatlik inkübasyon sonunda yarattığı sitotoksisite.



(a)



(b)



(c)

Şekil 3.80 Artan konsantrasyonlardaki ilaç gruplarının SKOV3 hücreleri üzerinde a) 24 saatlik, b) 48 saatlik, c) 72 saatlik inkübasyon sonunda yarattığı sitotoksosite.

Tablo 3.5’ te DOX, DSPM, VDSPM ve FVDSPM ilaç gruplarının A2780, OVCAR3 ve SKOV3 hücrelerinin büyümesini %50 azaltan konsantrasyon değerleri IC₅₀ değerleri gösterilmektedir. Bu konsantrasyon değerleri GraphPad Prism Software 5.0 programı ile hesaplanmış ve standart sapmaları bulunmuştur.

Tablo 3.5 Doksorubisin ve doksorubisin taşıyan ilaç gruplarının A2780, OVCAR3 ve SKOV3 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değerleri (µg/mL).

İlaç grubu	SKOV3	A2780	A2780 (folat (-) ortam)	OVCAR3	OVCAR3 (folat (-) ortam)
DOX	1,28 ± 0,43	0,031 ± 0,016	-	0,11 ± 0,09	-
DSPM	12,49 ± 1,56	1,19 ± 0,67	-	1,26 ± 0,25	-
VDSPM	1,05 ± 0,78	0,84 ± 0,31	-	0,55 ± 0,13	-
FVDSPM	0,74 ± 0,32	0,28 ± 0,11	0,10 ± 0,05	0,24 ± 0,09	0,21 ± 0,09

Hu ve arkadaşları 48 saatlik inkübasyon sonucunda kuyucuk başına 100.000 hücre ile gerçekleştirdikleri MTT testinde doksorubisinin SKOV3 hücreleri için IC₅₀ değerini 3,24±0,05 µg/mL olarak bulmuştur (Hu et al., 2008). Çalışmada serbest doksorubisinin SKOV3 hücreleri için belirlenen IC₅₀ değeri (1,28±0,43 µg/mL) literatür verisine yakındır. Başka bir çalışmada kuyucuk başına 10.000 A2780 hücresi ile doksorubisinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda elde edilen IC₅₀ değeri 0,024±0,013 µg/mL olarak bildirilmiştir (Kim et al., 2009). Serbest doksorubisinin A2780 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri projede 0,031±0,016 µg/mL olarak bulunmuştur ve literatür verisi ile oldukça yakındır. Hartog ve arkadaşları 96 saatlik inkübasyon sonucunda kuyucuk başına 5.000 hücre ile gerçekleştirdikleri MTT testinde doksorubisinin OVCAR3 hücreleri için IC₅₀ değerini 12,6 nM olarak bulmuştur (Hartog et al., 2004). Ren ve arkadaşlarının 2007 yılındaki çalışmasında ise kuyucuk başına 20.000 OVCAR3 hücresi ile doksorubisin inkübasyonu ile gerçekleştirdikleri MTT testinde IC₅₀ değeri 0,48 µg/mL olarak saptanmıştır (Ren et al., 2007). Deney koşulları düşünüldüğünde OVCAR3 hücresi için bulunan serbest doksorubisine ait IC₅₀ değeri (0,11 ± 0,09 µg/mL) literatür verileri ile uyumludur.

MTT analizlerinde üç hücre hattı için IC₅₀ değerleri en yüksekten en düşüğe sırasıyla DSPM, VDSPM ve FVDSPM’lerin hücrelere uygulanmasıyla saptanmıştır. VDSPM’ler ve FVDSPM’lerin IC₅₀ değerleri DSPM’lere göre yaklaşık olarak sırasıyla SKOV3 hücre hattında 11,90 ve 16,88 kat; A2780 hücre hattında 1,42 ve 4,25 kat; OVCAR3 hücre hattında ise 2,29 ve 5,25 kat daha düşüktür (Tablo 3.5). Bu durumun hücrelerin ilaç duyarlılığı yanısıra ilaç taşıyıcılarının hücre içerisine girişi ile

açıklanabileceği düşünülmektedir. Folat içermeyen nanopartiküller kanser hücrelerine non-spesifik bağlanma/ penetrasyon prosesleri ile alınırken folat taşıyan nanoyapılar hücrelere folat ligandının folat reseptörü ile etkileşimini takiben reseptör aracılı endositoz ile girdiği bilinmektedir (Wang et al., 2011). 2012 yılındaki bir çalışmada da lipozom kaplı manyetik nanokristal ve doksorubisin içeren polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanokürelerinin lipozom kaplı olmayan manyetik nanokürelere göre hücre içine daha etkili bir şekilde girdiği; folat ucu taşıyan lipozom kaplı manyetik nanopartiküllerin ise folat ucu taşımayan lipozom kaplı manyetik nanopartiküllere göre daha yüksek oranda hücre içine alındığı görülmektedir (Wang et al., 2012). Folat reseptörü eksprese eden hücrelerde folat ucu içeren nanotaşıyıcıların içermeyen kontrol gruplarına göre daha fazla oranda hücre içerisine girdiği ve yapıda bulunan ilacın daha yüksek etkinlik gösterdiği birçok çalışmada gösterilmektedir (Wang et al., 2011; Nukolova et al., 2011; Yang et al., 2014) .

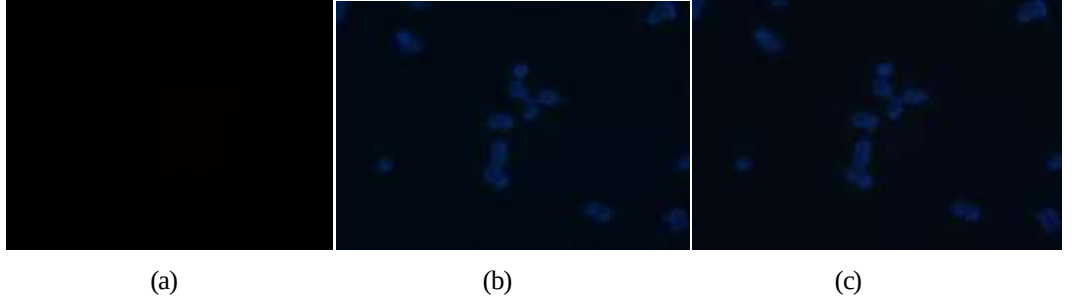
Ortamdaki serbest folatın folat reseptörüne bağlanarak reseptörü bloke edebildiği böylelikle de ilaç taşıyıcısının folat reseptörü aracılığıyla hücre içine girişini engelleyebileceği (Yang et al., 2014) bilindiğinden MTT analizleri sırasında folat içermeyen büyüme ortamlarında da sitotoksikite deneyleri yapılmıştır. Bu sayede taşıyıcıya bağlı folatın folat reseptörü ile etkileşiminin de kanıtlanması amaçlanmıştır. OVCAR3 hücrelerinde SKOV3 hücreleri gibi diğer bazı hücrelere göre çok daha az miktarda folat reseptörü sentezlendiği (Corona et al., 1998); A2780 hücrelerinde ise fazla miktarda folat reseptörü eksprese edildiği literatürde belirtilmektedir (Li et al., 2013). SKOV3 hücre hattının folat içermeyen büyüme ortamı ticari olarak sağlanamadığından sadece A2780 ve OVCAR3 hücreleri için folat içermeyen RPMI 1640 ortamları kullanılarak folat çapalı vezikül ile kaplı doksorubisin yüklü manyetik nanopartikül grubu ile analizler gerçekleştirilmiştir. Büyüme ortamında folik asit olmadığında FVDSPM ler ile DSPM lere göre yaklaşık olarak sırasıyla A2780 hücre hattında 11,90 ve OVCAR3 hücre hattında ise 6,00 kat daha düşük IC_{50} değerleri elde edilmiştir (Tablo 3.5). OVCAR3 hücrelerinde folat ekspresyonu A2780 hücreleri kadar fazla olmadığından FVDSPM lerin folat içermeyen ortamda A2780 hücrelerinde daha yüksek oranda sitotoksikite yarattığı düşünülmektedir. 2014 yılında yayınlanan bir çalışmada folat ucu taşıyan doksorubisin taşıyıcısının folat reseptörü eksprese eden HeLA hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğinin ortama eklenen folik asit varlığında azaldığı bildirilmiştir (Shi et al., 2014).

Serbest doksorubisinin hücre içerisine difüzyonla hızlı bir şekilde girebildiği ancak endositoz prosesinin ise daha yavaş olduğu literatürden de (Zhang et al., 2011) bilinmektedir. Serbest ilacın hücreye daha hızlı girişinin yanında dezavantaj olarak bazı

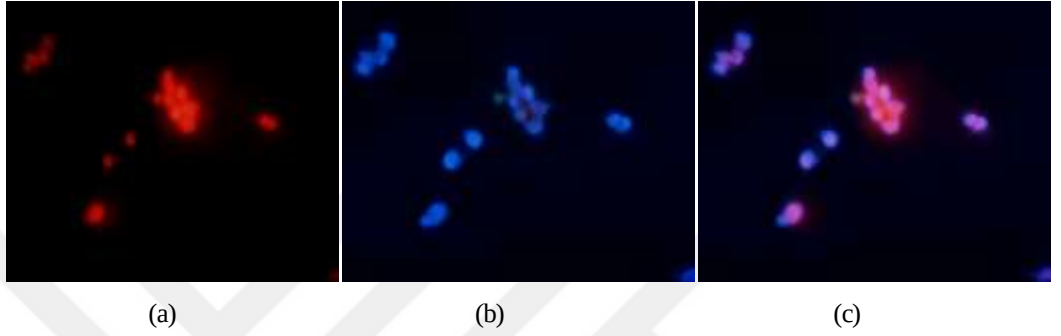
durumlarda ilaç direnç mekanizması dolayısıyla hücre içerisinde gerekli sitotoksik etkiyi gösterememektedir. Dolayısıyla folat reseptörü aracılı endositoz ile hücre içerisine girdiği düşünülen FVDSPM'lerin lizozomlardaki asidik ortamlarda yapısındaki ilacı salması ve direnç mekanizmasından kaçması gibi üstünlükleri vardır.

3.9.1 Morfolojik inceleme

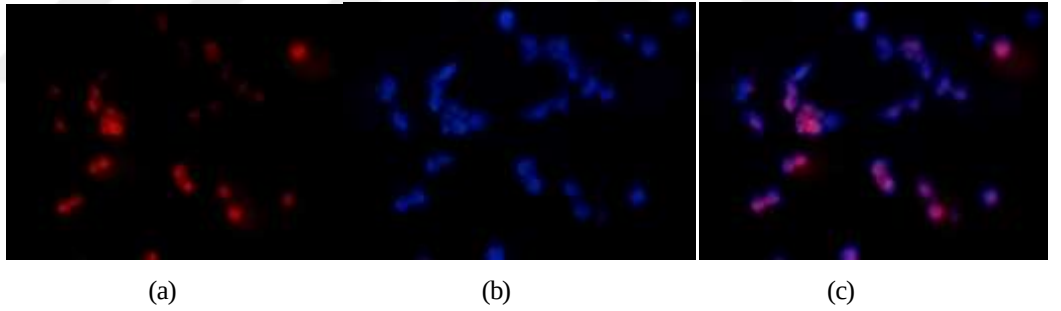
Serbest doksorubisin ve FVDSPM partiküllerinin 2 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücrelere girişi ve hücredeki lokalizasyonu floresans mikroskobu ile görüntülenmiştir. Aynı koşullarda sadece PBS ile inkübe edilen hücrelerin de görüntüleri alınarak kontrol amacıyla kullanılmıştır. Floresans mikroskobunun kırmızı filtresinde ve DAPI ayarında görüntüler alındıktan sonra karşılaştırılarak kırmızı floresans veren ilacın DAPI ile mavi renkte görülen DNA bölgesinde olup olmadığı değerlendirilmiştir. A2780 hücrelerinde PBS, DOX ve FVDSPM ile yapılan çalışmalarda elde edilen görüntüler sırasıyla Şekil 3.81, 3.82, 3.83; OVCAR3 hücrelerinde PBS, DOX ve FVDSPM ile yapılan çalışmalarda elde edilen görüntüler sırasıyla Şekil 3.84, 3.85, 3.86 ve SKOV3 hücrelerinde PBS, DOX ve FVDSPM ile yapılan çalışmalarda elde edilen görüntüler ise sırasıyla Şekil 3.87, 3.88 ve 3.89'da gösterilmektedir. Tüm görüntülerde kontrol grubunda kırmızı sinyalin alınmadığı yani bu sinyalin sadece ilaçtan geldiği saptanmıştır. Serbest doksorubisin uygulanmış her üç hücrede de ilacın nukleusta yoğun olarak bulunduğu karşılaştırılan görüntülerden anlaşılmaktadır. FVDSPM uygulanan hücrelerde ise doksorubisin yoğunluğunun daha az olduğu görülmektedir. *In vitro* sitotoksikite deneylerine uygun olarak doksorubisinin hücrelere daha hızlı girdiği, FVDSPM'lerin ise girişinin daha yavaş olduğu, dolayısıyla yoğunluğunun daha az olduğu sonucuna varılmaktadır. Benzer bir sonuç 2013 yılında Li ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada da bildirilmiştir (Li et al., 2013). FVDSPM'lerin hücrelere reseptör aracılı endositoz mekanizması ile girdikten sonra asidik ortamda ilacın serbest kalmasıyla nukleusa girdiği düşünülmektedir.



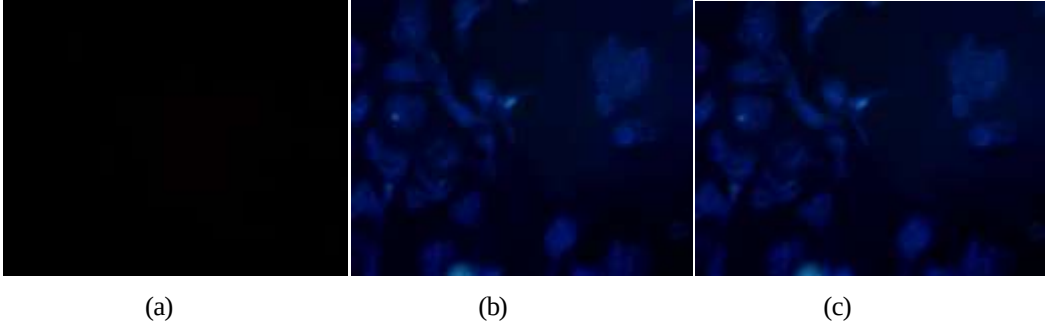
Şekil 3.81 PBS (kontrol) ile 2 saat inkübe edilen A2780 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler.



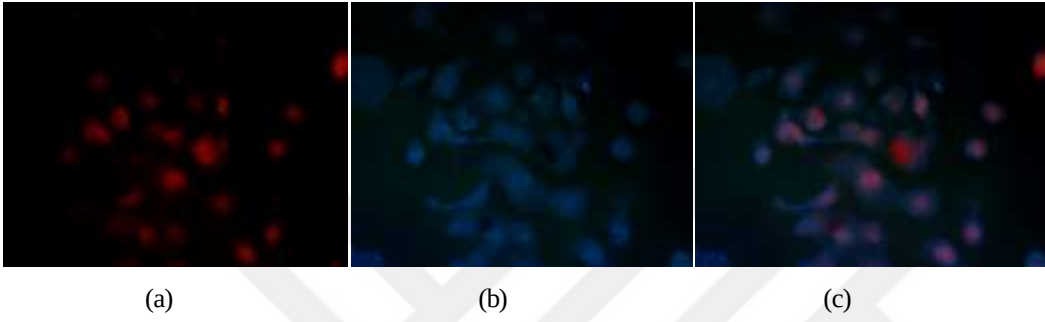
Şekil 3.82 DOX ile 2 saat inkübe edilen A2780 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler.



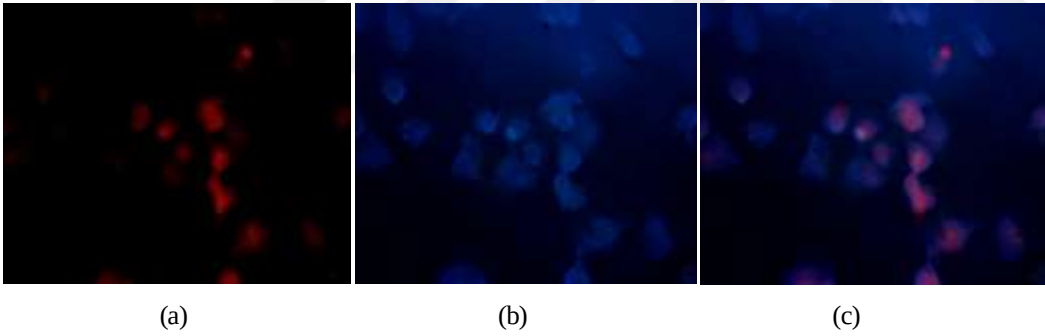
Şekil 3.83 FVDSPM ile 2 saat inkübe edilen A2780 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler.



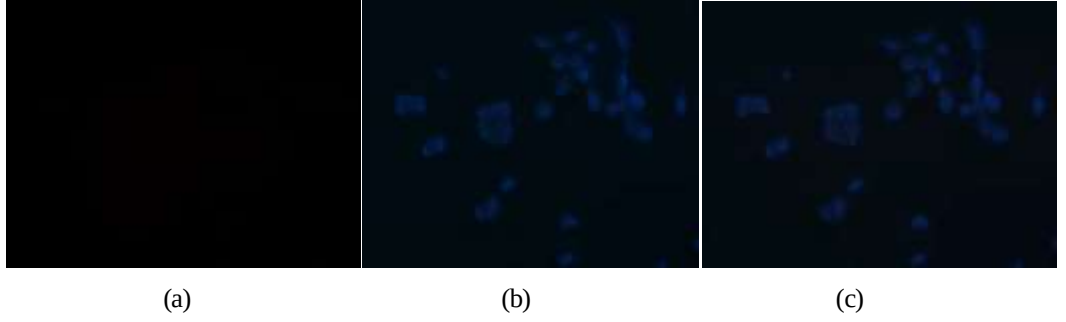
Şekil 3.84 PBS (kontrol) ile 2 saat inkübe edilen OVCAR3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler.



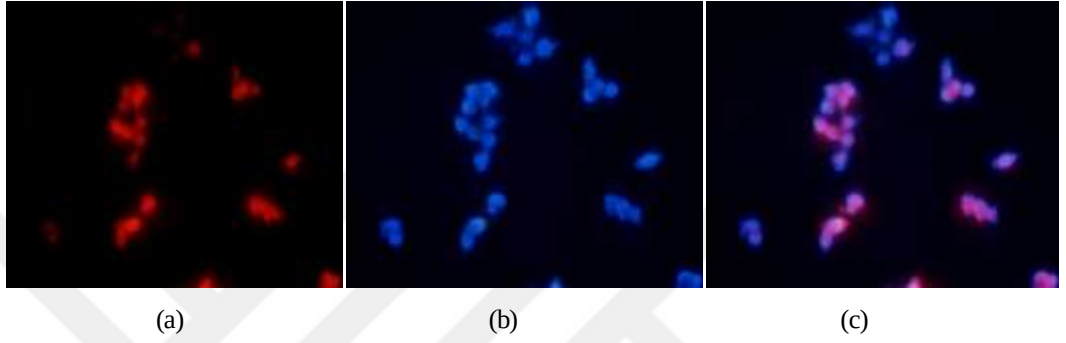
Şekil 3.85 DOX ile 2 saat inkübe edilen OVCAR3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler.



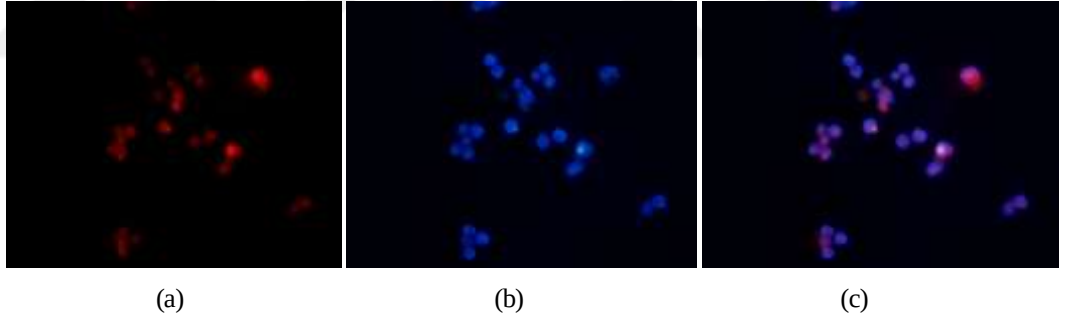
Şekil 3.86 FVDSPM ile 2 saat inkübe edilen OVCAR3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler.



Şekil 3.87 PBS (kontrol) ile 2 saat inkübe edilen SKOV3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler.



Şekil 3.88 DOX ile 2 saat inkübe edilen SKOV3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler.



Şekil 3.89 FVDSPM ile 2 saat inkübe edilen SKOV3 hücrelerinin a) DOX, b) DAPI ayarındaki floresans mikroskop görüntüleri, c) bu görüntülerin çakıştırılmasıyla elde edilen görüntüler.

3.10 Biyomimetik İlaç Taşıma Sisteminin *in Vivo* Koşullarda Biyopotansiyelinin Araştırılması

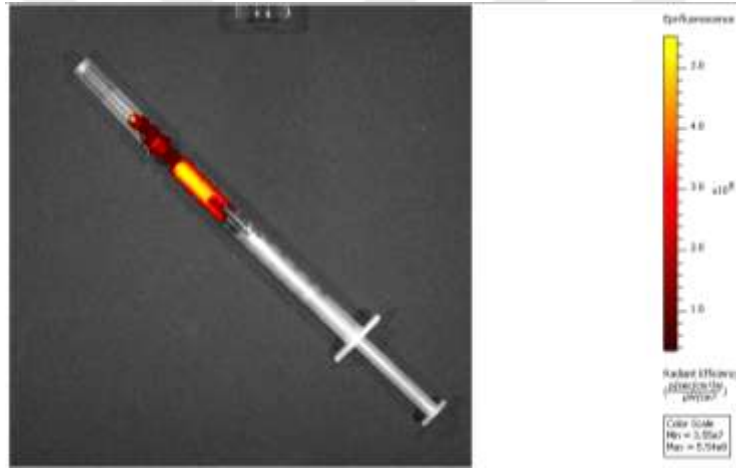
3.10.1 İlaç taşıyıcı sistemin dişi farelerde biyodağılım çalışmaları

Folat çapalı vezikül kaplı biyomimetik özellikli ilaç taşıma sisteminin biyopotansiyelinin belirlenmesi amacıyla 4-6 haftalık ve ortalama 25 g ağırlığındaki sağlıklı CD1dişi fareler üzerinde biyodağılım çalışması yapıldı ve floresans özellikli ilacın görüntülenmesi için IVIS spektrum cihazı kullanıldı. Biyomimetik özellikli ilaç taşıyıcı sistemin organ ve dokulardaki biyodağılımının kıyaslanması amacıyla DOX,

DSPM ve VDSPM olmak üzere üç ilaç grubu ile de rastgele seçilen fare gruplarında deneme gerçekleştirildi.

Fare kuyruk veninden enjekte edilen manyetik özellikli ilaç gruplarının (DSPM, VDSPM ve FVDSPM) hedefe yönlendirilmesi için farelerin abdomen bölgesine mıknatıs yerleştirilerek flaster ile sabitlendi. Fareler izofluran gazı anestezisi altında cihazda görüntülenirken mıknatısları çıkartıldı. Dişi farelerin 1. ve 3. saatlerde görüntüleri alındıktan sonra ketamin/ksilazin aşırı dozu kullanılarak sakrifiye edildi, kan ve belirli organları toplandı.

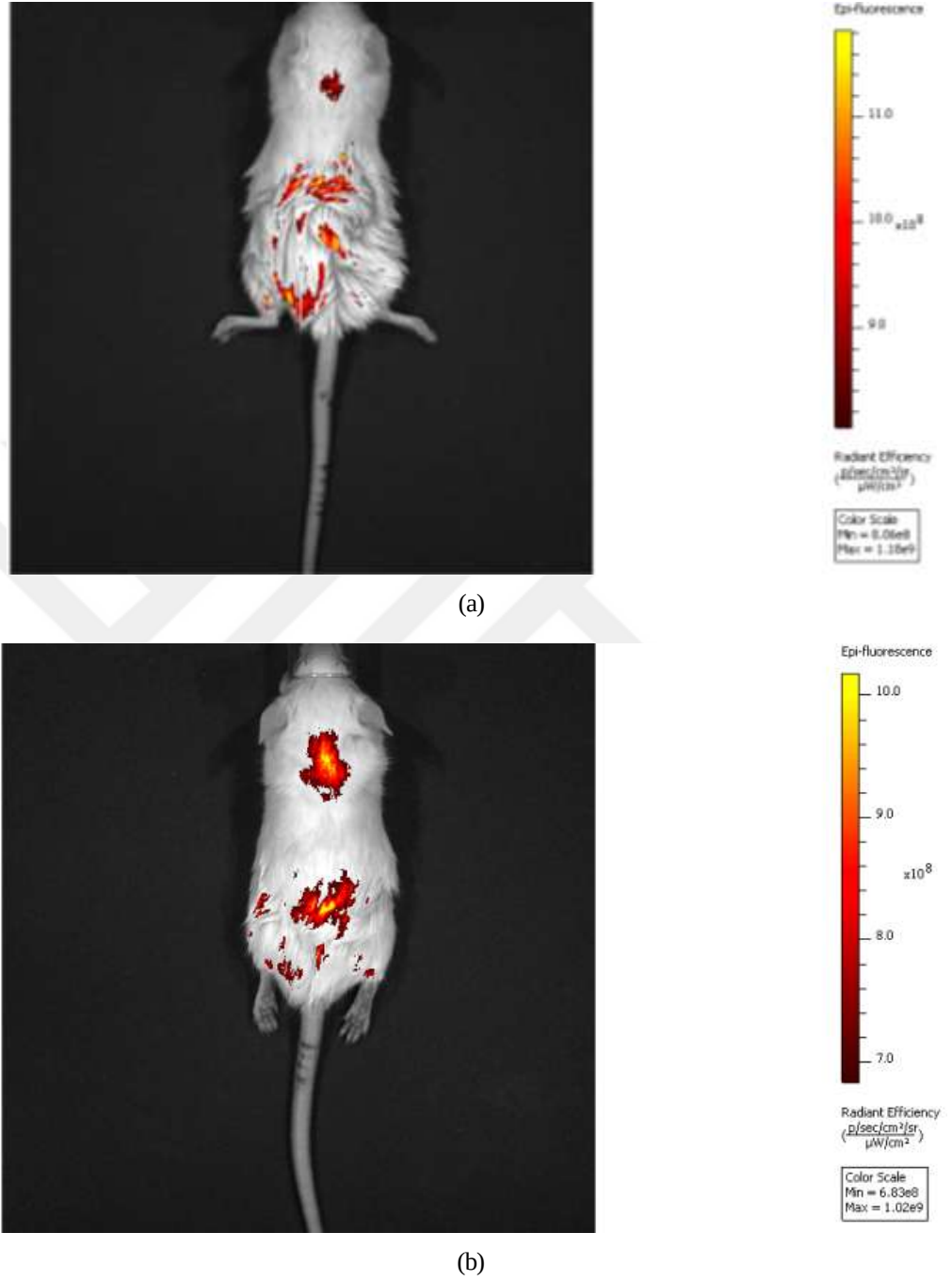
Farelere enjeksiyon yapılmadan önce enjektör içerisindeki ilaçlar IVIS cihazında görüntülenerek floresans sinyal kontrol edildi. İlaç çekilmiş enjektörler ile elde edilen örnek bir görüntü Şekil 3.90’da verilmektedir.



Şekil 3.90 İlaç çekilmiş enjektör ile IVIS cihazında elde edilen örnek bir görüntü.

Folat ligandı takılı vezikül ile kaplı doksorubisin içeren manyetik nanotaşıyıcı grubu verilen farelerin 1. ve 3. saatlerdeki örnek biyodağılım görüntüleri Şekil 3.91’de verilmektedir. Nanopartikül formülasyonlarının serbest ilaçtan farklı bir biyodağılım profili izleyebildikleri çalışmalarda rapor edilmiştir (Alhareth et al., 2012). FVDSPM’lerin 1. ve 3. saatte karın ve akciğer etrafında toplandığı anlaşılmaktadır. Akciğerdeki birikimin 3. saatte oldukça şiddetli olduğu saptanmıştır. Folat reseptörü ekspresyonunun sağlıklı organizmada böbreklerden sonra en fazla akciğerlerde gerçekleştiği bilinmektedir (Parker et al., 2005). FVDSPM’lerin uygulanan mıknatısın kuvvetinin yeterli olmamasından dolayı abdomenden farklı bölgelere dağılabildiği ve sağlıklı akciğer dokusunda folat reseptörü ekspresyonunun yüksek olması nedeniyle burada birikebildiği düşünülmektedir. IVIS cihazından elde edilen görüntülerde

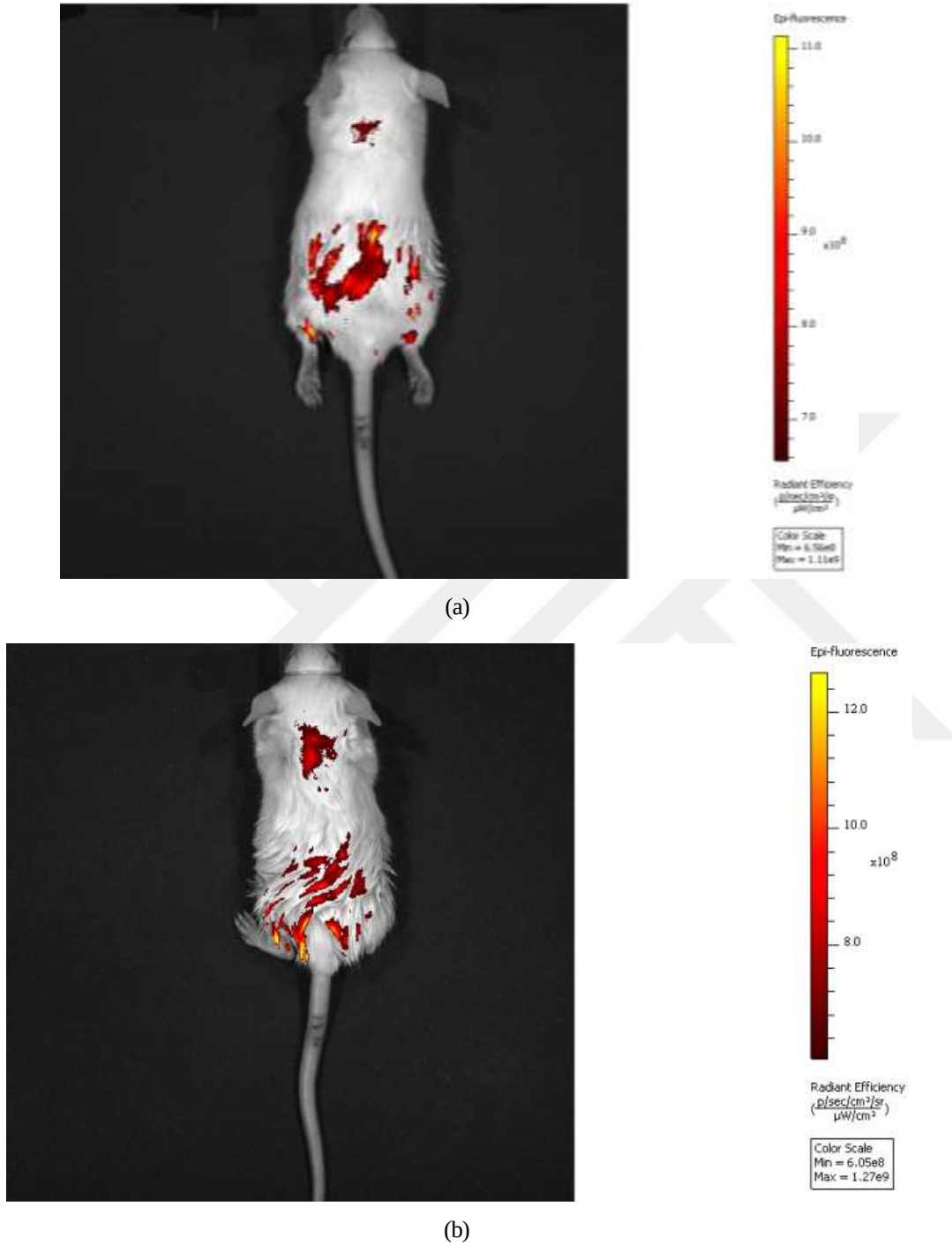
nanopartiküllerin dağıldığı organlar tam olarak saptanamamaktadır. İlacın hangi dokuda ne kadar biriktiği *ex vivo* analizler ile tam olarak anlaşılabilecektir.



Şekil 3.91 FVDSPM verilen farelerin a) 1. saatteki, b) 3. saatteki biyodağılım görüntüleri.

Vezikül ile kaplı doksorubisin içeren manyetik nanotaşıyıcı grubu verilen farelerin 1. ve 3. saatlerdeki örnek biyodağılım görüntüleri Şekil 3.92’de gösterilmektedir. Folat ligandı içeren formdan farklı olarak akciğerde veya mıknaıtis uygulanan abdomen bölge dışında farklı bir alanda spesifik bir birikim

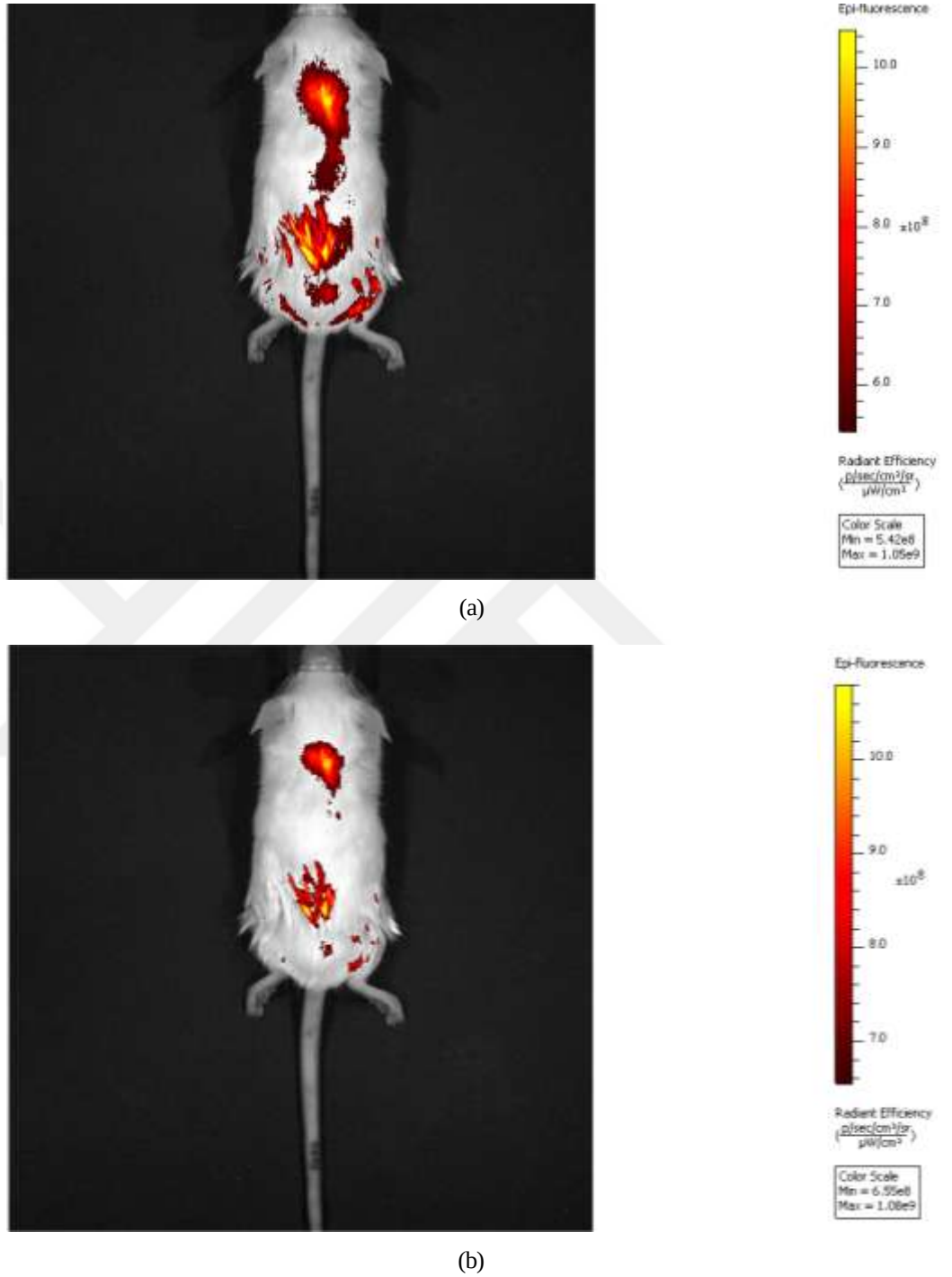
görülmemektedir. 1 ve 3. saatler arasında çok fazla farklanmanın da olmadığı saptanmıştır.



Şekil 3.92 VDSPM verilen farelerin a) 1. saatteki, b) 3. saatteki biyodağılım görüntüleri.

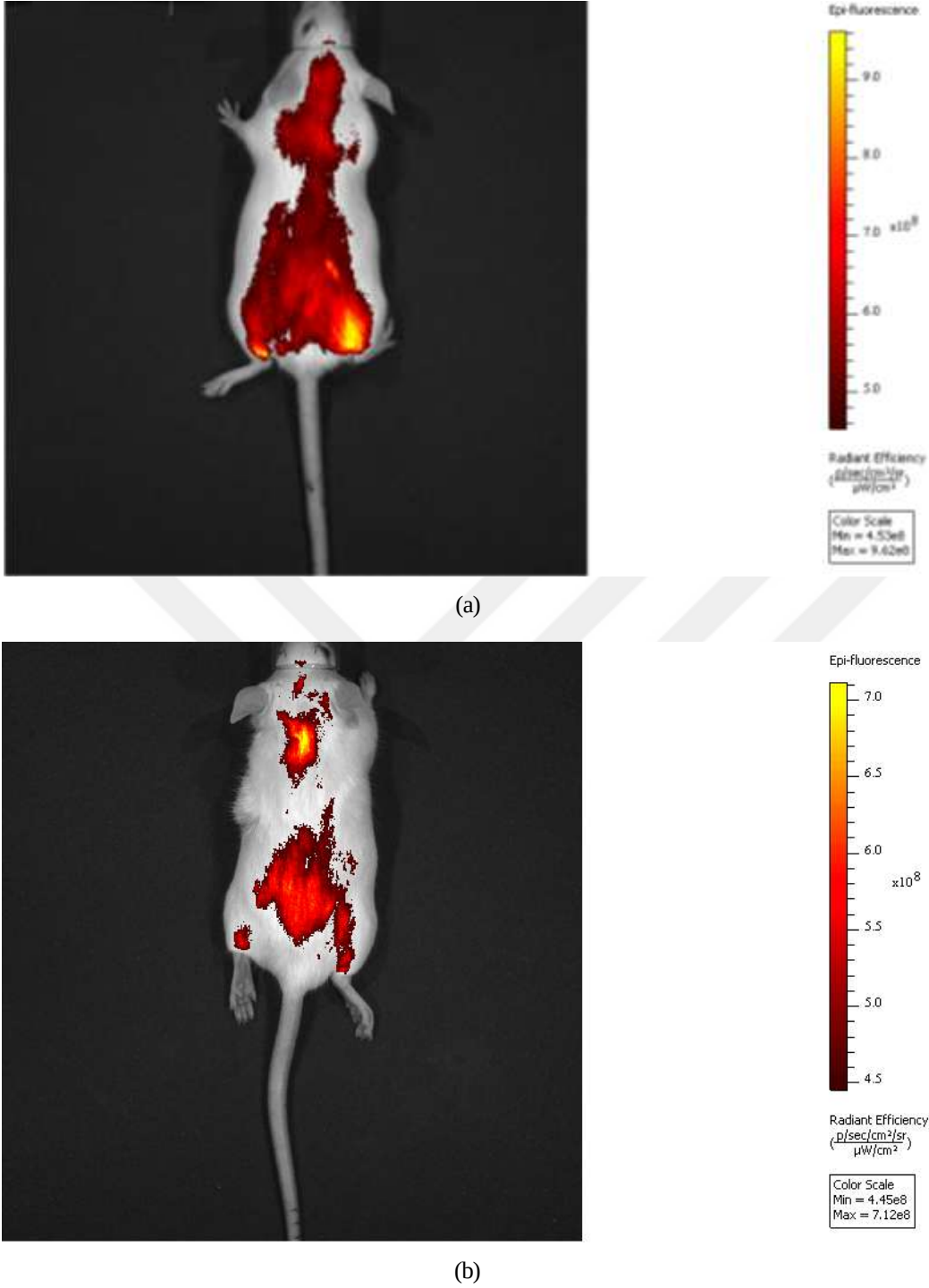
Doksorubisin içeren manyetik nanopartikül grubu verilen farelerin 1. ve 3. saatlerdeki örnek biyodağılım görüntüleri Şekil 3.93'te verilmektedir. Manyetik nanopartiküllerin abdomende ve akciğer bölgesi etrafında yoğun olarak biriktiği görülmektedir. Manyetik nanopartiküllerin eritrosit vezikülleri ile kaplı olmadığından

retikuloendotelyal sistem tarafından tanınmış olarak akciğerlerde toplanabildiği düşünülmektedir.



Şekil 3.93 DSPM verilen farelerin a) 1. saatteki, b) 3. saatteki biyodağılım görüntüleri.

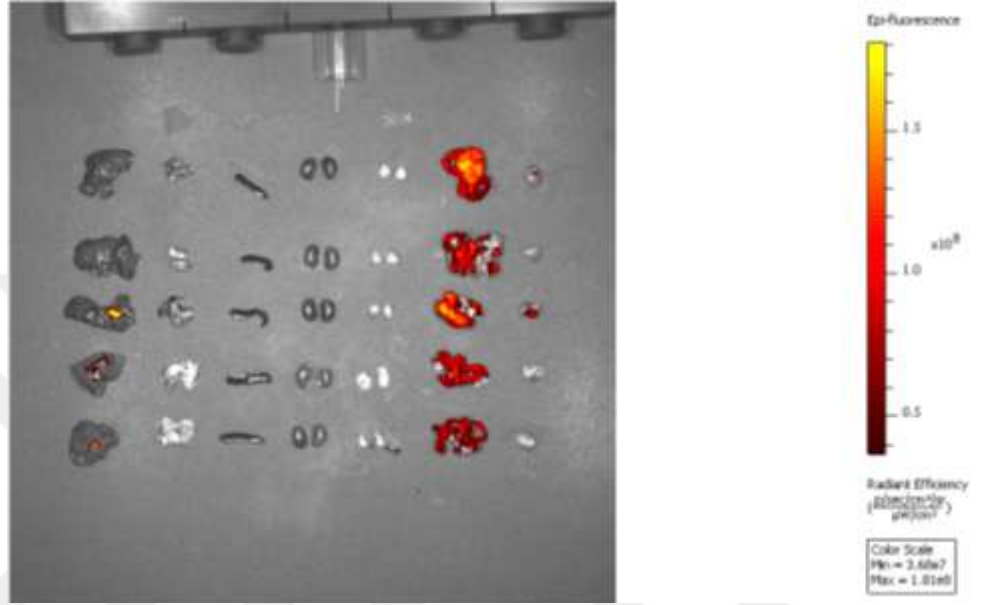
Serbest doksorubisin verilen farelerin 1. ve 3. saatlerdeki örnek biyodağılım görüntüleri Şekil 3.94'te gösterilmektedir. 1.saatte oldukça yaygın bir dağılım gösteren serbest ilacın 3. saatte metabolize olmaya başladığı düşünülmektedir. Doksorubisinin hızlı bir şekilde metabolize olduğu literatürden bilinmektedir (Heath and Davis, 2008).



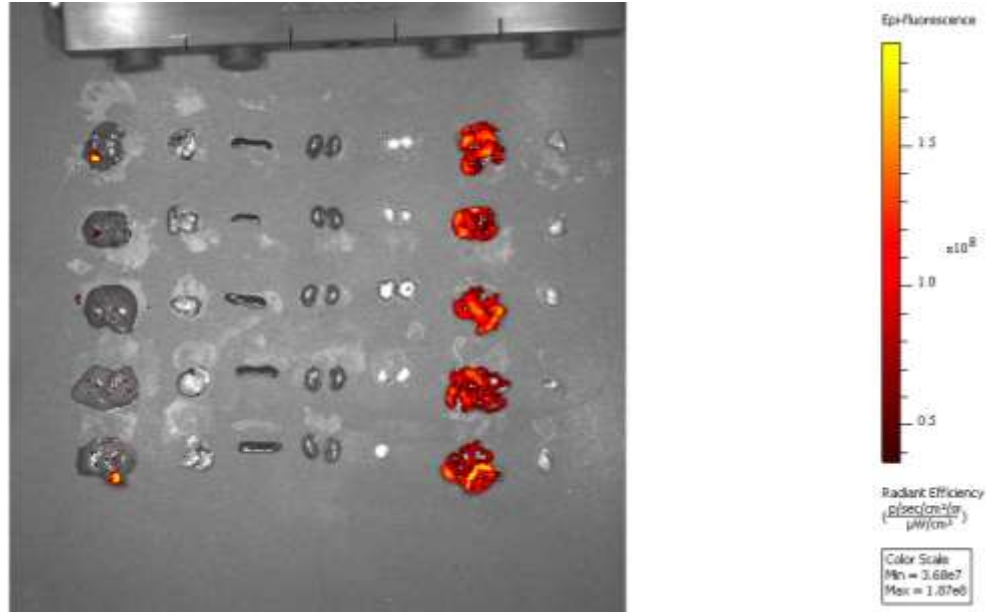
Şekil 3.94 DOX verilen farelerin a) 1. saatteki, b) 3. saatteki biyodağılım görüntüleri.

FVDSPM, VDSPM, DSPM ve DOX enjekte edilen farelerin 3. sa görüntülemesinin ardından çıkarılan organlar IVIS cihazında yapılan görüntülemeler sırasıyla Şekil 3.95, 3.96, 3.97 ve 3.98’de verilmektedir. Şekil 3.95 ve 3.96’da organ ve dokular soldan sağa karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, over, kalın barsak, kas sırasında ve Şekil 3.97 ve 3.98’de ise yukarıdan aşağıya, karaciğer, akciğer, dalak, böbrek, over, kalın barsak, kas sırasında olmak üzere konulmuştur. Tüm ilaç gruplarında en fazla

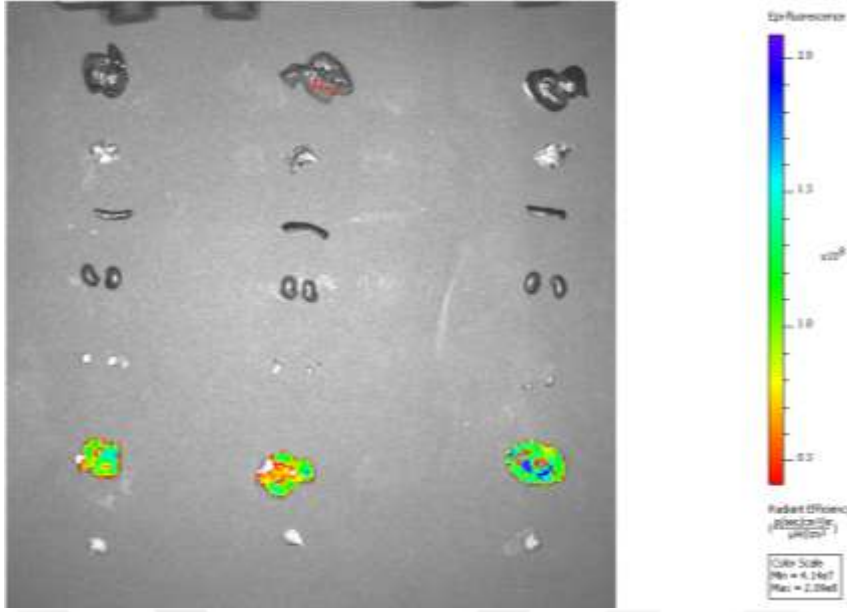
ışmanın kalın barsakta olduğu görülmektedir fakat yapılan araştırmada kalın barsağın kendisinin de IVIS spektrum cihazında benzer görüntü verdiği belirlenmiştir, dolayısıyla saptanan ışmanın ne kadarının ilaçtan kaynaklandığı anlaşılamamıştır. Daha önce de bahsedildiği gibi ilaç taşıyıcılarının biyodağılımının tam olarak belirlenebilmesi için bir sonraki aşamada kan, organ/doku örneklerinde HPLC analizi ile ilaç miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir.



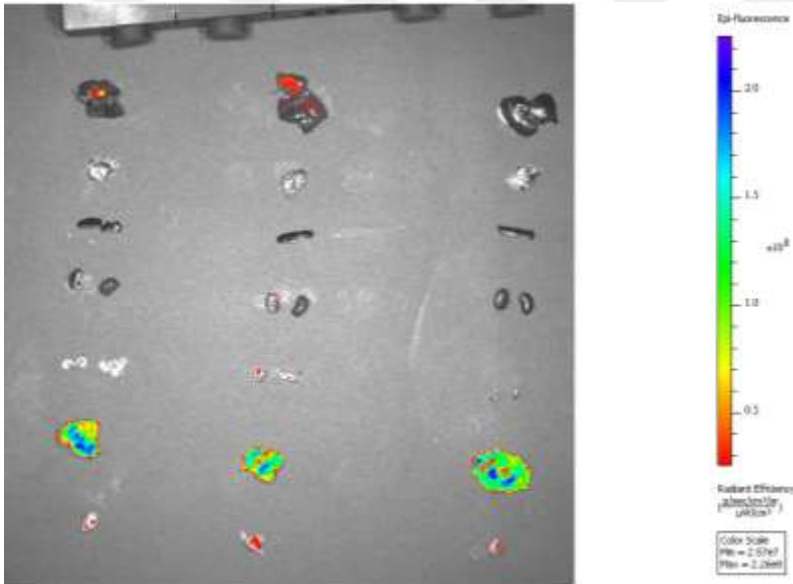
Şekil 3.95 FVDSM verilen fare organlarının görüntüleri.



Şekil 3.96 VDSPM verilen fare organlarının görüntüleri.



Şekil 3.97 DSPM verilen fare organlarının görüntüleri.

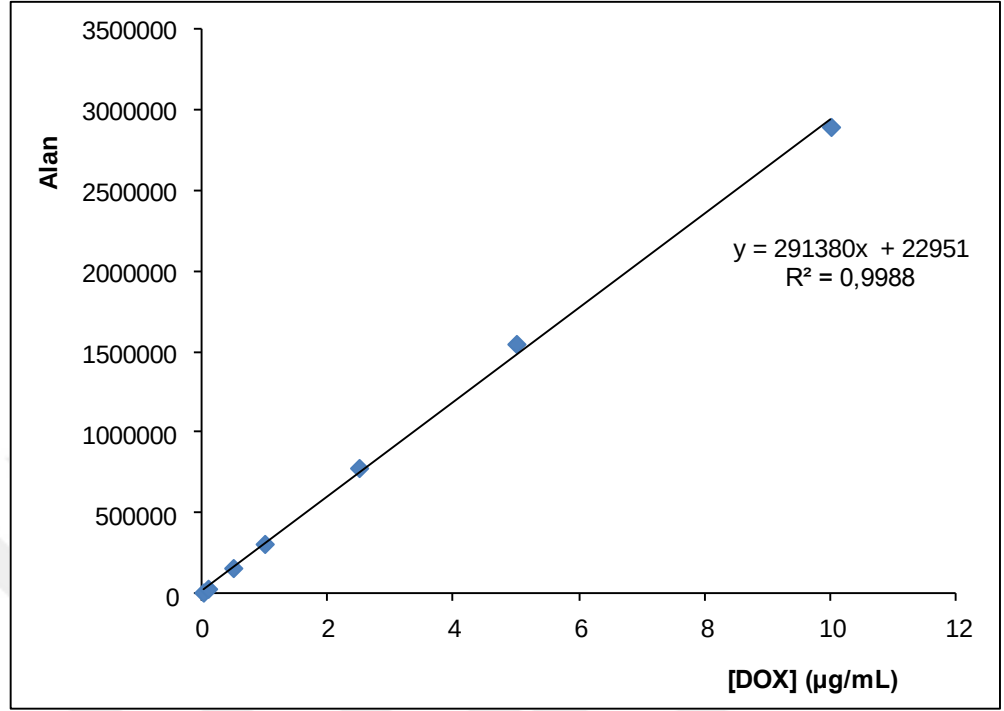


Şekil 3.98 DOX verilen fare organlarının görüntüleri.

3.10.2 İlaç taşıyıcı sistemin *ex Vivo* analizleri

Serbest ilaç ve ilaç içeren manyetik nanotaşıyıcıların enjekte edildiği farelerden 3.saatin sonunda organlar çıkarıldı ve homojenize edildi. Homojenize edilen dokulardan metanol ve kloroform ile doksorubisin ekstraksiyonu yapılarak miktarı HPLC ile belirlendi. Yöntemde 0,025-10 $\mu\text{g/mL}$ aralığında doksorubisin çözeltileri kullanılarak elde edilen doksorubisin standart grafiği Şekil 3.99'da verilmektedir. Şekil 3.100 ve 3.101'de sırasıyla standart doksorubisin ve dokulardan ekstrakte edilen

doksorubisinin HPLC analizinde elde edilen örnek kromatogramlar görülmektedir. Her iki analizde de alıkonma zamanı 2,33 dakika olarak saptanmıştır.

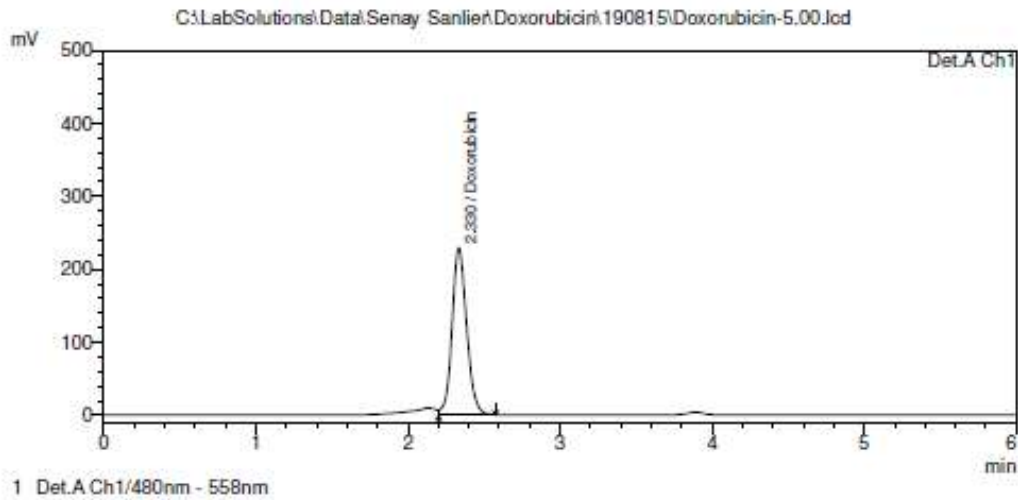


Şekil 3.99 HPLC analizinde elde edilen doksorubisin standart grafiği.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

C:\LabSolutions\Data\Senay Sanlier\Doxorubicin\190815\Doxorubicin-5.00.lcd
 Acquired by : Admin
 Sample Name : Doxorubicin 5.00 ug/mL
 Sample ID :
 Tray# : 1
 Vial # : 7
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : Doxorubicin-5.00.lcd
 Method File Name : Doxorubicin.lcm
 Batch File Name : 190815.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 19.08.2015 09:05:08
 Data Processed : 19.08.2015 09:11:12

<Chromatogram>



PeakTable

Detector A Ch1 480nm - 558nm

Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	Doxorubicin	2.330	1542511	280104	100.000
Total			1542511	280104	100.000

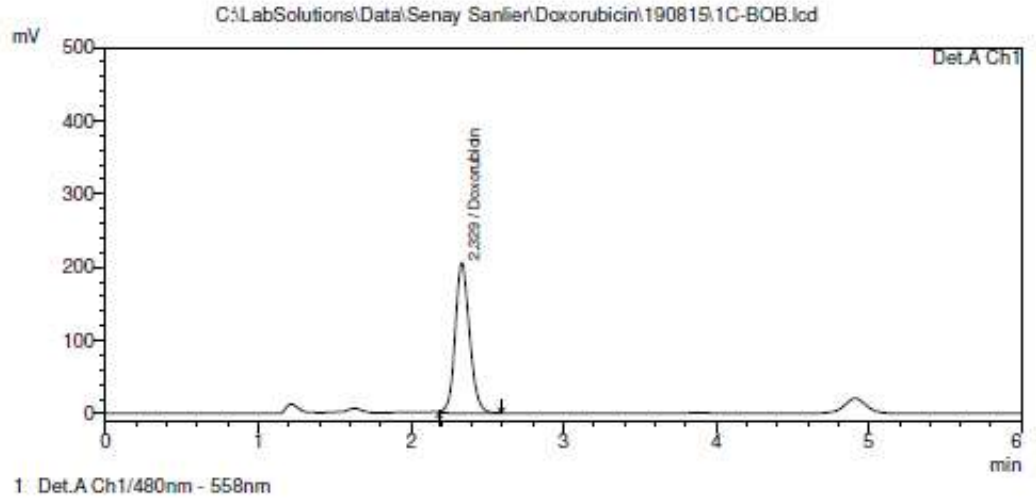
Height %
100.000
100.000

Şekil 3.100 Standart doksorubisin çözeltilerinin HPLC analizinden elde edilen örnek bir kromatogram.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Acquired by : Admin
 Sample Name : 1C-BOB
 Sample ID :
 Tray# : 1
 Vial # : 11
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : 1C-BOB.lcd
 Method File Name : Doxorubicin.lcm
 Batch File Name : 190815.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 19.08.2015 09:41:25
 Data Processed : 19.08.2015 09:47:27

<Chromatogram>



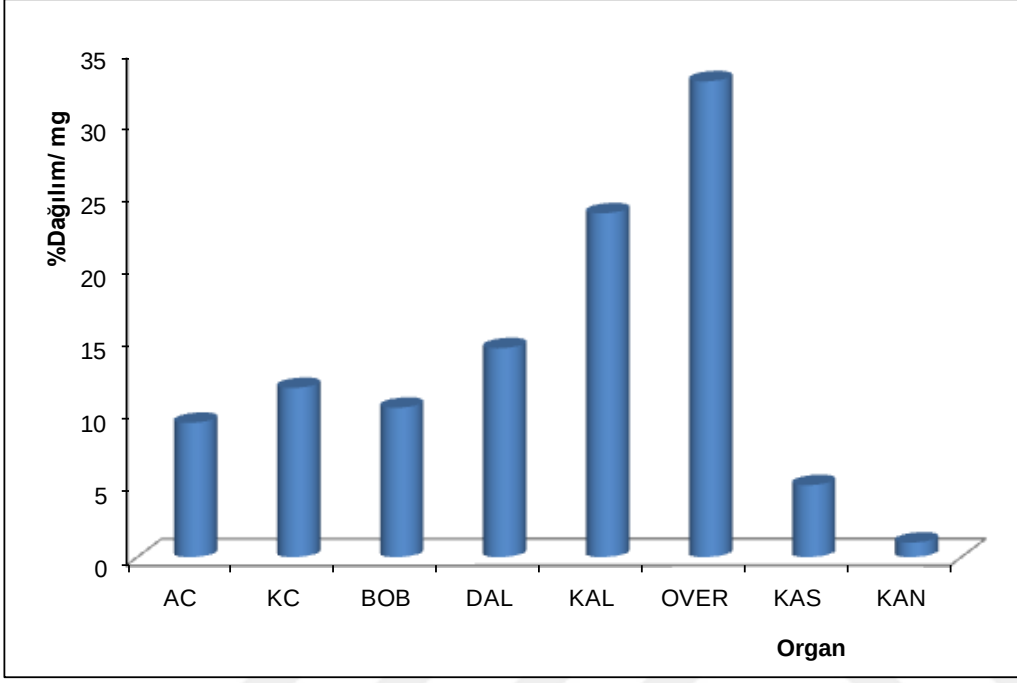
PeakTable					
Peak#	Name	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	Doxorubicin	2.329	1346465	205916	100.000
Total			1346465	205916	100.000

Height %
100.000
100.000

Şekil 3.101 Dokulardan ekstrakte edilmiş doksorubisinin HPLC analizinden elde edilen örnek bir kromatogram.

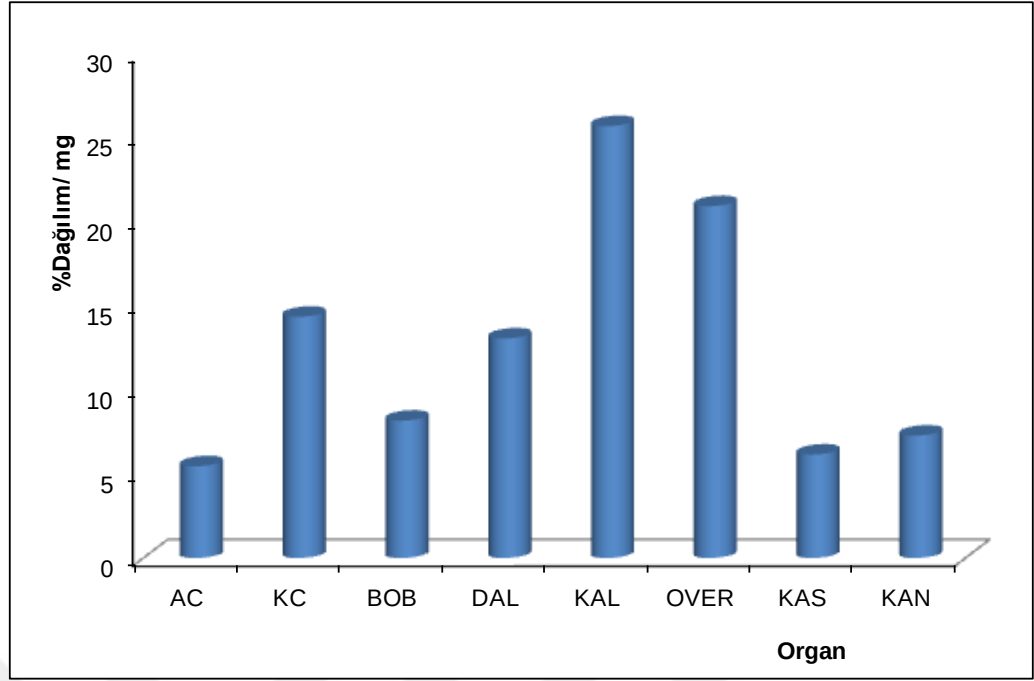
FVDSPM, VDSPM, DSPM ve DOX ve uygulanan fare doku ve plazmalarında ilaç miktarları belirlenerek mg doku başına olan % dağılımları hesaplanmıştır. Şekil 3.102'de FVDSPM uygulanmış fare doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları verilmektedir. FVDSPM' ler kalın barsak, dalak ve karaciğerde sırasıyla %23,77/ mg, %14,44/ mg, %11,69/ mg kadar birikmiştir. Over, böbrek ve akciğerde ise tutulum %32,89/ mg, %10,32/ mg, %9,28/ mg kadardır. İlaç taşıma sisteminin miknatis uygulama ve reseptör aracılı olarak spesifik birikimi nedeniyle karın bölgesi organlarında dağılmış olduğu ve kanda seviyesinin düşük (%1,00/ mg) olduğu görülmektedir. Kandaki seviyesinin folat ligandı takılı olmayan vezikül grubuna göre (VDSPM) daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durmunun nedeninin reseptör-ligand

ilişkisi sebebiyle dokulara daha yüksek ilgiyle ve daha yüksek hızda girmesi olduğu düşünülmektedir. FVDSPM' lerin folat reseptörü eksprese eden dokuların hepsinde birden (akciğer, böbrek, over, kalın barsak) diğer ilaç gruplarına göre yüksek miktarda birikim görülmektedir.



Şekil 3.102 FVDSPM uygulanmış farelerin doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları (%dağılım/ mg).

VDSPM uygulanmış fare doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları Şekil 3.103'te gösterilmektedir. VDSPM' lerin 3.saatte en fazla kalın barsakta (%25,71/ mg), sonra overde (%20,95/ mg), ardından karaciğer (%14,36/ mg) ve dalakta (%13,06/ mg) biriktiği saptanmıştır. VDSPM' lerin mknatıs ile hedeflendirme haricinde reseptör-ligand ilişkisi ile spesifik olarak bir dokuda birikmeyeceği tahmin edilmektedir ve elde edilen sonuçlar bu hipotezi doğrulamaktadır. Dışarıdan uygulanan magnet nedeniyle karın içi organlarda dağılımı yüksektir. Akciğer ve böbrekteki seviyesi ise FVDSPM' lere göre daha düşüktür. Hu ve arkadaşları tarafından erkek fareler üzerinde yapılan çalışmada eritrosit membran vezikülleri kaplı floresans işaretli nanopartiküllerin kuyruk veninden enjeksiyonunu takiben 24 sa sonunda en fazla sinyal karaciğer, dalak ve akciğerde bulunmuştur, böbrekte oldukça düşük sinyal elde edilmiştir. Kanda ise yüksek oranda ışıma olduğu saptanmıştır. Bunun yanında sadece PEG kaplı nanopartiküllere göre vezikül kaplı nanopartiküllerin vücuttaki eliminasyon süresinin daha uzun olduğu belirlenmiştir (Hu et al., 2011). Çalışmamızda ilaç grupları arasında kandaki seviyesi en yoğun olan grubun VDSPM lerin (%7,29/ mg) olduğu bulunmuştur ve literatüre uygun olarak eritrosit vezikülleri ile kaplamanın sirkülasyon süresini artırdığı sonucuna varılmaktadır.

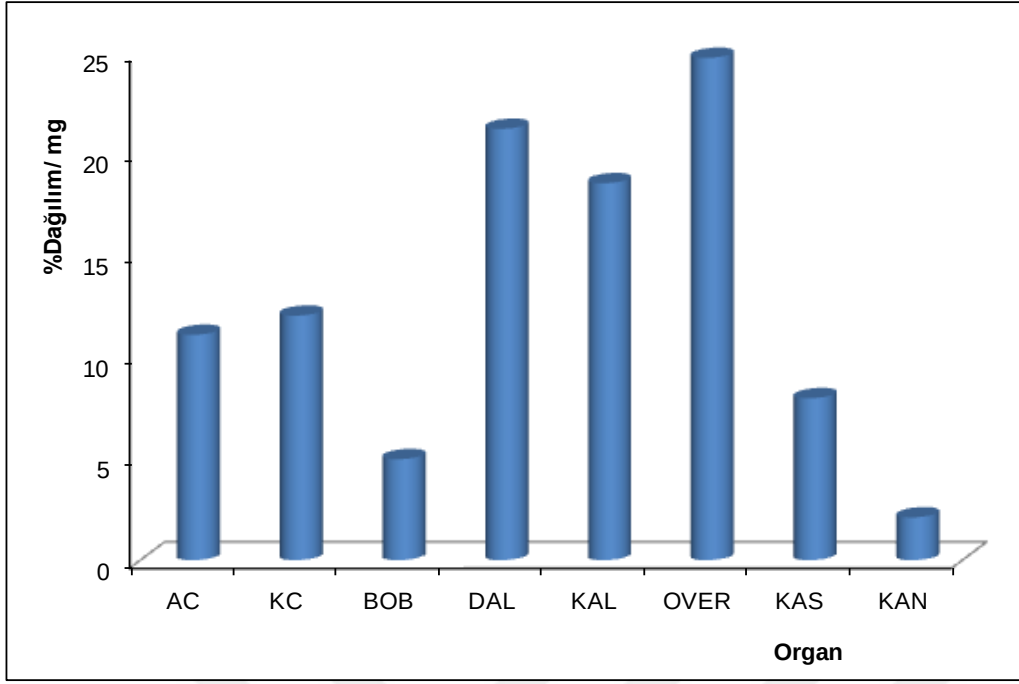


Şekil 3.103 VDSPM uygulanmış farelerin doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları (%dağılım/ mg).

Şekil 3.104'te DSPM uygulanmış fare doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları verilmektedir. DSPM' lerin karaciğer, akciğer ve dalakta sırasıyla %12,07/ mg, %11,12/ mg ve %21,29/ mg kadar biriktiği bulunmuştur. DSPM' lerin miknatis etkisiyle karaciğerde, kalın barsakta (%18,60/ mg) ve overde (%24,79/ mg) birikiminin yüksek olduğu belirlenmiştir. Böbrekte ise DSPM tutulumu düşük (%4,99/ mg) çıkmıştır.

Vezikül ile kaplı olmadığından biyomimetik özellik sergilemediği düşünülen DSPM' lerin RES organlarınca (akciğer, dalak) VDSPM' lere göre daha fazla tutulduğu saptanmıştır. DSPM'lerin yapılan biyoyuyluluk çalışmalarında çok düşük de olsa makrofajlarca alınabildiği tespit edildiğinden bulunan sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca DSPM' lerin kandaki miktarı (%2,11/ mg) VDSPM' ler kadar olmadığından doksorubisinin sirkülasyon zamanını VDSPM kadar artırmadığı düşünülmektedir. Dolayısıyla ilaç taşıyıcısı olarak polimer kaplı magnetitleri eritrosit vezikülleri içerisine yüklemek oldukça büyük bir avantaj kazandırmaktadır.

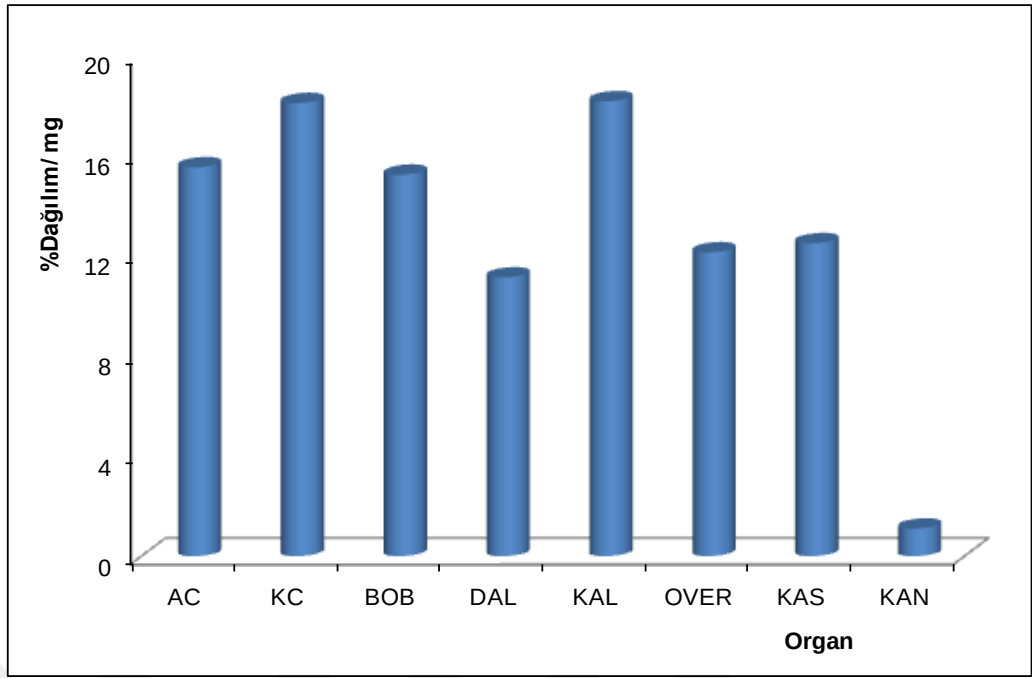
Maurizi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada nötral ve PEG kaplı magnetitlerin negatif yüklü ve karboksidedkstran kaplı (Resovist) magnetitlere göre karaciğerde daha yavaş biriktiği bulunmuştur (Maurizi et al., 2015). DSPM' lerin yükünün nötrale yakın olduğu bilindiğinden ticari görüntüleme ajanları olan magnetit türlerine göre spesifik olarak ve hızlıca karaciğerde birikmediği saptanmıştır.



Şekil 3.104 DSPM uygulanmış farelerin doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları (%dağılım/ mg).

DOX uygulanmış fare doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları Şekil 3.105'te gösterilmektedir. Karaciğerde 3.saatte ilaç grubu olarak en yoğun serbest doksorubisinin (%18,14/ mg) biriktiği görülmektedir. Karaciğerde hızlıca metabolize olan ilacın bu organda yüksek oranda dağılımı beklenen bir sonuçtur. Doksorubisinin akciğer (%15,57/ mg), böbrek (%15,27/ mg), dalak (%11,16/ mg) ve kalın barsakta (%18,21/ mg) yaygın olarak ve fazla miktarda biriktiği belirlenmiştir. Bu sonuçlardan ayrıca ilacın atılımının başladığı anlaşılmaktadır. 2014 yılında dişi atimik tümörlü fareler üzerinde yapılan bir biyodağılım çalışmasında kuyruk veninden uygulanan serbest doksorubisinin 2. saatte kalp, karaciğer, dalak, akciğer ve böbreğe yaygın bir şekilde dağılımının gerçekleştiği bulunmuştur (Ye et al., 2014). İlacın yarıömrünün 0,8 sa olması (Heath and Davis, 2008) ve tüm organlara yayılması nedeniyle çalışmamızda kandaki miktarı düşük olarak saptanmıştır. Bunun yanı sıra serbest ilacın overde seçimli olarak birikmediği de görülmektedir.

Kas dokuda ilaç grubu olarak en yoğun serbest doksorubisinin biriktiği (%12,53/ mg) saptanmıştır. Doksorubisinin kas dokuya dağılarak el-ayak sendromuna neden olduğu bilinmektedir (Jung and Reszka, 2001). Nanotaşıyıcılı ilaç gruplarının kaslarda DOX kadar birikmediği belirlenmiştir, böylece ilaç taşıma sistemi kullanıldığında kaslarda yan etkinin azalacağı düşünülmektedir.



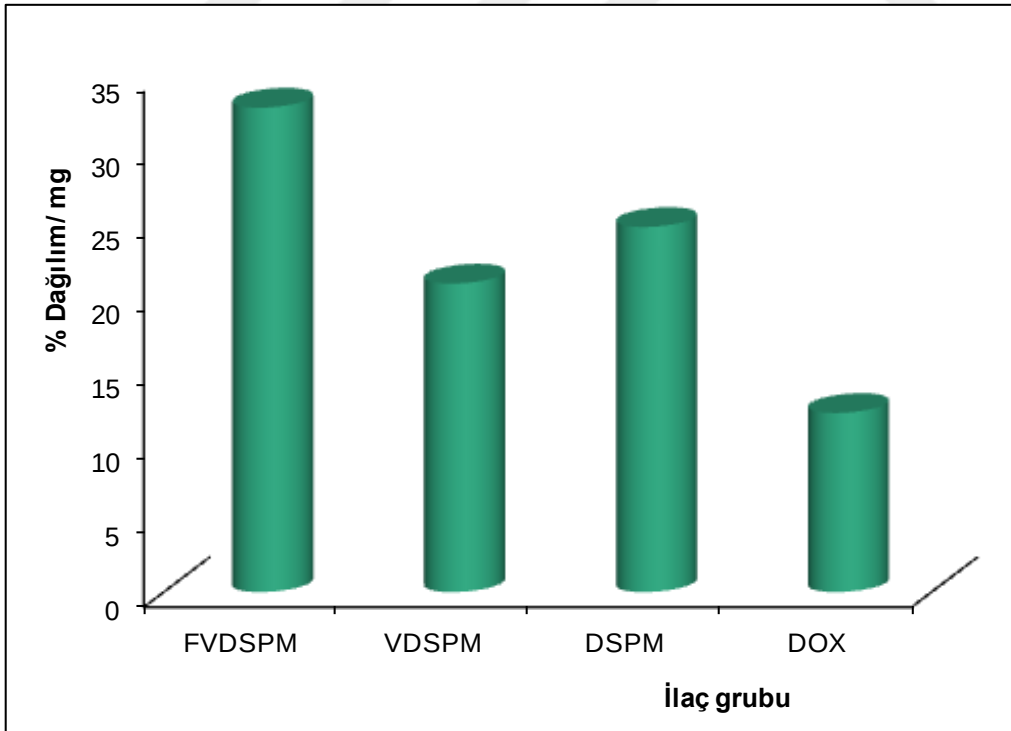
Şekil 3.105 DOX uygulanmış farelerin doku ve plazmalarında dağılan ilaç miktarları (%dağılım/ mg).

Kanserli olmayan insan dokularında folat reseptör (FR) miktarları literatürde (Parker et al., 2005) yer almakta olup bazıları Tablo 3.6'da gösterilmektedir. Sağlıklı dokularda folat reseptörleri en fazla böbrek sonrasında ise akciğer dokusunda eksprese edilmektedir. Over dokuda ise bu değer çok yüksek değildir, fakat kanserli durum geliştiğinde miktarının ~40 kat arttığı bilinmektedir (Parker et al., 2005).

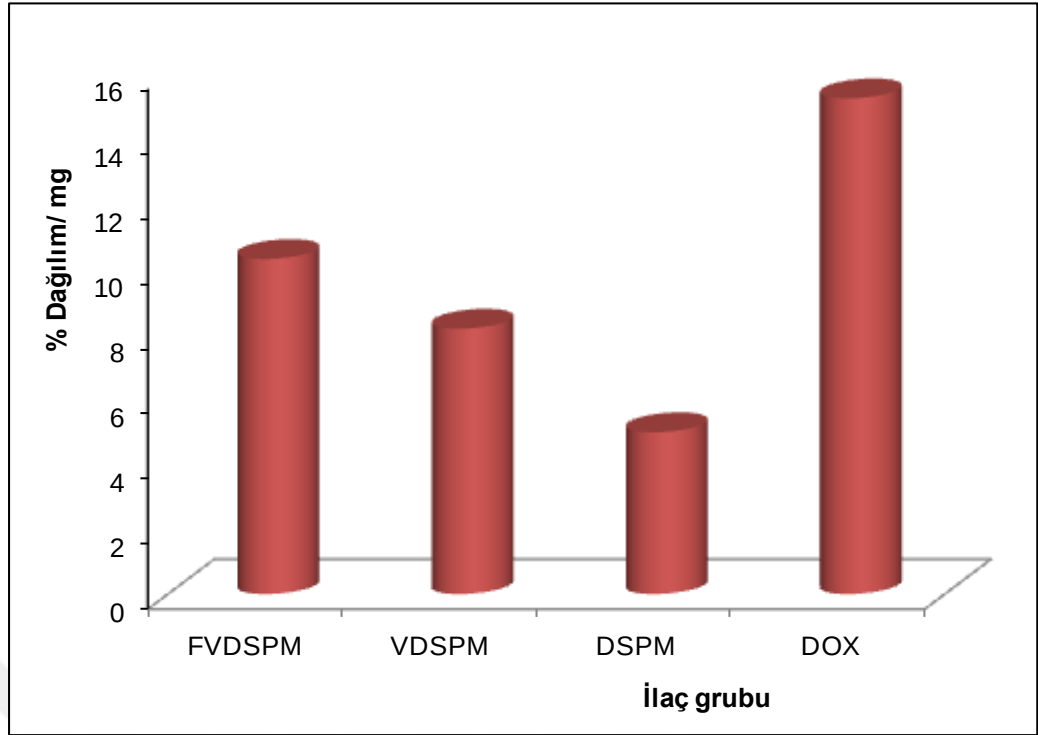
Tablo 3.6 İnsan dokularındaki folat reseptörü seviyeleri (Parker et al., 2005).

Doku tipi	pikomol FR/ mg protein
Over	1,54±1,00
Böbrek	14,40±6,70
Akciğer	7,79±2,99
Meme	3,99±1,68
Mesane	5,20±3,96
Karaciğer	1,23±0,42
Kolorektal	6,75±3,10

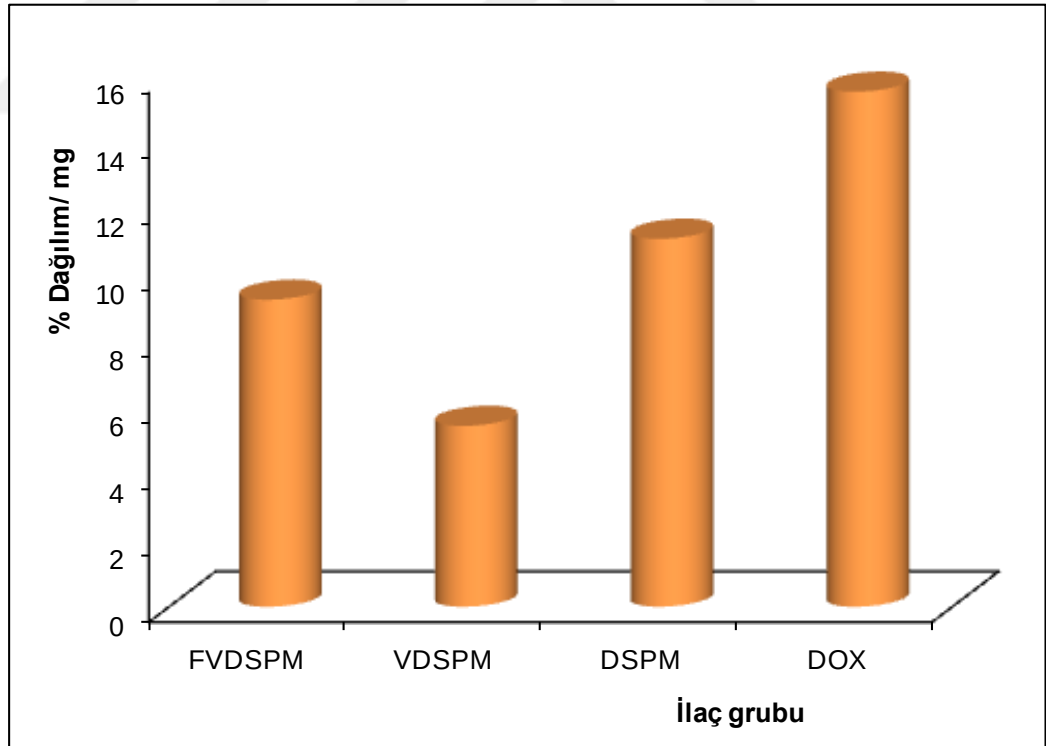
Folat reseptörüne yönelme açısından ilaç gruplarının mg over, böbrek ve akciğer dokularındaki dağılımları kıyaslanmıştır ve sırasıyla Şekil 3.106, Şekil 3.107 ve Şekil 3.108’de gösterilmektedir. Over dokuda FVDSPM, VDSPM, DSPM ve DOX grubunun sırasıyla %32,9/mg, %20,95/mg, %24,79/mg ve %12,16/mg miktarda biriktiği saptanmıştır. Over dokuda çok yüksek oranda FR ekspresyonu olmamasına rağmen ilaç grupları arasında en fazla FVDSPM’lerin over dokuya yöneldiği görülmüştür. Akciğer ve böbrek dokusunda da FVDSPM’lerin VDSPM’lere göre daha fazla oranda biriktiği belirlenmiştir. FVDSPM yapısında bulunan folat ligandının reseptörle etkileşmesi nedeniyle bu dokularda birikimin olduğu düşünülmektedir. Benzer bir sonuç 2014 yılında Lu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da açıklanmıştır. Dişi meme kanserli nude fareler üzerinde misel yapılı doksorubisin taşıyıcılarının biyodağılım çalışması gerçekleştirilmiş ve araştırma sonucunda EPR etkisiyle nanotaşıyıcıların tümör bölgesinde birikebildiği saptanmıştır. Ayrıca folat ligandı takılı olan formun birikiminin daha yüksek olduğu ve hücre içerisine daha etkili olarak girebildiği belirtilmiştir (Lu et al., 2014). Over kanserinde reseptör seviyelerinin ~40 kat arttığı bilindiğinden çalışmamız kapsamında geliştirilen biyomimetik özellikteki folat ligandı takılı ve doksorubisin içeren manyetik nanopartikül yüklü eritrosit veziküllerinin over kanserinde hedefli tedavi sağlama potansiyelinin olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.106 İlaç gruplarının mg over dokusu başına % dağılımı.



Şekil 3.107 İlaç gruplarının mg böbrek dokusu başına % dağılımı.



Şekil 3.108 İlaç gruplarının mg akciğer dokusu başına % dağılımı.

4. GENEL DEĞERLENDİRME

Tez projesi kapsamında öncelikle nişasta ve PEG diasit ile kaplanan manyetik nanopartiküller sentezlenmiş olup yapıya doksorubisin ilacı adsorpsiyon yöntemiyle $82,30 \pm 1,20$ verimde yüklenmiştir. Hemoliz edilen eritrosit hücrelerine folat ligandı takıldıktan sonra sırasıyla 400 ve 100 nm'lik extruder membranından geçirilerek boyutları küçültülmüş ve veziküler forma dönüştürülmüştür. Oluşan veziküller nanopartiküller ile tekrar extrude edilerek nanopartiküllerin veziküllere yaklaşık %90 verimle enkapsülasyonu sağlanmış ve tasarlanan final yapı elde edilmiştir. Hazırlanan yapıların TEM analizi verilerine göre yaklaşık 115 nm boyutunda olduğu belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda yapının ilaç taşıyıcısı olarak ideal özellikler taşıdığı bulunmuştur.

İlaç taşıma sisteminin asidik pH'da fizyolojik pH'ya göre daha fazla ilaç salımı yaptığı saptanmış olup bu durum taşıma sisteminin kanser hücrelerine hedefli ilaç salımı yapması açısından bir avantajdır. Biyouyumluluk araştırmaları sonucunda nanoyapıların biyomimetik özellik taşıdığı bulunmuştur. *In vitro* hücre kültürü deneylerinde vezikül kaplı nanopartiküllerin folat reseptörü aracılığıyla hücre içerisine girdiği ve içeriğindeki doksorubisin ile toksisite yarattığı belirlenmiştir. Folat ligandı taşıyan vezikül ile kaplı doksorubisin yüklü manyetik nanopartiküllerin folat reseptörünü fazla miktarda eksprese eden A2780 hücrelerindeki IC_{50} değeri $0,28 \pm 0,11$ $\mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır, folik asit içermeyen büyüme ortamında yapılan deneylerde ise IC_{50} değeri $0,10 \pm 0,05$ $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Biyomimetik doksorubisin taşıma sisteminin folat reseptörü pozitif kanser hücrelerinde hedefli olarak sitotoksisite yaratacağı düşünülmektedir.

Sağlıklı dişi fareler üzerinde gerçekleştirilen biyodağılım deneylerinde biyomimetik ilaç taşıma sisteminin manyetik alan uygulama ve folat reseptör aracılı spesifik birikimi nedeniyle karın bölgesi organlarında dağıldığı ve RES sistemine takılmadığı saptanmıştır. Folat reseptörü eksprese eden dokuların hepsinde birden (akciğer, böbrek, over, kalın barsak) folat ligandı taşımayan diğer ilaç gruplarına göre yüksek miktarda birikim görülmektedir. Over, böbrek ve akciğerdeki tutulum $32,89/\text{mg}$, $10,32/\text{mg}$, $9,28/\text{mg}$ doku olarak belirlenmiştir.

Hazırlanan ilaç taşıma sistemi kişinin kendi eritrositlerinden oluşturulan veziküller ile kaplanması dolayısıyla biyomimetik özellik taşımaktadır ve folat reseptörüne spesifik olarak dokularda birikebildiği belirlenmiştir. Ayrıca yüksek kuvvette ve lokalize manyetik alan uygulanarak ilaç taşıma sisteminin istenen bölgede

toplanabileceği öngörülmektedir. İlaç taşıyıcısının bireyin kendi eritrositlerinden hazırlanması ve bireyin over kanser dokusunda folat reseptörünün yüksek olarak saptanması ile over kanserli bireyde kişiselleştirilmiş ve hedefli tedavi sağlama potansiyelinin olduğu düşünülmektedir. Hazırlanan biyomimetik ilaç taşıyıcısı ile over kanserinde kişiselleştirilmiş ve hedefli tedavi stratejisi Şekil 4.1’de gösterilmektedir. İlerleyen çalışmalarda ilaç taşıma sisteminin over kanserindeki terapötik etkisinin *in vivo* deneyler ile araştırılması planlanmaktadır.



Şekil 4.1 Hazırlanan biyomimetik doksorubisin taşıyıcısı ile over kanserinde hedefe yönelik ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejisi.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aggarwal P., Hall, J.B., McLeland, C.B., Dobrovolskaia, M.A. and McNeil, S.E.,** 2009, Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61:428-437pp.
- Ağabeyoğlu, İ.,** 2002, Kontrollü salımın farmakokinetik temelleri, 7-20, Gürsoy, A.Z. (Der.), Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, 1, İstanbul, 406s.
- Ak, G.,** 2010, Folat-PEG-Doxorubicin Türevinin Sentezlenerek Teknesyumla İşaretlenmesi ve Kanser Görüntüleme Ajanı Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilimdalı, İzmir.
- Alhareth, K., Vauthier, C., Gueutin, C., Ponchel, G. and Moussa, F.,** 2012, HPLC quantification of doxorubicin in plasma and tissues of rats treated with doxorubicin loaded poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles, *Journal of Chromatography B*, 887–888:128–132pp.
- Antonelli, A., Sfara, C., Mosca, L., Manuali, E. and Magnani, M.,** 2008, New biomimetic constructs for improved *in vivo* circulation of superparamagnetic nanoparticles, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8:1–9pp.
- Arami, H., Khandhar, A., Liggitt, D. and Krishnan K.M.,** 2015, *In vivo* delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles, *Chem. Soc. Rev.*, 1-32pp.
- Bradford, M.M.,** 1976, A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248-254pp.
- Chang P.R., Yu J., Ma X. and Anderson D.P.,** 2011, Polysaccharides as stabilizers for the synthesis of magnetic nanoparticles, *Carbohydrate Polymers*, 83:640-644pp.
- Cheraghipour, E., Tamaddon, A.M., Javadpour, S. and Bruce, I.J.,** 2013, PEG conjugated citrate-capped magnetite nanoparticles for biomedical applications, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 328:91–95pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cole A.J., David, A.E., Wang, J., Galbán, C.J., Hill, H.L. and Yang, V.C.,** 2011, Polyethylene glycol modified, cross-linked starch coated iron oxide nanoparticles for enhanced magnetic tumour targeting, *Biomaterials*, 32: 2183-2193pp.
- Corona, G., Giannini, F., Fabris, M., Toffoli, G. and Boiocchi, M.,** 1998, Role of folate receptor and reduced folate carrier in the transport of 5-methyltetrahydrofolic acid in human ovarian carcinoma cells, *Int. J. Cancer*, 75:125–133pp.
- Cutts, M.S., Nudelman, A., Rephaeli, A. and Phillips, D.R.,** 2005, The power and potential of doxorubicin-DNA adducts, *IUBMB Life*, 57(2):73-81pp.
- Dashnyam, K., Perez, R. A., Singh, R. K., Lee, E.J. and Kim, H.W.,** 2014, Hybrid magnetic scaffolds of gelatin–siloxane incorporated with magnetite nanoparticles effective for bone tissue engineering, *RSC Adv.*, 4:40841–40851pp.
- Dastidar T.G. and Netravali A.N.,** 2012, ‘Green’ crosslinking of native starches with malonic acid and their properties, *Carbohydrate Polymers*, 90:1620-1628pp.
- Dobrovolskaia, M.A., Aggarwal, P., Hall, J.B. and McNeill, S.E.,** 2008, Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution, *Mol. Pharm.*, 5(4):487-495pp.
- Domcke, S., Sinha, R., Levine, D.A., Sander, C. and Schultz, N.,** 2013, Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles, *Nature Communications*, 4:2126 DOI: 10.1038/ncomms3126, 1-10pp.
- Donato, M.L., Wang, X., Kavanagh, J.J. and Gershenson, D.M.,** 2006, Chemotherapy for Epithelial Ovarian Cancer, 188-206, *Gynecologic Cancer*, Eifel, P.J., Gershenson, D.M., Kavanagh J.J., and Silva, E.G., (Eds.), Springer, USA, 311p.
- Dung, T.T., Danh, T.M., Hoa, L.T.M., Chien, D.M. and N.H. Duc,** 2009, Structural and magnetic properties of starch coated magnetite nanoparticles, *Journal of Experimental Nanoscience*, 4(3):259–267pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Easo, S.L. and Mohanan, P.V.**, 2013, Dextran stabilized iron oxide nanoparticles: synthesis, characterization and *in vitro* studies, *Carbohydrate Polymers*, 92(1):726– 732pp.
- Fang, R.H., Hu, C.M.J., Chen, K.N.H., Luk, B.T., Carpenter, C.W., Gao, W., Li, S., Zhang, D.E., Lu, W. and Zhang, L.**, 2013, Lipid-insertion enables targeting functionalization of erythrocyte membrane-cloaked nanoparticles, *Nanoscale*, 5(19):8884-8888pp.
- Farokhzad, O.C. and Langer, R.**, 2009, Impact of nanotechnology on drug, *American Chemical Society Nano*, 3(1):16-20pp.
- Feng, B., Hong, R.Y., Wang, L.S., Guo, L., Li, H.Z., Ding, J., Zheng, Y. and Wei, D.G.**, 2008, Synthesis of Fe₃O₄/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 328:52–59pp.
- Freshney, R.I.**, 1994, Culture of Animal Cells, A Manuel of Basic Technique. Third edition, Wiley-Liss,Inc. New York.
- Gao, W., Hu, C.M.J., Fang R.H. and Zhang, L.**, 2013, Liposome-like nanostructures for drug delivery, *Mater. Chem. B*, 1:6569- 6585pp.
- Gao, W. and Zhang, L.**, 2015, Engineering red-blood-cell-membrane coated nanoparticles for broad biomedical applications, *AIChE Journal*, 61(3):738-746pp.
- Groen, R.S., Gershenson, D.M. and Fader, A.N.**, 2015, Updates and emerging therapies for rare epithelial ovarian cancers: One size no longer fits all, *Gynecol Oncol.*, 136(2):373-83pp.
- Gupta A.K. and Gupta M.**, 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 26:3995– 4021pp.
- Gupta, N., Patel, B. and Ahsan, F.**, 2014, Nano-engineered erythrocyte ghosts as inhalational carriers for delivery of fasudil: preparation and characterization, *Pharmaceutical Research*, 31:1553-1565pp.
- Gupta P.K., Lam F.C. and Hung C.T.**, 1988, Investigation of the stability of doxorubicin hydrochloride using factorial design, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 14(12):1657-1671pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hajba, L. and Guttman, A.,** 2016, The use of magnetic nanoparticles in cancer theranostics: toward handheld diagnostic devices, *Biotechnology Advances*, 1-19pp.
- Hamidi, M., Zarrin, A., Foroozesh, M. and Samani, S.M.,** 2007, Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals, *Journal of Controlled Release*, 118:145-160pp.
- Hao, H., Ma, Q., He, F. and Yao F.,** 2014, Doxorubicin and Fe₃O₄ loaded albumin nanoparticles with folic acid modified dextran surface for tumor diagnosis and therapy, *J. Mater. Chem. B*, 2:7978–7987pp.
- Harries, M. and Gore, M.,** 2002, Part I: Chemotherapy for epithelial ovarian Cancer-treatment at first diagnosis, *The Lancet Oncology*, 3:529-536pp.
- Hartog, G.J.M., Haenen, G.R.M.M., Boven, E., Vijgh, V.J.F. and Bast, A.,** 2004, Lecithinized copper,zinc-superoxide dismutase as a protector against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 194:180–188pp.
- Heath, J.R. and Davis M.E.,** 2008, Nanotechnology and cancer, *Annu. Rev. Med.*, 59:251-65pp.
- Hilgenberk, A.R. and Low, P.S.,** 2005, Folate Receptor-Mediated Drug Targeting: From Therapeutics to Diagnostics, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(10):2135-2140pp.
- Hu, C.M.J., Fang, R.H. and Zhang L.,** 2012, Erythrocyte-inspired delivery systems, *Adv. Healthcare Mater.*, 1:537–547pp.
- Hu, C.M.J., Fang, R.H., Luk, B.T., Chen, K.N.H., Carpenter, C., Gao, W., Zhang K. and Zhang L.,** 2013, Marker-of-self functionalization of nanoscale particles through a top-down cellular membrane coating approach, *Nanoscale*, 5:2664-2668pp.
- Hu, C.M.J., Zhang, L., Aryal, S., Cheung, C., Fang, R.H. and Zhang, L.,** 2011, Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform, *PNAS*, 108(27):10980-10985pp.
- Hu, F.Q., Wu, X., Du, Y.Z., You, J. and Yuan, H.,** 2008, Cellular uptake and cytotoxicity of shell crosslinked stearic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles encapsulating doxorubicin, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69:117–125pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Illes, E. and Tombacz E.,** 2006, The Effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 295:115-123pp.
- Itamochi, H. and Kigawa, J.,** 2012, Clinical trials and future potential of targeted therapy for ovarian cancer, *Int J Clin Oncol*, 17(5): 430-440pp.
- Jiang, J.S., Gan, Z.F., Yang, Y., Du, B., Qian, M. and Zhang, P.,** 2009, A Novel magnetic fluid based on starch-coated magnetite nanoparticles functionalized with homing peptide, *Journal of Nanoparticle Research*, 11:1321-1330pp.
- Jung, K. and Rezska R.,** 2001, Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 49:87-105pp.
- Kaş, H.S.,** 2002, İlaç taşıyıcı partiküler sistemler, 65-120, Kontrollü Salım Sistemleri, Gürsoy, A.Z. (Der.), Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, 1, İstanbul, 406s.
- Kaş, H.S. and Eldem, T.,** 2002, Kontrollü salım sistemlerinin hedeflendirilmesi, 299-316, Kontrollü Salım Sistemleri, Gürsoy, A.Z. (Der.), Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, 1, İstanbul, 406s.
- Kayal, S. and Ramanujan, R.V.,** 2010, Doxorubicin loaded PVA coated iron oxide nanoparticles for targeted drug delivery, *Materials Science and Engineering C*, 30(3):484–490pp.
- Kim D.H., Lee S.H., Im K.N., Kim K.M., Shim I.B., Lee M.H. and Lee Y.K.,** 2006, Surface-modified magnetite nanoparticles for hyperthermia: Preparation, characterization, and cytotoxicity studies, *Current Applied Physics*, 6(1):242-246pp.
- Kim, J.O., Kabanov, A.V. and Tatiana K.,** 2009, Polymer micelles with cross-linked polyanion core for delivery of a cationic drug doxorubicin, *Journal of Controlled Release*, 138:197–204pp.
- Kolate, A., Baradia, D., Patil, S., Vhora, I., Kore, G. and Misra, A.,** 2014, PEG-A versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 192:67–81pp.
- Lanz-Landazuri, A., de Ilarduya A.M., Garcia-Alvarez M. and Munoz-Guerra S.,** 2014, Poly(β ,L-malic acid)/doxorubicin ionic complex: a pH-dependent delivery system, *Reactive & Functional Polymers*, 81:45–53pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, F., Zhang, H., Gu C., Fan, L., Qiao, Y., Tao, Y., Cheng, C., Wua, H. and Yi, J.**, 2013, Self-assembled nanoparticles from folate-decorated maleilated pullulan–doxorubicin conjugate for improved drug delivery to cancer cells, *Polymer International*, 62(2):165-171pp.
- Liu, H., Xie, F., Yu, L., Chen, L. and Li, L.**, 2009, Thermal processing of starch-based polymers, *Progress in Polymer Science*, 34:1348–1368pp.
- Lu, J., Zhao, W., Huang, Y., Liu, H., Marquez, R., Gibbs, R.B., Li, J., Venkataramanan, R., Xu, L., Li, S. and Li, S.**, 2014, Targeted delivery of doxorubicin by folic acid-decorated dual functional nanocarrier, *Molecular Pharmaceutics*, 11:4164–4178pp.
- Manocha B. and Margaritis A.**, 2010, Controlled release of doxorubicin from doxorubicin/ γ -Polyglutamic acid ionic complex, *Journal of Nanomedicine*, 780171.
- Mayer, A., Vadon, M., Rinner, B., Novak, A., Wintersteiger, R. and Fröhlich, E.**, 2009, The role of nanoparticle size in hemocompatibility, *Toxicology*, 258:139–147pp.
- Maurizi, L., Papa, A.L., Dumont, L., Bouyer, F., Walker, P., Vandroux, P. and Millot, N.**, 2015, Influence of surface charge and polymer coating on internalization and biodistribution of polyethylene glycol-modified iron oxide nanoparticles, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11:126–136pp.
- Meyer, R.A., Sunshine, J.C. and Green J.J.**, 2015, Biomimetic particles as therapeutics, *Trends in Biotechnology*, 33(9):514-524pp.
- Mosmann, T.**, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63pp.
- Mukerjee, A., Ranjan, A.P. and Vishwanatha, J.K.**, 2012, Combinatorial nanoparticles for cancer diagnosis and therapy, *Current Medicinal Chemistry*, 19:3714-3721pp.
- Nicolas P., Saleta M., Troiani H., Zysler R. and Lassalle V.**, 2013, Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: experimental and mechanistic issues, *Acta Biomaterialia*, 9:4754-4762pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nukolova, V.N., Obero, S.H., Cohe, S.M., Kabanov, A.V. and Bronich T.K.,** 2011, Folate-decorated nanogels for targeted therapy of ovarian cancer, *Biomaterials*, 32:5417-5426pp.
- Parker, N., Turk, M.J., Westrick, E., Lewis, J.D., Low, P.S. and Leamon, C.P.,** 2005, Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay, *Analytical Biochemistry*, 338:284–293pp.
- Petcharoen, K. and Sirivat, A.,** 2012, Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method, *Materials Science and Engineering B*, 177:421–427pp.
- Petros, R.A. and DeSimone, J.M.,** 2010, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9:615-627pp.
- Radovic M., Calatayud M.P., Goya G.F., Ibarra M.R., Antic B., Spasojevic V., Nikolic N., Jankovic D., Mirkovic M. and Duric S.V.,** 2014, Preparation and *in vivo* evaluation of multifunctional ⁹⁰Y-labeled magnetic nanoparticles designed for cancer therapy, *Society for Biomaterials*, DOI: 10.1002/jbm.a.35160.
- Ren, Y., Wong, S. M. and Lim, L.Y.,** 2007, Folic acid-conjugated protein cages of a plant virus: a novel delivery platform for doxorubicin, *Bioconjugate Chem.*, 18:836–843pp.
- Rodrigues, A. and Emeje, M.,** 2012, Recent applications of starch derivatives in nanodrug delivery, *Carbohydrate Polymers*, 87:987– 994pp.
- Rosen, J.E., Chan, L., Shieh, D. and Gu, F.X.,** 2012, Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(3):275-290pp.
- Sadighian, S., Rostamizadeh, K., Monfared H.H. and Hamidi, M.,** 2014, Doxorubicin-conjugated core-shell magnetite nanoparticles as dual-targeting carriers for anticancer drug delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117:406–413pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Semete B., Booysen L., Kalombo L., Ramalapa B., Hayeshi R. and Swai H.S.**, 2012, Effects of protein binding on the biodistribution of pegylated plga nanoparticles post oral administration, *International Journal of Pharmaceutics*, 424:115–120pp.
- Shi Z., Guo, R., Li, W., Zhang, Y., Xue, W., Tang, Yu. and Hang, Y.**, 2014, Nanoparticles of deoxycholic acid, polyethylene glycol and folic acid-modified chitosan for targeted delivery of doxorubicin, *J Mater Sci: Mater Med.*, 25:723–731pp.
- Singh, R. and Lillard, J.W.**, 2009, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and Molecular Pathology*, 86:215-223pp.
- Singh, R.K., Kim, T-H., Patel, K.D., Knowles, J.C. and Kim, H-W.**, 2012, Biocompatible magnetite nanoparticles with varying silica-coating layer for use in biomedicine: physicochemical and magnetic properties, and cellular compatibility, *J Biomed Mater Res Part A*, 100:1734–1742pp.
- Shmeeda, H., Amitay, Y., Gorin, J., Tzemach, D., Mak, L., Ogorka, J., Kumar, S., Zhang, J. A. and Gabizon, A.**, 2010, Delivery of zoledronic acid encapsulated in folate-targeted liposome results in potent *in vitro* cytotoxic activity on tumor cells, *Journal of Controlled Release*, 146:76–83pp.
- Steichen, S.D., Moore, M.C. and Peppas, N.A.**, 2013, A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics, *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 48:416-427pp.
- Sternberg, N., Georgieva, R., Duft, K. and Baumler, H.**, 2012, Surface-modified loaded human red blood cells for targeting and delivery of drugs, *Journal of Microencapsulation*, 29(1):9-20pp.
- Su, Z., Graybill, W.S. and Zhu, Y.**, 2013, Detection and monitoring of ovarian cancer, *Clinica Chimica Acta*, 415:341–345pp.
- Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Boussard, T.H., McLeod, H., Klein, T.E. and Altman R.B.**, 2011, Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects, 21(7): 440–446pp.
- Tomasina, J., Lheureux, S., Gauduchon, P., Rault, S. and Fréon, A.M.**, 2013, Nanocarriers for the targeted treatment of ovarian cancers, *Biomaterials*, 34: 1073-1101pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vasir, J.K. and Labhasetwar, V.,** 2005, Targeted drug delivery in cancer therapy, *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4(4):363-374pp.
- Wang, A.Z., Langer, R. and Farokhzad, O.C.,** 2012, Nanoparticle delivery of cancer drugs, *Annu. Rev. Med.*, 63:185-198pp.
- Wang, H., Wang, S., Liao, S., Zhao, P., Su, W., Niu, R., Chang, R.,** 2012, Folate-targeting magnetic core-shell nanocarriers for selective drug release and imaging, *International Journal of Pharmaceutics*, 430:342– 349pp.
- Wang, L., Neoh, K.G., Kang, E.T. and Shuter, B.,** 2011, Multifunctional polyglycerol-grafted $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ nanoparticles for targeting ovarian cancer cells, *Biomaterials*, 32:2166-2173pp.
- Waterhouse, D.N., Tardi, P.G., Mayer, L.D. and Bally M.D.,** 2001, A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form-changing toxicity profiles, *Drug Safety*, 24(12):903-920pp.
- Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian V. and Huwyler, J.,** 2015, Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications, *Journal of Controlled Release*, 200:138-157pp.
- Wilczewska, A., Niemirowicz, K., Markiewicz, K.H. and Car, H.,** 2012, Nanoparticles as drug delivery systems, *Pharmacological Reports*, 64:1020-1037pp.
- World Cancer Research Fund and American Institute For Cancer Research,** “Continuous Update Project, Overian Cancer 2014 Report, Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Ovarian Cancer”, http://www.dietandcancerreport.org/cup/cup_resources.php (Erişim tarihi: 27 Şubat 2016).
- Wu, J., Wang, Y., Jiang, W., Xu, S. and Tian R.,** 2014, Synthesis and characterization of recyclable clusters of magneticnanoparticles as doxorubicin carriers for cancer therapy, *Applied Surface Science*, 321:43– 49pp.
- Yallapu, M.M., Chauhan, N., Othman, S.F., Sharghi, V.K., Ebeling, M.C., Khan, S., Jaggi, M. and Chauhan, S.C.,** 2015, Implications of protein corona on physico-chemical and biological properties of magnetic nanoparticles, *Biomaterials*, 46:1-12pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, T., Li, B., Qi, S., Liu, Y., Gai, Y., Ye, P., Yang, G., Zhang, W., Zhang, P., He, X., Li, W., Zhang, Z., Xiang, G. and Xu, C.,** 2014, Co-delivery of doxorubicin and Bmi1 siRNA by folate receptor targeted liposomes exhibits enhanced anti-tumor effects *in vitro* and *in vivo*, *Theranostics*, 4(11):1096-1111pp.
- Ye, W.L., Du, J.B., Zhang, B.L., Na, R., Song, Y.F., Mei, Q.B., Zhao, M.G., and Zhou, S.Y.,** 2014, Cellular uptake and antitumor activity of DOX-hyd-PEG-FA nanoparticles, *PLoS ONE*, 9(5):e97358pp.
- Zhang, H., Yi, F.L.J., Gu C., Fan, L., Qiao, Y., Tao, Y., Cheng, C. and Wu, H.,** 2011, Folate-decorated maleilated pullulan–doxorubicin conjugate for active tumor-targeted drug delivery, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42:517–526pp.
- Zhang, J. and Misra R.D.K.,** 2007, Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: Core–shell nanoparticle carrier and drug release response, *Acta Biomaterialia*, 3:838–850pp.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : GÜLİZ AK

Doğum Tarihi: 04.07.1987

Unvanı : Araş. Gör.

Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi, İzmir	2008
Y. lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi, İzmir	2010
Doktora	Biyokimya	Ege Üniversitesi, İzmir	Devam ediyor

Akademik Unvanlar

Görev Dönemi	Görev Tanımı	Kuruluş
2010-devam ediyor	Araştırma Görevlisi	E.Ü.F.F. Biyokimya Bölümü

A. MAKALELER

A1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

A1.1. Ak G., Hamarat Sanlier S., “Synthesis of folate receptor targeted and doxorubicin coupled chemotherapeutic nanoconjugate and research into its medical applications”, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 42:6, 551-563, 2012.

A1.2. Ak G., Yurt Lambrecht F., Hamarat Sanlier S., “Radiolabeling of folate targeted multifunctional conjugate with Technetium-99m and biodistribution studies in rats”, Journal of Drug Targeting, 20:6, 509–514, 2012.

- A1.3.** Hamarat Sanlier S., Ak G., Yılmaz H., Ozbakir G., Cagliyan O., “Removal of textile dye, Direct red 23, with glutaraldehyde cross-linked magnetic chitosan beads”, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43:2, 163-176, 2013.
- A1.4.** Ak G., Aktuna Y., Kartal F., Kılınç A., “The effect of pretreatment with substrates on the activity of immobilized pancreatic lipase” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 42:2, 146-150, 2014.
- A1.5.** Ak G., Yılmaz H., Hamarat Sanlier S., “Preparation of magnetically responsive albumin nanospheres and *in vitro* drug release studies” *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 42:1, 18-26, 2014.
- A1.6.** Zeybek A., Şanlı-Mohamed G., Ak G., Yılmaz H., Hamarat Sanlier S., “*In vitro* evaluation of doxorubicin incorporated magnetic albumin nanospheres”, *Chemical Biology and Drug Design*, 84:1, 108-115, 2014.
- A1.7.** Yıldırım Y., Yılmaz H., Ak G., Hamarat Sanlier S., “New Copolymer of Acrylamide with Allyl Methacrylate and its Capacity for the Removal of Azo Dyes”, *Revista Polímeros - Ciência e Tecnologia*, 25:2, 137-145, 2015.
- A1.8.** Hamarat Sanlier S., Yasa M., Cihnioglu A., Abdulhayoglu M., Yılmaz H., Ak G., “Development of Gemcitabine Adsorbed Magnetic Gelatin Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Lung Cancer”, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 23: 1-7, 2015.
- A1.9.** Selvi Gunel N., Ozel B., Kipcak S., Aktan C., Akgun C., Ak G., Yılmaz H., Biray Avci C., Dodurga Y., Hamarat Sanlier S., “Synthesis of Methotrexate Loaded Chitosan nanoparticles and *in vitro* evaluation of the potential in treatment of prostate cancer”, *Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry*, DOI: 10.2174/1871520616666160101120040, 2016.

A2. SCI ve uluslar arası indekslerce taranan dergiler dışında hakemli ve süreli dergilerde yayınlanan makaleler

- A2.1.** Yılmaz H., Ak G., Hamarat Şanlier Ş., “Removal Of Hazardous Food Dye Brilliant Blue FCF From Aqueous Solution By Magnetic Crosslinked Chitosan Beads”, *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 40:1, 111-117, 2012.

B. BİLDİRİLER

B.1. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

- B1.1.** Ak G., Aktuna Y., Kartal F., Kılınç A., “The Effect of Pre-treatment with Substrates on Activities of Immobilized Lipase”, Poster bildiri, International Enzyme Engineering Symposium, Aydın, 1-5 Ekim 2008.
- B1.2.** Ak, G., Şanlıer Hamarat, Ş., “Synthesis of Folate-PEG-Doxorubicin Conjugate, Radiolabeling with Technetium-99m and Research into Its Applications as an Imaging Agent in Cancer”, Sözel bildiri, International Symposium on Drug Research & Development From Chemistry to Medicine, Antalya, 27-29 Mayıs 2011.
- B1.3.** Ak, G., Yılmaz, H., Şanlıer Hamarat, Ş., “Synthesis of Doxorubicin Incorporated Magnetic Albumin Nanospheres with a Simple Method and *In Vitro* Doxorubicin Release Studies”, Poster bildiri, International Symposium on Drug Research & Development From Chemistry to Medicine, Antalya, 27-29 Mayıs 2011.
- B1.4.** Yılmaz, H., Ak, G., Şanlıer Hamarat, Ş., “Preparation and *In Vitro* Release Studies of Cisplatin Loaded Magnetic Gelatin Nanoparticles”, Poster bildiri, International Symposium on Drug Research & Development From Chemistry to Medicine, Antalya, 27-29 Mayıs 2011.
- B1.5.** Ak G., Yılmaz H., Zeybek A., Şanlı G., Hamarat Şanlıer Ş., “Synthesis and characterization of magnetically responsive doxorubicin loaded nanospheres and *in vitro* cytotoxicity studies on cancer cells”, Sözel bildiri, 16th International Pharmaceutical Technology Symposium “Smart Technologies for Drug Delivery”, Antalya, 10-12 Eylül 2012.
- B1.6.** Cihnioglu A.Ö., Yaşa M., Abdulhayoğlu M., Yılmaz H., Ak G., Hamarat Şanlıer Ş., “Magnetic gelatin nanoparticle synthesis and gemcitabine loading through adsorption technique”, Poster bildiri, 16th International Pharmaceutical Technology Symposium “Smart Technologies for Drug Delivery”, Antalya, 10-12 Eylül 2012.

- B1.7.** Ak G., Hamarat Şanlier Ş., “Over kanserinde biyomolekül hedefli ve ultrases duyarlı e-lipozom yapılar ile yeni bir teranostik yaklaşım”, Hipotez yarışmasında poster sunum, International Symposium on Cancer Nanomedicine , İzmir, 07-09 Kasım 2013.
- B1.8.** Kinal A., Öztürk I., Ak G., Yılmaz H., Şanlier Ş., “Computational Investigation of Interaction of Gluconate Derivatives with Magnetite (Fe_3O_4) Surface in α -D-glucose coated iron oxide nanoparticles”, Poster bildiri, International Conference on Applied Informatics for Health and Life Sciences, Kuşadası-Aydın, 19-22 Ekim 2014.
- B1.9.** Öztürk I., Kinal A., Ak G., Yılmaz H., Sanlier S., “Interaction of gluconate derivatives with magnetite (Fe_3O_4) surface in α -D-glucose coated iron oxide nanoparticles: A DFT study”, Poster bildiri, International Symposium on Molecular Chemistry (MOLCHEM), İstanbul, 18-19 Aralık 2014.
- B1.10.** Öztürk I., Kinal A., Ak G., Yılmaz H., Sanlier S., “A computational study on carboxymethylation mechanism of gluconate”, Poster bildiri, Molecular Modeling Workshop, Almanya, 9-11 Mart 2015.
- B1.11.** Ak G., Şanlier Ş., “A Novel Dual-Targeted and Biomimetic Doxorubicin Nanocarrier”, Poster bildiri, European Pharma Congress, İspanya, 25-27 Ağustos 2015.
- B1.12.** Yılmaz H., Ak G., Güneş A., Akgül Y., Şanlier Ş., “Synthesis of Doxorubicin Loaded and Glucose/Gluconic acid Coated Magnetic Nanoparticles”, Poster bildiri, European Pharma Congress, İspanya, 25-27 Ağustos 2015.
- B1.13.** Ak G., Yılmaz H., Şanlier Ş., “Development of Nanoparticulate System for Ovarian Cancer Therapy”, Poster bildiri, European Pharma Congress, İspanya, 25-27 Ağustos 2015.
- B1.14.** Yıldırım Y., Yılmaz H., Ak G., Akgün C., Şanlier Ş., “Synthesis of dual drug and peptide decorated magnetic nanoparticles to address lung cancer”, Poster bildiri, European Pharma Congress, İspanya, 25-27 Ağustos 2015.
- B1.15.** Kinal A., Güreşçi M., Ak G., Yılmaz H., Şanlier Ş., “Computational Investigation of Interactions of Pemetrexed and Pazopanib Anticancer Drug

Molecules Conjugated with Small Peptide Link with Magnetite (Fe_3O_4) Surface”, Poster bildiri, European Pharma Congress, İspanya, 25-27 Ağustos 2015.

B1.16. Güneş A., Şanlıer Ş., Yılmaz H., Ak G., “Researching Potential of Medical Uses of Glucose/Gluconic Acid Coated and Magnetic Targeted Nanoparticles *in vitro* Conditions for Ovarian Carcinoma”, Poster bildiri, International Congress on Applied Biological Sciences, Makedonya, 16-20 Eylül 2015.

B1.17. Akgün C., Şanlıer Ş., Yılmaz H., Ak G., “Preparation and Characterization of Microbubbles Which Contain Peptide-Drug Konjugates with Magnetic Property Inhaler for Implementation for Use in the Treatment of Lung Cancer”, Poster bildiri, International Congress on Applied Biological Sciences, Makedonya, 16-20 Eylül 2015.

B1.18. Şanlıer Ş., Ak G., Yılmaz H., Güneş A., “Using Doxorubicin Linked Magnetic Nanoparticles for Treatment of Nude Mice Bearing Ovarian Cancer”, Poster bildiri, International Congress on Applied Biological Sciences, Makedonya, 16-20 Eylül 2015.

B2. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

B2.1. Ak G., Özçalışkan E., Küçük Kurt B., Kalkan T., Kaptan M., Hamarat Baysal Ş., “Manyetik aljinat boncuklara katalaz immobilizasyonu”, Poster bildiri, 23. Ulusal Kimya Kongresi, Sivas, 16-20 Haziran 2009.

B2.2. Ak, G., Hamarat Şanlıer Ş., “Folat-PEG-Doxorubicin türevinin sentezlenerek teknesyumla işaretlenmesi ve kanser görüntüleme ajanı olarak kullanım olanaklarının araştırılması”, Poster bildiri, 1. Ege Ar-Ge ve Teknoloji Günleri, İzmir, 1-3 Aralık 2010.

B2.3. Cihnioglu A.Ö., Yaşa M., Abdulhayoğlu M., Yılmaz H., Ak G., Hamarat Şanlıer Ş., “Manyetik jelatin nanopartiküllerine gempitabine ilacının adsorpsiyon tekniği kullanılarak yüklenmesi”, Poster bildiri, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, 3-7 Eylül 2012.

B2.4. Ak G., Zeybek A., Hamarat Şanlıer Ş., Şanlı Mohamed G., “Folat ile Hedeflendirilmiş Doksorubisin Konjugatının Prostat Kanseri Hücreleri

Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması”, Poster bildiri, 1. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya, 29-31 Mart 2013.

B2.5. Yaşa M., Cihnioğlu A.Ö., Zeybek A., Yılmaz H., Ak G., Hamarat Şanlıer G., Şanlı Mohamed G., “Gemsitabin İçeren Manyetik Hedefli Jelatin Nanopartiküller ile *İn vitro* Çalışmalar”, Poster bildiri, 1. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya, 29-31 Mart 2013.

B2.6. Akgün S., Ak G., Yılmaz H., Hamarat Şanlıer Ş., “Osteomiyelit Tedavisinde Kullanılmak Üzere Antibiyotik Yüklü Manyetik Albumin Nanopartiküllerin Sentezlenmesi”, Poster bildiri, 1. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya, 29-31 Mart 2013.

B2.7. Ak G., Yılmaz H., Hamarat Şanlıer Ş., “Akciğer Kanseri Tedavisine Yönelik Yeni Bir İlaç Taşıyıcı Sistem: Pemetrexed Yüklü Nanopartiküller”, Poster bildiri, 2. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya, 21-23 Mart 2014.

B2.8. Yılmaz H., Ak G., Yıldırım Y., Hamarat Şanlıer Ş., “Texas Red İşaretli Cisplatin İçeren Manyetik Nanopartiküllerin Sıçanlarda IVIS Spect ile Görüntülenmesi Çalışmaları”, Poster bildiri, 2. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi, Antalya, 21-23 Mart 2014.

B2.9. Ak G., Hamarat Şanlıer Ş., “Over Kanseri Tedavisinde Biyomimetik İlaç Taşıyıcı Ajan”, Poster bildiri, İBG-İzmir 2015 Yaşam Bilimleri ve Sağlık Proje Yarışması- ürün kategorisi, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, 9-10 Eylül 2015.

B2.10. Güneş A., Şanlıer Ş., Ak G., Yılmaz H., “Folat Reseptör Hedefli ve Biyomimetik Tasarlı Manyetik İlaç Taşıma Sistemleri İle Kişiselleştirilmiş Anti-Kanser Tedavi Potansiyelinin Araştırılması”, Poster bildiri, İBG-İzmir 2015 Yaşam Bilimleri ve Sağlık Proje Yarışması- ürün kategorisi, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, 9-10 Eylül 2015.

B2.11. Akgün C., Şanlıer Ş., Yılmaz H., Ak G., “Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılmak Üzere iv. Enjeksiyon ve/veya İnhaler Uygulamaya Yönelik Manyetik ve Ultrases Hedefli İlaç Taşıyıcı Sisteminin Geliştirilmesi ve *İn vitro/İn vivo/Ex vivo* Araştırmaları”, Poster bildiri, İBG-İzmir 2015 Yaşam Bilimleri ve Sağlık

Proje Yarışması- ürün kategorisi, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, 9-10 Eylül 2015.

- B2.12.** Şanlıer Ş., Yılmaz H., Ak G., “Osteomyelit Tedavisinde Nanoboyutlu Antibiyoterapi”, Poster bildirisi, İBG-İzmir 2015 Yaşam Bilimleri ve Sağlık Proje Yarışması- ürün kategorisi, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, 9-10 Eylül 2015.

C. EDITÖRLÜK, YAYIN KURULU ÜYELİĞİ, HAKEMLİK

- C1.** “Journal of Drug Targeting” dergisinde hakemlik
- C2.** “International Journal of Nanomedicine” dergisinde hakemlik
- C3.** “Journal of Nanoparticle Research” dergisinde hakemlik
- C4.** “Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals” dergisinde hakemlik
- C5.** “Chemical Engineering Journal” dergisinde hakemlik
- C6.** “Environmental Technology” dergisinde hakemlik
- C7.** “Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology” dergisinde hakemlik
- C8.** “International Journal of Pharmaceutics” dergisinde hakemlik
- C9.** “Drug Design, Development and Therapy” dergisinde hakemlik
- C10.** “Macromolecular Research” dergisinde hakemlik

D. EĞİTİM-ÖĞRETİM VE ARAŞTIRMA FAALİYETLERİ

D1. Ulusal kuruluşlarca desteklenen araştırma projeleri

- D1.1.** “Folat-PEG-Doxorubicin Türevinin Sentezlenerek Teknesyumla İşaretlenmesi ve Kanser Görüntüleme Ajansı Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması”, **Yürütücü (Yüksek lisans tezi)**, 2009 Fen 57 BAP, 2010.
- D1.2.** “Kanser Hücrelerine hedefli Biyomimetik ilaç taşıma sistemlerinin hazırlanması, karakterizasyonu ve biyopotansiyelinin araştırılması”, **Yürütücü (Doktora tezi)**, 2012 Fen 028 BAP, 2012- devam ediyor.

- D1.3.** “Pemetrexed yüklü manyetik O-karboksimetil kitosan nanopartiküllerinin sentezlenmesi ve akciğer kanseri hücre hatlarında etkinliğinin araştırılması”, **Araştırmacı**, 2013 İLAM 002, 2015.
- D1.4.** “Folat Reseptör Hedefli ve Biyomimetik Tasarlı Manyetik İlaç Taşıma Sistemleri İle Kişiselleştirilmiş Anti-Kanser Tedavi Potansiyelinin Araştırılması”, TÜBİTAK 1001, 113Z165 nolu proje, **Bursiyer**, 2015.
- D1.5.** “Osteomiyelit Tedavisinde Nanoboyutlu Antibiyoterapi”, **Araştırmacı**, 2014 İLAM 001 EBİLTEM, devam ediyor.
- D1.6.** “Akciğer Kanseri Kulllanılmak Üzere iv. Enjeksiyon ve/veya İnhaler Uygulamaya Yönelik Manyetik ve Ultrases Hedefli İlaç Taşıyıcı Sisteminin Geliştirilmesi ve *İn vitro/İn vivo/Ex vivo* Araştırmaları”, TÜBİTAK 1003, 213M672 nolu proje, **Bursiyer**, devam ediyor.
- D1.7.** “Folat Reseptör Hedefli ve Biyomimetik Tasarlı Manyetik İlaç Taşıma Sistemleri İle Kişiselleştirilmiş Anti-Kanser Tedavi Potansiyelinin Araştırılması”, **Araştırmacı**, EBİLTEM, 2014 BİL 006 BAP, devam ediyor.

D2. Alanında ulusal bilimsel nitelikli ödüller

- D2.1.** 1.İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi’nde “Folat ile Hedeflendirilmiş Doksorubisin Konjugatının Prostat Kanseri Hücreleri Üzerindeki Etkinliğinin Araştırılması” başlıklı poster ile poster birincilik ödülü, Antalya, 29-31 Mart 2013.
- D2.2.** 2. İlaç Kimyası, Üretimi, Teknolojisi ve Standardizasyonu Kongresi’nde “Texas Red İşaretli Cisplatin İçeren Manyetik Nanopartiküllerin Sıçanlarda IVIS Spect ile Görüntülenmesi Çalışmaları” başlıklı poster ile poster üçüncülük ödülü, Antalya, 21-23 Mart 2014.
- D2.3.** İBG-İzmir 2015 Yaşam Bilimleri ve Sağlık Proje Yarışması’nda “Over Kanseri Tedavisinde Biyomimetik İlaç Taşıyıcı Ajan” başlıklı poster ile ürün kategorisinde birincilik ödülü, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, 9-10 Eylül 2015.

D2.4. İBG-İzmir 2015 Yaşam Bilimleri ve Sağlık Proje Yarışması'nda "Akciğer Kanseri Kullandıkları Üzerine iv. Enjeksiyon ve/veya İnhaler Uygulamaya Yönelik Manyetik ve Ultrases Hedefli İlaç Taşıyıcı Sisteminin Geliştirilmesi ve *In vitro/In vivo/Ex vivo* Araştırmaları", başlıklı poster ile ürün kategorisinde ikincilik ödülü, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, 9-10 Eylül 2015.

D3. Alanında uluslararası bilimsel nitelikli ödüller

D3.1. European Pharma Congress Kongresinde "Development of Nanoparticulate System for Ovarian Cancer Therapy" başlıklı poster ile best poster award ödülü, İspanya, 25-27 Ağustos 2015.

D3.2. European Pharma Congress Kongresinde "Synthesis of dual drug and peptide decorated magnetic nanoparticles to address lung cancer" başlıklı poster ile best poster award ödülü, İspanya, 25-27 Ağustos 2015.

E. BİLİMSEL TOPLANTI DÜZENLEMEK

E1. Ulusal sempozyum, kongre, kollokyum ve sanatsal etkinlik düzenlemede üye olarak çalışmak

E1.1. "Kişiselleştirilmiş kanser tedavisinde hücre kültürü, proteomik & genomik uygulamalar kursu", Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi, 1-4 Şubat 2016.

E2. Ulusal Bilimsel Toplantılar (Seminerler)

E2.1. "Folat-PEG-Doxorubicin Türevinin Sentezlenerek Teknesyumla İşaretlenmesi ve Kanser Görüntüleme Ajanı Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması", Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 7 Mayıs 2010.

E2.2. "Kanserde Kişiselleştirilmiş Terapi", Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 17 Mayıs 2013.

E2.3. "Kanser Hücrelerine hedefli Biyomimetik ilaç taşıma sistemlerinin hazırlanması, karakterizasyonu ve biyopotansiyelinin araştırılması", Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü, 20 Mart 2015.

E3. Katılınan Ulusal ve Uluslararası Yaz Okulları, Eğitimler ve Yarışmalar

- E3.1.** Kanser Biyokimyası Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 2 Mart 2007.
- E3.2.** ISO 9001-2000 Kalite Yönetim Sistemi Eğitim Semineri, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 12-13 Mayıs 2007.
- E3.3.** Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 7 Mart 2008.
- E3.4.** Oksidatif Stres, DNA Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 13-17 Ekim 2008.
- E3.5.** Kök Hücre Sempozyumu, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 16 Mart 2009.
- E3.6.** Yapay Doku ve Organ Sempozyumu: Artan Organ İhtiyacına Güncel Yaklaşımlar, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 27 Ekim 2009.
- E3.7.** Kanser Çalıştayı, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 8 Mart 2010.
- E3.8.** Kanser Biyolojisinde Güncel Konular Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 31 Mayıs– 3 Haziran 2011.
- E3.9.** UHPLC Kromatografiye giriş, HPLC, Kolonlar ve Uygulama Teknikleri, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, 27 Nisan 2012.
- E3.10.** 2. Ege Ar-Ge ve Teknoloji Günleri, Arege 2 Patent, İzmir, 28-30 Kasım.2012.
- E3.11.** Elektroforez, Spektrometri ve Spektroskopi temelli proteomik analizler kursu, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, 26-27 Haziran 2013.
- E3.12.** Bilimde Etik, Türk Biyokimya Derneği İzmir Şubesi, 4 Kasım 2013.
- E3.13.** Onkolojide Nano-Tıp Uygulamaları Kursu (18. Ege Onkoloji Günleri kapsamı), Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, 7 Kasım 2013.

- E3.14.** Tübitak Proje Çağrılarına Etkin Proje Yazım Eğitimi, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Teknoloji Transfer Ofisi, 20-22 Kasım 2013.
- E3.15.** Medikal Tekstillerde Biyokimyasal Yaklaşımlar, Türk Biyokimya Derneği İzmir Şubesi, 19 Mart 2014.
- E3.16.** Turkish-German Workshop on Bioinformatics: Recent Developments from Health to Nanotechnology, Kuşadası-Aydın, 19-22 Ekim 2014.
- E3.17.** V3WW (Mini Protean Tetra Cell, Trans Blot Turbo, Chemi Doc Imaging System with LEDs), PDQuest Advanced Analysis Software, i12IEF System (BIORAD) Eğitimi, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi (ARGEFAR), 18-19 Ağustos 2014.
- E3.18.** Proteon XPR36 System (BIORAD) Eğitimi, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi (ARGEFAR), 18-19 Kasım 2014.
- E3.19.** 3.Ege Ar-Ge ve Teknoloji Günleri, Arege 3 Patent, İzmir, 11-12 Aralık 2014.
- E3.20.** 7.Geleneksel Bilim ve Teknoloji Sempozyumu: Kişiye Özgü İlaç Tedavisi, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Teknoloji Transfer Ofisi, 28 Mart 2015.
- E3.21.** Yaşam Bilimleri ve Sağlık Proje Yarışması, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biotıp ve Genom Merkezi, 9-10 Eylül 2015.

F. DİĞER GÖREVLER

F1. İdari Görevler

- F1.1.** Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme ve Farmakokinetik Araştırma Uygulama Merkezi (ARGEFAR), Faz Öncesi Araştırmalar Birimi, Araştırmacı, 2013- devam ediyor.
- F1.2.** Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Stratejik Planlama Alt Kurulu Üyesi, 2013- devam ediyor

F2. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler

F2.1. Türk Biyokimya Derneği

F2.2. Biyokimyagerler Derneği

F2.3. Moleküler Kansere Araştırma Derneği

F2.4. European Association of Cancer Research

G. PATENT/FAYDALI MODEL BAŞVURULARI

G1. “Over Kanseri Tedavisinde Biyomimetik İlaç Taşıyıcı Ajan” başlıklı çalışma ile Ege Üniversitesi EBİLTEM Teknoloji Transfer Ofisi’ne buluş bildirimi, 23 Aralık 2013.