

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DOKSORUBİSİN YÜKLÜ HYALURONİK ASİT
NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU VE FARKLI KANSER
TÜRLERİNDE UYGULANABİLİRLİĞİNİN *IN VITRO*
ARAŞTIRILMASI**

Ümmühan Fulden BOZKAYA

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Biyokimya Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 06.08.2018

Bornova-İZMİR

2018



Ümmühan Fulden BOZKAYA tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan "DOKSORUBİSİN YÜKLÜ HYALURONİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE FARKLI KANSER TÜRLERİNDE *IN VITRO* UYGULANABİLİRLİLİĞİNİN 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 06.08.2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavında oy birliği/oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. Seray Sönel

.....
.....

Raportör Üye

: Doç. Dr. ALKE DİNGER

.....
.....

Üye

Prof. Dr. Feri AKTILANIZ

.....
.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Doksorubisin Yüklü Hyaluronik Asit Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Farklı Kanser Hücre Hatlarında Uygulanabilirliğinin *in vitro* Araştırılması” başlıklı 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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite ve diğer başka bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlamasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06.08.2018

Ümmühan Fulden BOZKAYA





ÖZET**DOKSORUBİSİN YÜKLÜ HYALURONİK ASİT
NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ KARAKTERİZASYONU VE
FARKLI KANSER TÜRLERİNDE *IN VITRO*
UYGULANABİLİRLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

BOZKAYA, Ümmühan Fulden

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

06.08.2018, 57 Sayfa

Kanser, Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre dünyada çapındaki ölümlerin ikinci sebebidir. Günümüzde kanser tedavisine yönelik çeşitli terapi stratejileri geliştirilmektedir. Yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemlerinin neden olduğu yan etkiler ve kısıtlamalar yeni tedavi yöntemlerin geliştirilmesine öncülük etmektedir ki bu amaçla ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada ilaç taşıyıcı sistem olarak hyaluronik asit nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olup, antikanser özellik göstermesi amacıyla bu nanopartiküllere doksorubisin yüklenerek farklı kanser hücre hatlarında sitotoksik etkisi incelenmiştir. Yalnızca hyaluronik asit kullanılarak oluşturulan nanopartiküller yeterli verimde, yeterince hızlı ve kolay üretilmediği için kitosan ile modifiye edilerek hyaluronik asit nanopartiküller hızlı ve başarılı bir şekilde oluşturuldu. Oluşturulan nanopartiküller için optimum hyaluronik asit konsantrasyonu 0.01 mg/mL, optimum ilaç yükleme pH'ı 8 ve konsantrasyonu 1.5 mg/ml olarak belirlendi. SKOV-3 ve A549-Luc hücre hatları için nanopartiküler sistemin IC₅₀ değeri sırasıyla 48 ve 72 saat için 0,002 ± 0,00265 µg/ml ve 0,00078 ± 0,00066 µg/ml ve 0,84 ± 0,69 µg/ml ve 0,29 ± 0,066 µg/ml olarak tespit edildi.

Sonuç olarak, hyaluronik asit nanopartiküllerin farklı kanser hücre hatlarında doksorubisin taşıyıcısı olarak potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Hyaluronik asit nanopartikül, Hedeflendirilmiş Kanser Tedavisi, İlaç Taşıyıcı Sistem, Doksorubisin



ABSTRACT**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF DOXORUBICIN LOADED
HYALURONIC ACID NANOPARTICLES AND IN VITRO STUDIES OF
THEIR APPLICATION FOR DIFFERENT CANCER TYPES**

BOZKAYA, Ümmühan Fulden

Master of Science Thesis, Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

06.08.2018, 57 pages

According to World Health Organization data, cancer is the second cause of deaths worldwide. Nowadays, lots of different and modern cancer therapy strategies are being developed. Even though current therapy strategies are usually used, they cause too much adverse effects and had restrictions during treatment, thus, new methods for therapy needs to be developed, thus drug delivery systems are also built up.

In this study, synthesis and characterization of hyaluronic acid nanoparticles aimed at targeted cancer therapy were carried out and its anticancer properties were provided with loading doxorubicin which is antineoplastic agent. Afterwards, cytotoxicity of synthesized doxorubicin loaded hyaluronic acid nanoparticles was evaluated by performing in vitro studies with different cancer cell lines. Hyaluronic acid nanoparticles couldn't be prepared with enough yield and quick, thus nanoparticles were synthesized via hyaluronate-chitosan combination. Optimum pH value of prepared chitosan combined hyaluronic acid nanoparticles was found 8. IC₅₀ values of doxorubicin loaded chitosan combined hyaluronic acid nanoparticles were 0.002 ± 0.00265 µg/ml and 0.00078 ± 0.00066 µg/ml, and 0.84 ± 0.69 µg/ml ve 0.29 ± 0.066 µg/ml for 48 and 72 hours for SKOV-3 and A549-luc cell lines respectively.

As a result, it is considered that doxorubicin loaded hyaluronate nanoparticles would have a potential for being drug carrier for different cancer cell lines.

Keywords: Hyaluronic Acid Nanoparticle, Targeted Cancer Therapy, Drug Delivery System, Doxorubicin



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca aile ilgisi ve şefkatiyle desteğini, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen sayın Prof. Dr. Şenay ŞANLIER'e, bir abla sıcaklığıyla her ihtiyacıma koşan sevgili Dr. Güliz AK'a, bütün inanç, sevgi ve ilgileriyle her an yanımda olan aileme, bana can yoldaşlığı eden Serkan AYDIN'a, güler yüzüyle desteğini esirgemeyen Buket ÖZEL'e ve bıkmadan usanmadan benim için endişelenip merak eden, daima yanımda olan arkadaşlarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 17 FEN 004 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	VII
ABSTRACT	IX
TEŞEKKÜR	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVI
TABLolar DİZİNİ	XIX
SİMGELER VE KISALTMALAR	XX
1. GİRİŞ	1
1.1. KANSER	1
1.2. TÜMÖR MİKROÇEVRESİ	1
1.4. İLAÇ HEDEFLEME	3
1.5. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER	8
1.6. HYALURONİK ASİT	15
1.6.1. Hyaluronik Asit Yapısı Ve Özellikleri	15
1.6.2. Kanserde Hyaluronik Asit	16
1.6.3. Hyaluronik Asit Reseptörü: CD44	16
1.6.4. Hyaluronik Asidin İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Kullanımı	17
1.7. KİTOSAN	19

İÇİNDEKİLER (devam)

1.7.1. Biyomedikal Uygulamalarda Kitosan Temelli Sistemler.....	20
1.7.2. İyonik Jelleşme Yöntemiyle Kitosan Nanopartiküllerin Oluşturulması	21
1.8. HYALURONİK ASİT VE KİTOSAN	22
1.9. DOKSORUBİSİN.....	22
1.10. HÜCRE KÜLTÜRÜ	23
1.10.1. Hücre Kültür Koşulları	25
1.10.2. Hücre Bakımı.....	26
1.10.3. Hücre Kültüründe Sitotoksikite Testleri	26
2. MATERYAL VE METOT	28
2.1. HYALURONİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZLENMESİ.....	28
2.1.1. ORGANİK SOLVENT MİKTARI OPTİMİZASYONU	28
2.1.2. ÇAPRAZ BAĞLAYICI MİKTARI OPTİMİZASYONU	29
2.2. KİTOSAN İLE KOMBİNE EDİLMİŞ HA NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZLENMESİ.....	29
2.3. KİTOSAN İLE KOMBİNE EDİLMİŞ HA NANOPARTİKÜLLERE DOKSORUBİSİN YÜKLENMESİ.....	30
2.3.1. pH Optimizasyonu	30
2.3.2. İlaç Miktarı Optimizasyonu	30

İÇİNDEKİLER (devam)

2.4.	İN VİTRO İLAÇ SALIMI.....	31
2.5.	HÜCRE KÜLTÜRÜ VE İN VİTRO SİTOTOKSİSİTE TESTİ	31
3.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	33
3.1.	HYALURONİK ASİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZLENMESİ.....	33
3.2.	KİTOSAN İLE KOMBİNE EDİLMİŞ HA NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZLENMESİ.....	36
3.3.	KİTOSAN İLE KOMBİNE EDİLMİŞ HA NANOPARTİKÜLLERE DOKSORUBİSİN YÜKLENMESİ.....	39
3.4.	İN VİTRO İLAÇ SALIMI.....	44
3.5.	HÜCRE KÜLTÜRÜ VE İN VİTRO SİTOTOKSİSİTE TESTİ	45
4.	GENEL DEĞERLENDİRME	50
5.	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. EPR etkisi.....	2
Şekil 1.2. Aktif Hedefleme.....	5
Şekil 1.3. Manyetik İlaç Hedefleme.....	7
Şekil 1.4. Bazı nano taşıyıcıların şematik gösterimi. A) Dendrimer yapısı. B) Nanotüp yapısı. C) Katı lipid nanopartikül yapısı. D) Lipozom ve misel yapısı.....	10
Şekil 1.5. Polimerik Nanopartikül Çeşitleri: Nanokapsül ve Nanoküre.....	11
Şekil 1.6. Hyaluronik asitin tekrarlayan disakkarit birimlerinin yapısı.....	15
Şekil 1.7. Kitin ve Kitosanın Yapısı.....	20
Şekil 1.8. İyonik jelleşme yöntemiyle kitosan nanopartiküllerin oluşturulması.....	21
Şekil 1.9. Doksorubisinin kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.1. HA'nın EDC ve ADH ile çapraz bağlanması reaksiyonu.....	29
Şekil 3.1. A) Reaksiyon süresi sonunda açık mavi renkteki nanopartiküller, B) Elde edilen nanopartiküllerin SEM görüntüsü.....	33
Şekil 3.2. Aseton denemesine ait SEM görüntüleri A) 151.29; B) 167.29; C) 183.29 D) 199.29 ml aseton ilavesi.....	34
Şekil 3.3. Çapraz Bağlayıcı Miktarı Optimizasyonu. A) 0.16-0.32 g-g (ADH-EDC) ve B) 1.6-0.32 g-g (ADH-EDC) ile oluşturulan yapılara ait SEM görüntüleri C) 0.4-0.8 g-g (ADH-EDC) ve D) 4-0.8 g-g (ADH-EDC) ile oluşturulan yapıların reaksiyon sonu görüntüleri.....	35

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

- Şekil 3.4. Kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllerin HA optimizasyonuna ait SEM görüntüleri A) 0.05 mg/ml; B) 0.1 mg/ml ve C) 0.2 mg/ml HA ile oluşturulan nanopartiküller.....36
- Şekil 3.5. A) Kitosan, B) Hyaluronik Asit ve C) Kitosan ile kombine edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllere ait FTIR spektrumu.....37
- Şekil 3.6. Kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllere ait boyut dağılım grafiği.....38
- Şekil 3.7. Kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllere doksorubisin yüklemesinde pH' a bağlı adsorpsiyon verimi39
- Şekil 3.8. Doksorubisine ait A) pH 8 B) pH 8.5 ve C) pH 9 spektrum taraması sonuçları.....40
- Şekil 3.9. Doksorubisin yüklü kitosan ile kombine edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllere ait A) SEM görüntüsü, B) Boyut dağılım grafiği.....41
- Şekil 3.10. A) kitosan ile kombine edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllere, B) doksorubisine ve C) doksorubisin yüklü kitosan ile kombine edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllere ait FTIR spektrumu.....43
- Şekil 3.11. In vitro İlaç Salımı A) Kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllere ait salım grafiği B) Serbest doksorubisine ait salım grafiği.....45
- Şekil 3.12. MTT sitotoksisite testine göre 48. saat % canlılık grafikleri A) Serbest doksorubisin B) Doksorubisin yüklü ilaç taşıyıcı sistem.....47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sayfa

Şekil 3.13. MTT sitotoksisite testine göre 72. saat % canlılık grafikleri A) Serbest doksorubisin B) Doksorubisin yüklü ilaç taşıyıcı sistem.....48



TABLolar DİZİNİSayfa

Tablo 3.1. Doksorubisin adsorpsiyonunda ilaç miktarı optimizasyonu. Başlangıç ilaç konsantrasyonuna bağlı adsorplanan ve adsorplanmayan ilaç miktarları ile adsorpsiyon verimi.....42

Tablo 3.2. 48. Ve 72. Saat için A549-luc ve SKOV-3 hücre hatlarında serbest doksorubisinin ve doksorubisin yüklü kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllerin sitotoksosite testi sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri.....46



SİMGELER VE KISALTMALARSimgelerAçıklamalar

mm ³	milimetreküp
nm	nanometre
µm	mikrometre
kDa	kilodalton
mg	miligram
ml	mililitre
°C	santigrat derece
g	gram
%	yüzde
w	kütle
v	hacim
µg	mikrogram
ng	nanogram
MDa	megadalton

KısaltmalarAçıklamalar

PLA	polilaktit
PLGA	polilaktit koglitolit
PGA	poliglitolit
PMMA	polimetil metakiralit

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)KısaltmalarAçıklamalar

PAM

poliakirilamid

PEG

polietilenglikol

HA

hyaluronik asit, hyaluronat

HMW

yüksek molekül kütleli

LMW

düşük molekül kütleli

TPP

tripolifosfat

DNA

deoksiribonükleik asit

ADH

adipik asit dihidrazit

SEM

taramalı elektron mikroskobu

FTIR

fourier dönüşümlü infrared spektrofotometre

EDC

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

DMSO

dimetilsülfoksit



1. GİRİŞ

1.1. Kanser

Dünya Sağlık Örgütü'nün yaptığı tanımlamaya göre, kanser vücutta bulunduğu yere bitişik dokulara yayılabilen ya da diğer organlara sıçrayabilen anormal hücre çoğalmasıyla karakterize edilen büyük bir hastalık grubunu ifade etmektedir. Yokuş ve Çakır (2012), kanseri büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal yayılımı olarak tanımlamaktadır. Kanser multifaktöriyel bir hastalıktır. Kalıtsal ve çevresel faktörler, kimyasala maruz kalım, bazı virüsler ve radyasyon kansere yol açabilmektedir (Yokuş ve Çakır, 2012). Sınırsız sayıda bölünme özelliği ve bölünmenin büyüme faktörlerinden ve nütrientlerden bağımsız olarak devamlı artışı, genetik olarak heterojen yapı, kontakt inhibisyonun kaybı ve metastaz kanser hücrelerinin eşsiz özelliklerindedir (Lowitz and Casciato, 2010).

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılı istatistiklerine göre kanser ikinci ölüm sebebidir ve dünyada kanserden ölen kişi sayısı 8.8 milyondur. Bununla birlikte Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun Türkiye Kanseri İstatistikleri verilerine göre de 2014 yılında erkeklerde en sık görülen kanserler trakea, akciğer ve bronş, daha sonrasında sırayla prostat, kolorektal, mesane, mide ve diğerleri iken kadınlarda ek sık görülen kanserler, meme, tiroid, kolorektal, uterus korpusu, akciğer, mide ve diğerleridir (Türkiye Kanseri İstatistikleri, 2017).

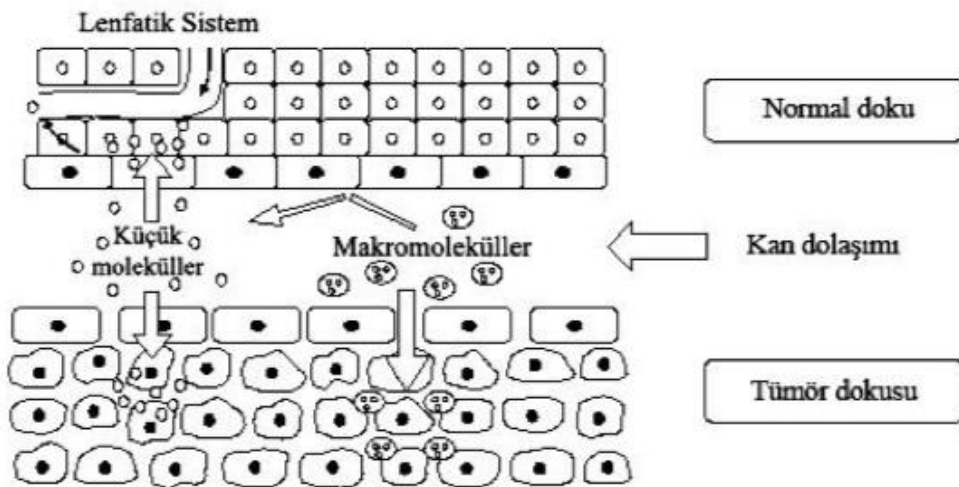
1.2. Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresi normal dokuya göre vasküler anomaliler, oksijenlenme, perfüzyon, pH gibi birçok açıdan farklılık göstermektedir.

1-2 mm³ boyutundaki solit tümörler oksijeni ve besinleri çevresinden basit difüzyonla alabilir. Ancak tümör boyutu 2 mm³ e ulaştığında ya da geçtiğinde hücresel hipoksi başlar ve bu durum anjiyogenezi başlatır. Anjiyogenez mevcut damarlardan yeni bir kan damarının oluşturulması olarak tanımlanır ve aktivatörler ve inhibitörler tarafından sıkı kontrol altındadır. Anjiyogenez beş fazla açıklanabilir: 1. Endotel hücre aktivasyonu, 2. Taban membran oluşumu, 3 endotel hücre göçü, 4. Damar oluşumu ve 5. Anjiyogenik yeniden modellenme. Bu yeniden

modellenme ile düzensiz biçimlenmiş, aralıklı ve tortiyöz tümör damarı oluşumunu meydana getirmektedir (Danhier et al., 2010).

Tümör dokusundaki kapiller endoteller, aralıklı sıralanımı sayesinde normal doku endotellerine göre çok daha geçirgendir. Tümörün lokasyonuna göre endoteller arası boşluklar 100-800 nm civarında olabilmektedir. Bu durum nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile ilaç taşınımına olanak tanımaktadır. Ayrıca tümör dokusundaki lenfatik direnaj eksikliği de ilacın burada birikimine olanak tanımaktadır. Bu duruma artan geçirgenlik ve alıkoyma (EPR-enhanced permeability and retention) etkisi denir (Ak, 2010). Her ne kadar EPR etkisi kemoterapötik ajanların nanotaşıyıcılar ile taşınması için etkili bir şekilde kullanılabilir olsa da bu etki bazı kısıtlayıcılarla karşılaşmaktadır. Tümör dokusundaki doku arası sıvısının oluşturduğu basınç nano taşıyıcının tümör dokusuna penetre olmasına önemli bir bariyerdir. Bu basınç plazma sıvısının ve proteinlerin kapillerlerden çıkışı ile oluşur ve dokular arasındaki bu yüksek protein içeriği kandan herhangi bir makromolekülün girişini engelleyecek koloidal basıncın gelişmesine neden olmaktadır. Ayrıca tümör hücrelerinin hızlıca büyüyor oluşu lenf damarlarına baskı yaparak dokular arası sıvı drenajının düşmesine ve sıvı basıncının artmasına yol açar. Bunların yanı sıra tümör dokusunun heterojenik bir yapıya sahip oluşu da nanotaşıyıcılar için bir güçlük oluşturabilmektedir. Çünkü nanotaşıyıcıların akümülyasyonu tümör kök hücrelerinin bulunduğu kısımlarda hipovaskülarizasyondan kaynaklı EPR etkisinin zayıflığı nedeniyle çok daha azdır (Kumari et al, 2015).



Şekil 1.1. EPR etkisi (Sayiner ve Çomoğlu, 2016).

Normal dokudaki ve kanser dokusundaki hücreler arası sıvının pH sı birbiriyle aynı iken, tümör dokusunda hücreler arası sıvının pH sı normal dokudan daha düşüktür. Tümör dokusunun hücrelerarası sıvısının pH sı bulunduğu çevreye göre değişebilmekle birlikte ortalama olarak 6-7 civarındadır (Danhier et al., 2010)

1.3. Kanser Tedavisi

Mevcut kanser tedavileri genellikle kanserli dokunun çıkarılması şeklinde gerçekleştirilen ameliyatı, kanser dokusunu küçültmek amacıyla bu ameliyatın öncesinde veya bu ameliyatın sonrasında uygulanan kemoterapiyi ve radyoterapiyi içerir (Brannon-Peppas and Blanchette, 2012). Dünya Sağlık Örgütü de kanser tedavisi yöntemlerini ameliyat, radyoterapi ve sistemik terapi olarak tanımlamaktadır.

Geleneksel kemoterapide ajanlar spesifik olmaksızın hem kanserli hem de normal dokulara dağılmaktadır ki bu durum ajanın kanserli dokuya uygun dozda ulaşmasını engellemektedir. Bunun yanı sıra normal dokularda da toksisiteye yol açmaktadır (Cho et al., 2008).

1.4. İlaç Hedefleme

İlaç hedefleme (akıllı ilaç taşıma) etken maddenin istenen bölgede vücudun diğer bölgelerine oranla daha fazla birikmesini sağlayan tedavi yöntemidir. Bu şekilde tedavinin etkinliğinin artması ve yan etkilerinin azaltılması sağlanmaktadır (Mishra et al., 2016).

Kanser tedavisinde gelişmeler devamlı olarak sürmektedir. Hedeflendirilmiş kanser tedavilerinin çoğu henüz deneyseldir ve diğer kanser tedavi yöntemleriyle beraber kullanılmaktadır (Kanser Dairesi Başkanlığı, 2017). Klinik araştırmalar göstermektedir ki hastalar yaşam ömrünü ve kalitesini artıracak hedeflendirilmiş terapi gibi yeni yöntemlere açıktır.

Hedeflendirilmiş kanser tedavisinin etkinliği doğrudan hedeflendirmeye ve kanser hücrelerini öldürürken sağlıklı hücrelere mümkün olan en az zararı vermesiyle ilişkilidir (Brannon-Peppas and Blanchette, 2012).

Hedefleme için kullanılan iki temel strateji şunlardır: pasif hedefleme ve aktif hedefleme.

Pasif hedeflendirme ilacın istenilen bölgeye taşınması için kanserli doku ile normal doku arasındaki anatomik farklılıklardan yararlanır (Çelik, 2014). Bu hedefleme EPR etkisi ile nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler yardımıyla ilacın istenilen bölgeye ulaşmasını sağlar. Bu ilaç taşıyıcı sistemler anjiyogenezle oluşan damarlardan tümör hücrelerine konveksiyon (büyük moleküllerin geçişi) ve pasif difüzyonla (küçük moleküllerin geçişi) taşınır. Pasif hedeflendirmeyi etkileyen bazı faktörler şunlardır: partikül boyutu, yüzey özellikleri, etken madde yüklenmesi, etken madde salımı.

Partikül Boyutu

Küçük yapıdaki taşıyıcı sistemin yüzey alanı-hacim oranı düşük olduğu için yapısında bulunan ilaç yüzeye daha yakındır. Bu nedenle ilaç daha büyük olanlara göre daha hızlı salınmaktadır.

Yüzey Özellikleri

Hidrofobik yapıda yüzeye sahip taşıyıcı sistemler kan dolaşımında hızla opsonize edilmektedir. Bu nedenle sistemin kan dolaşımındaki sirkülasyon süresinin de artırılması amacıyla yüzeyin hidrofilik gruplar içerecek şekilde modifiye edilmesi gerekmektedir.

Etken Madde Yükleme

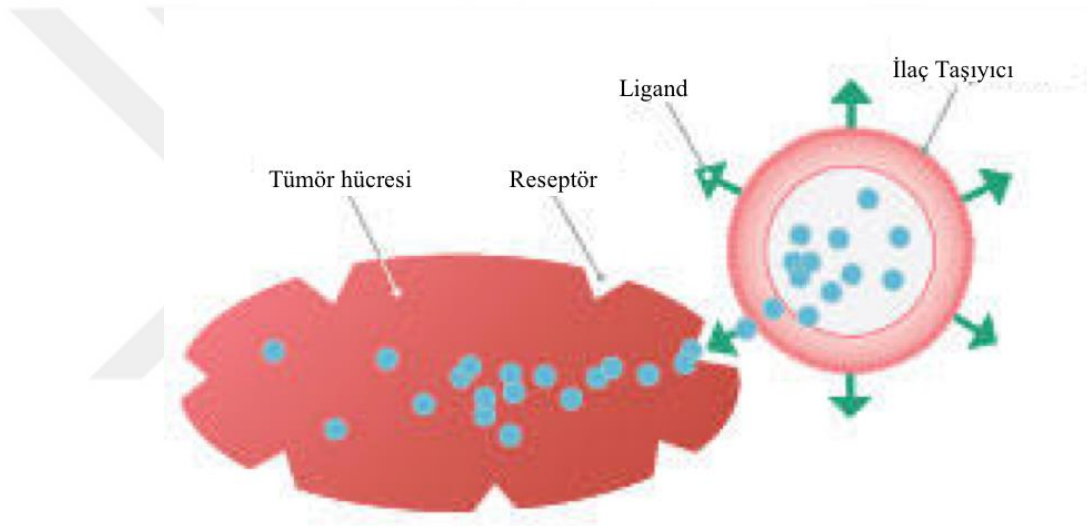
Etken madde yükleme kapasitesi taşıyıcı sistemin matriks kompozisyonuna, molekül ağırlığına, ilaçla etkileşimine, bulundurduğu fonksiyonel gruba vb. bağlıdır.

Etken Madde Salımı

Etken maddenin salımı maddenin çözünürlüğüne, yüzeye adsorbe olmuş ilacın desorpsiyonuna, taşıyıcı sistemin matriksinden difüzyona, matriksin degradasyonu ya da erozyonuna bağlıdır. İlacın ani salımı diğer bir deyişle “burst effect” büyük yüzeye sahip sistemlere zayıf bir şekilde bağlı ya da adsorbe olmuş ilacın neden olduğu bir etkidir.

Ayrıca pasif hedeflendirmede hedeflenen maddenin tümörlü dokuya ulaşımında tümör damarlanması ve dokular arası basınç etkilidir (Sayiner ve Çomoğlu, 2016).

Hedeflendirmede kullanılan diğer bir yöntem aktif hedeflendirmedir. Bu yöntemde hedefleme ligandı ilaç taşıyıcı sisteme tutturulur. Ligand hedeflenmek istenen bölgede aşırı ekprese olan ya da normal dokuda ekprese edilmeyen reseptörün ligandı olarak seçilir. Hedeflenen reseptörün hedef kanser hücrelerinde homojen olarak ekprese ediliyor olması önemli bir kriterdir. Hedefleme ligandları, monoklonal antikorlar, antikor fragmentleri ya da antikor olmayan ligandlar (peptidik ya da diğerleri) olabilir ve hedef doğrudan tümör hücresi olabildiği gibi tümöral endotel de olabilir (Danhier et al., 2010).



Şekil 1.2. Aktif Hedefleme (Tumor-Seeking Nanoparticles, 2018).

Aktif hedeflendirmeyi etkileyen bazı faktörler şunlardır: ligand yoğunluğu, taşıyıcı büyüklüğü ve şekli, yüzey ve ligand yükü.

Ligand Yoğunluğu

Ligand dizilişinin düzensizliği, komşu moleküllerin sterik engellemeleri, reseptöre bağlanmak için yarışmaları vb. gibi durumlar ligandın reseptöre afinitesini değiştirebilmektedir.

Taşıyıcı Büyüklüğü ve Şekli

Küresel yapıdaki taşıyıcılarda küçük boyuttakiler yüzeyde daha fazla kavışma gösterdiği için ligandın bağlanması zorlaşabilmektedir.

Yüzey ve Ligand Yüklü

Pozitif yüklü yüzeye sahip taşıyıcıların negatif yüklü hücre membranı ile spesifik olmayan etkileşimi alımı artırmaktadır. Ligandlar da yüklü moleküller olduğundan ligand yoğunluğu ve materyali taşıyıcı sistemin formülasyonunu da etkilemektedir (Sayiner ve Çomoğlu, 2016).

Pasif ve aktif hedeflendirmenin yanı sıra, hedefleme uyarıcı duyarlı olarak da yapılabilmektedir. Uyarıcı duyarlı hedeflemeler şunlardır: pH duyarlı hedefleme, sıcaklık duyarlı hedefleme, manyetik hedefleme, ışık duyarlı hedefleme, ultrason aracılı hedefleme ve enzim duyarlı hedefleme.

pH Duyarlı Hedefleme

Tümör doku içi sıvısı yüksek aerobik ve anaerobik glikolizden dolayı normal dokuya göre çok daha düşük pH' ye sahiptir. Normal doku pH' si 7.4 iken tümör dokusunun pH' si yaklaşık 6.6 civarındadır. Bu durum ilaç taşıyıcı sistemin ilacı tümörlü dokuda salması için bir avantaj olarak kullanılabilir. Bunun yanı sıra hücre içine alınan taşıyıcı sistem ya da taşıyıcı sistemden salınan ilaç konjugatları lizozomlardaki daha düşük pH özelliğinden (yaklaşık 4.5-5) dolayı kolaylıkla kırılabilir. pH duyarlı ilaç taşıyıcılar fizyolojik pH' de stabil iken düşük pH' lerde bozunup yüklü olan ilacı salabilmektedirler.

Sıcaklık Duyarlı Hedefleme

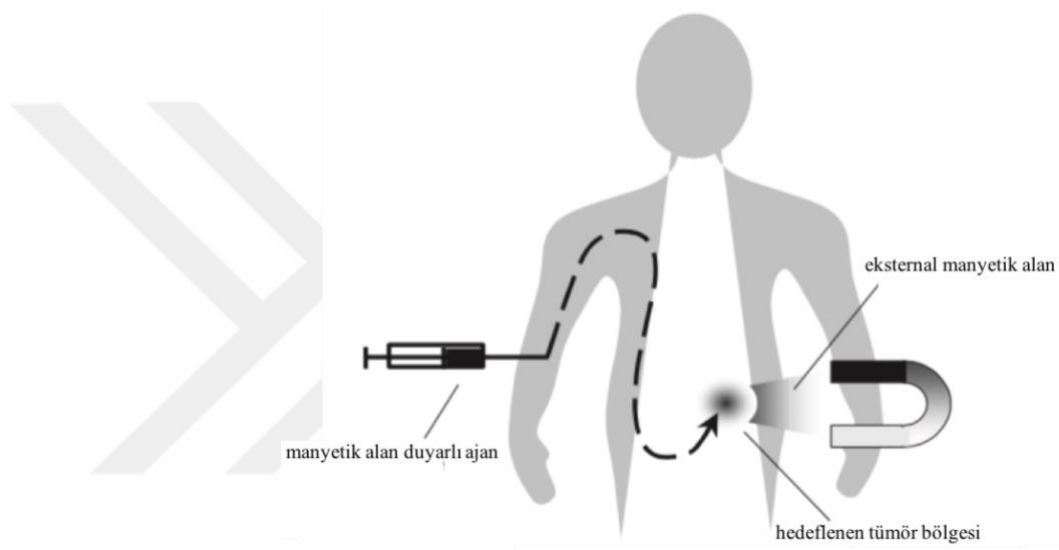
Sıcaklık duyarlı taşıyıcılar genellikle hidrojellerden ve polimerlerden oluşmaktadır ve birçok hidrofobik gruba sahiptirler. Bu taşıyıcıların çözünürlüğünün sıcaklığa bağlı olarak değişmesi ve ilacı salımı söz konusu olmaktadır.

Kanser tedavisinde hipertermi tümör geçirgenliğini ve birçok biyomolekülün tümör içine alımı için kullanılan bir tekniktir. Ancak hiperterminin

kendisinin sitotoksik özelliğinin bulunmasından dolayı tümörlü bölgenin yerinin kesin tespit edilmiş ve ulaşılabilir bir noktada olması gerekmektedir.

Manyetik Hedefleme

Manyetik alan duyarlı taşıyıcılar kemoterapötik ajanları hedeflenen bölgeye manyetik alan uygulanması suretiyle taşıyabilmektedir. Manyetik taşıyıcılar temel olarak demiroksit gibi manyetik materyallerden yapılmaktadır: magnetit, maghemit.



Şekil 1.3. Manyetik İlaç Hedefleme (Douziech-Eyrolles et al., 2014).

Ancak bu inorganik yapıdaki nanopartiküller düşük yükleme kapasitesi ve zorlu ilaç salım gibi kısıtlamalara sahiptir. Tümör dokusunun eksternal manyetik alanın yeterli olamayacağı kadar iç kısımda olması gibi durumlarda internal magnet implantlarının cerrahi operasyon ile yerleştirilmesi gibi çözümler üretilebilmektedir.

Işık Duyarlı Hedefleme

Taşıyıcı olarak lipozomlar, polimerler ve hidrojelcer ultraviyole ya da görünür bölge ışık duyarlı olarak üretilebilmektedir. Bu taşıyıcılar ucuz, güvenli, kolay ulaşılabilir ve kolaylıkla manipüle edilebilir olması dolayısıyla oldukça yararlıdır.

Ultrason Aracılı Hedefleme

Bu hedeflemede tümör dokusuna ultrases maruziyeti ile taşıyıcı sistemin o bölgede sınırlandırılması ve taşınan ilacın tam salımının gerçekleştirilmesi sağlanmaktadır. Bu yöntem non-invaziv olmasına karşın vücudun derinlerine kadar nüfuz edebilen ve böylece frekansın, güç yoğunluğunun, uygulanma süresinin ve döngüsünün kontrol edilmesi suretiyle ilaç taşıma işleminin gerçekleştirilmesine olanak tanıyan bir hedefleme yöntemidir.

EPR etkisi ile pasif hedeflendirmenin ardından uygulanan ultrases hücre membranının geçirgenliğinin değişimi ile yapının hücresel alımını sağlar ve taşıyıcının parçalanması ile de ilaç salımını indükler.

Enzim Duyarlı Hedefleme

Bu hedefleme tümör dokusunda overeksprese olan enzimlerin kullanılarak taşıyıcı sistemin degrade olması ve dolayısıyla terapötik ajanın salınması prensibini temel almaktadır (Arias, 2011).

1.5. İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaç taşıyıcı sistemler terapötik ajanların hedeflendirilmiş ya da kontrollü taşınması amacıyla hazırlanan sistemlerdir (National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, 2016).

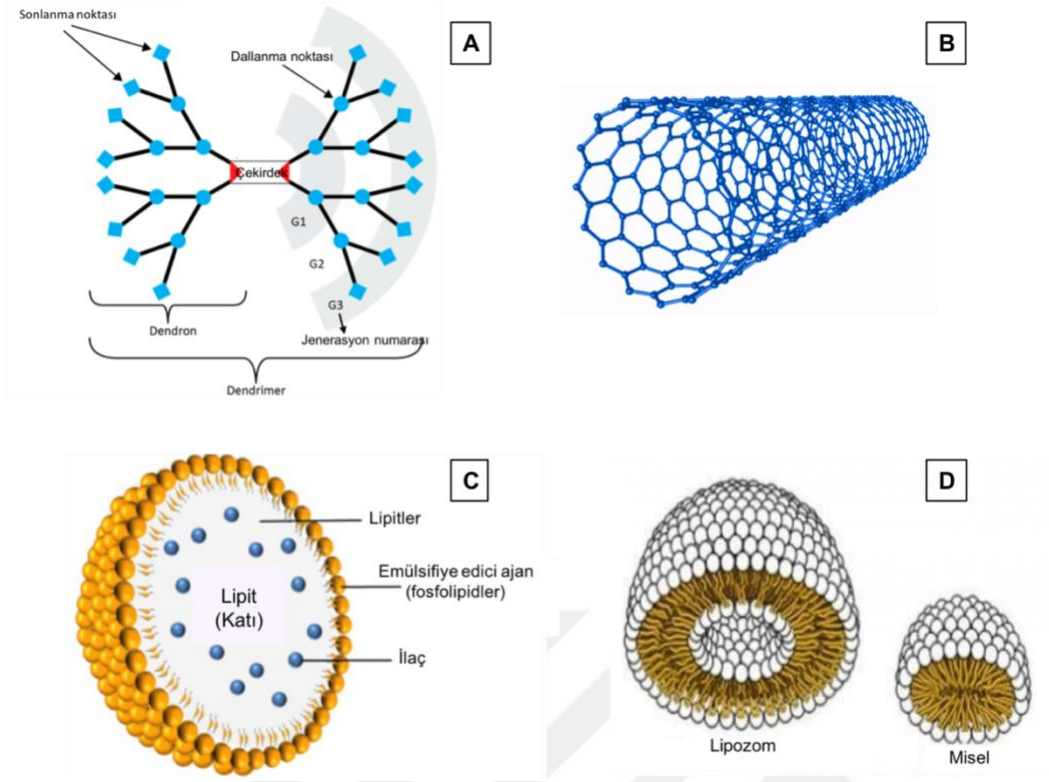
Yeni bir ilaç molekülünün geliştirilmesi oldukça pahalı ve zaman alıcı bir yöntemdir. Mevcut ilaçların yeni yöntemlerle iyileştirilmesi ile kontrollü, yavaş ve hedefli taşınım sağlanabilir. İlaç taşıyıcı sistemler temel olarak etkinliğin artırılması ve/veya antikanser ajanların toksisitesinin azaltılmasını sağlayabilir (Tiwari et al., 2012). Bunun yanı sıra geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemler sayesinde sağlanan kontrollü ilaç salınımı ilacın yarı ömrünün uzamasına, hedefe yönelik oluşu etkinliğinin artmasına ve dolayısıyla hastanın tedavisi süresindeki refahının artmasına olanak tanır. Ayrıca kullanımda olan birçok ilaç hedef hücrelere ulaşma aşamasında kan-beyin bariyeri gibi bazı bariyerleri aşma güçlüğü ya da hidrofobik yapı ve düşük çözünürlük dolayısıyla istenen etkinliğin sağlanamaması gibi bazı kısıtlamalara sahiptir (Tüylek, 2017). İlaç taşıyıcı sistemler ile bu gibi sorunlar çözülmeye çalışılmaktadır.

Taşıyıcıların genellikle boyutları nanometre ya da mikrometre civarında olmakla birlikte kanser tedavisinde kullanılan nanopartiküllerin boyutu 1-1000 nm arasında değişebilmektedir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Yüklü kemoterapötik ajanın terapötik indeksinin konvensiyonel dozaj formuna oranla artırılması
- Uzun süreli kararlı yapı ile ilaç etkinliğinin daha geniş periyoda uzatılabilmesi
- Kontrollü ilaç salımı ile toksisitenin azaltılması ve ilacın çözünürlüğünün ve stabilitesinin artırılması dolayısıyla ilaç farmakokinetiğinin artırılması

Bunun yanı sıra nano taşıyıcılar boyutlarından dolayı EPR etkisi ile tümör hedeflemeye, çeşitli yüzey modifikasyonlarına, birden fazla sinerjistik etki gösteren ilacın taşınımına uygundur.

En sık kullanılan nano taşıyıcılar şunlardır: polimerik nanopartiküller, miseller ya da dendrimerler, lipozomlar, katı lipid yapıları, altın nanopartiküller, karbon nanotüpler, hidrojel ve manyetik nanopartiküller (Khadobandehloo et al., 2016; Kumari et al., 2015).

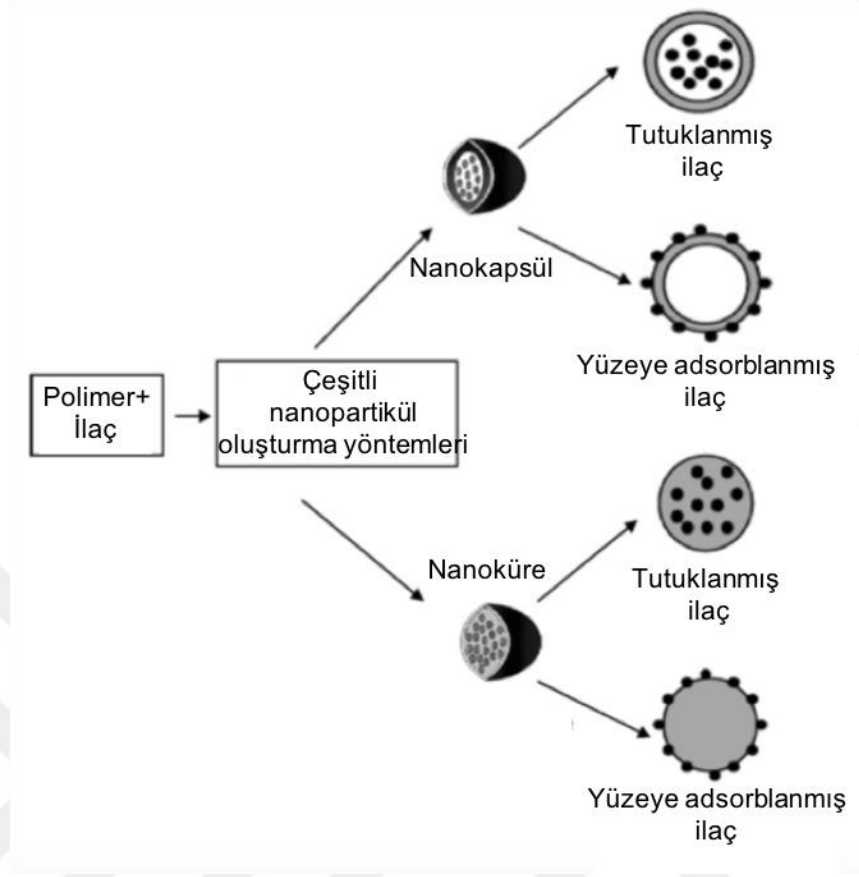


Şekil 1.4. Bazı nano taşıyıcıların şematik gösterimi. A) Dendrimer yapısı (Arseneault et al., 2015). B) Nanotüp yapısı (Cumar, 2015). C) Katı lipid nanopartikül yapısı (Lin et al., 2017). D) Lipozom ve misel yapısı (Manokaran, 2016).

Polimerik Nanopartiküller

Doğal ya da sentetik polimerlerden oluşan ve ilacın nanopartikülün içine hapsedilmesi, tutturulması ya da adsorblanması gibi yöntemlerle yüklenmesiyle elde edilen yapılardır (Khadobandehloo et al., 2016). Biyobozunur ya da biyobozunmaz yapıda olabilirler. Polimerik nanopartiküller genellikle immünojenik reaksiyonların azaltılması amacıyla iyonik olmayan sürfaktanlarla kaplanır. Biyobozunur yapıdaki polimerik nanotaşıyıcılar vücutta hidrolize edilerek metabolit monomerlere dönüştürülebilirler (Wilczewska et al, 2012).

Polimerik nanopartiküllerin iki tipi vardır: nanokapsüller ve nanoküreler. Nanokapsüller veziküler yapıdaki sistemlerdir. İlaç sulu olan ya da sulu olmayan haldeki sıvı iç kısma hapsedilirken çevresi katı haldeki polimerik kılıfla kaplanır. Öte yandan nanoküreler polimerik küresel kütleler olarak tanımlanabilir. İlaç küre merkezine tutuklanabilir ya da kürenin dışında polimere adsorblanabilir.



Şekil 1.5. Polimerik Nanopartikül Çeşitleri: Nanokapsül ve Nanoküre (Kumari et al., 2010).

Polimerik nanopartiküllerin oluşturulmasında en çok kullanılan doğal polimerler jelatin, kitosan, aljinat, albümin vb. dir. Bunun yanı sıra en çok kullanılan sentetik polimerler ise; polilaktit (PLA), polilaktit koglikolit (PLGA), poliglikolit (PGA), polimetil metakiralit (PMMA), poliakirilamid (PAM), polietilenglikol (PEG) vb. dir.

Polimerik nanopartiküllerin avantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Küçük partikül boyutundan dolayı küçük kapillerlerden geçerek hücrelere alınırlar.
- Biyobozunur polimerlerin uzun haftalar süren periyotlarda etkin madde salımı gerçekleştirebilmeleri mümkündür ve bu yapıdaki nanopartiküller ilaçların, peptit ya da diğer yüklü maddelerinin stabilitelerinin artmasını sağlarlar.
- Kolaylıkla sterilize edilebilirler.

- Fizyolojik ortamda parçalanabilirler ve parçalanma ürünleri toksik değildir.
- Etken madde yükleme kapasiteleri yüksektir.
- Polimerik yapıları sayesinde etken maddenin hedeflendirilmesi, salımı ve kontrolü mümkündür.
- Biyolojik sıvılarda diğer kolloid taşıyıcı sistemlere göre daha yüksek stabiliteye sahiptirler.
- Nanopartikül dispersiyonları ekstra bir çözücüye ihtiyaç duyulmaksızın parenteral yollarla kolayca uygulanmaya olanak tanır.
- Üretim teknikleri genellikle kolaydır (Derman vd., 2013).

Dendrimerler

Dendrimerler yapı ve boyut bakımından iyi tanımlanmış çok dallanmış yapılardır. Dentritik yapı biyolojik sistemlerde sıkça gözlenen bir yapıdır: glikojen, amilopektin vb (Kumari et al., 2015).

Dendrimer yapısı lineer bir polimerin aksine çekirdek, dendron ve aktif yüzey gruplarını içerir. Çekirdek iki veya daha fazla fonksiyonel gruba sahip bir atom ya da molekül olabilir ki dendronlar (dendrimer kolları) buraya tutturulur. Dendrimerin biyoyumlu olup olmadığı ya da fizikokimyasal özellikleri aktif yüzey gruplarınca belirlenir. Çekirdek, dendron ve yüzeydeki fonksiyonel grupların seçimi dendrimerin medikal uygulamalarda kullanılabilirliğini etkilemektedir. Ayrıca dendrimerin sitotoksitesi ve polivalansı da biyomedikal uygulamalarla ilişkilidir. Polivalans terimi dendrimer yüzeyindeki aktif grupları ifade eder. Dendrimerin sitotoksitesi çekirdek materyaline ve dendrimer yüzeyine bağlıdır. (Wilczewska et al, 2012).

Katyonik yapıdaki dendrimerler genellikle hemolitik ve sitotoksiktir. Bu yapıların toksisitesi jenerasyon sayısına bağlıdır ve yüzey grubu sayısı arttıkça artar. Katyonik dendrimerlerin kan dolaşımından hızla temizlendiğine dair göstergeler olmasına karşın anyonik dendrimerlerin daha uzun sirkülasyon sürelerinin olduğu bilinmektedir. Daha az jenerasyon sayısına sahip anyonik dendrimerler kan dolaşımında daha uzun süre kalmaktadırlar (Khodabandehloo et al., 2016).

Miseller ve Lipozomlar

Miseller, amfifilik sürfaktan konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve iyon şiddeti gibi parametreleri kapsayan uygun koşullar altında kendiliğinden oluşan tek tabakalı, hidrofobik bir çekirdek ile hidrofilik kabuktan oluşan nano boyutlu sistemlerdir (Kumari etl al., 2015). Hidrofobik özellikli çekirdek kısmına lipofilik molekülleri yükleyebilme özelliğinden dolayı suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların çözünürlüğünü artırma amaçlı kullanılabilirler (Khodabandehloo et al., 2016). Misel yapısının hidrofilik karakterli kabuk kısmı miseli suda çözünür hale getiren kısmı oluşturmaktadır (Singh and Jr. Lillard, 2008).

Lipozomlar, katmanlı fosfolipidlerden meydana gelen sulu faz içeren yapılardır (Yurdakul ve Atav, 2007). Yapısal olarak biyolojik membranlara benzemektedirler ve küresel yapıdadırlar. Temel yapılarının hücre membranına çok benzemesi nedeniyle in vitro çalışmalarda model membran olarak ve ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirler (Bozkır ve Koçyiğit, 1995). Lipozomlar çapı 20 nm'den 20 µm'ye kadar değişebilen boyutlarda olan bir veya birden fazla çift tabakalı katmanlar halinde bulunabilen yapılardır. Lipozomlara enkapsüle edilen ajanların içinde buldukları sistemle etkileşimlerinin kesilmesi sayesinde gerçekleşebilecek bozulma reaksiyonlarının engellenebilmesi ve aktif ajanların kontrollü salımının gerçekleştirilebildiği gözlenmiştir.

Lipozomların kullanımında bazı kısıtlamalar meydana gelebilir. Lipozomlar çok kıvrımlı olmadıkları durumlarda daha düşük enerjili oldukları için biraraya gelip birleşme ve kıvrımları azaltma eğilimine girerler. Bu da partikül boyutunun zamanla artmasına ve çökelmelerine neden olur (Kırtıl ve Öztıp, 2014).

Katı Lipit Yapıllar

Katı lipit nanopartiküller 50-1000 nm boyutlarında oda sıcaklığında katı halde bulunan ve fizyolojik lipitlerden oluşan taşıyıcılardır. Oda sıcaklığında katı halde bulunmalarından dolayı bu taşıyıcılar içerdikleri ilaçların hareketliliğini azaltır ve kontrollü ilaç salımı sağlarlar (Mühlen et al., 1998). Katı lipit nanopartiküller lipofilik bileşenlerin çözünürlüğünü artırabilir, immünojenik değildir ve biyobozunurdur (Venishetty et al., 2013).

Altın Nanopartiküller

Altın taşıyıcılar, tiyol (-SH) gruplarıyla fonksiyonelleştirilebilen altın atomlarından oluşan çekirdeği içerir. Altın taşıyıcılar tiyol içeren grupların altın atomları çevresinde belirli bir altın/tiyol sitokiyometrik oranı doğrultusunda ve NaBH₄ kullanılarak altın tuzunun indirgenmesine dayalı olarak da üretilir (Khodabandehloo et al., 2016).

Karbon Nanotüpler

Karbon nanotüpler yapısal olarak benzen halkalarından oluşan fulleren ailesinin bir üyesidirler (Khodabandehloo et al., 2016). Hücre içine iğnemi bir şekilde penetre olup molekülleri sitoplazmaya taşır. Yapısal olarak bu taşıyıcılar grafen tabakalarının yuvarlanıp tüp oluşturmuş hali gibi görülebilir. Yapıdaki grafen tabakalarının sayısına bağlı olarak tek duvarlı ya da çok duvarlı olabilirler (Kumari et al., 2015) ve biyouyumlulukları yüzeyin kimyasal modifikasyonu ile artırılabilir (Wilczewska et al., 2012).

Hidrojeller

Hidrojeller, suyla yüksek oranda şişen polimer ağlarıdır. Bazı araştırmacılar hidrojelleri suda şişen, bir ya da birden fazla monomerden oluşan çapraz bağlanmış polimerik ağlar olarak tanımlarken, bazıları da şişme kabiliyetine sahip ancak suda çözünmeyen polimerik materyal olarak tanımlamaktadır. Hidrojelin su absorblama kabiliyeti, polimerik iskelete bağlı hidrofilik fonksiyonel gruplardan kaynaklanırken çözünme direnci de ağ zincirlerindeki çapraz bağlanmalardan kaynaklanmaktadır (Ahmed, 2015). Hidrojellerin poröz yapısı ilaç yüklenmesine ve salımına olanak tanımaktadır. Hidrojelden ilacın salımı birkaç farklı yolla gerçekleşebilir: kontrollü difüzyon, kontrollü şişme, kimyasal yapısının kontrolü ve çevre duyarlı salım (Calo and Khutoryanskiy, 2015).

Manyetik Nanopartiküller

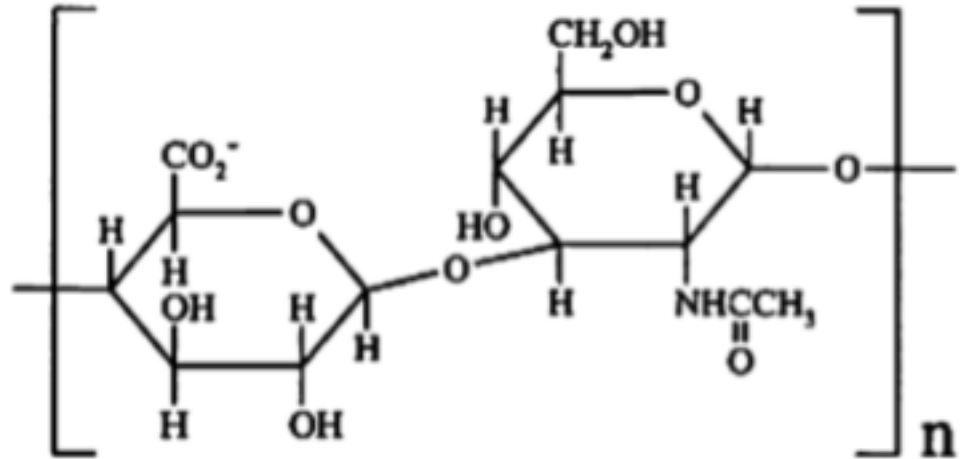
Manyetik nanopartiküller ilaç taşınmasında oldukça önemli rol oynayan yapılardır. Eksternal manyetik alanla kontrol edilebilir oluşları, aktif ve pasif

hedeflemeye uygun oluşları, MRI (Magnetic Resonance Imaging) ile kolaylıkla görüntülenebiliyor oluşları bu ilaç taşınımı için kullanılıyor olmalarında önemli faktörlerdendir. Manyetik özelliklerine göre saf metaller (kobalt, nikel, demir vb.) ve onların alaşımları ve oksitleri şeklinde ayrılırlar (Wilczewska et al., 2012).

1.6. Hyaluronik Asit

1.6.1. Hyaluronik Asit Yapısı Ve Özellikleri

Hyaluronik asit (HA, hyaluronan, sodyum hyaluronat) ekstraselüler matriksin ve sinoviyal sıvının temel bileşenidir. N-asetil-D-glukozamin ve D-glukuronik asidin β -(1→4) ve β -(1→3) glikozidik bağlarla bağlanması sonucu oluşan disakkarit birimlerin tekrarlanması sonucu oluşur (Kogan et al., 2007).



Şekil 1.6. Hyaluronik asitin tekrarlayan disakkarit birimlerinin yapısı (Kogan et al., 2007).

HA biyobozunur, biyoyumlu olan, immünojenik ya da toksik olmayan ve bu sebeplerle birçok biyomedikal uygulamada kullanılabilen bir glikozaminoglikandır. Kütlece çok geniş bir aralıkta (20-4000 kDa) bulunabilir. Bu geniş aralık farmakolojik formülasyonlarda kullanımında avantaj sağlayabilmektedir. HA oldukça hidrofilik olup çevresindeki su molekülleriyle hidrojen bağı yapar ve sulu çözeltisinde rastgele coil oluşumu söz konusudur. Bu

konformasyonel değişiklikler özellikle yüksek moleküler kütleli olmasıyla ilişkilidir ve sulu çözeltisi oldukça viskoz ve elastiktir.

Yapısında bulunan karboksil gruplarının pKa değeri 3-4 civarındadır ve fizyolojik koşullarda yani pH 7.4'te iyonize haldedir ve polianyonik yapıdadır. Ayrıca yapısında bulunan bu karboksil ve hidroksil grupları sayesinde çapraz bağlama reaksiyonlarına elverişlidir (Tripodo et al., 2015).

1.6.2. Kanserde Hyaluronik Asit

1970 lerde yapılan bir çalışmaya göre (Toole et al., 1979) HA ile tümör invazyonu arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Buna göre invaziv tümörlere bitişik olan dokulardaki HA konsantrasyonu invaziv olmayan tümörlerin yanındakilere göre çok daha yüksek tespit edilmiştir. Bazı tümörlerde, bu anormal HA artışının komşu kanser hücrelerle etkileşen fibroblast hücrelerindeki aşırı HA üretiminden kaynaklandığı bulunmuştur. Bunun yanı sıra kanser hücreleri kendisi de HA'yı aşırı miktarda üretebilmektedir. Bu nedenle mesane kanseri gibi bazı kanser türleri için HA marker olarak iş görmektedir. HA üretimindeki az miktarda artışın tümör gelişimini desteklediği buna karşın aşırı HA üretiminin ise tümör büyümesini baskıladığı görülmüştür. Endojen HA ile hücre yüzey glikoproteinlerinin etkileşimi ve yıkılması birçok intraselüler sinyal yolağını indükleyebilmektedir. Özellikle HA - protein bağlanmalarındaki karışıklığın tümör büyümesini ve metastazı inhibe ettiğine dair kanıtlar vardır. Düşük molekül ağırlıklı (LMW) HA oligomerleri hyaluronik asit-protein bağlanmasını bozabildiği için, LMW HA tedavisi melanoma, glioma gibi bazı kanser türlerinde büyüme ve metastazı önlemektedir. Ancak LMW HA fragmentlerinin (20-30 sakkarit birimi içeren) tümör anjiyogenezini indükleyebildiği tespit edilmiştir. Buna karşın yüksek molekül kütleli (HMW) HA moleküllerinin ise anjiyogenezini durdurduğu görülmüştür. Kısacası HA'nın tümör gelişimine olan etkisi molekül kütlesiyle ilişkilidir (Choi et al., 2011).

1.6.3. Hyaluronik Asit Reseptörü: CD44

CD44 hematopoetik hücrelerde, fibroblastlarda ve birçok kanser hücresinde bulunan hücre yüzey glikoproteinidir. İlk kez gp85 olarak tanımlanmış ve plasenta hücrelerinde hyaluronik asit reseptörü olarak iş yaptığı görülmüştür. CD44' ün HA

bağlama bölgesi olan amino-terminali her zaman HA bağlamayabilir. CD44' ün HA bağlaması hücre spesifiktir ve CD44'ün aktivasyon durumuna bağlıdır. CD44' ün yedi adet domaini bulunur: ekstraselüler, membran içi ve sitoplazmik Ekstraselüler kısımda, korunmuş bir dizi basit artık bulunduran iki bölge vardır ve bu bölgeler HA bağlanmasında sorumlu motifi oluşturur. Bu motif de RHAMM' ı da içeren HA bağlama proteinlerini bulundurur. Bu motifteki söz konusu iki bölge arasındaki disülfid köprüleri HA bağlanmasında önemli rol oynar.

CD44'ün HA ile etkileşimi için öncelikle aktive edilmesi gerekmektedir. Genellikle CD44 reseptörü küçük boyuttaki HA fragmentleriyle etkileşmesine rağmen, ekstraselüler matriksteki HMW HA'nın parçalanmasıyla oluşan küçük HA fragmentleri de CD44' e bağlanabilmektedir. Aktiflenmiş CD44 reseptörü solit tümörlerde overeksprese edilmektedir. CD44'ün aktif olmayan formdan HA bağlayan aktif forma geçebilmesi için ekstraselüler domainin glikozilasyonu ya da sitoplazmik domaninin serin artıklarının fosforilasyonu gibi posttranslasyonel modifikasyona ihtiyaç vardır.

Malign kolon, prostat ve meme hücrelerinde HA-CD44 etkileşimi birçok reseptör tirozin kinazı aktive eder. HA-CD44 etkileşimi ile reseptör tirozin kinaz aktivasyonu anti-apoptotik hücre yaşam proteinlerinin aktivasyonu üzerinde etkilidir. Ayrıca HA-CD44 bağlanması ilaç taşıyıcılarının ekspresyonunu düzenler (Misra et al., 2015).

1.6.4. Hyaluronik Asidin İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Kullanımı

HA-İlaç Konjugatları

Genel olarak polimer-ilaç konjugatları küçük bir ilaç molekülüyle suda çözünebilir polimerin kırılabilir bağlayıcılarla kovalent olarak konjuge edilmesiyle oluşturulur. Bu konjugatlar oluşturularak çözünürlük, farmakokinetik profil ve yarı ömür artırılır. Konjugasyonu sağlayan bağlayıcılar kan dolaşımında stabil olmasına karşın hedeflenen bölgeye geldiklerinde hidrolizle ya da enzimatik degradasyonla kırılır. Bu konjugatlar EPR etkisini kullanılarak tümör bölgesinde akümüle olabilirler.

Polimer-ilaç konjugatlarının oluşturulması için polimerde yeterli düzeyde fonksiyonel grup olması gerekmektedir. HA iskeletinde mevcut olan birden fazla

karboksil ve hidroksil grubuyla bir ilaç ile kimyasal olarak modifiye edilmeye uygundur.

Luo ve Prestwich, 1999, oldukça hidrofobik bir anti kanser ilaç olan paclitaxeli, adipik asit dihidrazit kullanarak HA ile konjuge etmiş ve bu konjugatın sitotoksitesini HA reseptörünün overeksprese edildiği kanser hücre hatlarında seçici olarak araştırmış ve bu hücre hatlarında sitotoksik olduğunu görmüştür.

HA Temelli Kendiliğinden Oluşan Nanopartiküller

Amfifilik yapıdaki polimerler kendiliğinden nanopartiküler form oluşturmaları ve böylece kabuk-çekirdek yapısına sahip olmaları dolayısıyla ilaç taşımada büyük dikkat çekmektedir. İç kısımda kalan hidrofobik çekirdek non-kovalent ilaç enkapsülasyonu için kullanılabilir. Hidrofobik kısımların artırılması partikül boyutunun küçülmesini sağlamaktadır. Dışta kalan hidrofilik kabuk ise spesifik olmayan bağlanmaların ve hücre içine alımların ve istenmeyen protein adsorpsiyonlarının önlenmesinde etkilidir (Choi et al, 2012).

HA Modifikasyonu ile Elde Edilen Mikro ya da Nanopartiküller

HA modifikasyonu doğal ya da modifiye HA ile reaksiyona girebilme özelliğine sahip birçok farklı ajanla gerçekleştirilebilir. Birçok ajan arasında adipik hidrazit (ADH), karbodiimitlerce başlatılan karboksil gruplarına bağlanma reaksiyonunda oldukça etkindir. Bazı araştırmacılar hyaluronik asidin sodyum tuzunu, adipik hidraziti ve surfaktan kullanarak hyaluronik asit mikropartiküller üretmişlerdir. Bunun yanı sıra Hu et al, 2006, surfaktan kullanımı olmaksızın nanoçöktürme yöntemiyle nanopartikül üretiminin patentini almıştır. Buna göre suda çözünmüş HA, aseton ile iki adımda çöktürülmektedir. Bu yöntemde ADH ve karbodiimit kimyası kullanılarak HA'nın çapraz bağlanması gerçekleştirilmiştir. Nanoçöktürme yönteminde polimer konsantrasyonu (<%2 olmalı), organik çözen-polimer-su miktarı gibi parametreler nanopartikül oluşumunda önemli kriterlerdir (Bicudo and Santana, 2012).

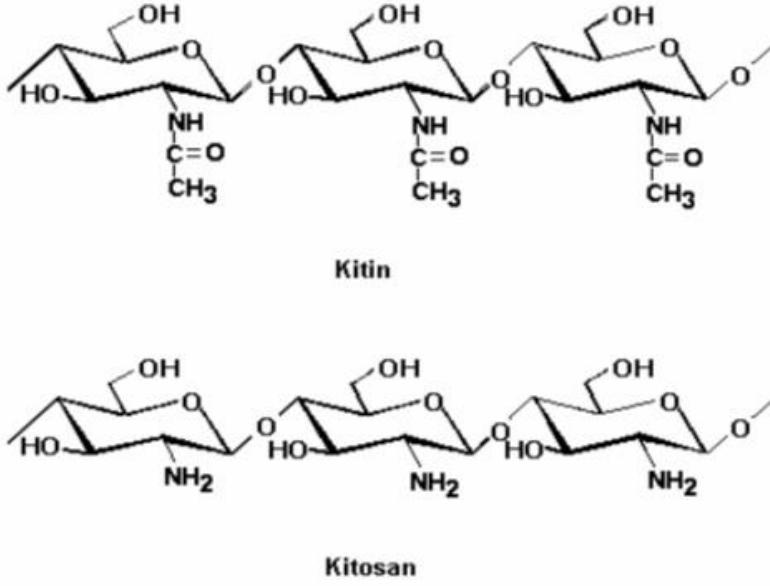
HA Temelli Nanokompleksler

Yüksek negatif yükünden dolayı HA kolaylıkla pozitif yüklü polimerlerle iyonik nanokompleksler oluşturabilir (Choi et al, 2012). İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanımında HA ile beraber kullanılan bazı polimerler şunlardır: kitosan, PEG, polilaktit, poliakiralitler vb. (Tripodo et al., 2015).

1.7. Kitosan

Kitosan kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen, katyonik yapılı ve asidik ortamda çözünür formda olan olan polimerdir. Kitin ise poli (β -(1→4)-N-asetil-D-glukozamin) yapıdaki doğal polisakkarit polimeridir. Bu biyopolimer büyük ölçekte yaşayan organizmalardan elde edilmektedir (Rinaudo, 2006). Kitin doğada genellikle deniz yosunları, tek hücreliler, eklem bacaklılar, halkalılar, solucanlar, mantarlar, böcekler, bazı bitkiler vb. de bulunmaktadır. Kitosan da kitin gibi kabuklu hayvanların ve mantarların hücre duvarlarında kendiliğinden bulunabilen bir bileşendir. Her ne kadar çok bulunsun da kitosan sudaki çözünürlüğünün düşük olmasından dolayı az çalışılmıştır. Kitosan, formik asit, asetik asit ve laktik asit gibi bazı asit çözeltilerinde çözünür ve polikasyonik bir polimer haline getirilir (Gökçe, 2008).

Kitosan, doğal, toksik olmayan, biyobozunur ve polikasyonik yapıda bir polimerdir. Farklı yüzdelerde kitin deasetilasyonu ile elde edilen kitosan yapısında bulunan primer amin grupları ile sahip olduğu pozitif yük dolayısıyla negatif yüke sahip farklı moleküllerle farklı oranlarda elektrostatik etkileşime girmektedir (Gwak et al., 2012).



Şekil 1.7. Kitin ve Kitosanın Yapısı (Ergün vd., 2017).

1.7.1. Biyomedikal Uygulamalarda Kitosan Temelli Sistemler

Kitosan mikro-nanopartiküller

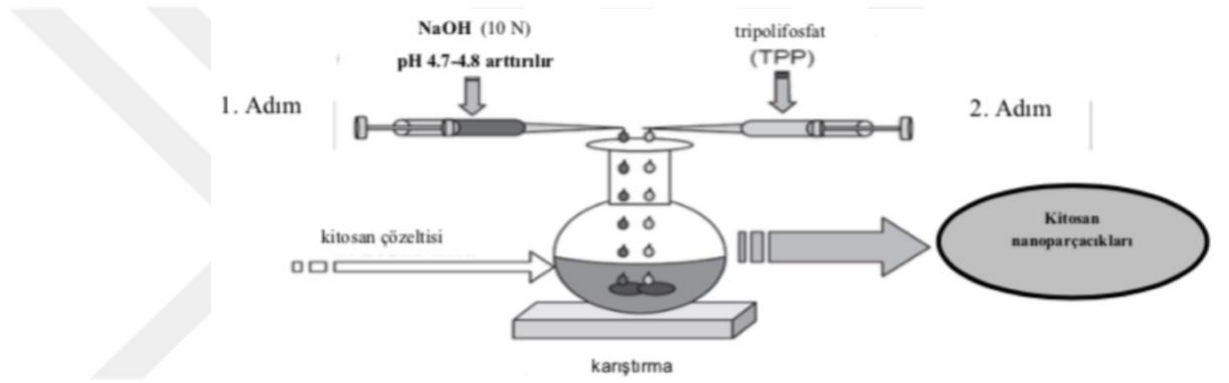
Kitosan zararsız organik çözümlerle partikül yapılabilmesi, aktif ajanların kontrollü salımının yapılabilmesi, sulu asidik çözeltilerde kolayla çözünebilir olması gibi birçok avantaja sahiptir. Bu nedenle kitosan yüksek oranda ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Kitosan partiküllerin oluşturulmasında farklı yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler partikül boyutu, termal ve kimyasal stabilite, yeniden üretilebilirlik, ilaç salım kinetiği gibi parametreler göz önüne alınarak sentezlenmektedir ve şu şekilde sıralanabilir: emülsiyon çapraz bağlama, koaservasyon/presipitasyon, püskürtmeli kurutma, emülsiyon-damlacık koalesans metodu, iyonik jelyasyon metodu, ters miselar metod, eleme metodu.

Kitosan partiküllere ilaç yüklenmesi iyi metodla olmaktadır: partiküllerin yapımı aşamasında ilacın ortama konmasıyla, partiküller oluşturulduktan sonra ilacın partiküllerle inkübe edilmesiyle. Bu yöntemlerle hem suda çözünebilir ilaçlar hem de suda çözünürlüğü olmayan ilaçlar partiküllere yüklenebilir.

Kitosan hidrojel

Hidrojel, yüksek oranda su absorblayan 3 boyutlu polimer ağlarından oluşmaktadır. Bu yapılar yumuşak ve ıslak yapıdaki materyallerdir. Kitosan hidrojel, farklı yöntemlerle oluşturulabilir. Her ne yöntem kullanılırsa kullanılsın temel olarak kitosan hidrojel oluşturmak üzere polimer ağlarıyla fiziksel olarak etkileşir ya da kimyasal olarak çapraz bağlanır (Dash et al., 2011).

1.7.2. İyonik Jelleşme Yöntemiyle Kitosan Nanopartiküllerin Oluşturulması



Şekil 1.8. İyonik jelleşme yöntemiyle kitosan nanopartiküllerin oluşturulması (Gökçe, 2008).

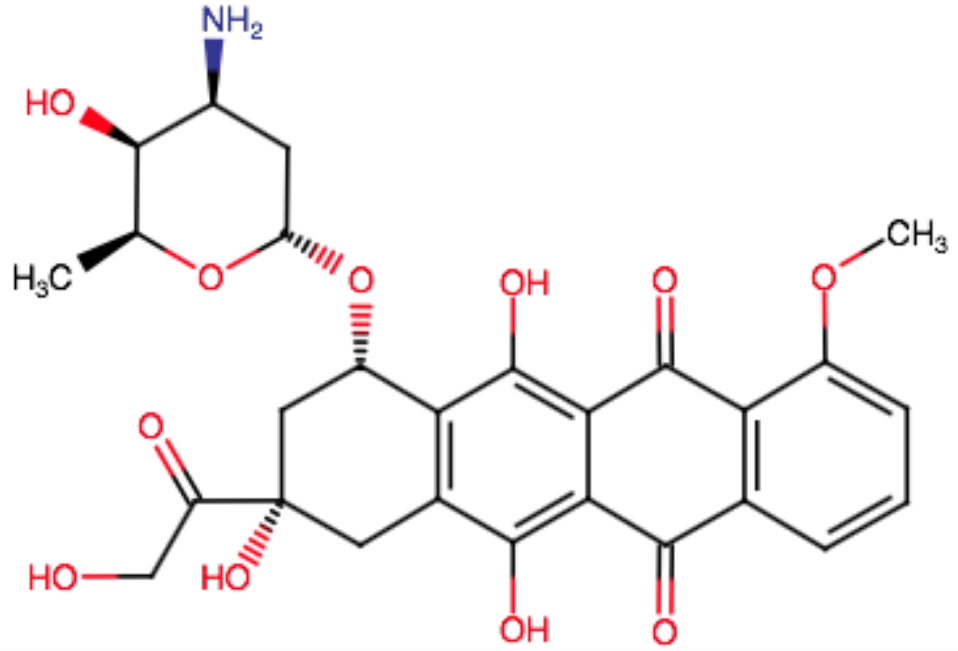
Kimyasal çapraz bağlayıcılar yerine kitosan ile elektrostatik etkileşim sonucu tersinir fiziksel bağlanan bir çapraz bağlayıcı kullanılarak nanopartiküllerin oluşturulması temeline dayanan yöntemdir (Gökçe, 2008). Kimyasal çapraz bağlayıcılar kullanılmadığından dolayı bu kimyasalların potansiyel zararları da düşürülmektedir. Polianyon olan tripolifosfat (TPP) ile polikasyon olan kitosan arasındaki etkileşim buna örnektir. İyonik jelleşme yöntemi için kitosan asidik ortamda çözünür hale getirilir ve polianyon olan TPP çözeltisi damla damla kitosan çözeltisine ilave edilir. Zıt yüklerin kompleksleşmesi reaksiyonu kitosanın iyonik jelleşmesine ve küresel partiküllerin oluşmasına olanak tanımaktadır (Dash et al., 2011).

1.8. Hyaluronik Asit ve Kitosan

HA ve kitosan beraber birçok ilaç taşıyıcı sistemin geliştirilmesinde kullanılmıştır. HA ve kitosanın yük özelliklerinden dolayı elektrostatik etkileşime girmesi üzerinden çeşitli polielektrot kompleksler oluşturularak bunların biyomedikal alanda kullanılması çalışılmıştır (Tripodo et al., 2015). Örneğin Li et al., 2013, pH duyarlı ilaç taşıyıcı sistem olarak paklitaksel taşınımı için HA amfifilik hale gelecek şekilde hidrofobik bir ajanla konjuge edilmiş ve kendiliğinden nanopartikül oluşumu sağlamıştır. Sonrasında ise pH duyarlılık için kitosan ile kombine edilerek polielektrolit kompleks nanopartiküller elde edilmiştir. Ramasamy et al., 2014, HA ve kitosanın beraber kullanımına başka bir örnek olarak yine bir ilaç taşıyıcı sistem tasarlamışlardır ve HA-kitosan kombinasyonu ile EPR etkisi temelli bir ilaç hedefleme çalışmışlardır. Yao et al., 2014, kanser tedavisinde HA- kitosan kombinasyonunu tek duvarlı karbon nanotüpler ile beraber kullanarak ilaç taşıyıcı sistem hazırlamışlardır. Kitosan yapının suda çözünürlüğünü ve biyoyumluluğunu artırırken HA da CD44 reseptörüne aktif hedefleme amacıyla kullanılmıştır. Görüldüğü gibi HA ve kitosan birçok biyomedikal uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.9. Doksorubisin

Doksorubisin sitotoksik antrasiklin grubu bir antineoplastik aktivite gösteren bir antibiyotik ve interkalasyon ajanıdır (drugbank.ca, doxorubicin). DNA' daki baz çiftlerinin arasına interkalasyon yaparak DNA'nın replikasyonunu ve böylece protein sentezini önler. Ayrıca doksorubisin topoizomera 2 enzimini inhibe ederek DNA replikasyonu sırasında enzim-DNA kompleksinin artışına neden olur ve çift zincir kırılmasının ardından nükleotid zincirinin ligasyonunu önler. Doksorubisin serbest oksijen radikalleri oluşturarak hücre membranı lipidlerinin peroksidasyonuna yol açarak sitotoksikite yaratır (pubchem, doxorubicin hydrochloride).



Şekil 1.9. Dokсорubisinin kimyasal yapısı (Drugbank, Dokсорubisin).

Dokсорubisin solid tümörler ya da yumuşak doku kanserleri gibi malign tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak kullanımı kardiyak miyopati gibi ciddi yan etkilerden dolayı kısıtlıdır (Dhamecha et al., 2015). Dokсорubisinin ciddi kardiyotoksitenin yanı sıra yarattığı yan etkilere örnekler şunlardır: kellik, kusma, lökopeni ve ağız iltihabı. İlaç etkisini azaltmadan yan etkileri azaltabilmek için dokсорubisin ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenerek seçici olarak hedef bölgelere taşınabilmektedir (Wu et al., 2013).

1.10. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin bir dokudan mekanik yolla ve proteolitik enzimlerle ayrıştırılarak *in vitro* olarak çoğaltılması işlemidir.

Hücre kültürü; aşı, monoklonal antikor, enzim ve hormon üretimi, DNA ve RNA replikasyonu araştırması, protein sentezi, enerji metabolizmasının araştırılması, çeşitli ilaçların hücre siklusuna etkisi, sinyal iletim mekanizması ve hücre haberleşmesi, hücrenin beslenme özellikleri, enfeksiyon araştırmaları, viral transformasyon, kimyasal transformasyon, hücre popülasyon kinetiği, sitogenetik

analiz, genetik manipölasyon ve immortalizasyon, sitotoksisite denemeleri gibi çeşitli amaçlarla yapılmaktadır.

Hücre kültürü çalışmaları ekonomik olması, örnek homojenitesi, fizyolojik ve kimyasal çevrenin kontrolü ve *in vivo* ortamın *in vitro* modellenmesi açısından avantaj sağlamaktadır (Tiryaki M. K., 2010).

Hücre kültürü için hücrelerin canlılığını sürdürebilmeleri için gerekli olan maddeleri içeren besi ortamının kullanılması gerekmektedir. Hücrelerin çabuk büyümesini sağlamak için genellikle serumla birlikte kullanılmakla birlikte ortam içerisinde esansiyerl aminoasitler, vitaminler, mineraller, şeker, tuz, glukoz, serum ve antibiyotikler bulunmaktadır (Kılınç A., 2016).

Hücre kültürleri tek tabaka yapışan ya da süspansiyon halinde üretilen hücre kültürleri olarak çalışılmaktadır. Süspansiyon hücreler besiyortamında asılı olarak büyürler. Kültür kabına bağlanmadan yaşayıp çoğalırlar. Bunlar kan, dalak, kemik iliğinden alınan hücrelerdir. Yapışık hücreler tek kat halinde kültür kabına bağlanarak büyürler. Endodermal ve ektodermal embriyonik hücre katmanları bu şekilde büyürler fakat buna fibroblastlar ve epitel hücreler dahil değildir. Ankoraj bağımlı hücreler çoğalma için vir yüzeye ihtiyaç duyarken, ankoraj bağımsız hücreler kültür kabının yüzeyine zayıf olarak tutunur ve büyüme için yüzeye ihtiyaç duymaz (Özdağ H., 2008).

Farklı kültürlerden elde edilen hücre kültürleri; primer, sekonder ve devamlı olmak üzere üç grupta toplanır.

Primer Hücre Kültürleri

Organizmadan doğrudan doğruya alınan organ, doku ya da hücrelerden elde edilen ilk kültürdür. Dokunun fizyolojik durumunu doğrudan yansıtmaktadır. Bu kültürlerde hücre soyu genellikle sonludur yani pasajlamalar sonrasında hücreler yaşlanarak ölür.

Sekonder Hücre Kültürü

Primer kültürden sonra hücreler ortalama 40-50 pasaj süresince fenotipik ve genotipik özellikleri değişmeden sabit bir oranda çoğalarak devam ettirilebilir. Bu dönemdeki kültüre diploid hücre kültürü ya da sekonder hücre kültürü denir. Bu kültürdeki hücreler alındıkları dokunun karyotipini %85 oranında korumasına karşın genellikle 30-40 pasaj sonunda spontan bir farklılaşma gözlenmeye başlar.

Devamlı Hücre Kültürleri

Primer hücre kültüründen spontan mutasyonlar sonucu ya da kimyasal ajanlar vb. ile oluşturulan kümelerdir. Primer hücre kültürü transformasyona uğradığında süresiz olarak bölünme yeteneği oluşturur. Bu hücreler daha hızlı ve daha kolay büyürler ve genelde anormal kromozomlara sahiptirler.

1.10.1. Hücre Kültür Koşulları

Kültür koşulları her hücre için farklılık göstermesine karşın bazı temel ihtiyaçları içerir. Bunlar; amino asitler, karbohidratlar, vitaminler, mineraller, büyüme faktörleri, O₂ ve CO₂ gazları, uygun pH , osmotik basınç ve sıcaklıktır.

Besiortamı

Kültür için düzenleyici pH ve osmotik basıncın yanı sıra gerekli besin maddelerini ve büyüme faktörlerini içerir. Hücrenin ihtiyacına göre serum ilavesi içerebilmektedir.

Serum bazal besiyerindeki hücrelerin kültürü için büyüme ve adhezyon faktörlerinin, hormonlarını lipidlerin ve minerallerin kaynağı olarak oldukça önemlidir. Serum aynı zamanda hücre membran geçirgenliğini de sağlamaktadır.

Karbondioksit

pH değişikliklerine karşın kültürün büyüme besiyerinin ve tamponun pH sini düzenler. Genellikle HEPES veya bikarbonat tamponu kullanılır. Çoğu hücre kültürü yönteminde %5-7 oranında CO₂ kullanılmaktadır.

Sıcaklık

Uygun sıcaklık genellikle izole edildiği konağın vucüt sıcaklığına bağlıdır. Fazla sıcaklık az sıcaklığa göre hücre kültüründe daha ciddi bir problem olabilmektedir. Çoğu insan ve hayvan hücre hattı için uygun sıcaklık 36-37 °C aralığındadır (Kılınç A., 2016).

1.10.2. Hücre Bakımı

Kültür ortamının pH si 7' den 6.5' e düşerse birçok hücrenin büyümesi durur ve pH 6-6.5 arasında ölmeye başlarlar. Ortamın pH' sı düştüğünde indikatör olan fenol kırmızısının rengi önce turuncuya sonra sarıya döner. Bu durumda besiyeri değiştirilmelidir.

Kültürde yüksek hücre konsantrasyonu varsa besiyeri daha çabuk tükenir. Bu durumda ya sık sık besiyeri değiştirilmeli ya da hücreler pasajlanmalıdır.

Kontaminasyona karşı koruyuculuk sağlanması için kültür ortamına genellikle penisilin-streptomisin antibiyotikleri sık sık ilave edilir.

Hücre pasajlama işlemi; flasklarda tek tabaka halinde bulunan hücre dizilerinin zarar verilmeden yüzeyden tripsin enzimi ya da hücre kazıyıcı yardımıyla kaldırılıp sıvı içinde süspansiyon ederek başka ortamlara aktarılması prensibine dayanır. Aktarılan ortam yine % 5 CO₂'li etüvde 37° C' de hücreler tam tabaka olana kadar inkübe edilir (Tiryaki M. K., 2010).

1.10.3. Hücre Kültüründe Sitotoksikite Testleri

Sitotoksikite hücresel aktivitenin geri dönüşümsüz olarak durdurulması ve hücresel yapının onarılamaz bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Sitotoksikite testleri test maddesinin hücre üzerindeki etkisinin negatif ve pozitif kontrol kullanılarak değerlendirilmesi amacıyla yapılır.

Sitotoksikite testleri tekrarlanabilir olmalı, uygulanan konsantrasyonlar için doz-cevap eğrisini vermeli, hücre sayısı ve test cevabı arasında doğrusal ilişki olmalı ve veriler *in vivo* koşullara yorumlanabilmelidir.

Çok sayıda örneklik kısa zamanda ve ekonomik olarak incelenmesi, kantitatif sonuçlara ulaşılabilir olması, test yöntemlerinin standardize edilebilir olması vb. *in vitro* sitotoksikite testlerinin avantajları iken, her test için bir tür hücre kullanılması, kültür hücrelerinin konak hücrelerden farklılık göstermesi ve kültür ortamında doku koruyucu mekanizmaların olmaması da dezavantajlarındandır.

Hücre kültüründe %50 oranında hücre ölümüne neden olan konsantrasyon IC₅₀ olarak ifade edilir ve sitotoksikitenin gösterilme biçimidir.

Çoğunlukla kullanılan sitotoksikite testleri; MTT , XTT, WST, nötral kırmızısı ve laktat dehidrogenaz testidir.

MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] Testi

Testin prensibi MTT bileşiminin tetrazolyum halkasının canlı hücrelerde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimiyle formazona dönüşmesidir. Sarı renkli MTT, enzim aktivitesi sonucu suda çözünmeyen koyu mor renkli formazon tuzuna dönüşür. Canlı ve mitokondriyal aktivitesi bozulmamış hücreler mor formazon tuzu oluştururken, ölü hücreler formazon ürününü oluşturamaz. Oluşan tuz DMSO (dimetilsülfoksit) çözündürülerek oluşa rengin şiddeti spektrofotometrik olarak tayin edilir (Kılınç A., 2016).



2. MATERYAL ve METOT

LMW HA (0.5-1.3 MDa) ve HMW HA (1.8-2.5 MDa) SK Bioland' den, adipik asit dihidrazit (ADH), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC), aseton (>%99) Sigma'dan, kitosan (asetilasyon derecesi: > %90) Marine Bio Resources'tan ve doksorubisin hidroklorit Chemos'tan temin edildi. Isıtmalı orbital çalkalayıcı Heidolph ve spektrofotometre Perkin Elmer markadır. Hücre kültürü çalışmalarında A549-luc ve SKOV-3 hücre hatları kullanılmıştır.

2.1. Hyaluronik Asit Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Hyaluronik asit nanopartiküller Hu ve arkadaşları, 2009, tarafından geliştirilen ve Fakhari ve arkadaşları, 2013 tarafından adapte edilen yöntem kullanılarak hazırlandı. Yöntemde kullanılan çapraz bağlayıcılar ile HA arasındaki reaksiyon şekil 2.1. de görülmektedir. 200 mg HMW HA 20 ml distile suda üç gün boyunca oda sıcaklığında çözüldü. Bu çözültiden 8 g tartılarak 80 ml su ile seyreltilir. 136.71 ml aseton HA çözültisi üzerine yavaşça eklendi ve 25 °C deki su banyosunda 2 saat boyunca karıştırıldı. Ardından 80 mg EDC ve 40 mg ADH 2 ml suda çözülerek reaksiyon ortamına eklendi ve 24 saat boyunca karıştırmaya bırakıldı. Süre sonunda 131.64 ml aseton yavaş yavaş eklendi ve 20 saat boyunca karıştırmaya bırakıldı. 20 saatin sonunda elde edilen nanopartiküller 9000 rpm de 25 dakika olacak şekilde santrifüjlenerek ayrıldı ve 2 kez distile suyla yıkama yapıldı. Elde edilen nanopartiküllerin SEM analizi yapıldı.

Nanopartiküllerin sentezlenmesi esnasında en uygun organik solvent ve çapraz bağlayıcı miktarı denendi.

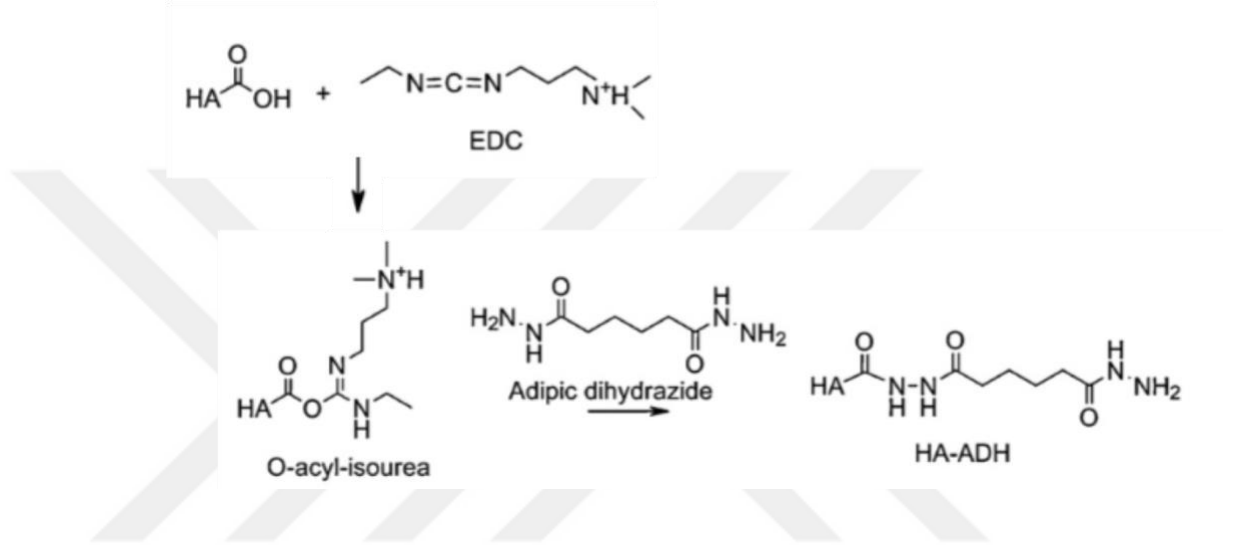
2.1.1. Organik Solvent Miktarı Optimizasyonu

Organik solvent miktarı denemesi için Hu ve arkadaşlarının, 2009, belirttiği aseton-su oranı göz önünde bulundurularak nanopartikül oluşumun gerçekleştiği aşama olan ikinci aseton ilavesindeki aseton miktarı değiştirildi. Buna göre, 2.1. de anlatılan prosedür aynen gerçekleştirilmekle birlikte ikinci aseton ilavesinde 151,29; 167,29; 183,29 ve 199,29 ml aseton eklenerek nanopartikül oluşumu gerçekleştirildi. Elde edilen nanopartiküllerin SEM analizi yapıldı.

2.1.2. Çapraz Bağlayıcı Miktarı Optimizasyonu

Çapraz bağlayıcı miktarı denemesi için Pouyani and Prestwich'in, 1994, belirttiği HA-ADH-EDC oranları göz önünde bulundurularak 2.1.1 de belirtilen yöntemde 2. aseton ilavesi için 167.29 ml seçilerek ADH-EDC miktarları 0,16-0,32; 1,6-0,32; 0,4-0,8; 4-0,8 g-g olacak şekilde nanopartikül sentezi gerçekleştirildi.

Elde edilen nanopartiküllerin SEM analizi yapıldı.



Şekil 2.1. HA'nın EDC ve ADH ile çapraz bağlanması reaksiyonu (Schante et al., 2010).

2.2. Kitosan ile Kombine Edilmiş HA Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

HA-kitosan nanopartiküller Oyarzun-Ampuero et al, 2009, Deng et al., 2014, ve Selvi Günel., ve arkadaşları 2016, tarafından geliştirilen yöntemler adapte edilerek ve geliştirilerek hazırlandı. % 0,11'lik (% w/v) kitosan çözeltisi %1 lik asetik asit çözeltisi içerisinde kitosanın çözünmesiyle hazırlandı. Kitosan çözeltisinin pH'ı 4.7-4.8 olacak şekilde 10 N NaOH ile ayarlandı. 14 ml kitosan çözeltisi üzerine 0,05; 0,1 ve 0,2 mg/ml LMW HA ve 0,44 mg/ml TPP içeren sulu çözeltinin 14 ml si orbital karıştırıcıda karıştırma altında oda sıcaklığında damla damla ilave edildi ve 20 dakika boyunca karışmaya bırakıldı. Süre sonunda oluşan nanopartiküller reaksiyon ortamının 9000 rpm de 30 dakika santrifüjlenmesi ile ayrıldı ve 2 kez distile su ile yıkama yapıldı. Elde edilen nanopartiküllerin SEM, FTIR ve Zeta-Boyut analizi yapıldı.

2.3. Kitosan ile Kombine Edilmiş HA Nanopartiküllere Doksorubisin Yüklenmesi

HA-kitosan nanopartiküllere doksorubisin yüklenmesi adsorpsiyon yöntemiyle gerçekleştirildi. 2.2. başlıklı yöntem ile sentezlenen nanopartiküller 2 ml 0,5 mg/ml doksorubisin ile disperse edildi ve nanopartiküller 16 saat 37 °C de inkübe edildi. Doksorubisinin yüklenmesinin gerçekleştirileceği en uygun pH ve doksorubisin konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla pH ve ilaç miktarı optimizasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen nanopartiküllerin SEM, FTIR ve Zeta-Boyut analizi yapıldı.

2.3.1. pH Optimizasyonu

İlaç adsorpsiyonu için en uygun pH'nın bulunması amacıyla pH 6 asetat, pH 7 PBS, pH 7,4 PBS, pH 8, 8,5 ve 9 Tris tamponlarında 0,5 mg/ml doksorubisin çözeltileri hazırlandı. Her bir pH'daki ilacın 2 ml si ile disperse edilen nanopartiküller 16 saat 37 °C de inkübe edildi. Süre sonunda santrifüj gerçekleştirilerek nanopartiküller ayrıldı ve 2 kez su ile yıkama yapılarak adsorplanmayan ilaç miktarı 480 nm de spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

Nanopartiküllere yüklenen ilaç miktarı ve adsorpsiyon verimi aşağıdaki verilen 1 ve 2 no'lu denklemler kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Adsorplanan ilaç miktarı } (\mu\text{g}) = \text{Başlangıç İlaç Miktarı} (\mu\text{g}) - \text{Adsorplanmayan İlaç Miktarı } (\mu\text{g}) \quad [1]$$

$$\% \text{ Adsorpsiyon Verimi} = \frac{\text{Adsorplanan İlaç Miktarı } (\mu\text{g})}{\text{Başlangıç İlaç Miktarı } (\mu\text{g})} \times 100 \quad [2]$$

2.3.2. İlaç Miktarı Optimizasyonu

İlaç adsorpsiyonu için en uygun başlangıç doksorubisin konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla pH 8 Tris tamponunda hazırlanan 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 ve 2,5 mg/ml konsantrasyonlarındaki doksorubisin çözeltilerinin 2 ml si ile disperse edilen HA-kitosan nanopartiküller 16 saat 37 °C de inkübe edildi. Süre sonunda santrifüj gerçekleştirilerek nanopartiküller ayrıldı ve 2 kez su ile yıkama yapılarak adsorplanmayan ilaç miktarı 480 nm de spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

Nanopartiküllere yüklenen ilaç miktarı ve adsorpsiyon verimi 1 ve 2 no'lu denklemler kullanılarak hesaplandı.

2.4. *In vitro* İlaç Salımı

İlaç salımı için 2.3.' te belirtilen yöntem ile doksorubisin yüklü nanopartiküller elde edildi. 1 mg/ml ilaç içeren nanopartiküller pH 7,4 PBS'te ve pH 5,5 asetat tamponunda dağıtıldı ve selüloz diyaliz membranına (MWCO 18 000 Da) alındı. Aynı zamanda 1 mg/ml pH 7,4 PBS'te ve pH 5,5 asetat tamponunda hazırlanan serbest ilaç da diyaliz membranına alındı. Her bir örnek ilgili tamponun 10 ml' sinde 37°C'deki çalkalamalı su banyosunda salımı izlemek üzere bırakıldı. Belirlenen aralıklarla reaksiyon kabındaki tüm hacim alınarak yerine 10 ml taze tampon eklendi. Alınan örneklerin doksorubisin içeriği 480 nm dalga boyunda spektrofotometrede belirlendi. Hesaplamalar aşağıda verilen 3 no'lu formülle hesaplandı.

$$\text{Salınan İlaç Yüzdesi \%} = \frac{\text{Salınan İlaç Miktarı}}{\text{Başlangıç İlaç Miktarı}} \times 100 \quad [3]$$

2.5. Hücre Kültürü ve *In Vitro* Sitotoksosite Testi

Hücre kültürü çalışmaları CD44 reseptörünün aşırı üretildiği küçük hücre dışı akciğer kanseri hücre hattı A549-luc ve over kanseri hücre hattı SKOV-3 üzerinde yapıldı. Hücreler % 5 CO₂ 'li inkübatörde 37 °C de kültüre edildi. A549-luc hücre hattı için % 10'luk FBS içeren DMEM besiyeri, SKOV-3 için ise yine % 10'luk FBS içeren Mc Coy's 5A besiyeri kullanıldı.

Hücreler pasajlanıp yeterli sayıya ulaştıktan sonra 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 5000 hücre ekilerek bir gün plakaya yapışması beklendi. Hücreler plakaya yapıştıktan sonra serbest doksorubisin için 1- 0,015625 µg/ml, doksorubisin yüklü kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküller için 20- 0,3125 µg/ml ilaç konsantrasyonu olacak şekilde ve aynı oranda yapılan seyreltmeyle boş nanopartiküller uygulandı. Örnek uygulamalarından 48 ve 72 saat sonra MTT testi için kuyucuklardan örnekler uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 µl sarı renkli MTT çözeltisi uygulandı. MTT uygulanan hücreler 37 °C'de inkübatörde 4 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından MTT çözeltisi uzaklaştırıldı. Oluşan formazon tuzu 100 µl DMSO eklenerek çözüldü. MTT testi canlı hücrelerdeki mitokondriyal

enzim aktivitesi sonucu MTT bileşimindeki tetrazolyum tuzunun formazon tuzuna dönüştürülmesi temeline dayanmaktadır. Hücre canlılığına bağlı olarak oluşan mor renkli çözeltinin şiddeti değişiklik gösterecektir. Oluşan mor rengin şiddeti 540 nm de görünür bölgede spektrofotometre yardımıyla okundu.

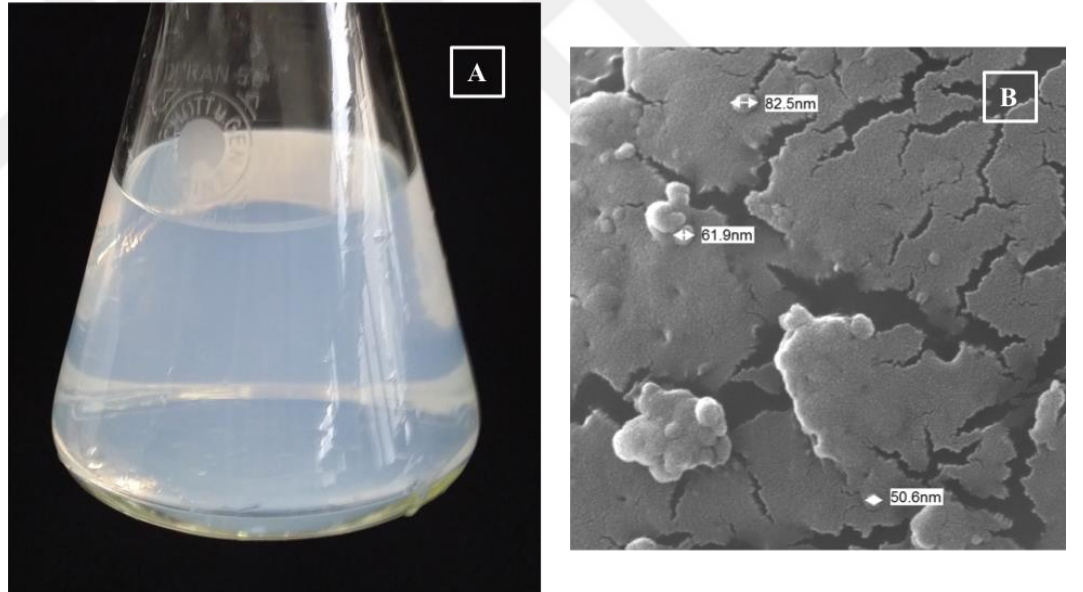
Hiçbir etken maddenin uygulanmadığı kontrol grubu temel alınarak hücrelerin her bir etken madde ve konsantrasyonu için canlılık yüzdeleri hesaplandı. İki hücre hattı için de IC_{50} değerleri GraphPad yazılımı ile hesaplandı.



3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Hyaluronik Asit Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

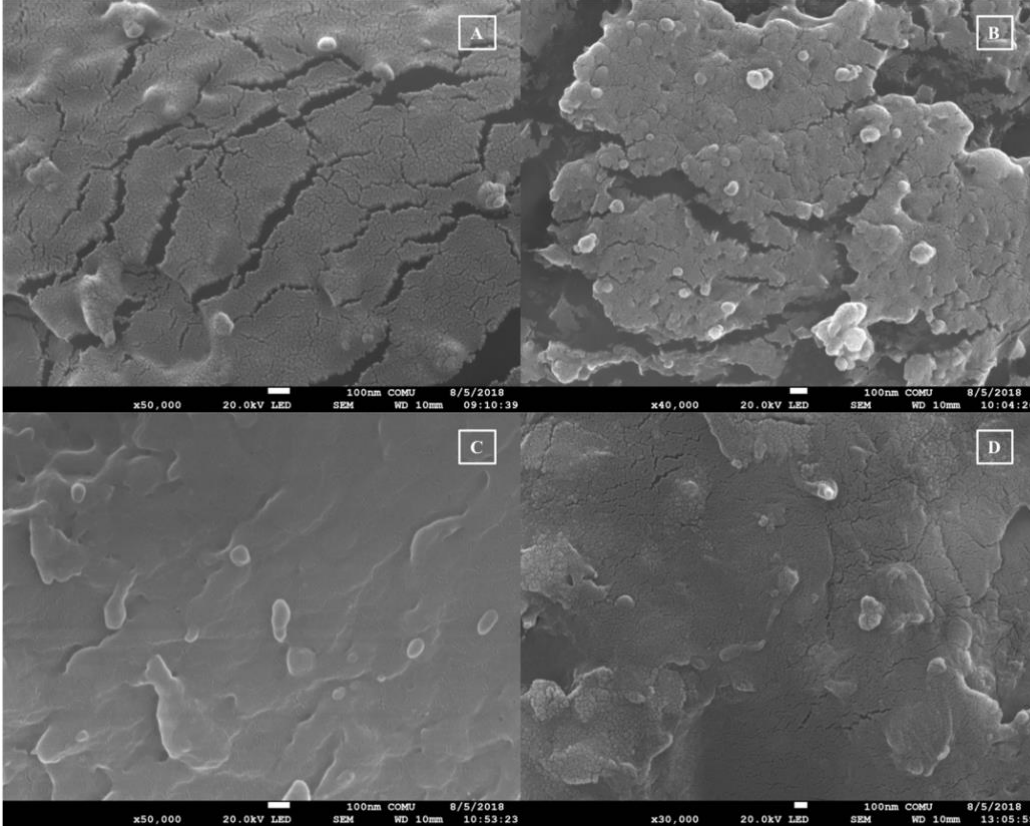
Surfaktan ya da yağ kullanmaksızın çapraz bağlayıcılar ile hyaluronik asit nanopartikül sentezlenmesi, hyaluronik asitin karboksil gruplarının EDC ile aktive edilip ardından ADH ile çapraz bağlanması temeline dayanmaktadır. Aseton ilavesiyle -COOH gruplarıyla su arasındaki hidrojen bağı kırılıp daha sonra EDC ile o-açıl izoüre ara ürününün oluşumu sağlanmaktadır ki burada EDC çapraz bağlama reaksiyonu için katalist görevi görmektedir. ADH ile amid bağı oluşturulup çapraz bağlama sağlanmaktadır. Ardından ikinci aseton ilavesi yapılarak çapraz bağlanmış HA yapısının yine HA zinciriyle su arasındaki güçlü etkileşimin kırılması suretiyle nanopartiküller forma geçmesi sağlanmaktadır. Santrifüj yapılarak çöktürülen nanopartiküller su ile yıkanarak asetonun, reaksiyona girmeyen EDC, ADH' in uzaklaştırılması sağlanmaktadır (Hu et al., 2009).



Şekil 3.1. A) Reaksiyon süresi sonunda açık mavi renkteki nanopartiküller, B) Elde edilen nanopartiküllerin SEM görüntüsü.

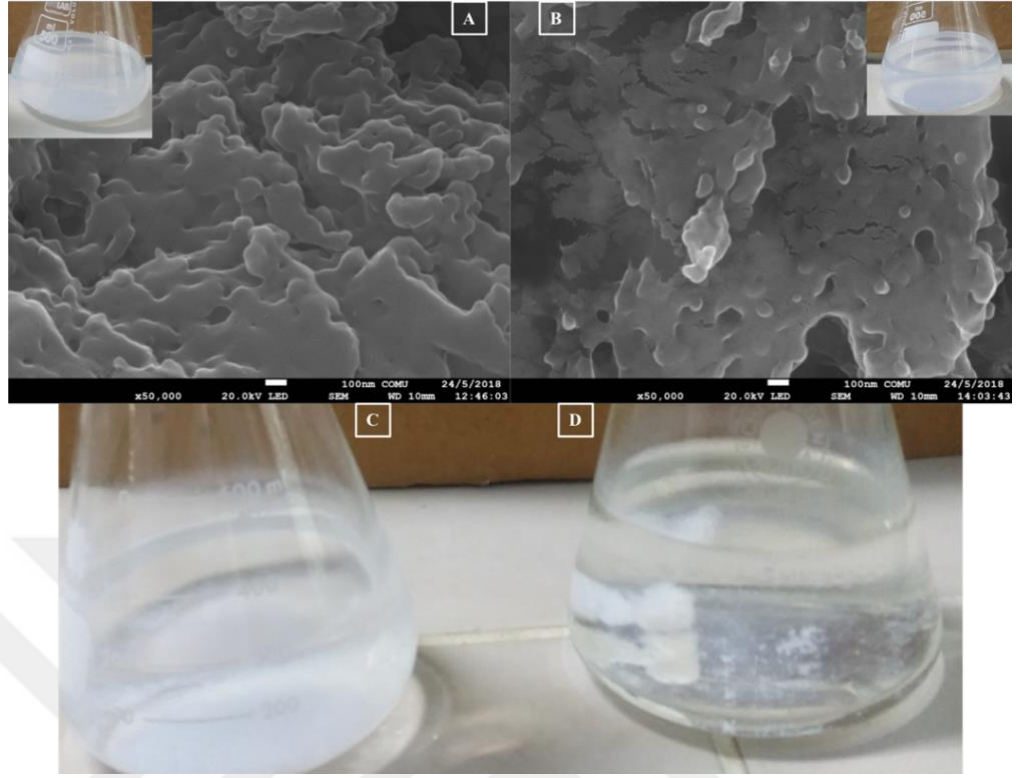
Fakhari et al., 2013 ve Hu et al., 2009, ikinci aseton ilavesine kadar reaksiyon ortamının renginde herhangi bir değişiklik olmadığını bununla birlikte ikinci aseton ilavesinden sonraki 20 saatin sonunda rengin açık maviye döndüğünü belirtmektedir (Şekil 3.1. A). Oluşturulan yapının SEM görüntüsü göstermektedir

ki (Şekil 3.1. B) elde edilen nanopartiküller 50-80 nm civarındadır. Ancak HA zincirleri çok düşük oranda nanopartikül oluşturma eğilimindedir.



Şekil 3.2. Aseton denemesine ait SEM görüntüleri A) 151.29; B) 167.29; C) 183.29 D) 199.29 ml aseton ilavesi.

Şekil 3.2. de görüldüğü gibi 151,29 ve 167,29 ml aseton ilavesi ile oluşturulan sistemlerde nanopartikül oluşum oranı bir miktar daha artmakta ancak yine de polimerin nanopartiküler forma geçme oranı düşük kalmaktadır. 167,29 ml aseton ilavesi ile oluşturulan sistemde Şekil 3.2.' de de görüldüğü üzere nanopartikül oluşumu daha belirgindir. Ancak aseton miktarı arttıkça HA zincirlerinin herhangi bir nanopartikül yapısı oluşturmadığı görülmektedir. Bicudo and Santana, 2012, su moleküllerinin organik solvent molekülleriyle karışması nedeniyle HA zincirlerinin aşırı doymuş hale geldiğini ve stabil olmayan globüler yapılar meydana getirdiğini söylemektedir. Bununla birlikte HA zincirlerinin nanopartiküler forma gelmesinin çapraz bağlayıcılar ile reaksiyonun gerçekleşmesi sonucu olduğunu söylemektedirler. Bu nedenle 167,29 ml aseton miktarı üzerinden çapraz bağlayıcı miktarı optimizasyonu yapılmıştır.

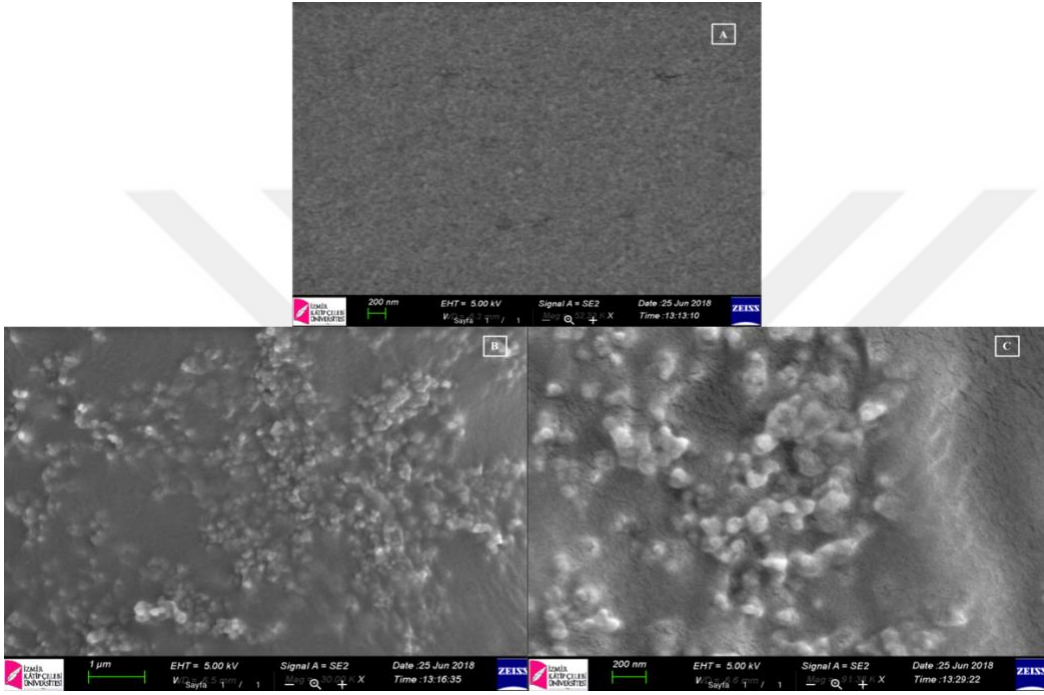


Şekil 3.3. Çapraz Bağlayıcı Miktarı Optimizasyonu. A) 0,16-0,32 g-g (ADH-EDC) ve B) 1,6-0,2 g-g (ADH-EDC) ile oluşturulan yapılara ait SEM görüntüleri C) 0,4-0,8 g-g (ADH-EDC) ve D) 4-0,8 g-g (ADH-EDC) ile oluşturulan yapıların reaksiyon sonu görüntüleri.

Şekil 3.3. 'te ADH-EDC optimizasyonuna ait görüntüler verilmektedir. Şekil 3.3. C ve D 'de görüldüğü üzere HA:ADH:EDC (w/w/w) oranı 1:5:10 ve 1:50:10 olduğunda polimer agregatlaşarak çöktü. Bu nedenle herhangi bir ileri analiz gerçekleştirilemedi. HA:ADH:EDC (w/w/w) oranı 1:2:4 ve 1:20:4 olan sentezlerde agregatlaşıp çökme az gözlemlendi. Bu nedenle ileri analiz olarak SEM analizi gerçekleştirildi. Şekil 3.3. A ve Şekil 3.3.B 'de görülmektedir ki yüksek oranda çapraz bağlayıcı eklenmesi polimer zincirinin kendi arasında çok fazla çapraz bağlanmasına yol açmaktadır. Schante et al., 2011, aşırı ADH eklenmesiyle çapraz bağ oluşumunun yerine dihidrazit bağlarının ve tek koldan fonksiyonlaşmanın olduğunu vurgulamaktadır. Bu nedenle homojen nanopartikül yapıları oluşmak yerine rastgele amorf yapılar oluşmaktadır.

3.2. Kitosan ile Kombine Edilmiş HA Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

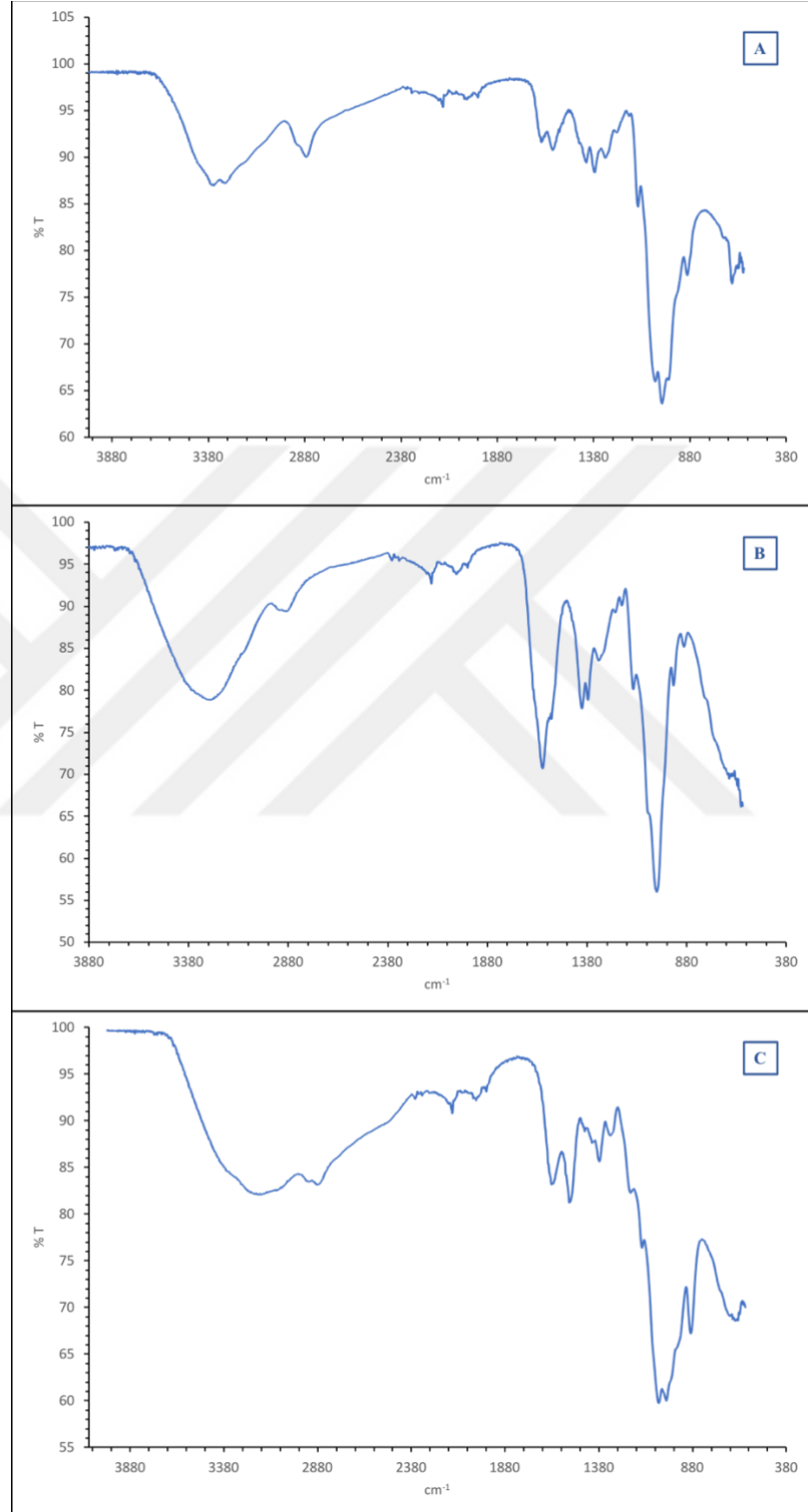
Oyazun-Ampuero et al., 2009, Gwak et al., 2012 ve Deng et al., 2014, HA nanopartiküllerin kitosan ile oluşturulması yönteminde negatif yüklü polimer olan HA ile çapraz bağlayıcı olan TPP yi, pozitif yüklü polimer olan kitosan üzerine damlatmak suretiyle hazırlamaktadır. Damlatma işlemi sayesinde negatif yükler ile pozitif yükler etkileşmekte ve polimerler nanopartikül yapısını oluşturmaktadır.



Şekil 3.4. Kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllerin HA optimizasyonuna ait SEM görüntüleri A) 0,05 mg/ml; B) 0,1 mg/ml ve C) 0,2 mg/ml HA ile oluşturulan nanopartiküller.

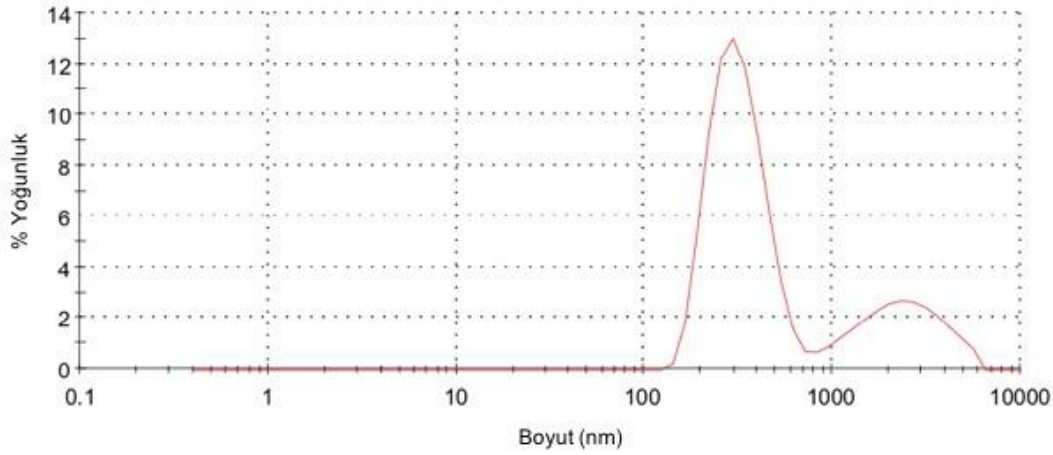
Şekil 3.4.'te HA 0,05; 0,1 ve 0,2 mg/ml HA ile oluşturulan kitosan temelli HA nanopartiküllerinin SEM görüntüsü görülmektedir. 0,05 mg/ml HA ile yapılan sentezde herhangi bir nanopartikül oluşumu gözlenmemektedir. Bu durumun sebebi olarak HA konsantrasyonunun az olması düşünülmektedir. Nitekim HA konsantrasyonu 0,1 ve 0,2 mg/ml'ye çıkarıldığında nanopartikül oluşumu olduğu görülmektedir. SEM analizi sonuçlarına göre 0,1 mg/ml HA ile oluşturulan nanopartiküllerin boyutunun yaklaşık 80-100 nm olduğu, 0,2 mg/ml HA ile oluşturulan nanopartiküllerin boyutunun ise yaklaşık 110-120 nm olduğu tespit

edilmiştir. Bu nedenle optimum HA konsantrasyonu olarak 0,1 mg/ml HA seçilmiştir.



Şekil 3.5. A) Kitosan, B) Hyaluronik Asit ve C) Kitosan ile kombine edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllere ait FTIR spektrumu.

Şekil 3.5'te kitosan(A), hyaluronik asit(B) ve kitosan ile kombine edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllere (C) ait FTIR spektrumu görülmektedir. Şekil 3.5.A da $3300-2500\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki ve hyaluronik asit yapısında bulunan karboksilik aside ait O-H gerilme piki ve 1400 cm^{-1} deki yine karboksilik aside ait O-H bükülme piki görülmektedir. Şekil 3.5.'B de, $3500-3400$ aralığındaki kitosanın yapısında bulunan primer amin grubuna ait iki bantlı N-H gerilme piki görülmektedir. Şekil 3.5.C' de ise karboksilik aside ait O-H bükülme pikinin ve primer amin grubuna ait N-H gerilme pikinin kaybolduğu gözlenmektedir. Bu durum nanopartikül oluşumuna neden olan hyaluronik asit yapısında bulunan karboksilik asit ile kitosana ait amin grubu etkileşiminin gerçekleştiğinin bir kanıtıdır. Sonuç olarak, FTIR spektrum verileri göstermektedir ki kitosan ile kombine edilerek oluşturulan hyaluronik asit nanopartiküller başarılı bir şekilde elde edilmiştir.

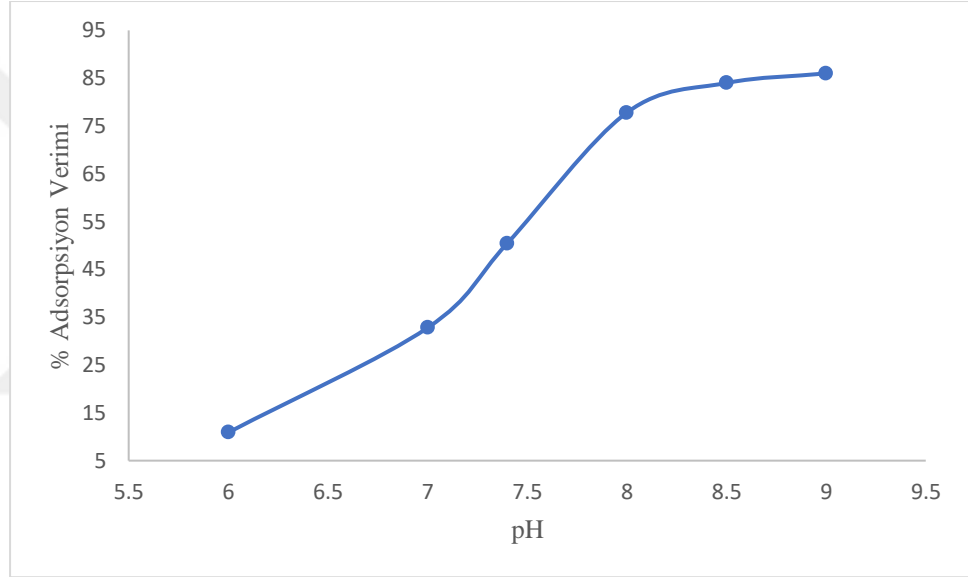


Şekil 3.6. Kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllere ait boyut dağılım grafiği

Şekil 3.6 'da kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllerin boyuta göre yüzde dağılım grafiği verilmektedir. Buna göre elde edilen nanopartiküllerin boyutu $327,6\text{ nm}$ olarak ölçüldü.

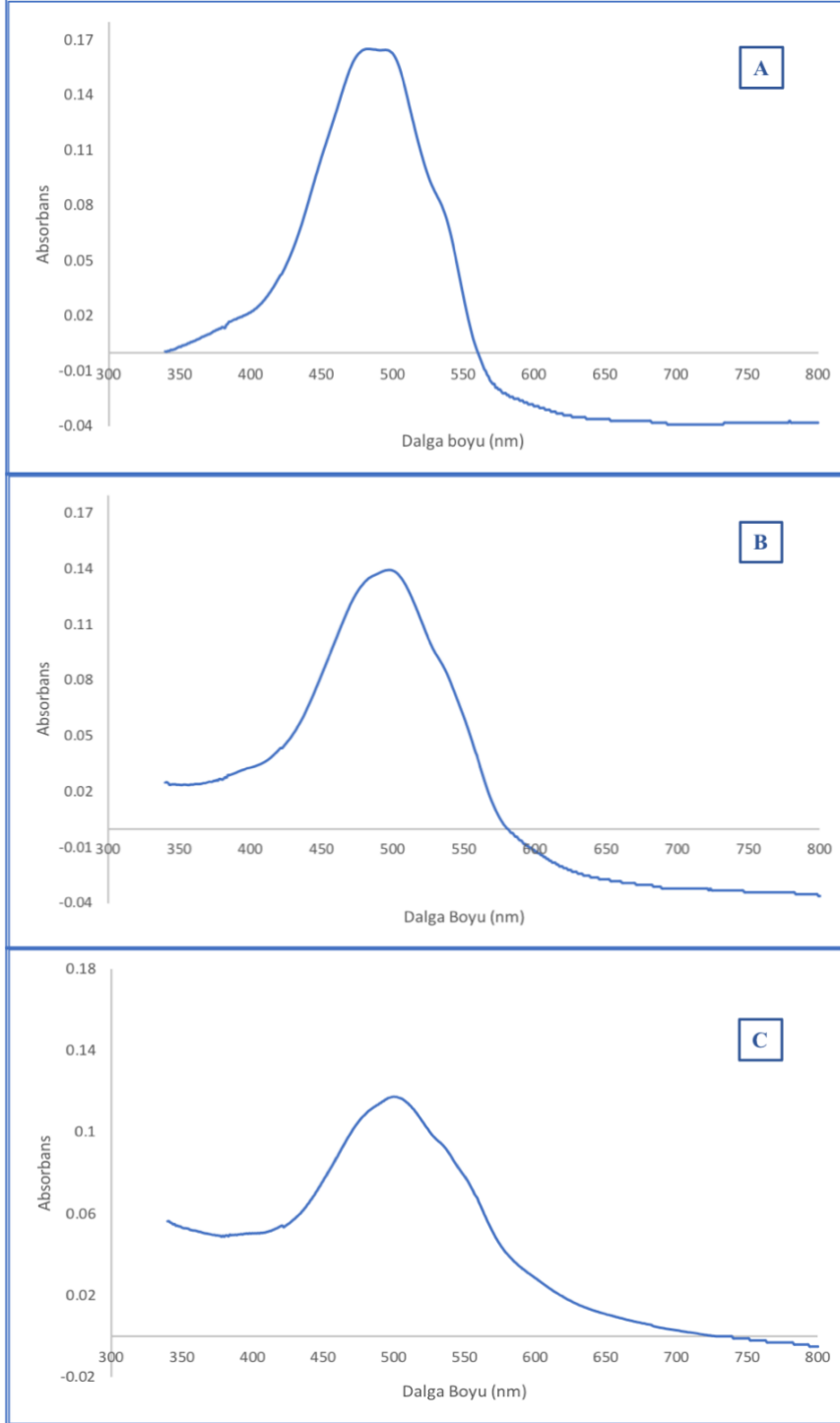
3.3. Kitosan ile Kombine Edilmiş HA Nanopartiküllere Doksorubisin Yüklenmesi

Kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllere doksorubisin adsorpsiyonu için pH optimizasyonu denemesinde pH arttıkça adsorpsiyon veriminin arttığı gözlemlendi (Şekil 3.7.). HA'nın yapısında bulunan -COOH gruplarının, kitosana ait amin gruplarının ve doksorubisine ait amin gruplarının pKa değerinin sırasıyla 3-4, 6,5 ve 8-8,4 olduğu bilinmektedir. Buna göre pH arttıkça doksorubisinin amin grupları pozitif yüklenecek, HA'nın -COOH grupları ise negatif yüklenecek ve etkileşim artacaktır. Bu nedenle pH arttıkça HA- doksorubisin etkileşiminin artması beklenen bir durumdur.



Şekil 3.7. Kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllere doksorubisin yüklenmesinde pH' a bağlı adsorpsiyon verimi

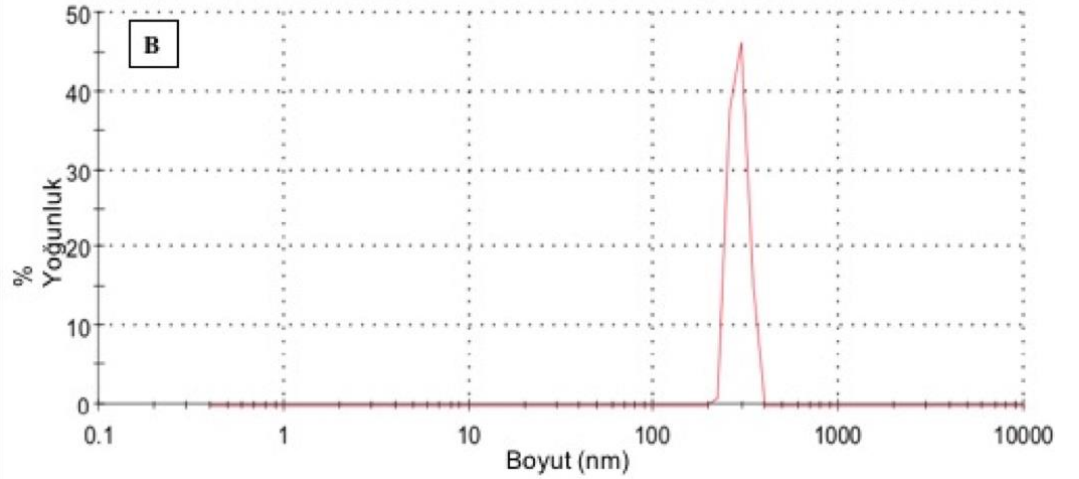
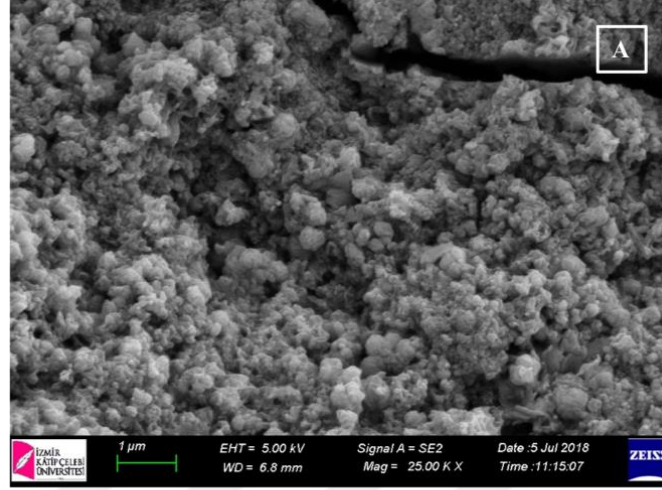
Doksorubisinin düşük pH'larda daha stabil olduğu pH arttıkça stabilitesini yitirdiği Sunar, 2014 tarafından belirtilmektedir. Şekil 3.8.' da da görüldüğü gibi doksorubisinin spektrum taramasında pH 8' de (A) 480 nm civarında en yüksek absorbans değerini almaktadır. pH 8,5 (B) ve 9 (C) da ise pik değerleri 500 nm civarına kaymaktadır. Bu durum da 480 nm de okunan değerlerle yapılan hesaplamada her ne kadar adsorpsiyon verimi artıyor görünse de ilacın yapısının bozulması sebebiyle hataya yol açtığını göstermektedir. Bu nedenle optimum pH olarak 8 seçilmiştir.



Şekil 3.8. Dokсорubisine ait A) pH 8 B) pH 8.5 ve C) pH 9 spektrum taraması sonuçları

İlaç miktarı optimizasyonu denemesinde de yüklenen ilaç miktarının başlangıç ilaç miktarı arttıkça arttığı tespit edilmiştir. Ancak ilaç miktarı 1,5 mg/ml

nin üzerine çıkarıldığında yükleme veriminin daha fazla artmadığı görülmüştür (Tablo 3.1). Bu nedenle optimum ilaç miktarı 1,5 mg/ml, adsorbsiyon verimi de %89.8 olarak belirlenmiştir.



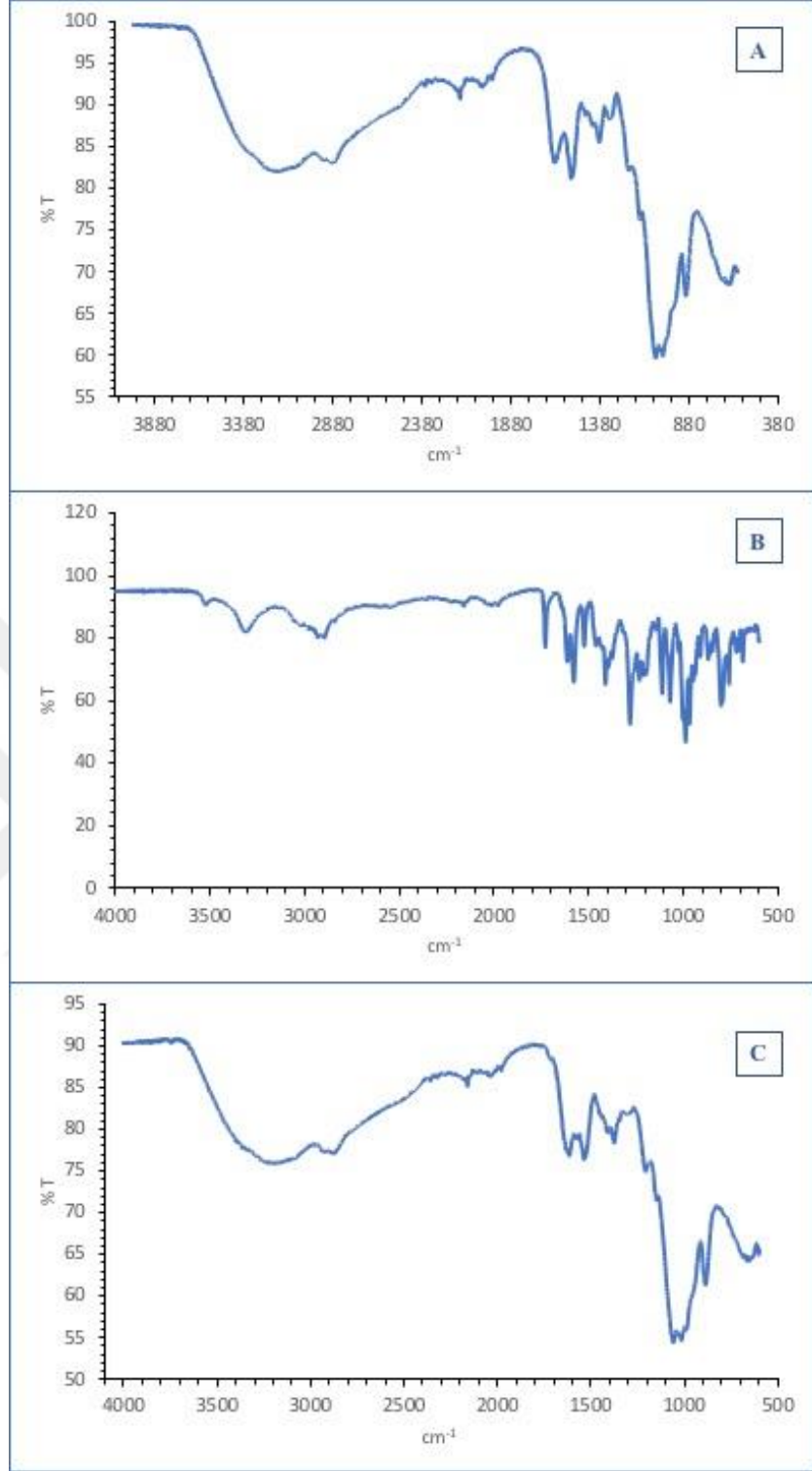
Şekil 3.9. Doksorubisin yüklü kitosan ile kombine edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllere ait A) SEM görüntüsü, B) Boyut dağılım grafiği.

Doksorubisin yüklü kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllere ait zeta boyut analizi sonuçlarına göre ilaç yüklü nanopartiküllerin boyutu 286,6 nm olarak ölçüldü (Şekil 3.9-B). Buna göre ilaç yükleme işleminden sonra nanopartikül boyutu küçülmüştür. Bu durumun doksorubisinin yapısındaki amino grupları ve HA'nın yapısındaki karboksil gruplarının iyonik etkileşiminden dolayı olduğu söylenebilir. Şekil 3.9-A, doksorubisin yüklü kitosan ile kombine edilmiş HA

nanopartiküllere ait SEM görüntüsüne aittir ve taşıyıcı sistemin beklendiği gibi küresel yapıda olduğu gözlenmektedir.

Tablo 3.1. Dokсорubisin adsorpsiyonunda ilaç miktarı optimizasyonu. Başlangıç ilaç konsantrasyonuna bağlı adsorplanan ve adsorplanmayan ilaç miktarları ile adsorpsiyon verimi.

Dokсорubisin konsantrasyonu mg/ml	Başlangıç ilaç miktarı(μg)	Adsorplanmayan ilaç miktarı(μg)	Adsorplanan ilaç miktarı(μg)	% Adsorpsiyon verimi
2,5	5336,4	1294,67	4041,73	75,73
1,5	3235,84	329,91	2906,02	89,81
1	1543,58	271,46	1272,12	82,41
0,75	1434,58	235,08	1199,49	83,61
0,5	871,68	197,87	673,80	77,28
0,25	423,58	174,79	248,78	58,72



Şekil 3.10. A) kitosan ile kombine edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllere, B) doksorubisine ve C) doksorubisin yüklü kitosan ile kombine edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllere ait FTIR spektrumu.

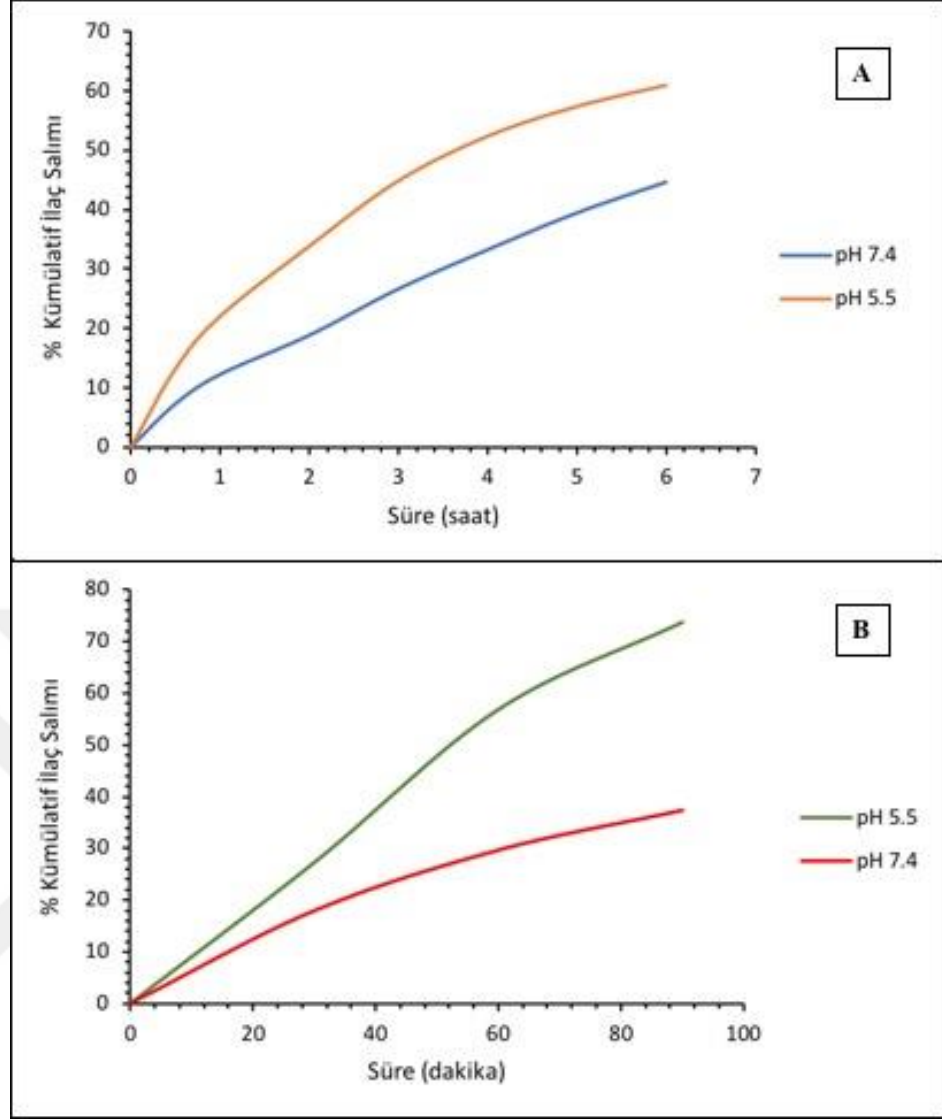
Doksorubisine ait aromatik halkalara ait $1400-1600\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki C=C titreşim bandı nanopartiküler sisteme ait FTIR spektrumunda (Şekil 3.10.) 1530

cm⁻¹ civarında kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllere ait pikler arasında yerleşmiş olarak gözlenmektedir. Bu da doksorubisinin nanopartiküler ilaç taşıyıcı sisteme başarıyla yüklendiğini göstermektedir.

3.4. In vitro İlaç Salımı

In vitro ilaç salımı sonuçlarına göre oluşturulan nanopartiküllerin pH 5,5' ta ilacı çok daha hızlı saldığı buna karşın pH 7,4' te salımın daha yavaş olduğu tespit edilmiştir. Bu durum sentezlenen nanopartiküler yapının ilacı dolaşımında ve sağlıklı dokularda salma eğiliminin kanserli dokuda salma eğilimden çok daha az olduğunu gösterir ki bu durumun da ilacın yan etkilerinin azaltılmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

Şekil 3.11. A 'da da görüldüğü gibi nanopartiküllerden salınan ilaç miktarı pH 7,4' te ilk 6 saatte % 44,6 kadar iken pH 5,5 'ta aynı saatte yaklaşık %61' e ulaşmıştır. Bununla birlikte serbest ilacın salım denemesi göstermektedir ki serbest ilaçlar nanopartiküler forma göre çok daha kolay difüze olmaktadır. Şekil 3.11. B' de de görüldüğü gibi 90. Dakikada pH 7,4'te %37.3' lük bir ilaç salımı varken aynı dakikada pH 5,5'ta %74' lük bir salım söz konusudur. Bu durum da hazırlanan nanopartiküllerin ilacı kontrollü bir şekilde saldığını aynı zamanda da asidik ortamda fizyolojik pH'a göre daha fazla ilaç salımı olduğunu gösterir.



Şekil 3.11. In vitro İlaç Salımı A) Kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllere ait salım grafiği B) Serbest doksorubisine ait salım grafiği.

3.5. Hücre Kültürü ve In Vitro Sitotoksite Testi

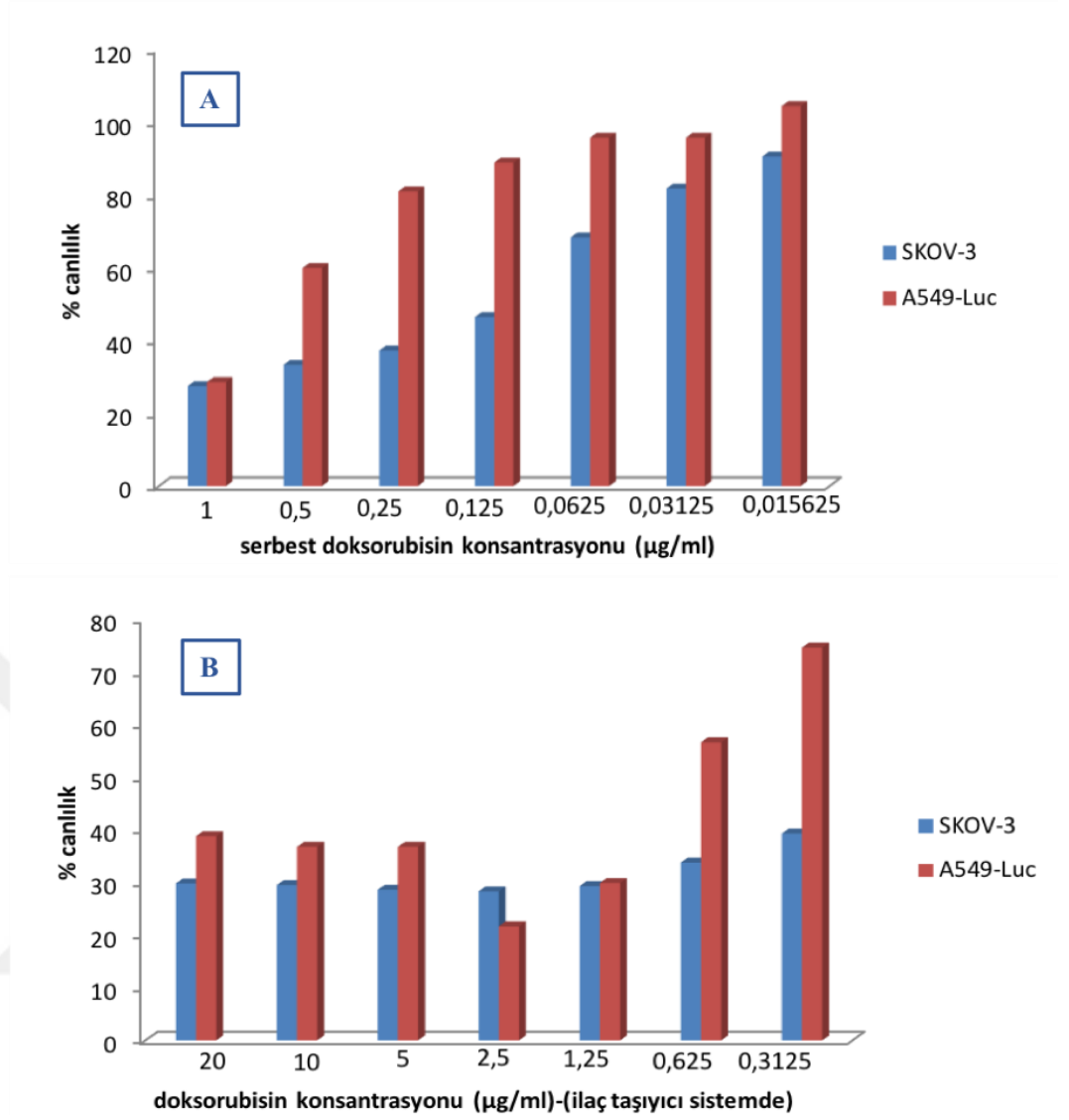
A549-luc ve SKOV-3 hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen 48 ve 72 saatlik sitotoksite testi sonuçlarına göre ilaç yüklü olmayan kitosan temelli hyaluronik asit nanopartiküllerin herhangi bir toksik etki yaratmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 3.2. 48. Ve 72. Saat için A549-luc ve SKOV-3 hücre hatlarında serbest doksorubisinin ve doksorubisin yüklü kitosan ile kombine edilmiş HA nanopartiküllerin sitotoksisite testi sonucu elde edilen IC₅₀ değerleri.

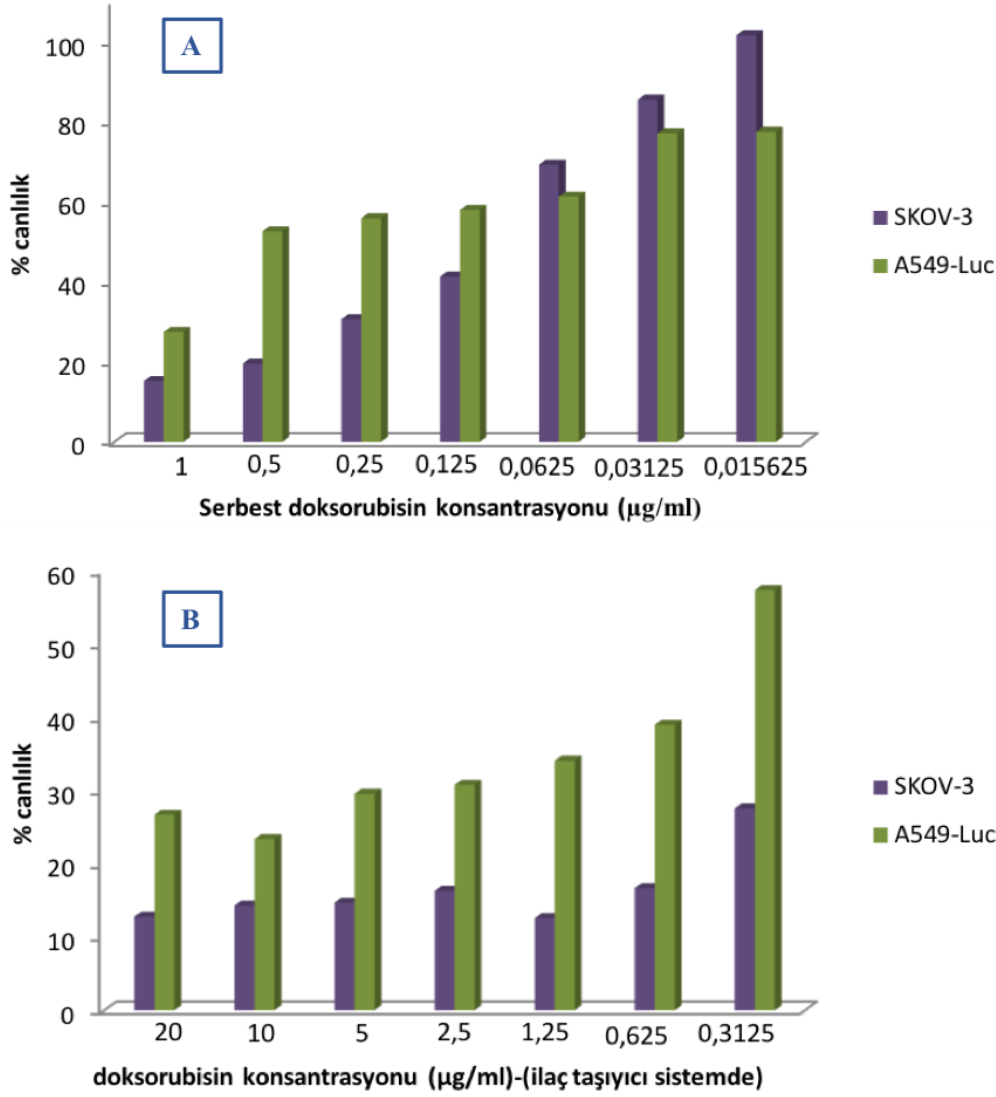
IC ₅₀ Değerleri (µg/ml)	48. saat		72. saat	
	Serbest dox	İlaç taşıyıcı sistemde dox	Serbest dox	İlaç taşıyıcı sistemde dox
Hücre Hatları				
A549-Luc	0,60 ± 0,1	0,84 ± 0,69	0,54 ± 0,5	0,29 ± 0,066
SKOV-3	0,16 ± 0,00007	0,00203 ± 0,00265	0,12 ± 0,00061	0,00078 ± 0,00066

Tablo 3.2. 'de görüldüğü üzere, 48. ve 72. saat sonunda yapılan sitotoksisite testi sonucuna göre serbest doksorubisinin IC₅₀ değeri sırasıyla SKOV-3 hücre hattı için 0,16 ± 0,00007 µg/ml ve 0,12 ± 0,00061 µg/ml, A549-luc hücre hattı için 0,60 ± 0,1 µg/ml ve 0,54 ± 0,5 µg/ml bulunmuştur. Bununla birlikte doksorubisin yüklü kitosan ile kombine edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllerin 48. ve 72. saat için IC₅₀ değerleri SKOV-3 hücre hattı için 0,00203 ± 0,00265 µg/ml ve 0,00078 ± 0,00066 µg/ml, A549-luc hücre hattı için 0,84 ± 0,69 µg/ml ve 0,29 ± 0,066 µg/ml bulunmuştur. Buna göre hazırlanan ilaç taşıyıcı sistem A549-luc hücre hattı için serbest doksorubisine göre 72. saatte 1,86 kat daha sitotoksik iken, SKOV-3 hücre hattı için aynı saatte 153,8 kat ve 48. Saatte 78,8 kat daha sitotoksiktir.

Platt and Szoka, 2008 tarafından yapılan derlemede hem A549-luc hücre hattının hem de SKOV-3 hücre hattının CD44 reseptörünü aşırı eksprese ettiği belirtilmektedir. Ancak CD44 reseptörüne hedeflemede A549-luc hücre hattı için HMW HA kullanılırken, SKOV-3 hücre hattı için LMW HA kullanılması söz konusudur. Sentezlenen yapıda LMW HA kullanılmış olması ve sitotoksisite testi sonuçlarına göre SKOV-3 hücre hattında A549-luc hücre hattına göre daha fazla toksisite yaratmış olması yapının aktif hedefleme yoluyla CD44 reseptörü ile etkileşim ilacın daha etkin bir şekilde hücre ölümü yaratmasını mümkün kılmıştır.



Şekil 3.12. MTT sitotoksosite testine göre 48. saat % canlılık grafikleri A) Serbest doxorubisin B) Doxorubisin yüklü ilaç taşıyıcı sistem



Şekil 3.13. MTT sitotoksosite testine göre 72. saat sonunda % canlılık grafikleri A) Serbest doksorubisin B) Doksorubisin yüklü ilaç taşıyıcı sistem

Şekil 3.12. ve şekil 3.13'te A549-luc ve SKOV-3 hücre hatlarında serbest ve ilaç taşıyıcı sistemde yüklü doksorubisinin MTT sitotoksosite testine göre sırasıyla 48. saat ve 72. saat sonunda analizlenen canlılık oranları yüzdesel olarak verilmiştir.

72. saat sonunda her iki hücre hattında da hem serbest ilaçta hem de ilaç taşıyıcı sistemde yüklü olan ilaç uygulamasında 48. saate göre ölüm oranının daha fazla olduğu görülmektedir.

Serbest doksorubisin uygulanan her iki hücre hattında da her iki süre için de canlılık ilaç taşıyıcı sisteme göre daha fazladır. İlaç taşıyıcı sistem serbest ilaç formülasyonuna göre daha fazla toksisiteye sebep olmuştur.

Doksorubisin özellikle over kanseri tedavisi için kullanılmaktadır. % canlılık verileri ve IC_{50} değerleri de buna paralel sonuçlar vermiştir. SKOV-3 hücre hattında hem serbest ilaç için hem de nanotaşıyıcı sistemde yüklü ilaç için canlılık oranları belirgin oranda A549-luc hücrelerine göre daha düşüktür. Bu durum hem doksorubisinin over kanseri üzerinde kullanılmasından hem de yine SKOV-3 hücrelerinin sahip olduğu CD44 reseptörü ile LMW HA etkileşiminden kaynaklanmaktadır.

Tüm bu veriler göz önüne alındığında doksorubisin yüklü kitosan temelli hyaluronik asit nanopartiküllerin bu hücre hatları için potansiyel bir ilaç taşıyıcı sistem olabileceği söylenebilir.



4. GENEL DEĞERLENDİRME

Mevcut antikanser ajan olan ve aktif olarak kanser tedavisinde kullanılmakta olan doksorubisin ilacının yol açtığı yan etkilerin azaltılması, terapötik indeksin artırılması amacıyla bu ajanın bir hedefli olarak kanser dokusuna taşınması amacıyla ilaç taşıyıcı sisteme yüklenmesi çalışılmıştır. Hazırlanan bu sistemin farklı kanser türlerindeki etkinliğinin araştırılması amacıyla iki farklı kanser hücresi üzerinde in vitro sitotoksitesite denemeleri yapılmıştır.

Yalnızca hyaluronik asit ile oluşturulan nanopartiküllerin yeterli verimde ve homojen olarak oluşturulamaması ve aynı zamanda yavaş bir yöntem olması nanopartiküler sistemin hyaluronik asit-kitosan kombinasyonu ve çok daha hızlı bir yöntem olan iyonik jelleşme yöntemiyle oluşturulmasına öncülük etmiştir. İyonik etkileşim temeline dayanarak oluşan kitosan ile kombine edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllere antineoplastik ajan olan doksorubisin ilacı başarıyla yüklenmiştir.

Sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilen ilaç taşıyıcı sistemin ilaç salım verilerine göre nanopartiküler sistemin ilacı serbest ilaç formülasyonuna kıyasla kontrollü olarak salıyor olduğu görülmüştür. Buna göre taşıyıcı sistem ile uzun sürede etkin doz miktarında kalınması mümkün olacaktır. Bununla birlikte oluşturulan ilaç taşıyıcı sistemin ilacı tümör mikroçevresine ait ve fizyolojik pH'tan düşük olan asidik pH'ta fizyolojik pH'a oranla daha hızlı saldığı tespit edilmiştir. Bu durumda sistem ilacı kan dolaşımında çok az salacak ancak kanser dokusuna ulaştığında bu bölgede daha fazla salacaktır. Bu sayede normal dokuya olan toksisitenin azaltılabilecektir.

Hazırlanan nanopartiküllerin 250-300 nm civarındaki boyutu sayesinde yapı EPR etkisi ile hedeflenebilecektir. EPR etkisinin kullanılması sayesinde nanopartiküller sağlıklı dokuda birikmek yerine tümör çevresindeki endotellerden tümör dokusuna geçerek bu bölgede birikecektir.

Farklı kanser hücre hatlarında sitotoksik etkisi incelenen ilaç yüklü olmayan sistemin toksisite yaratmadığı, ilaç yüklü olan taşıyıcı sistemin ise bu hücre hatları üzerinde etkin toksisitesi olduğu tespit edilmiştir. Özellikle SKOV-3 over kanseri hücre hattında A549-luc hücre hattına oranla daha fazla toksisite yaratmış olması sistemin bir diğer hedefleme mekanizmasının da çalıştığını göstermektedir. SKOV-3 hücre hattında aşırı üretilen CD44 reseptörünün ligandı olan ve sentezde

kullanılan LMW HA ile etkileşimi, yapının diğer hücre hattına oranla daha yüksek sitotoksik etki yaratmasına olanak tanımıştır.

Sonuç olarak hazırlanan kitosan ile modifiye edilmiş hyaluronik asit nanopartiküllerin farklı kanser hücre hatlarında kontrollü salım, terapötik indeks artışı ve toksisite azaltılmasına yönelik potansiyele sahip olabileceği söylenebilir.



5. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmed, E. M.**, 2015, Hydrogel: Preparation, Characterization, and Applications: A Review, *Journal of Advanced Research*, 6, 105-121 s.
- Ak, G.**, 2010, Folat-PEG-Doksorubisin Türevinin Sentezlenerek Teknesyumla İşaretlenmesi ve Kanser Görüntüleme Ajanı Olarak Kullanım Olanaklarının Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Biyokimya Anabilim Dalı, 78 s.
- Arias, J. L.**, 2011, Drug Targeting Strategies in Cancer Treatment: An Overview, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11, 1-17 s.
- Arseneault, M., Wafer, C., and Morin J.-F.**, 2015, Recent Advances in Click Chemistry Applied to Dendrimer Synthesis, *Molecules*, 20(5), 9263-9294 s.
- Bicudo, R. C. S., and Santana, M., H., A.**, 2012, Effects of Organic Solvents on Hyaluronic Acid Nanoparticles Obtained by Precipitation and Chemical Crosslinking, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 12, 1-9 s.
- Bozkır, A. ve Koçyiğit, S.**, 1995, Lipozomların Fiziksel ve Kimyasal Stabilitelerinin İncelenmesi, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 24(1), 42-52 s.
- Brannon-Peppas, L., and Blanchette, J. O.**, 2012, Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 206-212 s.
- Calo, E., Khutoryanskiy, V. V.**, 2015, Biomedical Applications of Hydrogels: A Review of Patents and Commercial Products, *European Polymer Journal*, 65, 252-267 s.
- Cho, K., Wang, X., Nie, Zhuo, G., C., and Shin, D. M.**, 2008, Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1310-1316 s.
- Choi, K. Y., Saravanakumar, G., Park, J. H., and Park, K.**, 2011, Hyaluronic Acid-based Nanocarriers for Intracellular targeting: Interfacial Interactions with Proteins in Cancer, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 99, 82-94 s.
- Choi, K. Y., Saravanakumar, G., Park, J. H., and Park, K.**, 2012, Hyaluronic acid-based Nanocarriers for Intracellular Targeting: Interfacial Interactions with Proteins in Cancer, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 99, 82-94 s.
- Cumar, K.**, 2015, Carbon Nanotubes and Energy, <http://large.stanford.edu/courses/2015/ph240/kumar1/> (Son Erişim Tarihi: 06.06.2018)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Çelik, M., 2014, Farmasötik Biyoteknolojide İlaç Hedefleme Teknikleri, Bitirme Ödevi, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 42 s.

Danhier, F., Feron, O., Preat, V., 2010, To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 148, 135-146 s.

Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., and Chiellini, E., 2011, Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 36, 981- 1014 s.

Deng, X., Cao, M., Zhang, J., Hu, K., Yin, Z., Zhou, Z., Xiao, X., Yang, Y., Sheng, W., Wu, Y., and Zeng, Y., 2014, Hyaluronic Acid- Chitosan Nanoparticles for Co-delivery of MiR-34a and Doxorubicin in Therapy Against Triple Negative Breast Cancer, *Biomaterials*, 35, 4333-4344 s.

Derman, S., Kızılbey, K., Akdeste Z. M., 2013, Polimerik Nanopartiküller, *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 107-120 s.

Dhamecha, D., Jalalpure, S., and Jadhav, K., 2015, Doxorubicin-functionalized Gold Nanoparticles: Characterization and Activity Against Human Cancer Cell Lines, *Process Chemistry*, 28 s.

Douziech-Eyrolles, L., Marchais, H., Herve, K., Souce, M., Claude, L., Dubois, P., and Chourpa, I., 2007, Nanovectors for anticancer agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), 541-550 s.

Doxorubicin **Hydrochloride**, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Doxorubicin_Hydrochloride#section=Top , Son Erişim Tarihi: 30.06.2018.

Doxorubicin, <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00997>, Son Erişim Tarihi: 30.06.2018.

Fakhari, A., Phan, Q., Thakkar, S. V., Middaugh, R., and Berkland, C., 2013, Hyaluronic Acid Nanoparticles Titrate the Viscoelastic Properties of Viscosupplements, *American Chemical Society, Langmuir*, 29, 5123-5131 s.

Gökçe, Y., 2008, Kitosan Nanoparçacıkların Sentezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 92 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gwak, S. J., Jung, J. K., An, S. S., Kim, H. J., Oh, J. S., Pennant, W. A., Lee, H. Y., Kong, M. H., Kim, K. N., Yoon, D. H., and Ha, Y., 2012, Chitosan/TPP-Hyaluronic Acid Nanoparticles: A New Vehicle for Gene Delivery to the Spinal Cord, *Journal of Biomaterials Science*, 23, 1437- 1450 s.

Hu, Z., Xia, X., and Tang, I., 2009, Process for Synthesizing Oil and Surfactant-Free Hyaluronic Acid Nanoparticles and Microparticles, <https://patents.google.com/patent/US20060040892A1/en>, Son Erişim Tarihi: 30.06.2018.

Hu, Z., Xia, X., Tang, L., 2006, Process for Synthesizing Oil and Surfactant-free Hyaluronic Acid Nanoparticles and Microparticles, US Patent 20060040892 A1, <https://patents.google.com/patent/US20060040892A1/en>, Son Erişim Tarihi: 24.06.2016.

Kanser Dairesi Başkanlığı, 2017, Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-tedavisi/kanser-tedavisi-nelerdir/428-hedefe-yonelik-tedaviler.html> (Erişim Tarihi: 01.06.2018)

Khodabandehloo, H., Zahednasab, H., and Hafez, A. A., 2016, Nanocarriers Usage for Drug Delivery in Cancer Therapy, *Iran Journal of Cancer Previews*, 9(2):3966

Kılınç, A., 2016, Neonikotinoit Grubu İnteksitisitlerin Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji ABD Farmasötik Toksikoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, 69 s.

Kırtıl, E., Öztop, M. H., 2014, Enkapsülasyon Maddesi Olarak Lipozom ve Gıdalarda Kullanımı:Yapısı, Karakterizasyonu, Üretimi ve Stabilitesi, *Akademik Gıda Dergisi*, 12(4), 41-57 s.

Kogan, G., Soltes, L., Stem, R., and Gemeiner, P., Hyaluronic Acid: A Natural Biopolymer with A Broad Range of Biomedical and Industrial Applications, *Biotechnology Letters*, 29, 17-25 s.

Kumari, A., Yadav, S. K., and Yadav S. C., 2010, Biodegradable Polimeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18 s.

Kumari, P., Ghosh, B., and Biswas, S., 2015, Nanocarriers for Cancer-targeted Drug Delivery, *Journal of Drug Targeting*, early online: 1-13.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, J., Huang, P., Chang, L., Long, X., Dong, A., Liu, J., Chu, L., Hu, F., Liu, J., and Deng, L.,** 2013, Tumor Targeting and pH-responsive Polyelectrolyte Complex Nanoparticles Based on Hyaluronic Acid-Paclitaxel Conjugates and Chitosan for Oral Delivery of Paclitaxel, *Macromol. Res.*, 21, 1331-1337 s.
- Lin, C.-H., Chen C.-H., Lin, Z.-C., Fang, J.-Y.,** 2017, Recent Advances in Oral Delivery of Drugs and Bioactive Natural Products Using Solid Lipid Nanoparticles as the Carriers, *Journal of Food and Drug Analysis*, 25, 219-235 s.
- Lowitz, B. B. and Casciato, D. A.,** 2010, *Manual of Clinical Oncology*, Cancer biology and oncogenes
- Luo, Y., and Prestwich, G. D.,** 1999, Synthesis and Selective Cytotoxicity of a Hyaluronic Acid-Antitumor Bioconjugate, *Bioconjugate Chemistry*, 10, 755-763 s.
- Manokaran, K.,** 2016, Exploring the scaffold structure and fluid properties of organs using clarity and decellularization techniques, Final Year Project Report, Bioengineering, University of Sheffield, 49 s.
- Misra, S., Hascall, V. C., Markwald, R. R., and Ghatak, S.,** 2015, Interactions Between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer, *Frontiers in Immunology*, 201(6), 31 s.
- Mühlen, Z. A., Schwarz, C., and Mehnert, W.,** 1998, Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery- Drug Release and Release Mechanism, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45, 149-155 s.
- National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering,** 2016, Drug Delivery Systems: Getting Drugs to Their Targets in a Controlled Manner, <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/drug-delivery-systems-getting-drugs-their-targets-controlled-manner> , (Erişim Tarihi: 01.06.2018)
- Oyarzun-Ampuero, F. A., Brea, J., Loza, M. I., Torres, D., and Alonso, M. J.,** 2009, Chitosan-Hyaluronic Acid Nanoparticles Loaded with Heparin for the Treatment of Asthma, *International Journal of Pharmaceutics*, 381, 122-129 s.
- Özdağ, H.,** 2008, Hücre Kültürü, Güvenli ve Etkin Laboratuvar Uygulamaları, <http://www.ozdaglab.com/styled-21/downloads-2/files/Hafta%20IX.pdf> , Son Erişim Tarihi: 07.08.2018.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Platt, V. M., and Szoka Jr., F. C., 2008, Anticancer Therapeutics: Targeting Macromolecules and Carriers to Hyaluronan or CD44, a Hyaluronan Receptor, *Molecular Pharmaceutics*, 5(4), 474-486 s.

Pouyani, T. and Prestwich, G. D., 1994, Functionalized Derivatives of Hyaluronic Acid Oligosaccharides: Drug Carriers and Novel Biomaterials, *Bioconjugate Chem.*, 5, 339- 347 s.

Ramasamy, T., Hiep Tuan, T., Choi, J. Y., Cho, H. J., Kim, J. H., Yong, C. S., Choi, J. O., and Kim, J. O., 2014, Layer-by-layer Coated Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles Designed for Use in Anticancer Drug Delivery, *Carbohydr. Polym.*, 102, 653- 661 s.

Rinaudo, M., 2006, Chitin and Chitosan: Properties and Applications, *Progress in Polymer Science*, 31, 603- 632 s.

Sayiner, Ö. ve Çomoğlu, T., 2016, Nanotaşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 40(3), 62-79 s.

Schante, C. E., Zuber, G., Herlin, C., and Vandamme, T. F., 2010, Chemical Modifications of Hyaluronic Acid for the Synthesis of Derivatives for a Broad Range of Biomedical Applications, *Carbohydrate Polymers*, 85, 469- 489 s.

Selvi Günel N., Özel, B., Kıpçak, S., Aktan, C., Akgün, C., Ak,G., Yılmaz, H., Biray Avcı C., Dodurga, Y., Hamarat Şanher, Ş., 2016, Synthesis of Methotrexate Loaded Chitosan Nanoparticles and In Vitro Evaluation of the Potential in Treatment of Prostate Cancer, *Anti-Cancer Agent sını Medicinal Chemistry*, 16:8, 5, 1038- 1042 s.

Singh, R., and Jr. Lillard, J., W., 2009, Nanoparticulate-based Targeted Drug Delivery, *Experimental and Molecular Pathology*, 86, 215-223 s.

Sunar, B. S., 2014, Doksorubisin (Drug Master Files), <https://www.slideshare.net/BurdeSuheylaSUNAR/doksorubisin-drug-master-files>,
Son Erişim Tarihi: 04.07.2018

Tiryaki, M. K., 2010, Hücre Kültürü Uygulamalarında Temel Prensipler, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Bitirme Tezi, 45 s.

Tiwari, G., Tiwari, R., and Bannerjee, S., K., 2012, Drug Delivery Systems: An Updated Review, *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2-11 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Tripodo, G., Trapani, A., Torre, M. L., Giammona, G., Trapani, G., and Mandracchia, D., 2015, Hyaluronic Acid and Its Derivatives in Drug Delivery and Imaging: Recent Advances and Challenges, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 97, 400-416 s.

Tumor-Seeking Nanoparticles,
<http://www.understandingnano.com/nanomedicine-nanoparticles-targeted-chemotherapy.html> (Son Erişim Tarihi: 07.06.2018)

Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017,
https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014-RAPOR_uzuun.pdf (Erişim tarihi: 31.05.2018)

Tüylek, Z., 2017, İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Nanoteknolojik Etkileşim, Bozok Tıp Dergisi, 7(3), 89-98 s.

Venishetty, V. K., Samala, R., Komuravelli, R., Kuncha, M., Sistla, R., and Diwan, P. V., 2013, β -Hydroxybutyric Acid Grafted Solid Lipid Nanoparticles: A Novel Strategy to Improve Drug Delivery to Brain, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 9, 388-397 s.

Wilczewska, A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., and Car, H., 2012, Nanoparticles as drug delivery systems, Pharmacological Reports, 64, 1020-1037 s.

Wu, S., Zhao, X., Du, Q., Sun, J., Wang, Y., Xia, Y., Wang, Z., and Xia, L., 2013, Adsorption Properties of Doxorubicin Hydrochloride onto Graphene Oxide: Equilibrium, Kinetic and Thermodynamic Studies, Materials, 6, 2026-2042 s.

Yao, H. J., Zhang, Y.G., Sun, L., and Liu, Y., 2014, The Effect of Hyaluronic acid Functionalized Carbon Nanotubes Loaded with Salinomycin on Gastric Cancer Stem Cells, Biomaterials, 35, 9208- 9223 s.

Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü., 2012, Kanser biyokimyası, Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 1(2), 7-18 s.

Yurdakul, A. ve Atav, R., 2007, Lipozomların Yapısı ve Sınıflandırılması, Tekstil ve Konfeksiyon, 4