

**HEDEFLENDİRİLMİŞ KANSER TEDAVİSİ İÇİN
BİYOPOLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF
BIOPOLYMERIC NANOPARTICLES FOR TARGETED
CANCER THERAPY**

ESMA ALP

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP Ana Bilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2010


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

: 
Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

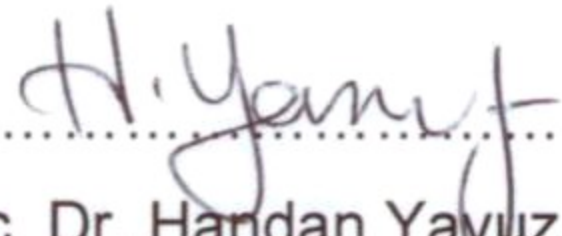
Üye

: 
Prof. Dr. Gülberk Uçar

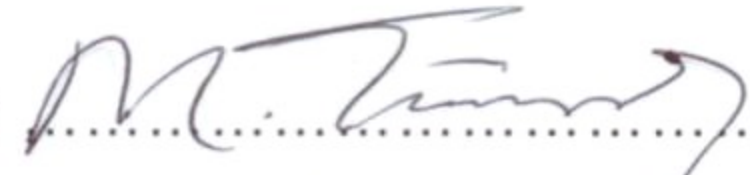
Üye (Danışman)

: 
Doç. Dr. Eylem Öztürk Güven

Üye

: 
Doç. Dr. Handan Yavuz

Üye

: 
Yard. Doç. Dr. Mustafa Türk

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil Denizli
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

HEDEFLENDİRİLMİŞ KANSER TEDAVİSİ İÇİN BİYOPOLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

ESMA ALP

ÖZET

İlaç veya biyomolekülleri taşımak amacı ile kullanılan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler son yıllarda büyük ilgi çekmektedir. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan çeşitli nanopartiküler sistemler mevcuttur. Özellikle polimerik nanopartiküller kanser tedavisinde; ilaç salımı kontrolü, ilaç verimliliğinde artış ve ilaç toksisitesinde azalma gibi avantajlarından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda tümör biyolojisinde elde edilen gelişmelere paralel olarak nanoteknolojik yaklaşımların kullanıldığı hedefli ilaç taşıyıcı sistemler kanser tedavisi için umut vaat etmektedir. Bu çalışmada reseptör aracılı kanser tedavisinde kullanılmak üzere nanopartiküllerin hazırlanması ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında polihidroksialkanoatlar grubunun bir üyesi olan poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV), kullanılmış olup antineoplastik ajan olarak kanser tedavisinde kullanılan etoposid seçilmiştir. Nanopartiküllerin fizikokimyasal ve morfolojik özellikleri; FTIR, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile belirlenerek; homojenizasyon hızının, polimer konsantrasyonunun ve stabilize edici ajan miktarının partikül boyutu üzerine etkisi zeta boyut analizi ile incelenmiştir. Bir anti-kanser ajan olan etoposid nanopartiküllere yüklenerek ilaç salım profilleri elde edilmiştir. Kanser hücrelerinin "aktif" hedeflenmesi amacıyla nanopartiküller folik asit ile modifiye edilmiş ve ligand bağlanma verimliliği araştırılmıştır. Çalışmanın son aşamasında nanotaşıyıcıların kanserli hücrelerle olan etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaçla sitotoksite ve apoptosis/nekrosis çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, etoposid yüklü ve folik asit ile modifiye edilmiş PHBV nanopartiküllerin kanser tedavisi için biyoyumlu ve verimli bir yol sağladığını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: PHBV nanopartikül, folik asit, etoposid, hedefli kanser tedavisi, nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemler

Danışman: Doç. Dr. Eylem Öztürk Güven, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIOPOLYMERIC NANOPARTICLES FOR TARGETED CANCER THERAPY

ESMA ALP

ABSTRACT

Nanoparticulate drug delivery systems which are nanometric carriers used to deliver drugs or biomolecules have received great attention over the last decades. There are a variety of nanoparticle systems currently being used for cancer therapeutics. Polymeric nanoparticles have been widely investigated for both diagnosis and targeted treatment of cancer because of their advantages, such as drug release control, improvement of drug efficiency, drug targeting and reduction of drug toxicity. Recently in parallel with developments in tumor biology, targeted drug delivery systems seem promising for successful cancer treatment. Aim of this study was to prepare and characterize nanoparticles to use in receptor-mediated cancer therapy. A member of polyhydroxyalkanoates, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV), was used to prepare nanoparticles. The antineoplastic drug selected in this study was etoposid which can be used for the cancer treatment. Physicochemical and morphological properties of nanoparticles were determined by using FTIR, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM). Effect of homogenization time, polymer concentration and amount of surfactant on nanoparticle size were also investigated by Zeta Size Analyser. Etoposid was loaded into nanoparticles and drug loading/drug release profiles were obtained. For 'active' targeting of cancerous cells; nanoparticles were modified with folic acid and ligand binding efficiency was investigated. At the last stage of the study cytotoxicity and apoptosis/necrosis studies were performed. Obtained results showed that Etoposid-loaded and folic acid attached PHBV nanoparticles provide a biocompatible and efficient means for cancer treatment.

Keywords: PHBV nanoparticle, folic acid, Etoposid, targeted cancer therapy, nanoparticulate drug delivery systems.

Advisor: Doç. Dr. Eylem Öztürk Güven, Hacettepe University, Nanotechnology and Nanomedicine Division

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, pratik uygulamalar süresince tıkanıp her noktada yol göstericiliği ile ilerlememe katkıda bulunan, en zor zamanlarımda beni hiç yalnız bırakmayan sevgili Hocam Doç. Dr Eylem Güven Öztürk'e;

Sahip olduğu deneyim ve birikimi benimle paylaşan, zamanını ve desteğini esirgemeyen, motivasyonumun her zaman zinde kalmasını sağlayan sayın Hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a ve sevgili ailesine;

Tez çalışmalarımıdaki yardım ve desteği için Hocam Yrd. Doç. Dr. Mustafa Türk'e

Çalışmalarım sırasında sorularımı yanıtsız ve beni çaresiz bırakmayan, yardımlarından ötürü kendisine karşı minnet duygularla dolduğum Dr. Ebru Kılıçay'a

Çalışmalarım esnasında bana maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, kaprisli her anımı büyük bir erdemle geçiştirebilen sevgili arkadaşlarım Nazlı Çalışkan ve Öznur Akbal'a;

Tez boyunca yakasından düşmediğim ama her seferinde vakur kişiliği ile yardım taleplerimi olumlu karşılayan ve beni zor anlarımda yalnız bırakmayan sevgili arkadaşım Tayfun Vural'a,

Çalışmamın başından beri akademik bilinci ve disipliniyle beni etkileyen ve yardımlarıyla beni destekleyen, birlikte çalışmaktan keyif aldığım Tamer Çırak'a,

Destekleri ve paylaştıkları keyifli anlarla beni her an mutlu ve motive eden canım arkadaşlarım Ebru Erdal, Zeynep Karahaliloğlu, Eda Yalçın, Damla Türkay ve Betül Bozdoğan Pala'ya,

Birlikte olmaktan ve çalışmaktan mutluluk duyduğum Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu üyeleri, Yrd. Doç.Dr. Mesut Şam, Cem Bayram, Doğa Kavaz, Mehdi Tayybi Azar, Reza Didarian, Gökçe Bozokalfa, Mehmet Doğan Aşık ve Ekin Çelik'e,

Tez çalışmam süresince benimle değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan Murat Demirbilek'e,

Zaman, mekan ya da koşul gözetmeksizin ihtiyacım olan her an yanımda bulabileceğimden şüphe ettirmeyen dostum Tuğba Emekçi'ye

Beni özen ve özveriyle büyüten, bana duydukları güveni ve sevgiyi zırah gibi kullanarak bugünlere gelmemi sağlayan canım anneme ve babama,

Bana, ihtiyacım olan maddi ve manevi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen, şımarma ihtimalimi bir an olsun hesaplarına katmayan candan öte ağabeylerime, ablama ve kardeşime,

Varlığıyla hayatımıza gökkuşağının tüm renklerini katan Ahmet Dağlı'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Esma Alp

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.2. Kanser Teşhis ve Tedavisi	6
2.2.1. Cerrahi Tedavi.....	6
2.2.2. Radyasyon Tedavisi	7
2.2.3. Kemoterapi	8
2.2.4. İmmünoterapi	8
2.2.5. Lazer Tedavisi	10
2.2.6. Hipertermi.....	10
2.3. Kanser Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	11
2.3.1. Mikrokapsüller	11
2.3.2. Lipozomlar.....	11
2.3.3. Dendrimerler	12
2.4. İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme	13
2.4.1. Pasif Hedeflendirme	14
2.4.2. Aktif Hedeflendirme	14
2.4.2.1. Manyetik Hedeflendirme.....	15
2.4.2.2. Ultrasonik Hedeflendirme	15
2.4.2.3. Ligand-Reseptör Aracılı Hedeflendirme.....	15
2.5. İlaç Hedeflendirmesinde Karşılaşılan Engeller	16
2.6. Aktif hedeflendirme işleminde kullanılan hedefler ve liganlar	17
2.7. Kanser Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar.....	18
2.7.1. Kuantum Noktacıkları..	18
2.7.2. Manyetik Nanopartiküller	18

2.7.3.	Karbon Nanotüpler	19
2.7.4.	Altın Nanopartiküller	20
2.8.	Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	20
2.9.	Polimerik Nanoterapötikler	21
2.9.1.	Polimerik Nanopartiküller.....	21
2.9.2.	Polimerik Miseller	22
2.10.	İlaç İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Kullanılan Polimerler	23
2.11.	Polihidroksialkanoatlar.....	23
2.12.	Etoposid.....	25
2.13.	Hücre Kültürü	26
2.13.1.	Hücre Kültürünün Kullanım Alanları.....	27
2.13.2.	Hücre Kültürü Koşulları.....	27
2.13.3.	Hücre Kültür Sistemleri.....	28
2.13.4.	MTT Testi	29
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	30
3.1.	Kimyasallar	30
3.2.	PHBV Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	30
3.3.	PHBV Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	31
3.3.1.	Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi	32
3.3.2.	Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi	33
3.3.3.	Nanopartikül Boyut Analizi.....	33
3.4.	PHBV Nanopartiküllere İlaç Yükleme ve Salım Çalışmaları	34
3.4.1.	İlaç Yükleme Çalışmaları.....	34
3.4.2.	İlaç Salım Çalışmaları.....	35
3.4.3.	İlaç Enkapsülasyon Verimliliği	36
3.5.	PHBV Nanopartiküllerin Folik Asit ile Modifiye Edilmesi.....	36
3.6.	In Vitro PHBV Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri	37
3.6.1.	Sitotoksosite Testleri (MTT).....	37
3.6.1.1.	Hücrelerin Hazırlanması	37
3.6.2.	Etoposid yüklü, folik asit ile modifiye edilmiş PHBV nanopartiküllerin, hücre kültüründe Osteosarkoma hücreleri üzerine etkisinin araştırılması	40

3.6.2.1. Hücre Kültürü ve etoposid yüklü PHBV nanopartiküllerin hücrelerle etkileşimi	41
3.6.2.2. İkili boyama ve Aneksin-5 fluoresan metodu ile Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi	41
3.6.2.2.1. İkili boyama metodu.....	41
3.6.2.2.2. Aneksin-V Floresein Yöntemi	42
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMALAR	44
4.1. PHBV Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	44
4.1.1. Morfolojik Karakterizasyon	44
4.1.2. Kimyasal Karakterizasyon	46
4.1.3. Nanopartikül Boyut Analizi.....	50
4.1.3.1. Polimer Konsantrasyonunun Nanopartikül Boyutuna Etkisi.....	50
4.1.3.2. Homojenizasyon Hızının Nanopartikül Boyutuna Etkisi.....	51
4.1.3.3. Emülsifier Oranının Nanopartikül Boyutuna Etkisi.....	51
4.2. PHBV Nanopartiküllerin Folik Asit ile Modifikasyonu.....	52
4.2.1. PHBV nanopartiküllere folik asit bağlama verimliliği	52
4.3. PHBV nanopartiküllere ilaç yüklenmesi ve in-vitro ilaç salımı.....	53
4.4. PHBV nanopartikül-Hücre Etkileşimleri	55
4.4.1. Sitotoksikite testleri.....	55
4.4.2. İkili boyama ve Aneksin-V floresein boyaması ile elde edilen apoptotik indeks sonuçları	63
4.4.3. İkili boyama ve Aneksin-V floresein boyaması ile elde edilen Nekrotik indeks sonuçları.....	68
5. SONUÇLAR	71
6. KAYNAKLAR.....	72
7. EK	78
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. İyi huylu ve kötü huylu kanser gelişimi	6
Şekil 2.2. Doğal katil hücreler (NK), dendritik hücreler ve makrofajlar gibi folat reseptörleri ile birlikte immün hücreler tarafından antibadi-kaplı tümör hücrelerinin doğal tanınması	9
Şekil 2.3. Mikrokapsülün genel yapısı	9
Şekil 2.4. Lipozomların oluşum basamakları	12
Şekil 2.5. Dendrimerlerin yapısı ve şematik görünümü	13
Şekil 2.6. İyileştirilmiş geçirgenlik ve alıkonma etkisi yoluyla pasif ilaç hedeflemesi	14
Şekil 2.7. Nano sistemlerin ilaç hedeflendirmesindeki rolü	16
Şekil 2.8. Hücre yüzeyindeki ligand ve reseptörlerin şematik görünümü ...	17
Şekil 2.9. Bir kuantum noktacığının yapısı	18
Şekil 2.10. Manyetik Nanopartikülün şematik görünümü	19
Şekil 2.11. Polimerik ilaç taşıyıcı sistemler için olası ilaç salım mekanizmaları	21
Şekil 2.12. Polimerik misellerin genel şematik görünümü	22
Şekil 2.13. PHA'ların genel yapısı	24
Şekil 2.14. PHBV'nin kimyasal yapısı	25
Şekil 2.15. Etoposidin kimyasal yapısı	28
Şekil 2.16. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromür)	29
Şekil 3.1. PHBV nanopartiküllerin hazırlanma prosedürü	30
Şekil 3.2. Atomik kuvvet mikroskopunun temel çalışma prensibi	31
Şekil 3.3. PHBV nanopartiküllerden etoposid salım ve analiz düzeneği	34
Şekil 3.4 Folik Asitin Kimyasal Yapısı	35
Şekil 3.5 Folik asitin PHBV nanopartiküllerine kovalent bağlanması mekanizması	36

Şekil 4.1a. PHBV nanopartiküllerin AFM görüntüsü.....	43
Şekil 4.1b. PHBV Nanopartiküllerin üç boyutlu AFM görüntüsü.....	44
Şekil 4.2. PHBV nanopartiküllerin SEM görüntüsü	44
Şekil 4.3. PHBV polimerine ait FTIR spektrumu	46
Şekil 4.4. PHBV nanopartiküllere ait FTIR spektrumu	46
Şekil 4.5. Folik asit bağlı PHBV nanopartiküllere ait FTIR spektrumu.....	47
Şekil 4.6. Folik asite ait FTIR spektrumu	47
Şekil 4.7. Etoposid yüklü PHBV nanopartiküllere ait FTIR spektrumu	48
Şekil 4.8. Etoposide ait FTIR spektrumu	48
Şekil 4.9. Polimer miktarının partikül boyutuna etkisi.....	49
Şekil 4.10. Homojenizasyon hızının partikül boyutuna etkisi	50
Şekil 4.11. Tween-80 miktarının partikül boyutuna etkisi	51
Şekil 4.12. Etoposid yüklü PHBV nanopartiküllerine folik asit bağlanması ..	52
Şekil 4.13. PHBV nanopartiküllerden kümülatif etoposid salım grafiği	53
Şekil 4.14. PHBV-NP ve PHBV-Etoposid nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 24 saatlik sitotoksik etkisi.....	55
Şekil 4.15. Folat takılmış PHBV-NP ve Etoposid yüklü folat takılmış PHBV-NP'lerin osteosarkoma hücrelerine 24 saatlik sitotoksik etkisi.....	57
Şekil 4.16. PHBV-NP ve PHBV-Etoposid nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 48 saatlik sitotoksik etkisi	58
Şekil 4.17. Folat takılmış PHBV-NP ve Etoposid yüklü folat takılmış PHBV-NP'lerin osteosarkoma hücrelerine 48 saatlik sitotoksik etkisi.....	60
Şekil 4.18. Serbest etoposidin sitotoksitesi	61
Şekil 4.19. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen apoptotik hüce fotoğrafları	64
Şekil 4.20. Aneksin-V ve PI ile boyama metodundan elde edilen etoposid yüklü NP fotoğrafları	65

Şekil 4.21. Aneksin-V ve PI ile boyama metodundan elde edilen etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP fotoğrafları	66
Şekil 4.22. Aneksin-Vflorosein ve Propodium Iyodid(PI) floresan boya kullanılarak elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan doğal ve sentetik polimerler ...	18
Çizelge 3.1. Osteosarkoma hücrelerinin hücre kültür ortamı	18
Çizelge 4.1. İlaç enkapsülasyon verimi.....	52
Çizelge 4.2. PHBV ve farklı polimer/etoposid oranlarında hazırlanan PHBV-Etoposid nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 24 saatlik sitotoksik etkisinin sonuçları.....	54
Çizelge 4.3. PHBV-Folat ve farklı polimer/etoposid oranlarında hazırlanan PHBV-Etoposid-Folat nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 24 saatlik sitotoksik etkisinin sonuçları.....	56
Çizelge 4.4. PHBV ve farklı polimer/etoposid oranlarında hazırlanan PHBV-Etoposid nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 48 saatlik sitotoksik etkisinin sonuçları	57
Çizelge 4.5. PHBV-Folat ve farklı polimer/etoposid oranlarında hazırlanan PHBV-Etoposid-Folat nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 48 saatlik sitotoksik etkisinin sonuçları.....	59
Çizelge 4.6. Serbest etoposidin osteosarkoma hücrelerine 24 ve 48 saat süre sitotoksik etkisinin sonuçları	61
Çizelge 4.7. Kanser ilacı Etoposid(E), farklı oranlarda etoposid yüklü nanopartiküller(NP) ve farklı oranlarda etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş nanopartiküllerin(PF) osteokarsinoma kanser hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % apoptotik indeksleri gösteren çizelge.....	64
Çizelge 4.8. Kanser ilacı Etoposid(E), farklı oranlarda etoposid yüklü nanopartiküller(P) ve farklı oranlarda etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş nanopartiküllerin(PF) osteosarkoma hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % nekrotik indekleri gösteren çizelge	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PHBV	: Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat)
PHA	: Polihidroksialkonat
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	: Fourier Transform İnfrared Spektrometresi
EDC	: 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimid
MES	: 2-(N-Morpholino)ethane Sülfonik Asit
FITC	: Florosein İzotiyosiyanat
PI	: Propodiyum iyodid
NP	: Nanopartikül
MTT	: (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium bromür; Tiazolil blue)
RES	: Retiküloendotelial Sistem
EPR	: Artan Geçirgenlik ve Retansiyon Etkisi

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Sık görülmesi ve ölüm oranının yüksek olması nedeniyle de bir halk sağlığı sorunudur. Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında dördüncü sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sıraya yükselmiştir.

Sağlıklı vücut hücreleri (kas ve sinir hücreleri hariç) bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların (vücut içi ve dışındaki) onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanmaktadırlar. Fakat bu yetenekleri sınırlıdır. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Öte yandan kanser hücreleri herhangi bir sınırlama olmaksızın kontrolsüz bir şekilde bölünmekte, çoğalmakta ve komşu hücrelerin yerini almaktadırlar. Normal hücrelerin ihtiyacı olan beslenme kaynaklarını tüketerek buldukları organın işlevini bozabilmektedirler.

Kanser tedavisi birçok uzmanlık dalının işbirliğine ihtiyaç duymaktadır. Cerrahi ve radyoterapi lokal tedavi yöntemleri olmakla birlikte kemoterapi ve immünoterapi gibi sistematik tedaviler de devamında uygulanmaktadır. İlaç tedavisi yani kemoterapi kanserin tedavisi amacı ile kimyasal ajanların kullanımına dayalı bir yöntemdir. Ancak kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve kanserli hücrelerde beklenen yok edici etkiyi gösteren etken maddelerin tedavi sürecinde tercihi (veya seçimli) olarak kanserli hücrelere ulaşmak yerine normal ve sağlıklı dokulara-hücrelere de ulaşması, bu dokular-hücreler üzerinde olumsuz etkiler yaratması (veya toksik etki göstermesi) ve tedavi verimini azaltması kemoterapide karşılaşılan en önemli problemlerden biridir.

Son yıllarda anti-kanser ajanlarını içeren nano-yapılı ilaç salım sistemleri tümör bölgelerindeki eşsiz akümülyasyon davranışlarından ötürü oldukça dikkat çekmeye başlamıştır. Polimer konjüatları, polimerik miseller, nanopartiküller ve lipozomlar gibi çeşitli nano-yapılı taşıyıcılardan çeşitli anti-kanser ajanlarını pasif hedefleme tekniği ile seçimli olarak tümörlü bölgeye ulaştırmak üzere yararlanılmaktadır. Fakat tümörlü bölgede ilaç taşıyıcı nanopartiküllerin kanser hücresinin içine alınmasını arttırmak üzere daha efektif ve aktif bir hedefleme sistemine gerek duyulmaktadır.

Hedeflendirmenin amacı, konvansiyonel tedavide gözlenen olumsuzlukları en aza indirmek, hücresel düzeylere taşınmayı arttırmak, ilaçların dolaşımında yada diğer biyolojik sıvılardaki konsantrasyonunu ve farmokinetik özelliklerini değiştirmek, toksik ve immünojenik özellikleri gidermek yada en aza indirmek, ilaçların kararlılığını arttırmak ve vücudun diğer bölgelerinde herhangi bir etkileşime neden olmadan hedef bölgede istenilen düzeyde farmokolojik yanıt elde etmektir.

Kanser hücresi-spesifik reseptörlerine karşı çeşitli hedefleme ligandları nano-yapılı taşıyıcıların yüzeyine immobilize edilerek bunların kanserli hücrelere reseptör aracılığı ile endositoz yoluyla gönderilmesi sağlanmıştır. Bunların arasında folik asit (folat) çeşitli anti-kanser ilaçları için hedefleme ligandı olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. Folat bağlayıcı protein (folat reseptörü) tümörlerde çok fazla bulunurken normal dokularda çok az bulunmaktadır. Bu yüzden tümörlü hücrelere seçimli olarak hedefleme için folik asit anti-kanser ilaçlara ve nanopartiküllere (lipozomlara) kovalent olarak bağlanmıştır.

Nanoteknoloji ile geliştirilen polimerik nanopartiküller çözünebilir bir polimer matriks içerisinde ilaç taşıyabilen koloidal sistemlerdir. Nanopartiküllerin en önemli özelliği doku hedeflemeyi başarabilmeleri ve ilaçların hücre içine penetrasyonunu arttırmalarıdır. Hücre içine alım endositoz ile gerçekleşir. Partiküller lizozomal kompartmanda düşük molekül ağırlıklı çözünen bileşiklere dönüşerek bozunurlar ve boşaltım sistemi ile vücuttan atılırlar. Böylece bölgesel hedefleme sayesinde diğer organların etkilenmesi, çeşitli aktif maddelerin toksik etkisi ve yan etkileri önlenmiş olur.

Sunulan çalışmanın amacı, kanser tedavisinde kullanılmak üzere yüzeyleri biyokimyasal moleküllerle modifiye edilmiş nano boyutlu polimerik taşıyıcıların hazırlanması ve bunların karakterizasyonudur. Nanopartiküllerin hazırlanmasında polihidroksialkanoatlar grubunun bir üyesi olan poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV) kullanılarak emülsifikasyon-difüzyon yöntemiyle nanopartiküller hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanması aşamasından sonra nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskopu (AFM) teknikleri kullanılmıştır. Partiküllerin boy-boy dağılımları ise zeta boyut analizi ile incelenmiştir. Kanser

hücrelerinin “aktif” hedeflenmesi amacıyla nanopartiküller folik asit ile modifiye edilerek ligand bağlama verimliliği araştırılmıştır. Bir anti-kanser ilaç olan etoposid taşıyıcıya yüklenmiş ve *in vitro* ilaç yükleme/salım çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra sitotoksikite testleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise hazırlanan nanopartiküllerin osteosarkoma kanser hücre kültürleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, tek bir hastalık olmayıp, ortak özellikler paylaşan iki yüzden fazla hastalığı kapsayan genel bir tabirdir. Kanserler düzensiz büyümeleri ve vücudun diğer bölümlerindeki hücrelere yayılmalarıyla karakterize edilir (Corner, 2001; Yarbrow, Frogge ve Goodman, 2005).

İnsan trilyonlarca hücrenin oluşturduğu bir canlıdır. Bazı hücreler belli dokulara özgüdür. Örneğin epitel hücreleri gastrointestinal yol, mesane, akciğer, vajina, meme ve cilt dokularına has hücrelerdir. Bu grup hücreler kanserlerin yaklaşık %70'inden sorumludur (Venitt, 1978; Corner, 2001). Ancak malign değişiklik potansiyeline sahip her hücre kanserli bir yapıya öncülük edebilir. Kanserli doku sadece lokal olarak büyüme ve etrafındaki dokulara sızmalarıyla sınırlı özelliklere sahip değildir. Bunlar lenf sistemi ve kan yoluyla vücudun çoğu bölgesine yayılıp metastaza neden olurlar. Bu durum normal hücrelerin kontrol mekanizmalarının bozulduğu veya tamamen çöktüğü zaman meydana gelir (Corner, 2001).

Kanserli hücrelerde meydana gelen değişimler Hanahan ve Weinberg (2000) tarafından yapılan bir araştırma sonucu açıklanabilmektedir. Buna göre kanserli hücreler sağlıklı hücrelerin aksine gelişme sinyallerini kendi üretebilme yeteneklerine sahip olabilmektedir. Bunun sonucu olarak kendi gelişme faktörlerini sentezleyebilmekte ve bunlara tepki verebilmektedir. Böylece hücreler organizmadan bağımsız olarak hareket etmeye başlamaktadır (Hermanson ve ark., 1988).

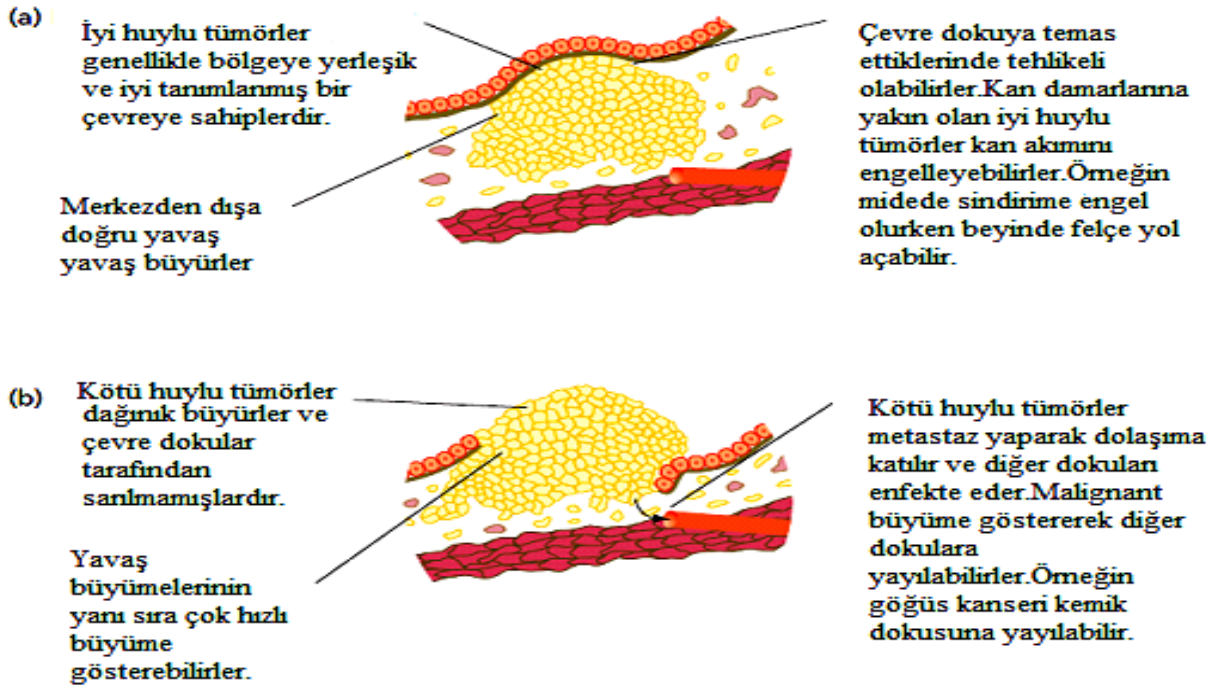
Hücreler çevrelerini kontrol edip çoğalma yada çoğalmama kararı alırlar. Rb adlı protein anti-çoğalma sinyallerinin iletilmesinden sorumludur. P53 proteininde meydana gelen mutasyon hücrelerin anti-yayılma işaretlerine karşı duyarsızlaşmasına neden olur.

Kanserli tüm hücreler apoptoza karşı direnç kazanır. DNA'nın uğradığı hasarı algılayan bir düzenleyici olarak hareket eden p53'ün kaybı veya mutasyonu kanserli hücrelerin apoptozdan kaçmasını sağlar.

Kanserli hücreler, sınırsız çoğalma özelliklerine sahiptirler. Yapılan çalışmalar, sağlıklı hücrelerin sadece 60-70 kez çoğalabileceğini ve sonra gelişmeyi bırakıp öldüklerini belirlemişlerdir. Buna karşın kanser hücreleri telomeraz adı verilen bir enzime bağlı olarak, sınırsız çoğalma kapasitesi kazanırlar.

Sürekli anjiyogenez (yeni kan damarlarının oluşturulması) kanserli hücrelerin bir diğer ortak özelliğidir. Bu durumun sürekliliği tümör kitlesinde yer alan hücrelere besin ve oksijen sağlanması açısından önemlidir. Tümörler anjiyogenez indükleyicilerinin ve inhibitörlerinin dengesini, gen ifadelerini değiştirerek etkileyebilmektedirler.

Kanser ölümlerinin büyük çoğunluğu, birincil tümör kitlesinin vücudun diğer bölümlerine yayılması sonucu gerçekleşir. Bu durum, hücrelerin sitoskeletlerini yeniden düzenleyerek diğer hücrelere eklenmelerini, diğer hücreler üzerinden veya etrafından geçmelerini sağlayarak başlar. Kanser hücreleri karşılaştıkları engelleri ortadan kaldırmak için bazı enzimler salgırlar. Bu enzimlerin içinde, kanser hücrelerinin geçişini engelleyen proteinleri kesen matrixmetalloproteinleri bulunur. Hücreler, bazal laminayı aşip kan damarlarının içine girebilir ve vücutta yerleşip çoğalmalarına uygun bir alan bulana kadar dolaşabilirler.



Şekil 2.1. İyi huylu ve kötü huylu kanser gelişimi a) iyi huylu tümörler orijin aldığı yerden gelişirler ve başka dokulara yayılmazlar. b) kötü huylu tümörler orijin aldıktan sonra çevre dokulara yayılarak metastaz özelliği gösterirler.

2.2. Kanser Teşhis Ve Tedavisi

Kanser tedavisinde kullanılan belli başlı yöntemler cerrahi, radyasyon, kemoterapi, immunoterapi, biyolojik tedavi, lazer tedavisi ve hipertermidir. Büyüyen kanser hücreleriyle savaşmada vücudun immün sistemini kullanan bu yöntemler biyolojik tedaviyle birlikte önemli rol oynamaktadır.

2.2.1. Cerrahi Tedavi

Bu metot, kanser tedavisinde en eski ve en başarılı yaklaşımlardan biridir. Kanserli bölgenin güvenli bir şekilde kesilmekte ve sonuçta geriye hastalık yaratacak herhangi bir kesit bırakmamak amaçlanmaktadır. Cerrahi operasyonun gerçekleştirilebilmesi için iki önemli sorunun cevaplanması gerekmektedir:

Tümörün bir bölgeye lokalize olup olmadığı önemlidir. Öncelikle kanser yayıldıysa cerrahi müdahale uygun olabilir veya olmayabilir.

Tümörün, hayati öneme sahip organlara ve önemli fonksiyonel problemlere neden olmadan uzaklaştırılması önemlidir. Kanserli akciğer veya böbrek uzaklaştırılabilir çünkü her birinin yedeği söz konusudur. Fakat cerrahi işlemle beynin önemli parçası ve tüm karaciğer kesilip çıkartılamaz.

İki cerrahi yaklaşım vardır. Birinci basamak yaklaşımda, anestezi altındayken tanısal biyopsi esnasında tümörün acil bir şekilde uzaklaştırılması gerekebilmektedir. Operasyon sonrasında ek tedaviye gereksinim olup olmadığı ve alternatif tedaviler arasında en etkin metodun ne olacağı tartışılmalıdır.

İkinci basamak yaklaşımda, sadece biyopsi yapılır ve sonrasında doktor ile sonuç tartışılır. Şayet biyopsi sonucu kötü huylu ise etkin olabilecek kanser tedavisi tartışılmalıdır. Eğer cerrahi işlem gerekiyorsa operasyonla tümörün uzaklaştırılması gerçekleştirilmelidir.

2.2.2. Radyasyon Tedavisi

Radyasyonun amacı tümörü azaltmak veya ortadan kaldırmaktır. Radyasyon, tümör hücrelerinin genetik yapısına (DNA) zarar verir. Böylelikle tümör hücreleri büyüyemez ve bölünemez. Buradaki amaç, radyoaktif materyalin tümörün içine veya yakınına yerleştirilmesiyle veya vücuttan belli uzaklıkta bulunan yüksek enerjili x-ışını cihazından tümöre x-ışını, gama veya elektronların direkt olarak ışınlanmasıyla tedavi gerçekleştirilebilmektedir.

Radyasyon tedavisi esnasında ağrı veya rahatsız edici bir durum yoktur. Radyasyon, sadece bazı lokalize kanserlerin tedavisinde gerekli olabilmektedir veya diğer tedavi çeşitleri ile birlikte kullanılabilir.

2.2.3. Kemoterapi

Bu terim çoğu zaman anlaşılammaktadır. Bu yöntemde kimyasallar (ilaçlar) ile birlikte kanserin tıbbi tedavisi gerçekleştirilmektedir. Örneğin kanserin 5-flurourasil ile tedavisi bir kemoterapidir.

Kemoterapinin kanser ile ilişkilendirilmesi ve tedavinin insanlar üzerindeki önemli yan etkileri korku ve endişe yaratmaktadır. Fakat çoğu zaman bu durum gereğinden çok abartılmaktadır. Ancak bazı insanlar bu kimyasal tedaviyi tolere edemeyebilmektedirler. Kemoterapide pek çok ilaç kullanılmaktadır ve bunların hepsi önemli yan etkiler yaratmamaktadır. Bu yan etkiler mide bulantısını giderici ilaçlar veya diğer ilaç tedavileri ile kontrol edilebilmekte veya azaltılabilmektedir.

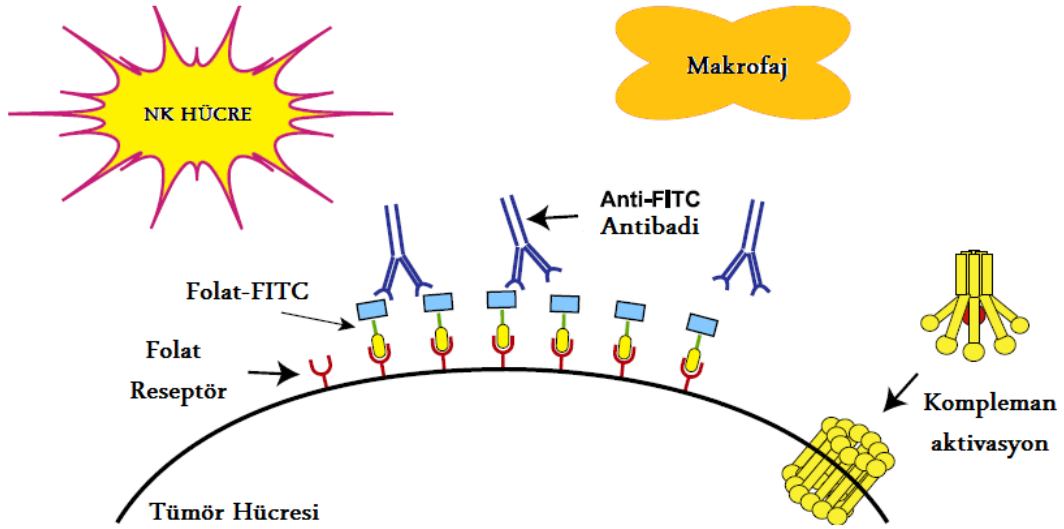
Cerrahi veya radyasyon yöntemi, belirli bir bölgede büyümekte olan kanseri tedavi etmektedir (lokal tedavi). Oysaki kemoterapi, genellikle lenf sistemi veya kan yoluyla vücudun pek çok bölgesini dolaşan kanserin tedavisinde kullanılmaktadır (sistemik tedavi). Geçmişte kemoterapi, cerrahi veya ışın tedavisinin uzun süreli etkin olmadığı durumlarda kullanılırdı. Fakat günümüzde kemoterapi, çeşitli kanserlerin özellikle de lokalize kanserin tedavisinde cerrahi ve radyasyon tedavisiyle birleştirilerek kullanılmaktadır.

2.2.4. İmmünoterapi

İmmünoterapi, vücut içerisinde bulunan herhangi bir yabancı maddeyi yıkmak ve elimine etmek için tasarlanan insan immün sistemi temelinde dayanmaktadır ve kanser hücrelerine hedefleme ve onları öldürmede önemli bir rol oynamaktadır.

İmmünoterapinin başarısında birtakım engeller vardır. Üstesinden gelinmesi gereken en önemli şey, immün sistemin daima kanser hücreleri veya yabancı maddelere karşı tedavi edici olmadığıdır. Normal insan hücrelerinde oldukça farklı olduklarından dolayı immün sistemin bakteri veya virüsü tanımlaması kolaydır. Ancak tümör hücreleri ve normal hücreler arasındaki fark çok azdır.

Önemli birtakım bilimsel ilerlemeler sonucunda immünoterapi bazı kanserlerin tedavisinde kullanılabilir. Günümüzdeki immünoterapi, sitokin ve antibadileri içeren immün sistem proteinleri ile birlikte tedaviyi kapsamaktadır. Sitokin tedavisi, immün sistemi aktive etmek ve etkinliğini arttırmak için tasarlanmıştır. İnterfreon ve interleukin-2, bu sitokinlerin en iyi bilinenleridir. Monoklonal antibadiler, kanser hücreleri üzerine hedefleme sonrasında kullanılarak, vücudun antibadi versiyonu şeklinde yapay olarak üretilmektedir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Doğal katil hücreler (NK), dendritik hücreler ve makrofajlar gibi folat reseptörleri ile birlikte immün hücreler tarafından antibadi-kaplı tümör hücrelerinin doğal tanınması. (Yingjuan Lu,2004)

Monoklonal antibadiler çeşitli kanser proteinlerini hedeflemektedir. Örneğin göğüs kanseri için trastuzumab (herseptin); non-Hodgkin lenfoma için rituksimab (rituksan), ytrium Y 90 ibritumomab tiuksetan (zevalin) ve iyot I-131 tositumomab (bekssar); akut miyelojen lösemi için gemtuzumab ozogamisin (milotarg); kronik lenfositik lösemi için alemtuzumab (kampat); kolorektal kanser için setuksimab (erbituks) ve panitumumab (vestibiks); Bazı durumlarda monoklonal antibadiler kemoterapi ilaçlarına (kemoetiketli), radyoaktif parçacıklara (radyoimmunoterapi) veya toksinlere (immunotoksinler) bağlanmaktadır.

Kanser aşılı, doğrudan kanser hücrelerine özgüdür. Bunlar çeşitli metodlar ile üretilmiştir. Bazıları nispeten non-spesifiktir iken bazıları direkt olarak kanser

hücreleri üzerindeki proteinlere karşı spesifiktir. Çeşitli enfeksiyon hastalıklarına karşı kullanılan aşılar, yabancı ajanları (kansere hücreleri) yıkmak ve saldırmak için kişinin immun sistemini uyarmaya yönelik olarak tasarlanmışlardır.

2.2.5. Lazer Tedavisi

Lazer tedavisi, tümör hücrelerini yıkmak için yüksek yoğunluktaki ışığın kullanımını içermektedir. Habis tümörün tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Lazer tedavisi, bazı hastalarda hastalığın erken aşamasında kanseri tamamen yenebilmektedir. Fakat bu teknik başlıca, cerrahi, radyasyon ve kemoterapi yoluyla tedavinin gerçekleştirilemediği kanama ve tıkanmanın olduğu ilerlemiş kanser tiplerinde kullanılmaktadır. Ayrıca kalp veya pulmonar hastalık, zayıf beslenme ve yaşın oldukça ilerlemiş olduğu koşullarda standart tedavilerin geçerli olmadığı durumlarda sıkça kullanılmaktadır. Lazer tedavisi, iyileşme evresi esnasında normal dokunun yerini alan kansere dönüşebilecek dokuyu yıkabilmektedir.

2.2.6. Hipertermi

Tümörü yok etmek için ısı ile tedavi uzun süredir kullanılmaktadır. 1800'lü yıllarda, bazı hastalarda yüksek ateşten sonra tümörün küçüldüğüne dair bulgular rapor edilmiştir. Kansere hastalarında hipertermiye ait klinik araştırmalar 1970'lerde başlamıştır ve böylelikle yeni antikansere tedavi yöntemi ortaya çıkmıştır.

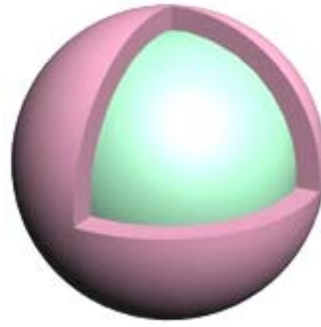
Hipertermi genellikle radyoterapi ve kemoterapi ile birleştirilmiştir. Bu tedavi tüm tümör çeşitleri için uygun değildir ve yaygın bir uygulama alanı yoktur ancak belirli tür kanserler için umut verici bir tedavi yöntemidir.

Hipertermi 102 ile 107°F (39 ile 42°C) sıcaklık aralığında tümöre karşı vücudun immün cevabını iyileştirebilmektedir ve tümöre karşı kan akışını arttırmakta ve oksijen sağlamaktadır, potansiyel olarak tümörü radyasyon tedavisine karşı daha hassas hale getirmektedir ve ayrıca kemoterapi, immunoterapi veya tümöre karşı gen terapisinin uygulanabilirliğini kolaylaştırmaktadır. Sıcaklık 106°F (41°C) yukarısına çıktığında hücreler zarar görmeye başlamaktadır. Zararın miktarı sıcaklığa ve maruz kalma süresine bağlıdır. 122°F (50°C) üzerindeki çok yüksek

sıcaklıklarda, tümörün ameliyatla çıkartılması kontrollü bir şekilde yapılmalıdır. Kanser tedavisi için genellikle yaklaşık bir saatlik sürede 106 ile 113°F (41 ile 45°C) arasında sıcaklık kullanılmaktadır.

2.3. Kanser Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Sistemler

2.3.1. Mikrokapsüller



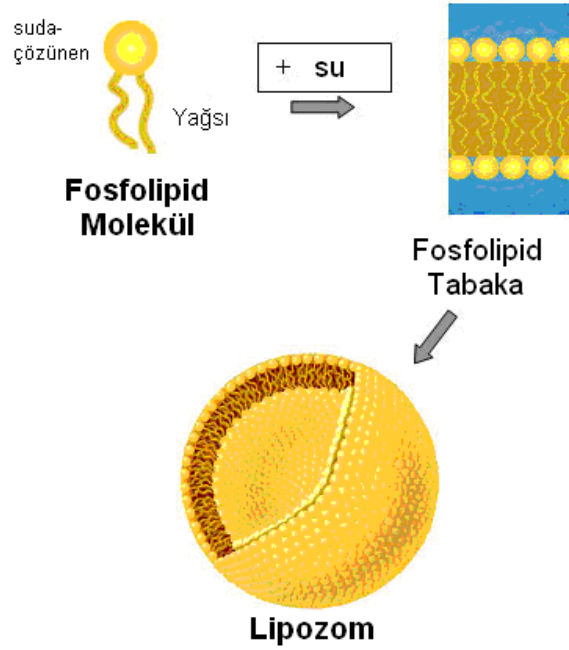
Şekil 2.3. Mikrokapsülün genel yapısı

Bir çekirdeğin çeperle kaplanması sonucu oluşan dozaj şekline mikrokapsül denir. Mikrokapsülleme ise katı, sıvı, ve gazın inert polimerik bir madde ile film şeklinde kaplanması işlemidir. Çekirdek maddeleri olarak proteinler, hormonlar, enzimler, antibiyotikler, antihistaminikler, vitaminler kullanılmaktadır. Çeper maddeleri olarak ise, doğal ve sentetik hidrofilik ve hidrofobik özellikteki polimerler kullanılır.

2.3.2. Lipozomlar

Lipozomlar doğal toksik olmayan fosfolipitler ve kolesterolden üretilen küresel yapılardır. Lipozomlar küçük boyutları, hidrofobik ve hidrofilik karaktere sahip olmaları ve biyouyumluluklarından dolayı ilaç taşıyıcı sistemler için büyük umut vaatmektedir. Lipozomların yapısı içerdiği lipidin kompozisyonu, boyutu, yüzey yükü ve hazırlanış metoduna göre değişir. Lipozomlar boyutlarına ve içerdikleri çift katmanın sayısına göre sınıflandırılır. Küçük tek katmanlı vesiküller (SUV) tek bir lipit tabakasıyla çevrelenmiş ve 25-50 nm çapındadır. Büyük tek katmanlı vesiküller(LUV) de küçük tek katmanlılara benzeyen heterojen yapılardır. Çok

katmanlı vesiküller (MLV) ise birbirlerinden sulu bir fazla ayrılmış birden fazla lipid tabakasından meydana gelen yapılardır.



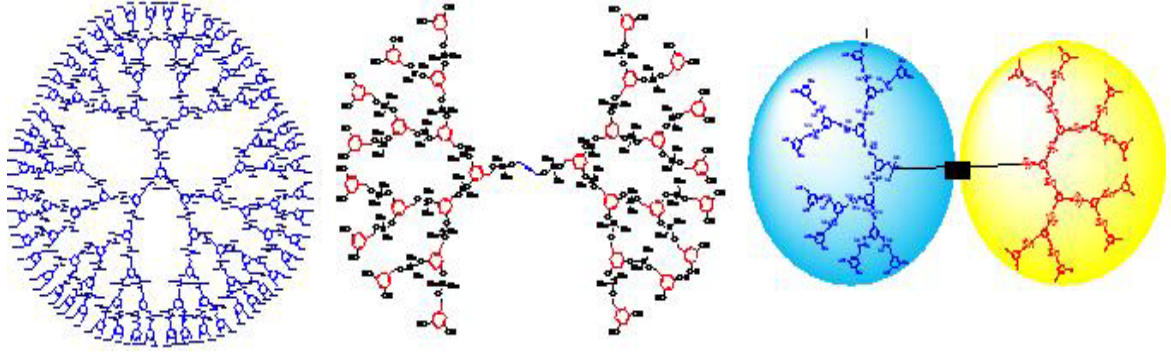
Şekil 2.4. Lipozomların oluşum basamakları

Negatif ve pozitif yüklerin varlığı, lipozomlara bir yüzey yükü sağlamaktadır. Lipozomlara yüklü ilacın farmokinetik özellikleri çözeltideki ilaçtan çok farklıdır. Ayrıca lipozomlar sistematik toksisitenin azalmasında ve enkapsüle edilen ilacın biyobozunurluğunu önlemede büyük yararlar sağlamaktadır. Lipozomlar antikorlar yada ligandlar bağlanarak hedeflendirilmiş ilaç tedavisinde kullanılmaktadır.

2.3.3. Dendrimerler

Dendrimerler ilk olarak 1980 ların başında keşfedilen, bir çekirdek etrafında dallanmış yapıda olan makro moleküllerdir (Tomalia, D.A. ve ark., 1985). Nanometre düzeyindeki boyutları, kolay hazırlanmaları ve işlevsel olmaları, biyolojik düzenlenme işlemini sağlayan yüzey gruplarının kopyalanma yeteneği sergilemeleri dendrimerleri ilaç taşıyıcı sistemler için cazip kılmıştır (Quintana.A. ve ark., 2002). Dendrimerler küçük bir molekül etrafında veya lineer bir polimer çekirdek etrafında dallanmış birimler ve bağlayıcılar bulunan simetrik moleküllerdir. Dendrimerlerdeki uç birimler moleküler çevrelerindeki etkileşimleri belirleyici rol

oyunur. Dendrimerlerin sağladığı en önemli katkı tedavi edici ajanların enkapsülasyonuna olanak vermesidir. İlaçlar içeriye hapsedilebileceği gibi, yüzey gruplara da bağlanabilmektedir. Dendrimerler biyolojik olarak aktif ajanlar için kaplama aracı olup, ilaçların vücudun belli bölgesine hedefli taşınımını sağlamaktadır. Örneğin, anti-tümör etkisi yüksek olan 5-Fluorouracil ilacının yüksek derecedeki toksik etkisi PAMAM dendrimerleriyle minimize edilmektedir.



Şekil 2.5. Dendrimerlerin yapısı ve şematik görünümü

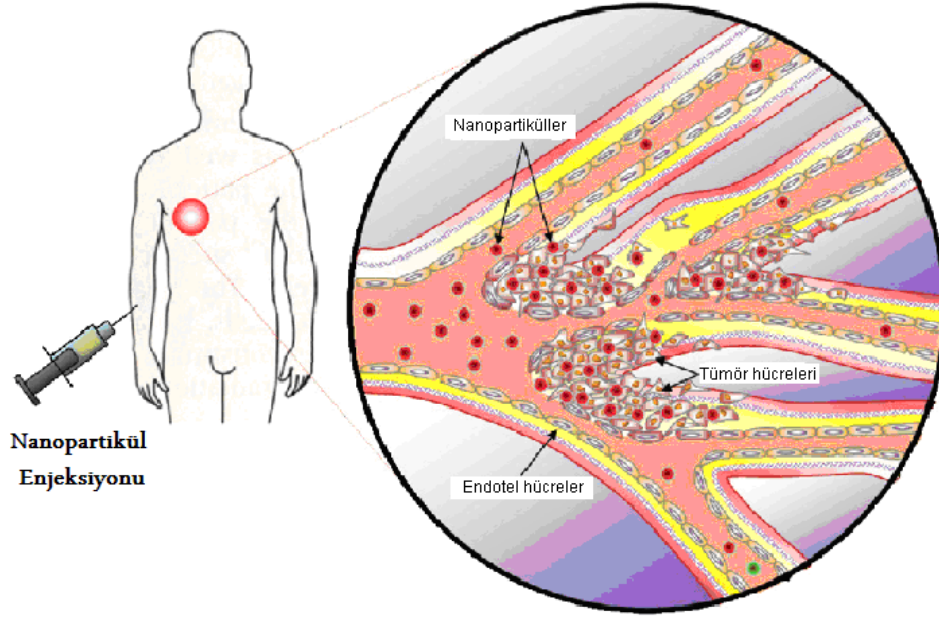
2.4. İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme

Hücre ve moleküler biyoloji alanında son yıllardaki gelişmeler artık birçok hastalığın patofizyolojisini daha iyi anlamamıza olanak vermektedir. Bu gelişmeler sadece ilaç keşfinde değil aynı zamanda görüntüleme ve tedavide de daha fazla yol almayı sağlamaktadır. İlaç taşıyıcı sistemlerde hedeflendirmede amaçlananlar; ilacın etkinliğini artırmak ve toksisitesini farmokinetik özelliklerini değiştirerek ve biyoyayımlarını sınırlandırarak azaltmaktır.

Hem düşük molekül ağırlıklı ilaçlar hemde protein ve plasmid DNA'lar gibi makromolekülleri içeren terapötik usul ve araçların tümünde hızlı bir ilerleme gözlenmektedir.

2.4.1. Pasif Hedeflendirme

Pasif hedeflendirme ilacın veya ilaç taşıyıcı sistemlerin fizikokimyasal ve farmakolojik faktörlere göre belli bir bölgede birikmesidir. İlaç ve ilaç taşıyıcı sistemler patofizyolojik ve anatomik olanakları kullanarak pasif olarak hedeflendirilir.



Şekil 2.6. İyileştirilmiş geçirgenlik ve alıkonma etkisi yoluyla pasif ilaç hedeflemesi. Polimerik nanopartiküller tercihen katı tümörde, yada sızıntı şeklindeki tümör damarı bölgesinde ve etkin olmayan lenfatik drenaj sisteminde toplanmaktadır (Jae Hyung Park ve ark. ,2008).

2.4.2. Aktif Hedeflendirme

Pasif hedeflendirmede yaklaşımların sınırlı olması ilaç hedeflendirme alanında aktif hedeflendirmeye yönelmeyi gerektirmiştir. Aktif hedeflendirme, vücudumuzda belli hücre, doku ve organlara özgü bağlanma özellikleri taşıyan ilaç ve ilaç taşıyıcı nanosistemlerin modifikasyonunu aktif ajanlarla sağlamaktadır (Nishioka, Y. ve Yoshino, H. 2001). İlacın, hedef liganda direkt bağlanması, bağlanma kapasitesini sınırlar. Ancak, ilaç taşıyıcı nanosistemlerin liganda bağlanması tam tersine milyonlarca ilaç molekülünün reseptöre bağlanmasını sağlamaktadır.

İlaç hedeflendirmesi, çeşitli reseptörler, hücre membranları üzerindeki antijen-proteinler ve lipit bileşenleri varlıkları sayesinde gerçekleşmektedir. Bazı reseptörler ve yüzey antijenler normal hücrelere oranla hastalık taşıyan hücreler üzerinde daha fazla bulunurlar.

Aktif hedeflendirme manyetik, ultrasonik ve ligand-reseptör aracılı olmak üzere 3'e ayrılmaktadır.

2.4.2.1. Manyetik Hedeflendirme

Belirli bir bölgeye tedavi amacıyla manyetik partiküller gönderildikten sonra manyetik alan uygulanarak yönlendirilmesi ve yine manyetik alan yönlendirilmesi ile manyetik alan altında ilacın salımının kontrol edilmesine dayanan hedeflendirme yöntemidir (Zhang J. ve ark., 2007).

2.4.2.2. Ultrasonik Hedeflendirme

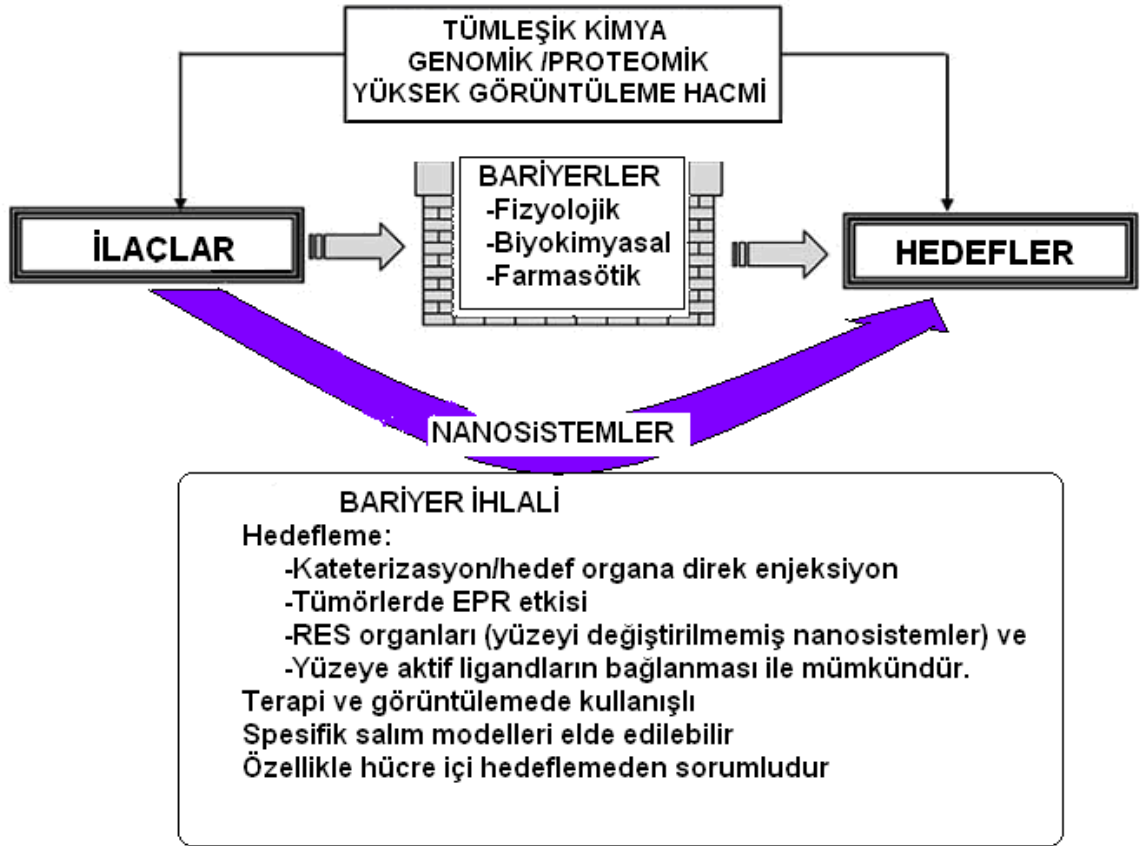
Dışarıdan uygulanan ultrasonik dalga sayesinde ilacın hedeflenen bölgede yoğunlaşmasını ve salımını kontrol eden sistemlerdir (Sheppard N.F, ve ark., 1992).

2.4.2.3. Ligand-Reseptör Aracılı Hedeflendirme

Hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere yönlendirilen taşıyıcı sistemler, hücre içine alınma ligantın ve reseptörün yapısına bağlı olarak reseptör aracılı endositoz veya transitoz ile gerçekleşmektedir. Ligant-reseptör aracılı hedeflendirmede kullanılan belli başlı ligandlar; lektinler, monoklonal antikorlar, monoklonal antikor-enzim konjugatları, monoklonal antikor fragmanları, vitaminler, sitokinler, peptid yapıdaki büyüme faktörleri, glikoproteinler, viral proteinler, hücre adezyon molekülleri, toksinler, apolipoproteinler ve glikoaminoglikanlar bulunmaktadır (Gürsoy 2002). Ligand doğrudan ilaca, polimer-ilaç konjugatına kovalent bağlanabildiği gibi, lipozomal taşıyıcılarda lipozom membranına veya yüzeyde kaplı bulunan polimerin dış ucuna da bağlanabilmektedir (Eldem ve Speiser 1989, Vyas ve ark. 2001).

2.5. İlaç Hedeflendirmesinde Karşılaşılan Engeller

İlaç hedeflendirmesinde, hedefin tanımlanmasında hem fizyolojik hem biyokimyasal sınırlamalar söz konusudur. Nanosistemler için uygun bir tekniğin geliştirilmesinde ise farmasötik engellerle karşılaşılmaktadır. Karşı kalınan zorluk sadece ilacın hedeflendirilmesiyle sınırlı olmayıp ilacın farmakolojik etkisini tümüyle sağlaması için ilacın istenen süre etkileşimde kalmasını sağlamaktır. Nanosistemler için en önemli engel endotel yapı ve bazal membrandır. Ayrıca plazma proteinleri de kandaki ilaç taşıyıcı sistemlerin dağılımını etkiler. Nanosistemlerin in-vivo dağılımını ve kandaki dolaşımını, sistemlerin boyutu ve yüzey karakteristikleri önemli derecede etkiler. Beyindeki endotel hücreler, beyine birçok ilacın girişini engelleyen kan beyin bariyerini (KBB) oluştururlar. Fakat vasküler endotel yapı düzenli değildir. Tümörlerde değişen endotel yapı makromoleküllere ve ilaç taşıyıcı geçişine artırılmış geçirgenlik sayesinde izin verir.



Şekil 2.7. Nanosistemlerin ilaç hedeflendirmesindeki rolü (Jaspreet K. Vasir ve ark. , 2005)

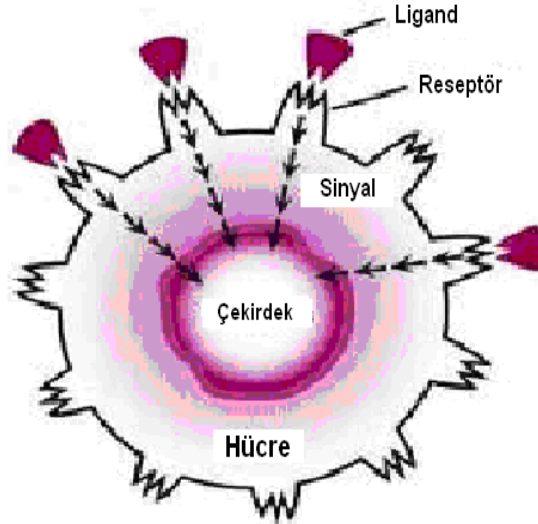
2.6. Aktif hedeflendirme işleminde kullanılan hedefler ve liganlar

Hedefler

A) Reseptörler

Hücre membranları üzerindeki reseptörler aktif hedeflendirme esnasında sadece hücrelerin ilaç taşıyıcı sistemler ile spesifik etkileşimi değil, aynı zamanda endositoz ile hücresel alımı sağlamaktadır (Rihova, B. 1998). Bu reseptörler;

- Folik asit resöptörleri
- LDL Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörleri
- Peptit reseptörleri



Şekil 2.8. Hücre yüzeyindeki ligand ve reseptörlerin şematik görünümü

B) Hücre Membranındaki Lipit Bileşenleri

C) Yüzey antijenleri/proteinleri

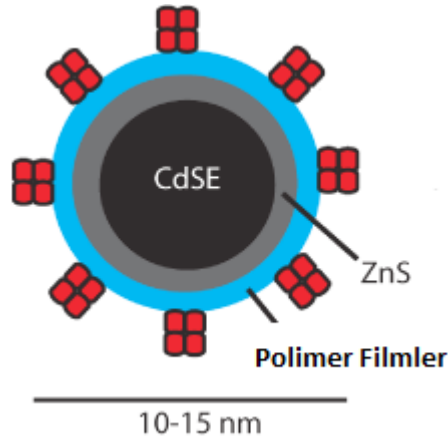
Ligandlar

Folik asit	Peptitler
Şekerler	Antikorlar
Lektinler	Modifiye Albüminler

2.7. Kanser Tedavisinde Nanoteknolojik Yaklaşımlar

2.7.1. Kuantum Noktacıkları

Kuantum noktacıları 2-10nm arasında boyutlara sahip kolloidal ve floresan özelliğe sahip yarı iletken kristallerdir. Kuantum noktacıların çekirdekleri periyodik sistemin II–VI(CdSe, CdTe, CdS, PbSe, ZnS ve ZnSe) veya III–V (GaAs, GaN, InP ve InAs) grup elementlerinin kombinasyonlarının ZnS kaplamasından oluşmaktadır. Işığa karşı kararlı yapıda olan parçacıklardır (Medintz, I.L. ve ark., 2005). Canlı organizmalarda hücrelerin floresans mikroskobu ile kombine olarak yüksek ayıricılıkta takip edilmesinde kullanılabilir. Bu nedenle kuantum noktaların organik floroforlara göre önemli avantajları bulunmaktadır. Kuantum noktalar ile işaretlenmiş kanser hücreleri farelere intravenöz olarak verilmiş ve akciğer dokusuna ekstravaze olurlarken takip edilmişlerdir.



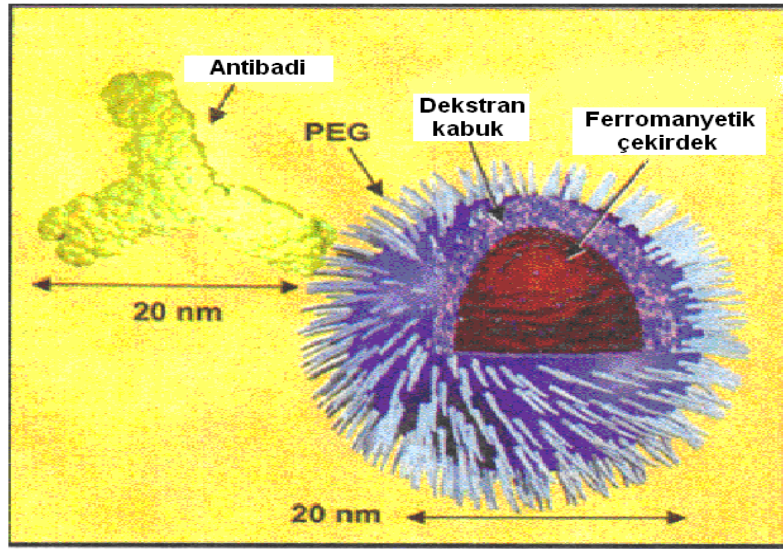
Şekil 2.9. Bir kuantum noktacığının yapısı

2.7.2. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller 10-20 nm boyutlarında sentezlenebilen, dışarıdan uygulanan bir manyetik alan ile istenilen şekilde hareket ettirilen ve canlı vücudundaki uygulamalarında hedeflenen yere gönderilebilen partiküllerdir. Fe^{2+} ve Fe^{3+} çekirdeklerinin genellikle dekstran veya PEG (polietilenglikol) molekülleri ile kaplanmasıyla oluşturulmaktadır. Bu partiküller, başta tıp olmak üzere ilaç

hedefleme, NMR gibi pek çok alanda geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Ayrıca yüzey fonksiyonlarının modifikasyonu ile hem in-vivo hem in-vitro aktif hedeflendirmeye teşhis olanağı vermektedirler (Lu, A.H. ve ark., 2007). Büyük yüzey alanları ve kuantum etkilerinden dolayı manyetik nanopartiküller süper manyetik özellik kazanmaktadırlar (Goya, 2003). Süperparamanyetik nanopartiküllerin uygulamalarından bazıları şu şekilde sıralanabilir.

- Hücre izolasyonu;
- Kontrollü ilaç salımı;
- Hipertermi;
- Manyetik rezonans görüntüleme (MRI);
- Gen transfeksiyonu;
- Doku mühendisliği (Ito A. ve ark., 2005).



Şekil 2.10. Manyetik Nanopartikülün şematik görünümü

2.7.3. Karbon Nanotüpler

Karbon nanotüpler, 100 nanometrenin altında eş-eksenli, silindirik yapıdaki grafit tabakasından oluşan flüenler kümesine ait yapılardır. Karbon nanotüpler tek katlı ya da çok katlı olabilmektedirler. Bu yapılar üstün derecede mukavemete, elektriksel özelliklere ve ısı iletimine sahiptirler. Metalik veya yarıiletken doğalarından ötürü biyosensör olarak da kullanımları söz konusudur. Karbon

nanotüpler yüzey fonksiyonlarının değişimi ile suda çözünür hale getirilebilirler. Bundan dolayı ilaç taşıyıcı sistemler ve doku iskeletleri olarak kullanılabilceği düşünülmektedir (Polizu, S. ve ark., 2006). DNA moleküllerinin yarısı kadar bir çapa sahip olan karbon nanotüpler özellikle kanser mutasyonlarının belirlenmesinde kullanılmak üzere araştırılmaktadır.

2.7.4. Altın Nanopartiküller

Altın nanopartiküller metalik nanopartiküllerin bir çeşididir; diğerleri Au, Ni, Pt ve TiO₂ nanopartiküllerdir. Altın nanoparçacıklar (<50 nm) farklı geometrilere (nanoküreler, nanokabuklar, nanoteller) hazırlanabilirler. Bu partiküllerin ışık altında yüzey plasmon rezonans özelliği gösterdiği bilinmektedir. Rezonans frekansında açığa çıkan toplam salınım iletilen elektronların hareket etmesini sağlar. Bunun sonucunda absorplanan ışık ve emilen fotonlar aynı frekanstadır. Altın nanopartiküller elektrik iletkenliği, floresans ve optik absorpsiyon gibi birçok teknikte belirlenebildiklerinden dolayı biyosensörler için mükemmel belirleyicilerdir (Huang, X. ve ark., 2007).

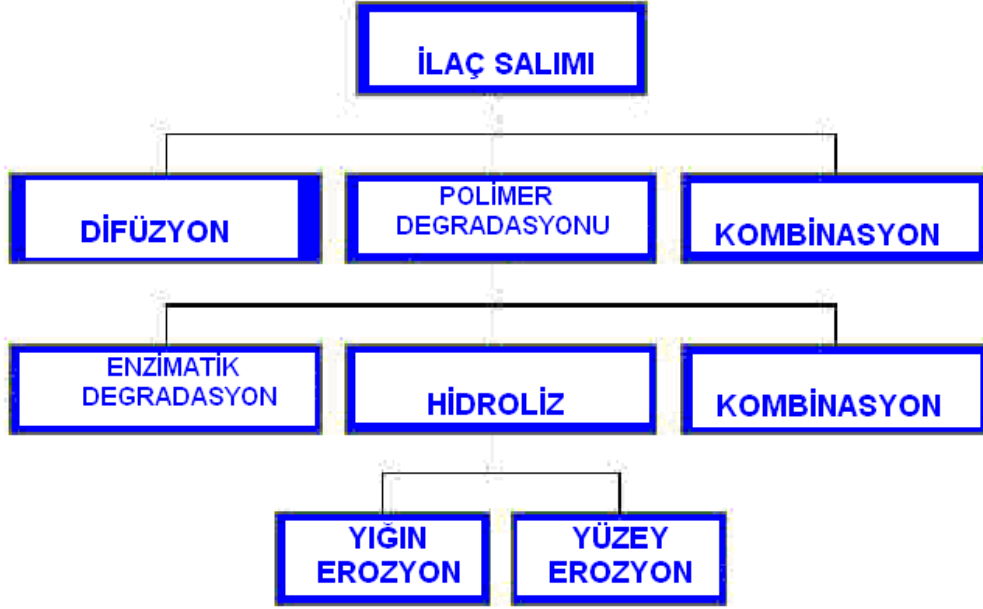
2.8. Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemler

Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler taşıyıcının özelliğine göre şu üç ana grupta toplanır;

- Lipozomal sistemler
- Elektromekanik sistemler
- Polimerik sistemler (Santini JT, Cima MJ, Langer R, 1999)

Polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerde ilaç polimerik bir matriksle birleştirilmektedir. Polimerik matriksten ilacın salımı bir çok parametreye bağlı olarak değişir. Bu parametreler; polimerik matriksin doğası, matriksin geometrisi, ilacın özellikleri, başta yüklenen ilaç miktarı ve ilaç matriks etkileşimidir (Bae YH, Kim SW ,1998). Polimerik matriksten istenen ilaç salım profilinin elde edilmesi için bu parametreler optimize edilir. İlacın polimerik matriksten salım mekanizmaları mekanik ve kimyasal olarak kontrol edilebilir. Fiziksel olarak kontrol mekanizmaları, difüzyon

ve çözücü bazlı mekanizmalar olarak sınıflandırılır. Kimyasal olarak ise, ilacın biyobozunur, polimer matriksten dağılım veya biyobozunur ilaç polimer konjugasyon mekanizmaları üzerinden yürür.



Şekil 2.11 Polimerik ilaç taşıyıcı sistemler için olası ilaç salım mekanizmaları

2.9. Polimerik Nanoterapötikler

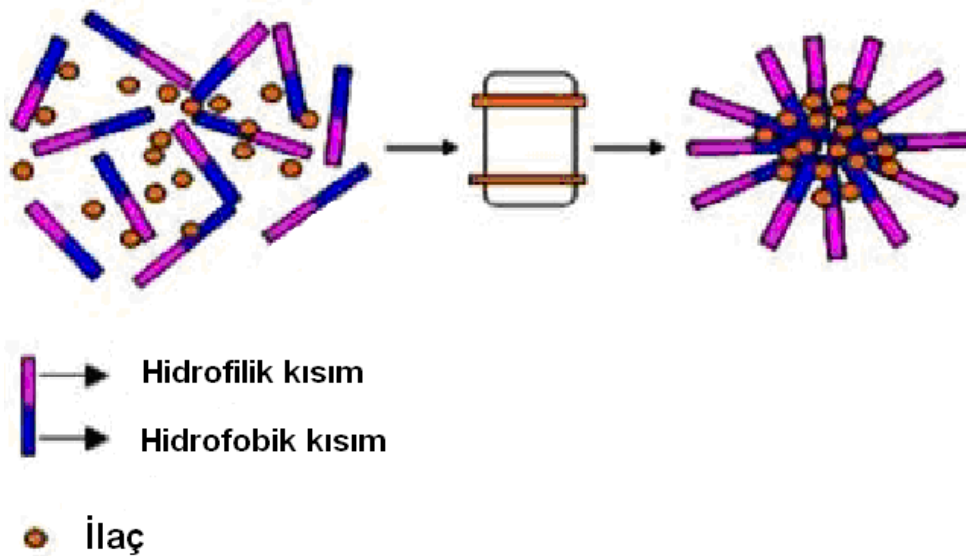
2.9.1. Polimerik Nanopartiküller

Son yıllarda biyobozunur polimerik nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemler arasında etkili bir yer edinmiştir (Brigger, I, ve ark., 2002). Nanopartiküller boyutları 10 ila 1000 nm arasında değişen makromoleküler yapılardan oluşan katı ve kolloidal parçacıklardır. İlaç partikülün içerisinde çözülmüş, matriks yapı içine enkapsüle edilmiş veya yüzeye tutturulmuş şekilde olabilir. Hazırlanış metodlarına göre partiküller farklı özelliklere ve salım karakteristiklerine sahip nanokapsül veya nanoküre oluşturabilir. İlaç taşınım sistemi olarak kullanımının avantajı küçük boyutlarından dolayı kapillerlerden daha kolay geçebilmeleridir.

2.9.2. Polimerik Miseller

Amfifilik kopolimerler sulu ortamda kendiliğinden düzenlenerek küresel kolloidal yapılar olan polimerik miselleri oluştururlar (Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y, 2001). Polimerik miseller yeni ilaç taşıyıcı sistemler olarak .ilaçların yükleme kapasitesini artırmaları, fiziksel koşullar altındaki kararlılıkları ve farklı uygulamalar için modifiye edilebilmeleri gibi özelliklere sahiptirler (Kwon, G.S.; Kataoka, 1995 ve Kwon, G.S.; Okano, T., 1996). Polimerik misellerin boyutları genellikle 100 nm nin altındadır. Hidrofilik yüzeyleri ilaç taşınım sistemlerinde büyük bir engel teşkil eden RES (retiküloendotelial sistem) in aşılmasını sağlar. Ayrıca bu özellikleri ile tümörlerin hedeflendirilmesinde EPR (artan geçirgenlik ve retansiyon) etkisinin etkili bir şekilde kullanımını sağlar (Kwon, G.S. ve ark., 1994). Polimerik miseller hücreye özgü çalışmalarda ligand-hedefe yönelik fonksiyonlaştırılırlar.

İmmünomiseller, polimerik misellere antitümör antikoların bağlanmasıyla oluşturulurlar. Bunların, in-vitro çalışmalarda çeşitli kanser hücrelerine bağlandıkları gösterilmiştir (Torchilin, V.P. ve ark., 2003). Örneğin polimerik misellere yüklü, suda çözünen bir anti-kanser ilaç olan Taxol, farelerdeki kanser hücreleri üzerinde daha fazla yığılma göstermiştir.



Şekil 2.12. Polimerik misellerin genel şematik görünümü

2.10. İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Kullanılan Polimerler

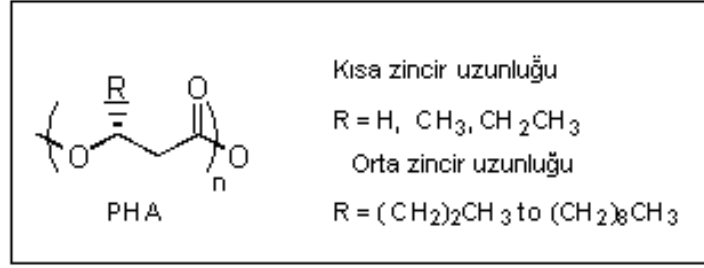
Biyobozunur polimerler ilaç, makromolekül, hücre ve enzimleri taşımak amacıyla sentezlenirler. Kullanılan polimerler, bünyesinde bulundurdukları ester, ortoester, anhidrit, karbonat, amid, üre gibi grupların manipülasyonu ile biyobozunurluk derecesinin belirlenmesi sağlanır (Mao HQ ve ark., 1999) Biyobozunma bir çok faktöre bağlı olarak enzimatik, kimyasal ve mikrobiyal esaslı olabilir. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan doğal ve sentetik polimerler çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan doğal ve sentetik polimerler

Sentetik Polimerler	Doğal polimerler
1)Alifatik poliesterler <ul style="list-style-type: none">• poli(glikolik asit)• poli(laktik asit)• poli(kaprolakton),• poli(laktit-ko-glikolit),• polidioksanon,• poliglikonat,	Polisakkaritler Selüloz Nişasta Aljinik asit Hyalüronik Asit Kitin ve Kitosan
2) Poli-orto-esterler	Proteinler
3) Polianhidritler	Kollojen
4) Poli(alkil siyanoakrilatlar)	Jelatin
5) Poli-aminoasitler	Albümin
6) Poli-fosfozenler	
7) Poli-fosfoesterler	

2.11. Polihidroksialkanoatlar

Polihidroksialkonatlar (PHA), sahip olduğu çok farklı yapısal farklılıklarından ve plastiklere benzerliklerinden ötürü büyük ilgi görmektedir (Reddy CSK ve ark., 2003). Bu biyobozunur poliesterler gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler tarafından sentezlenirler.



Şekil 2.13. PHA'ların genel yapısı

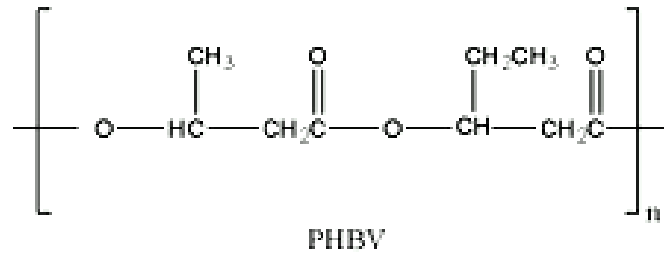
PHA'lar biyobozunur ve biyoyumlu olduklarından dolayı oldukça caziptirler. Karakteristik özellikleri bakteri içerisinde üretilmesi yoluyla başarılmıştır, bu sebeple biyobozunurluk ve biyoyumluluk için gerekli olan tüm stereospesifiklik [R(-) konfigürasyon içerisinde çatıdaki 35 tüm kiral karbon atomları] temin edilmiştir. Bakteri çeşidi ve büyüme koşulları PHA'nın kimyasal bileşimini belirlemektedir ve tipik olarak molekül ağırlığı 2×10^5 ile 3×10^6 Da arasındadır.

PHA'lar normal olarak, karbon kaynağının fazlasında hücreler kültüre edildiği zaman ve sınırlı besinle büyütüldüğü zaman sentezlenmektedirler (Witholt ve Kessler, 1999). Kısa zincirli olanlar *Ralstonia eutropha* ve diğer birçok bakteri tarafından, (Lenz and Marchessault, 2005) orta zincir uzunluğunda olanlar *Pseudomonas oleovorans* ve diğer pseudomonads sensu strictu tarafından üretilmektedir (Timm ve Steinbüchel 1990). Fonksiyonel grup içeren organik bileşikler üzerinde büyütülen hücre, fonksiyonize olmuş PHA oluşturmaktadır (Fritzsche ve ark., 1990, Lenz ve ark., 1990, Lenz ve ark., 1993). Olefin (Preusting ve ark., 1990), fenil (Fritzsche ve ark., 1990, Hazer ve ark., 1996), klorür (Doi ve Abe, 1990.), bromür (Kim ve ark., 1992), florür (Abe ve ark., 1990, Kim ve ark., 1996), fenoksi (Kim ve ark., 1996) ve siyanofenoksi (Kim ve ark., 1995) gibi fonksiyonel gruplar içeren PHA'lar, fonksiyonel substrat üzerinde büyütülen *Pseudomonas putida* veya *P. oleovorans* tarafından elde edilmiştir. Kısa zincirli PHA'ların karakteristik üyeleri poli(3-hidroksibütirat) PHB; poli(3-hidroksivalerat) PHV; ve poli(3-hidroksibütirat-co-3-hidroksivalerat) PHBV kopolimeridir.

PHA'lar yüksek kristallığe sahip, termoplastik ve suda çözünemeyen polimerlerdir. Optik aktiflik, izotaktik ve piezoelektrik gibi özelliklere sahiptir. Ayrıca biyobozunur, toksik olmayan ve in-vivo uygulamalarında minimal inflamatuvar etki gösterirler.

Kopolimerleri homopolimerlerinden daha hızlı bir şekilde bozunur. Aerobik koşullar altında karbondioksit ve suya parçalanırlar. PHB'ler biyoyumlulukları, işlenebilirlikleri ve bozunabilirlikleri gibi özellikleri sayesinde ilaç taşıma sistemleri ve doku mühendisliğinde kullanılırlar (Kassab AC ve ark., 1997). Piezoelektrik özellikleri bu polimerleri özellikle ortopedik uygulamalar için cazip kılmıştır (Reddy CSK ve ark., 2003).

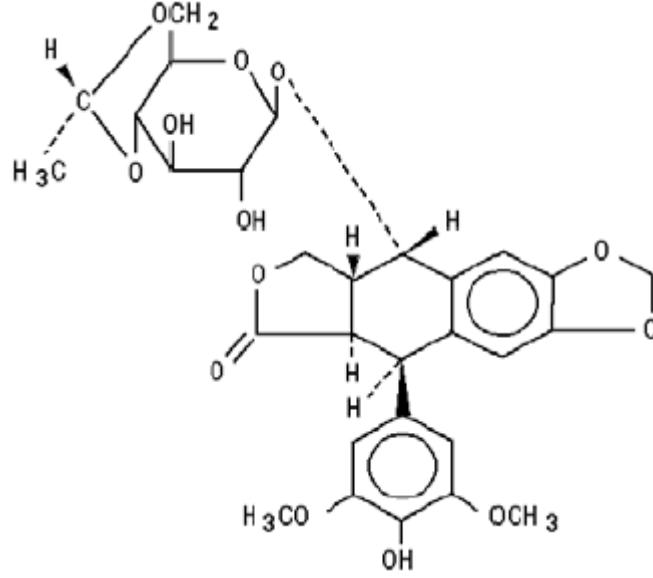
Polihidroksialkonatlar grubundan olan Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV) kopolimeri bakteriyel poliester sınıfındadır. Mükemmel biyobozunurluk , ve biyoyumluluk özelliklere sahiptir.



Şekil 2.14. PHBV'nin kimyasal yapısı

2.12. Etoposid

Etoposid (VP-16 olarak da bilinen) podofilotoksininin yarı sentetik türevlerinden olup bir çok neoplastik hastalığın tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Metanol ve kloroformda yüksek çözünürlüğe sahip olan etoposidin moleküler ağırlığı 588.56 g/mol ve moleküler formülü $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$ dir.



Şekil 2.15. Etoposidin kimyasal yapısı

Etoposidin etkinliği, topoizomeraz-II enzimi ile etkileşerek veya serbest radikal oluşumunu sağlayarak DNA zincirindeki kırıkların indüklenmesine bağlıdır. Terapötik konsantrasyondaki etkisi hücre dönemine özgüdür ve en fazla S ve G2 dönemine etkilidir. Etoposid diğer kemoteropatik ilaçlarla kombine olarak da kullanılabilir.

2.13. Hücre Kültürü

Hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Pratikte hücre kültürü terimi, çok hücreli ökaryotlardan özellikle hayvan hücrelerinden kaynaklanan hücrelerin kültüre edilmesi için kullanılmaktadır. Hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar günümüzde popüler araştırma konularında önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Örneğin, kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkilerini ya da bir hücre veya dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla hücre kültürleri yapılabilmektedir. Hücre kültüründe belirli bir hücre hattından çoğaltılan hücrelerde çeşitli çalışmalar yapılarak canlı ortamında (in vivo) yapılamayan denemeler yapılabilir ve buradan yola çıkarak sonuçlara ulaşılabilir.

Hücre kültürü, spontan migrasyon, mekanik veya enzimatik parçalanma ile bir dokudan ayrılmış olan hücrelerin üretilmesidir. Hücre kültürü başlıca; organ kültürü, doku eksplant kültürleri ve hücre kültürü olarak üçe ayrılabilir. Organ kültürü,

organların belirli sürelerde vücut dışında canlı kalmalarının sağlanmasıdır. Doku eksplant kültürü ise, doku parçacıklarının canlılıklarını in-vitro ortamda sağlanmasıdır. Hücre kültürünün tarihçesi 1800'ü yıllara kadar dayanmaktadır. İlk olarak 1866 yılında in-vitro doku kültürü çalışılmış ve amfibi kan hücrelerinin 35 gün canlı kalabilmeleri sağlanmıştır.

2.13.1. Hücre kültürünün kullanım alanları

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

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

2.13.2. Hücre kültürü koşulları

Hücre kültür ortamı; hücre ve kültür tipine göre değişmekle birlikte hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması için gereksinim duyacağı şartları eksiksiz sağlamalıdır. Kültür ortamı, osmotik olarak dengelenmiş enerji kaynağı, vitaminler, ko-faktörler, inorganik tuzlar, eser elementler, büyüme faktörü, mineraller ve aminoasitlerden oluşur. Kültür ortamını etkileyen diğer faktörler ise sıcaklık, pH, nem, gaz fazı bileşenleri, ozmolarite ve ışıktır. Hücre vasatları farklı hücre tipleri için, amaca göre de değişmekle birlikte farklı özellikler sergilemelidir. Hayvan

hücre kültür ortamı fizikokimyasal olarak, optimum pH 7,2–7,5; osmolarite 280–320 mOsmol/kg; CO₂ %2-5; sıcaklık 35-37 olmalıdır. Bikarbonat gibi tamponlayıcılar (özellikle toz vasat kullanıldığında), glutamin, kan serumu ve antibiyotik ortama sonradan ilave edilir. Farklı hücre kültür ortamları için farklı özelliklerde kültür ortamları gereklidir. Örneğin hayvan hücre kültüründe pH 7,4 iken birçok deniz canlısında 7,2-7,8; insektelerde 6-7,7; lepitopterilerde 6,2-7,6, bazı salyangoz türlerinde 7-7,9 arasında değişmektedir.

2.13.3. Hücre kültür sistemleri

Hücre kültürleri, kaynaklarına ve büyüme biçimlerine göre sınıflandırılırlar.

A-Kaynaklarına göre:

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

Hücre soyları; primer hücrelerde spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden, kimyasal ajanlar veya virüsler eklenerek insan eliyle oluşturulurlar. Tümör dokularından alınan hücrelerden de elde edilirler. Primer kültürlerden farkları; kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilirler, büyüme faktörüne ve seruma daha az ihtiyaç duyarlar, çoğalmak için zemine tutunma ihtiyaçları daha azdır ve sonsuz çoğalma yetenekleri vardır.

B-Büyüme biçimlerine göre:

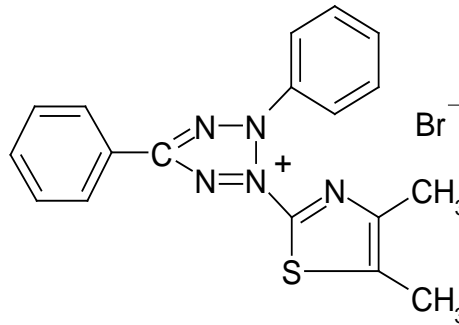
Süspanse kültürler ve tutunarak büyüyen hücreler olarak sınıflandırılır. Kan, dalak, kemik iliği kültürleri ve olgunlaşmamış hücreler bu şekilde ürerler.

Tutunarak büyüyen hücreler: ektoderm ve endodermden oluşan hücreler (fibroblast ve epitel hücreleri), ekstraselüler matriks olarak adlandırılan ve kollojen, laminin, proteoglikanlar gibi makromoleküllerin bir karışımı olan karmaşık bir yapı

üzerinde, bu yapıdaki moleküller membran reseptörleri (integrin $\alpha1\beta3$, $\alpha1\beta5$, $\alpha2\beta3$ v.s.) aracılığı ile etkileşerek büyürler.

2.13.4. MTT Testi

Hücre kültürü çalışmalarında, hücre sayısının belirlenmesi esastır. Bu nedenle hücre sayımında birçok yöntem geliştirilmiştir. Hücreler, spesifik enzimler, tuzlar, substuratlar veya boyalar kullanılarak sayılabilir. Tetrazolium tuzları (MTT,INT,NBT,TNBT, vb.) bu boyalardan biridir. MTT testi canlı hücrelerde mitokondriyal enzimlerin dehidrojenaz aktivitesi sonucu sulu ortamda çözünmeyen formazan kristalleri meydana gelmesine, bu kristallerin organik çözücülerle çözünmesine ve spektrofotometrik yöntemle absorbanlarının belirlenmesi temeline dayanır. NAD(P)H formazan kristallerinin oluşumunda indirgeyici olarak çalışır ve tetrazolium tuzuna elektron ve hidrojen verir. Bunun sonucunda da formazan kristalleri oluşur (Cardin GB ve ark, 2009). Ölü hücrelerde mitokondriyal aktivite gözlenemeyeceği için tetrazolium tuzları ile sadece canlı hücreler sayılabilir. Lizosomal enzimlerden olan hexoamidinaz da hücre sayımında kullanılan enzimlerdendir. Metilen mavisi kullanılan boyalardan bir diğeridir. Metilen mavisi hücrede negatif gruplara bağlanır (nükleik asit, posfataz ve bazı proteinler gibi). Bu boyalara ilaveten jenus yeşili, tripan mavisi de hücre sayımında kullanılan boyalar içerisinde (Cabrera M. ve ark 2009).



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

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasallar

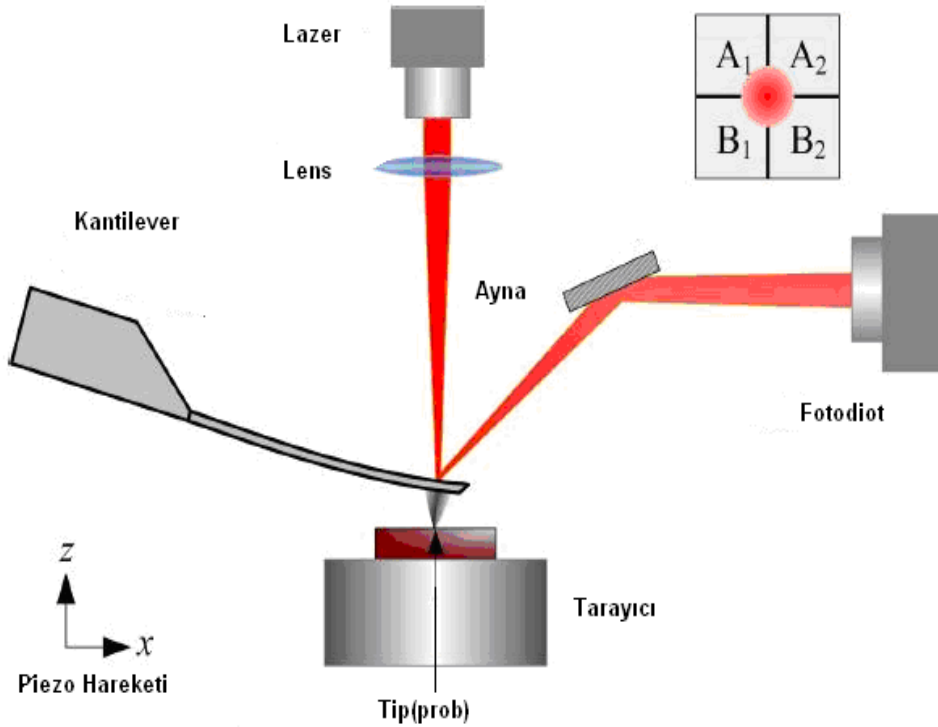
Ticari olarak üretilen PHBV kopolimeri Sigma(USA) firmasından temin edilmiştir. Organik çözücü olarak kullanılan kloroform Merck (Almanya) firmasından satın alınıp kullanılmıştır. Dağıtıcı ortam olarak Tween80 (Merck, Almanya) kullanılmıştır. Hücre sitotoksikite testleri için, Tripsin-EDTA (Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit), DMEM F-12 ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium") besiyeri ve Fetal Sığır Serumu (FCS), DMSO (Dimetilsülfoksit) ve EZ-DNA Biological Industries (İsrail) firmasından, Tetrazolium Tuzu (MTT) Serva'dan (ABD) temin edilmiş olup herhangi bir işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır. RPMI 1640 medium L-Glutamine(Bio. Ind),FCS (Bio.Ind.) Hoechst 33342 (Serva, İsrail) Propodium Iyodide (Serva, İsrail), Annexin-5 Fluos (Roche, USA), Penisilin-streptomisin Sol.(Bio.Ind, İsrail), Etil alkol (Merck, Almanya) hücre kültürü deneylerinden apoptoz ve nekroz indeks çalışmalarında kullanılan kimyasallardır. Sigma (USA) firmasından temin edilen Folik asitin PHBV nanopartiküllere ligand olarak bağlanmasında kullanılan glisin, Fluka (İsviçre) firmasından satın alınmıştır. Kullanılan kimyasallar ek bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan direkt olarak kullanılmıştır.

3.2. PHBV Nanopartiküllerin Hazırlanması

PHBV nanopartiküller emülsifikasyon-difüzyon yöntemine göre hazırlanmıştır. (Murakami ve ark., 1999). 10 mg PHBV, 10 ml kloroform içerisinde ultrasonik banyo eşliğinde çözülerek % 0,1'lik PHBV çözeltisi hazırlanmıştır. Dağıtma ortamı olarak Tween80 ve distile su kullanılmıştır. Ultrason probu (Ultra-Turrax) kullanılarak polimer çözeltisi, 50 ml % 6'luk Tween80 içerisine enjekte edilmiştir. Bu esnada partikül boyutunun minimum olmasını sağlamak amacıyla, polimer çözeltisi ultrason banyoda ve azot gazı eşliğinde püskürtülerek enjekte edilmiştir. Daha sonraki basamak ise organik çözücü olarak kullanılan kloroformun uzaklaştırılması basamağıdır. Kloroform iki saat süre ile oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Son aşamada ise çözeltinin 18514g (12000 rpm) de 30 dakika süre ile santrifüjlemesinin ardından elde edilen

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), bir tür taramalı uç mikroskobudur. Kuvvet-mesafe prensibiyle çalışmaktadır. Yüzey topografisini angstrom (\AA) mertebesinde 100 mikrona (μ) kadar görüntüleyebilen yeni nesil bir mikroskoptur. Bu cihaz ile moleküllerarası kuvvetlerin ölçülmesi mümkün olmaktadır (Çınar ve ark., National Symposium on Biomedical Engineering, 2005). AFM, yüzeyleri taramak için gezici bir uca sahiptir. AFM kantileverinin ucu, numune üzerindeyken yüzey ile fiziksel etkileşim halindedir. Kantilever yüzeyi tarayarak üç boyutlu görüntü oluşturabilir ve atomik seviyedeki kuvvetleri piko-newton (pN) mertebesindeki hassasiyetle ölçebilir. En önemli avantajı, özel bir hazırlama işlemi uygulamadan örneklerin doğrudan ve hemen hemen her ortamda görüntülenebilmesidir (Binning ve ark., 1986). AFM ile herhangi bir yüzey karakterize edilebilmektedir, polimer yüzeylerin analizinde de kullanımı uygundur.

Nanopartiküllerin AFM (nanomagnetics, UK) görüntüsünü elde etmek için mika yüzey üzerinde oda koşullarında kurutulmuş ve yine oda koşullarında görüntüsü alınmıştır. Görüntüleme için rezonans frekansı 300kHz, kuvvet sabiti 40 N/m olan silikon bir uç kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Atomik kuvvet mikroskobunun temel çalışma prensibi.

3.3.2. Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

Folik asitin PHBV yapısına katıldığıının ve ilaç enkapsülasyonunun gösterilmesi amacıyla FTIR çalışmaları yapılmıştır. Örnekler, FTIR çalışmaları için KBr ile uygun oranlarda (örneğin; ağırlıkça % 1 olacak şekilde) karıştırılarak 10 tonluk pres yardımıyla incelemeye hazır diskler haline getirilmiş ve FTIR (Schimadzu, DR8101, Japonya) spektrumları alınmıştır. Elde edilen FTIR spektrumları değerlendirilerek hazırlanan örneklerin beklenen kimyasal yapıya ulaşmış olmadığı incelenmiştir.

3.3.3. Nanopartikül Boyut Analizi

Nanotaşıyıcıların boy-boy dağılımlarını belirlemek ve AFM'den elde edilen verilerle karşılaştırmak amacıyla Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Zeta-Sizer, koloidal çözeltilerde partiküllerin boyutunu ve zeta-potansiyelini bulmak için kullanılan bir cihazdır. Dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemleriyle çalışmaktadır. Bu çalışmada cihaz ölçüm yöntemi olarak Dinamik Işık Saçılması (DLS) kullanılmıştır. Yıkanarak çöktürülen nanopartiküller deiyonize su ile seyreltilmiş ve yaklaşık 3 ml hacimli örnek çözeltisi, polistiren küvet içerisine konularak gerekli ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Yapılan çalışmalar kapsamında, süspansiyon ortamının homojenizasyon hızı, polimer/çözücü oranı ve emülsifier konsantrasyonu PHBV nanopartiküllerin boy-boy dağılımına etki eden parametreler olarak belirlenmiştir.

Nanopartiküllerin boy-boy dağılımını etkileyen en önemli parametrelerden biri dispersiyon ortamın karıştırma hızıdır. 7000,15500 ve 24000 rpm karıştırma hızları PHBV nanopartiküllerin hazırlanması esnasında kullanılmıştır. Diğer (10 mg polimer, 10 ml çözücü ve 5 ml emülsifier) tüm parametreler sabit tutulmuştur.

Boy ve boy dağılımını değiştiren diğer etkin parametre ise, dispersiyon ortamında polimerin vizkozite veya konsantrasyon farkı için ihtiyaç duyulan enerji değişiminden dolayı polimer konsantrasyonudur. Bu polimer konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla;

- (20mg PHBV/10 ml çözücü)
- (10mg PHBV/10ml çözücü)
- (5mg PHBV/10 ml çözücü)

şeklinde hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki polimer çözeltileri, nanopartiküllerin hazırlanması esnasında dispersiyon ortamına püskürtülerek enjekte edilmiştir. Bu esnada diğer (emülsüfier miktarı ve homojenizasyon hızı) parametreler sabit tutulmuştur.

Polimer ve sulu ortam arasındaki yüzey gerilim farkını azaltmak için kullanılan emülsifierin farklı konsantrasyonlarının, nanopartikül boy-boy dağılımına etkisini incelemek amacıyla;

- 1ml Tween80/100ml distile su
- 3ml Tween80/100ml distile su
- 5ml Tween80/100ml distile su

oranlarına sahip dağıtma ortamları kullanılmıştır. Aynı şekilde diğer (polimer/çözücü oranı ve homojenizasyon hızı) parametreler sabit tutulmuştur.

3.4. PHBV Nanopartiküllere İlaç Yükleme ve Salım Çalışmaları

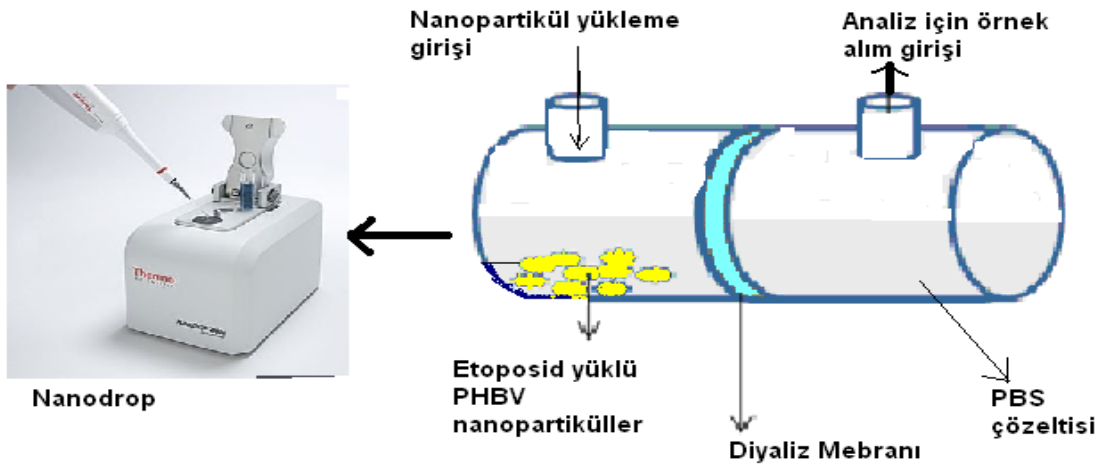
3.4.1. İlaç Yükleme Çalışmaları

Nanopartiküllere in-vitro ilaç yükleme çalışmalarında antikanser ilaç olarak etoposid kullanılmıştır. Polimer çözeltisine 1/1, 1/0.5 ve 1/0.25 polimer/ilaç (w/w) oranlarında ilaç ilave edilerek, ilacın polimer çözeltisi içerisinde homojen şekilde dağılmasını sağlamak amacıyla ultrason banyosu kullanılmıştır. Elde edilen homojen çözelti, Ultra-Turrax probu varlığında distile su ve tween80 içeren dağıtma ortamına püskürtülerek ilave edilip ilaç yüklü PHBV nanopartiküllerin elde edilmesi sağlanmıştır. Çözeltideki kloroformun uzaklaştırılması amacıyla mekanik karıştırıcı ve ultrasonik banyo kullanılmıştır. Son olarak elde edilen nanopartiküller üç defa distile su ile yıkanıp kurutulmuştur.

3.4.2. İlaç Salım Çalışmaları

PHBV nanotaşıyıcılardan ilaç salım çalışmalarını yapabilmek amacıyla öncelikle etoposid fosfat tamponu içerisinde (pH 7.4) farklı derişimlerde çözülmüş ve nanodrop (Thermo Scientific, Nanodrop 1000) kullanılarak 284 nm'de bu çözeltilerin absorbanları ölçülerek standart kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır. Elde edilen kalibrasyon grafiği Ek 1'de verilmiştir. Bütün çalışmalar $37\pm 1^\circ\text{C}$ ve pH 7.4 ± 0.2 gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen ilaç yüklü PHBV nanopartiküllerden salınacak ilaç miktarını tayin etmek amacıyla Şekil 3.3'de görülen ilaç salım düzeneği geliştirilmiştir. Söz konusu düzeneğin ortasına sadece etoposid geçişine izin veren diyaliz membranı yerleştirilmiştir (12-14 kDa aralığında). Düzeneğin bir tarafına 2,5 ml fosfat tamponu, diğer tarafına ise 2,5 ml fosfat tamponu ve ilaç yüklü nanopartiküller konulmuştur. Belirli zaman aralıklarında (5.dak., 15.dak., 30.dak. vb.) nanopartikül içermeyen hücre bölümünden alınan örneklere ait absorbanlar nanodrop kullanılarak okunmuş ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak salım ortamındaki ilaç derişimleri belirlenerek grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 3.3. PHBV nanopartiküllerden etoposid salım ve analiz düzeneği

3.4.3. İlaç Enkapsülasyon Verimliliği

Etoposid yüklü nanopartiküller 12000 rpm +10 °C'de 30 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra elde edilen süpernatantdaki ilaç miktarı tespit edilmiştir. Miktar tayini için Bölüm 3.4.2." İlaç Salım Çalışmaları" başlığı altında anlatılan Nanodrop yöntemi kullanılmıştır.

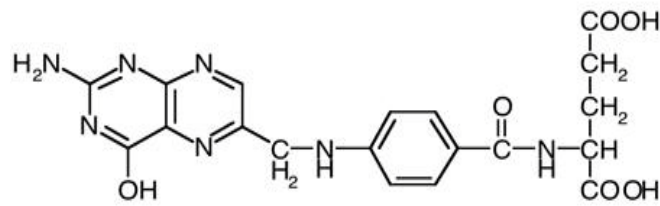
İlaç yükleme etkinliği (% YE), aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ YE} = 100 \times \frac{(\text{Toplam İlaç Miktarı} - \text{Serbest İlaç Miktarı})}{\text{Toplam İlaç Miktarı}}$$

Eşitlik 3.1

3.5. PHBV Nanopartiküllerin Folik Asit ile Modifiye Edilmesi

PHBV nanopartiküllerin modifikasyonu için folik asit kullanılmıştır. Folik asit, hücre yüzey reseptörü olarak yüksek affiniteye sahip olan tümör hücrelerine hedeflemede kullanılan bir liganttır. Kararlı ve immunojenik olmayan bir kimyasaldır. Folik asit iki adet karboksilik asit grubuna sahiptir. Bunlardan biri sterik olarak bloklanmıştır, diğer karboksil grubu ise amid grubu yoluyla nanopartiküllere ve diğer çeşitli organik moleküllere bağlanabilmektedir (Zhang, 2008)

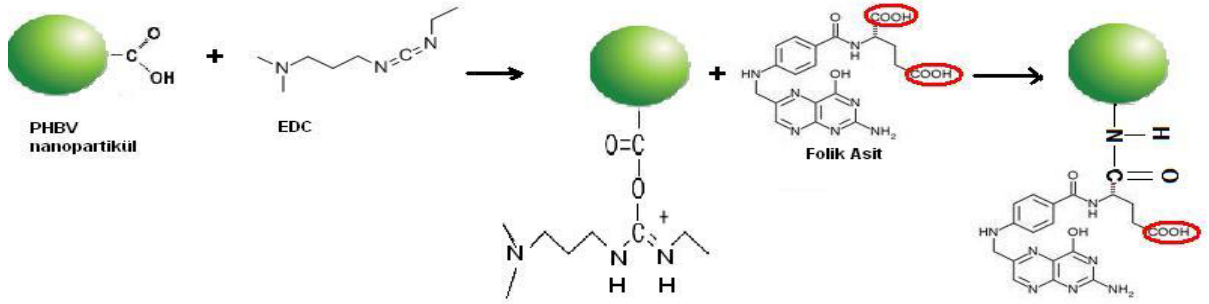


Şekil 3.4. Folik Asitin Kimyasal Yapısı

Tümör tedavisinde en etkili ligandlardan biri, tümör-spesifik ilaç salım sistemlerine folat hedeflemesidir (Dube ve ark., 2002, Wang ve ark., 1997, Stella ve ark., 2000, Lee ve ark., 2003, Christopher ve Philip, 2001) Folat, tümöral hücrelerin yüzeyinde var olan folat reseptörle spesifik olarak bağlanan düşük molekül ağırlıklı (Mw= 441

Da) vitamindir (Sudimack ve Lee, 2000, Turek ve Leamon, 1993). Folat reseptörü (FR), ovaryum, kolorektal ve göğüs kanserleri gibi epitelyal habis durumunda kanser hücrelerinin yüzeyinde gözlenmiştir. Oysaki normal dokudaki düzeyi çok düşüktür (Campobell ve ark., 1991, Ross ve ark., 1994, Weitman ve ark., 1992).

Bu çalışmada folik asit, PHBV nanopartiküllere, PHBV, EDC (1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimid) ile etkileştirildikten sonra uçtaki amin (-NH₂) grubu üzerinden bağlanmıştır. Kovalent bağlanma EDC'li nanopartikülün amin ucu ile folik asitin karboksilik asit (-COOH) ucu arasında olmaktadır.



Şekil 3.5. Folik asitin PHBV nanopartiküllerine kovalent bağlanması mekanizması

Nanotaşıyıcıların aktive edilmesi amacıyla PHBV nanopartiküller üç defa pH 5.2 MES tamponu ile yıkanmış ve süspansiyon edilmiştir. Daha sonra bu nanotaşıyıcılar 25 mg/ml EDC'la uygun hızda dönen karıştırıcı ile 30 dakika süreyle karıştırılmış ve böylelikle yapıdaki ligandın amin grupları ile özgün aktif ara formun oluşması sağlanmıştır. Nanotaşıyıcılar üç sefer pH 5.2 MES tamponu ile yıkanıp, süspansiyon edilerek ortamdaki fazla EDC uzaklaştırılmıştır. 1000 µg/ml folik asit süspansiyonu % 0.1'lik NaOH çözeltisinde çözünüp, MES tamponunda hazırlanmıştır ve bağlanma verimini belirlemek amacıyla ligand süspansiyonundan 50 µl alınarak 950 µl MES tamponunda çözülmüş ve "bağlanma öncesi örnek" elde edilmiştir. Kalan ligand süspansiyonu ile aktive nanotaşıyıcılar 24 saat oda sıcaklığında sabit hızda karıştırılmıştır ve sonunda süspansiyon edilerek üstteki süpernatant "bağlanma sonrası örnek" olarak test edilmiştir. Nanodrop cihazı vasıtasıyla

spektrofotometrik yöntem kullanılarak, Eşitlik 4.1 den yararlanılarak PHBV nanopartiküllere folik asit bağlanma verimliliği hesaplanmıştır.

$$\%Bağlanma = \frac{\text{Abs (Bağlanma sonrası örneğin değeri)} - \text{Abs (Bağlanma öncesi örneğin değeri)}}{\text{Abs (Bağlanma sonrası örneğin değeri)}} \times 100$$

Eşitlik 3.2

3.6. In Vitro PHBV Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri

3.6.1. Sitotoksisite Testleri (MTT)

3.6.1.1. Hücrelerin Hazırlanması

Yapılan çalışmada kullanılan, Osteosarkoma hücreleri Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Bankasından temin edilmiştir. Çizelge 3.1.'de verilen koşullarda hücre kültür ortamlarında çoğaltılmıştır. İki günde bir hücre kültür vasatı değiştirilmiştir. Hücreler hücre kültür kabı zeminini kapladıklarında 1/3 pasaj yapılmıştır. Mantar ve bakteri kontaminasyonlarına karşı her gün mikroskopik incelemeye tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.1. Osteosarkoma hücrelerinin hücre kültür ortamı.

Hücre Türü	Osteosarkoma-2 / An1, Human bone osteosarcoma (İnsan)
HÜKÜK Kayıt No	02111901
Kültür kabı	25 cm ³ lük polistren flask
Kültür vasatı	%10 Fetal sığır serumu içeren DMEM-F12; %1 penisilin-streptomisin
Rutin sub-kültür	1/3
Kültür özelliği	Monolayer
Toplam hacim	5 ml
pH	7,2-7,5
Sıcaklık	37±0,5°C
İnkübasyon ortamı	% 5'lik CO ₂ etüvü

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoluim bromide; Thiazolyl blue) testi hücre canlılığının ve böylelikle sitotoksitesinin kolorimetrik olarak ölçülebileceği bir testtir. Bu çalışmada PHBV nanopartiküllerini kanser hücrelerine hedeflemek amacıyla nanopartiküller folik asit ile modifiye edilmiştir. Antikanser ajan olarakta farklı polimer/etoposid oranlarında (1/1, 1/2, 1/4 polimer/etoposid) etoposid yüklenmiştir. Elde edilen bu nanopartiküllerin antiproliferatif etkileri Osteosarkoma hücreleri üzerinde test edilmiştir. Bu amaçla MTT testi kullanılmıştır. Etoposidin bölünen hücreler üzerine etkisinin incelenmesi için farklı formülasyonlarda hazırlanan nanopartiküller bir ve iki gün Osteosarkoma hücreler ile inkübe edilmiştir. Sonuçlar kontrol çalışmaları ile karşılaştırılmıştır.

Bu çalışma için Osteosarkoma hücreleri 96 kuyucuklu plaklara 3×10^3 hücre/ml konsantrasyonda ekilmiş ve plaklar bir gece etüvde inkübe edilmiştir. Nanopartiküller UV ışık altında 30 dakika steril edildikten sonra hücre kültür vasatı ile farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25 ve 50 $\mu\text{g/ml}$) seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu plaklardaki vasat atılmış ve farklı konsantrasyonlarda nanopartiküller içeren vasat hücrelerin üzerine 200 μl olarak pipetlenmiştir. Plaklar 1 ve 2 gün 37°C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra plaktaki vasat atılmış ve kuyucuklara 100 μl taze vasat ve 13 μl MTT solüsyonu (5 $\mu\text{g/ml}$, fenol-red içermeyen RPMI 1640 ile seyreltilmiştir) pipetlenmiştir. Plaklar 4 saat karanlıkta, etüvde inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki vasat ve MTT solüsyonu dikkatlice dökülmüş ve kuyucuklara 200 μl 0,04M HCl içeren saf izopropanol pipetlenmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta bekletildikten sonra plaklar 570nm'de Mikro plate okuyucuda okutulmuştur.

MTT testi, hücre canlılığının tesbiti için kullanılan bir testtir. Antiproliferatif ajanların sitotoksik olup olmadıkları veya sitotoksite oranları bu test ile saptanabilir. Yapılan MTT testinde, 96 kuyucuklu plakların ilk sütunundaki sekiz kuyucuk kontrol çalışması olarak kullanılmıştır ve hücreler herhangi bir aktif ajan ile muamele edilmemiştir. Sadece hücre kültür vasatı ile muamele edilmiştir. Farklı konsantrasyonlardaki nanopartiküller sekiz tekrarlı olarak çalışılmıştır. Kontrol plağından alınan absorbansların ortalaması %100 kabul edilmiş olup, test kuyucuklarından alınan absorbansların ortalamaları ile mukayese edilmiştir ve

nanopartiküllerin sitotoksitesi Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır. Jorg Weyermann ve ark.,2005)

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = (\text{OD570(numune)}/\text{OD570(kontrol)}) \times 100 \quad \text{Eşitlik 3.3}$$

3.6.2. Etoposid yüklü, folik asit ile modifiye edilmiş PHBV nanopartiküllerin, hücre kültüründe Osteosarkoma hücreleri üzerine etkisinin araştırılması

Normal sağlıklı hücrelerde programlı bir yaşam döngüsü vardır. Bu döngü tamamlandığında hücre ölür. Bu olaya apoptozis denir. Fakat kanser hücrelerinde bu döngü bozulur ve kontrolsüz olarak çoğalırlar, yani apoptoza uğramazlar. Apoptoza girmiş hücrede belirli değişiklikler ortaya çıkar. En önemli belirtiler; hücre DNA'sında parçalanmaların oluşması, çekirdek yapısında şekilsel bozukluklar, DNA'da yoğunlaşma, boyandığında parlak görülmesi ve hücre membranında veziküllerin oluşmasıdır. Ayrıca hücre zar yapısındaki fosfolipitlerin zar dış yüzeyi ve iç yüzeyi dağılımı apoptotik ve sağlıklı hücrelerde farklılık göstermektedir (Majno G., ve ark., 1995). Apoptoza girmemiş bir hücrenin zar iç yüzeyinde anyonik fosfolipitlerin (fosfotidil serin) fazla iken, apoptoza girmiş bir hücre zarının dış yüzeyinde de fosfotidil serin gibi fosfolipitler bulunmaktadır (Katharine A. ve ark., 2007).

Hücreyi ölüme götüren nedenlerden bir diğeri ise nekrozistir. Nekrozis, hücre sitoplazma membranının çeşitli kimyasal ajanlar (toksik kanser ilaçları gibi), hormonal ve fiziksel etkiler sonucunda bütünlüğünün bozulması ile kendini gösterir. Bu bozunma sonucunda hücre madde alışverişi bozularak hücre stoplazma içeriği dışarı çıkacağı gibi hücre içersine fazla miktarda ekstraselüler sıvı girerek hücre ve çekirdekte şişme gözlemlenir ve sonuç olarak hücre ölür (Xinbo Zhang ve Frederick Kiechle, 2001).

Çalışmanın bu kısmında; tek başına kanser ilacı (etoposid), tek başına PHBV nanopartiküller, farklı oranlarda ilaç yüklü PHBV nanopartiküller ve kanser hücrelerine hedefleyici amaçlı folik asit takılmış ilaç yüklü nanopartiküller kullanılarak Osteosarkoma kanser hücre kültürlerinde apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır.

3.6.2.1. Hücre kültürü ve etoposid yüklü PHBV nanopartiküllerin hücrelerle etkileşimi

Osteosarkoma tümör hücreleri kültür ortamında çoğaltılarak hücre hatları hazırlanmıştır. Hücreler 15% FCS, 1% antibiyotik içeren DMEM-F12 kültür ortamında flasklarda 37°C'de karbondioksit etüvünde inkübe edilmiştir. Hücreler yeterli sayıya ulaşıncaya kadar iki gün ara ile besi ortamının vasatı değiştirilmiştir. Belirli sayıya ulaşan hücreler tripsin ile kaldırılarak 48 kuyucuklu platalere (10.000 hücre/kuyucuk) ekimi yapılmıştır. Hücreler belli bir sayıya ulaştıklarında serum ve antibiyotik içeren vasatlar serum ve antibiyotik içermeyen vasat ile değiştirilmiştir. Tümör hücreleri 0-50 µg/ml miktarlarındaki etoposid ile 24 saat süresince muamele edilmiştir. Diğer taraftan aynı miktarda ilaç içeren 1:1, 1:0.5, 1:0.25 polimer/ ilaç oranlarındaki etoposid yüklü PHBV nanopartikül, aynı oranlarda ilaç içeren folik asitle modifiye edilmiş etoposid yüklü PHBV nanopartikül ve aynı miktarlardaki ilaç yüklenmemiş ve folik asit ile modifiye edilmemiş PHBV nanopartiküller Osteosarkoma hücreleri ile etkileştirilmiştir. İlaç ve nanopartikül içermeyen ortam kontrol grubu olarak kanser hücrelerine uygulanmıştır. 2 saat sonra hücre ortamlarına serum ve antibiyotik ilave edilmiştir. Belirtilen süreler sonunda aşağıda belirtilen yöntemlerle nanopartiküllerin hücreler üzerine etkileri araştırılmıştır.

3.6.2.2. İkili boyama ve Aneksin-5 floresan metodu ile Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi

3.6.2.2.1. İkili boyama metodu:

İlaç yüklenmiş, folik asit ile modifiye edilmiş, sadece ilaç ve sadece nanopartikülle etkileştirilmiş kanser hücreleri falkon tüpe toplanarak santrifüj edilmiş ve süpernatantı atılmıştır. Üzerlerine ikili boyama solüsyonu (RNase(2µl/ml), hoechst 33342(2µl/ml), propidium iodide(2µl/ml) 10⁶ hücreye 100µl solüsyon) konulmuş ve 20 dakika etüvde inkübe edilmiştir. Lam üzerine damlatıldıktan sonra lamelle kapatılmış ve floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış ve FITC (480-520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Değerlendirme floresan mikroskop kullanılarak (Leica DMI70,

Almanya) yapılmış olup, 10 farklı alan (yaklaşık 1000 hücre) sayılarak ortalaması alınmıştır ve apoptotik indeks yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Değerlendirmede normal, apoptotik olmayan hücreler, çekirdekleri sönük mavi, çekirdekte DNA dağılmamış, hücrede veziküller oluşmamış olarak görülmektedir. Apoptoza girmiş hücre çekirdekleri ise normal hücre çekirdeklerine göre çok parlak, çekirdek homojenliği kaybolmuş, çekirdek kenarları düzgün değil ve DNA parçalanmış parlak mavi görünümündedir. Kültür kabında yüzeye tutunan hücreler kaldırılmadan yukarıda belirtilen floresan boyama solüsyonu 100 µl/well hücrelere uygulanarak da inceleme yapılmıştır. İkili boyama sonucunda apoptoza girmiş hücrelerin çekirdekleri Hoechst 33342 floresan boyası ile boyanmıştır. İkili boyamada kullanılan diğer boya propodium iyodid (PI) ise nekroza uğramış hücreleri göstermek amacı ile kullanılmıştır. PI floresan boyası normalde canlı ve hücre zarlarında hasar olmayan hücrelere girememekte ve bu hücreler PI ile boyanamamaktadırlar. Fakat hücre nekroza uğradığında veya hücre zarı hasar gördüğünde hücre içerisine girmekte ve çekirdeği kırmızıya boyamaktadır. Floresan ışık (FITC veya kırmızı floresan ışık) altında bakıldığında nekroza uğrayan hücrelerin çekirdekleri kırmızı renkte görülmektedir.

3.6.2.2.2. Aneksin-V Floresein Yöntemi:

Apoptoza girmemiş hücrelerin membranlarının iç yüzü fosfotidil serin gibi fosfolipitlerden dolayı anyonik özelliktedir. Fakat apoptotik hücrelerin membran yapısı değişerek membranın dış yüzünde de bu fosfotidil serin gibi fosfolipitlerin yer almasından dolayı anyonik bir özellik kazanmaktadır. Aneksin-V ortamda kalsiyum iyonları varlığında fosfotidil serine bağlanabilmektedir. Fakat aneksin-V apoptoza uğramamış hücrelerin zarlarına bağlanmamaktadır. Bu özelliği apoptotik hücrelerin tespitinde kullanılmaktadır. Hücreler boyanmadan önce çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. 10mM HEPES/NaOH, pH 7.4'te, 140mM NaCl, 5mM CaCl₂ den oluşan inkübasyon tamponu hazırlanmıştır. 20µl Aneksin-V floresin 1ml inkübasyon tamponu içerisine ilave edilerek boyama solüsyonu elde edilmiştir. İkinci olarak nekrotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılan Propodium Iyodid (PI) stok solüsyonu hazırlanmıştır. 50µl PI 1ml double distile su içerisine ilave edilerek boyama solüsyonu hazırlanmıştır. 20µl Aneksin-V floresin ve 20µl PI (stok çözeltiden) içeren 1ml boyama solüsyonundan 100µl alınmış, hücreler PBS ile

yıkayıp santrifüj edildikten sonra 10^6 hücreye uygulanmıştır. Kültür tabağına yapışmış hücrelerde ise her bir kuyucuk için 100 µl boyama solüsyonu ilave edilmiştir. Karbondioksitli inkübatörde 20 dakika inkübe edildikten sonra invert floresan mikroskopta FITC filtrede incelenmiştir.

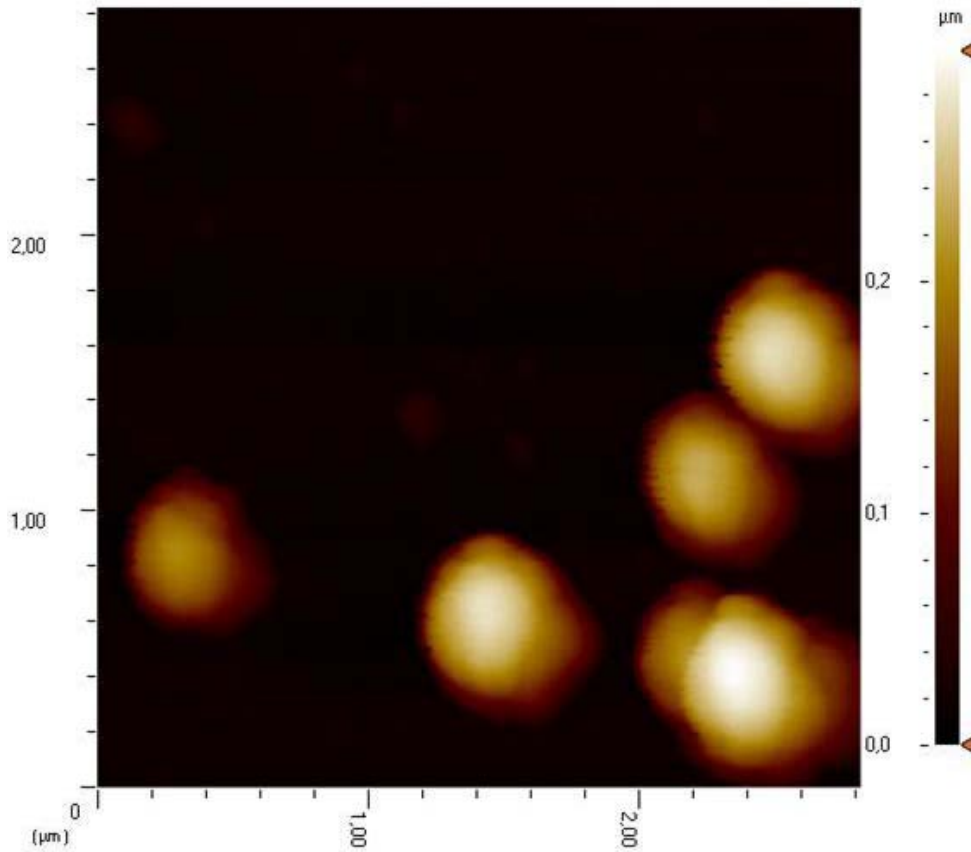
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMALAR

4.1. PHBV Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

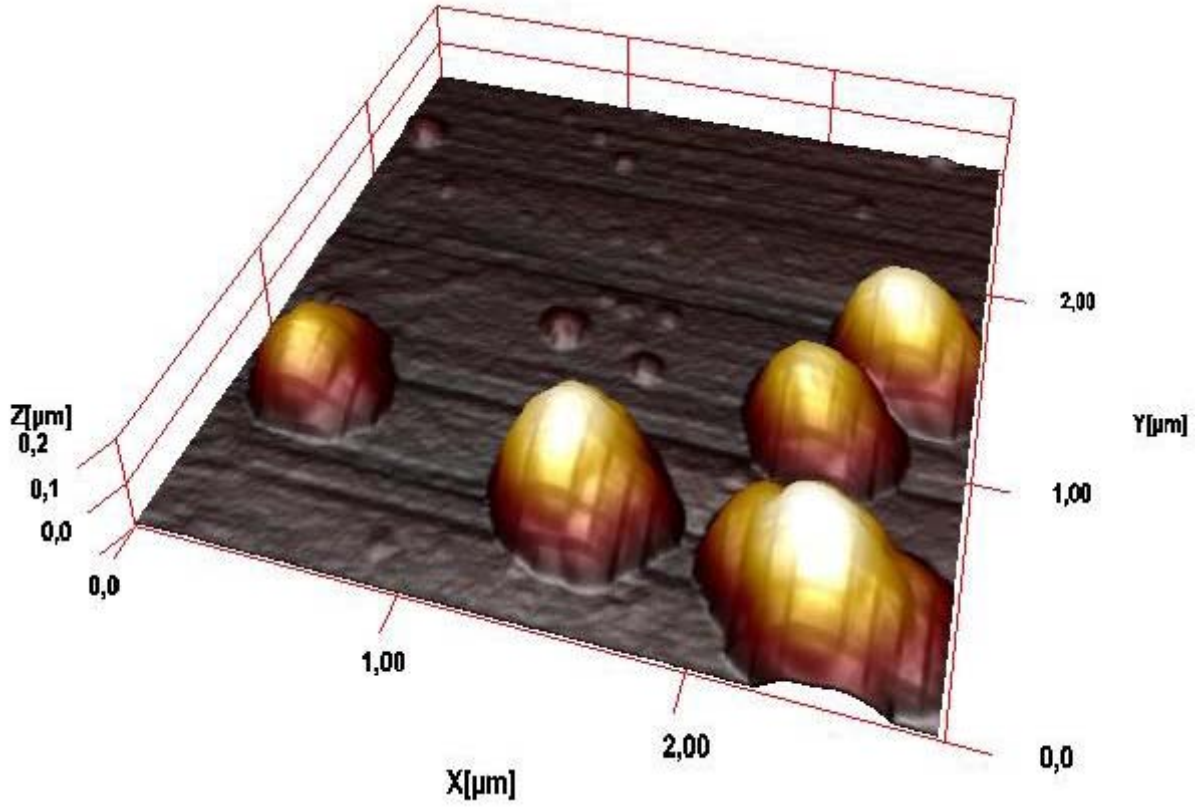
4.1.1. Morfolojik Karakterizasyon

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak PHBV nanopartiküllerin morfolojik değerlendirmeleri yapılmıştır. Elde edilen SEM ve AFM görüntüleri Şekil 4.1. ve 4.2. de verilmiştir.

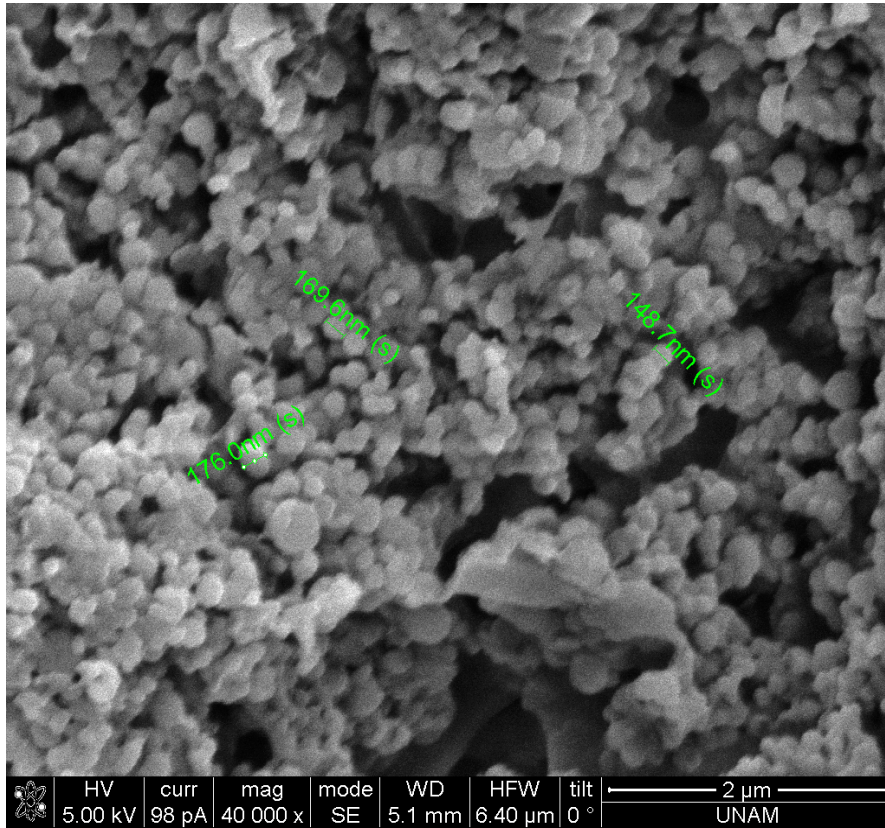
Görüntülerden anlaşılacağı üzere yaklaşık 200-300 nm boyutlarına sahip olan PHBV nanopartiküller küresel ve düzgün yapıdadırlar. Ayrıca elde edilen SEM görüntüleri nanopartiküllerin oldukça düzgün yüzeye sahip olduklarını göstermektedir (Şekil 4.2)



Şekil 4.1a. PHBV nanopartiküllerin AFM görüntüsü



Şekil 4.1b. PHBV Nanopartiküllerin üç boyutlu AFM görüntüsü



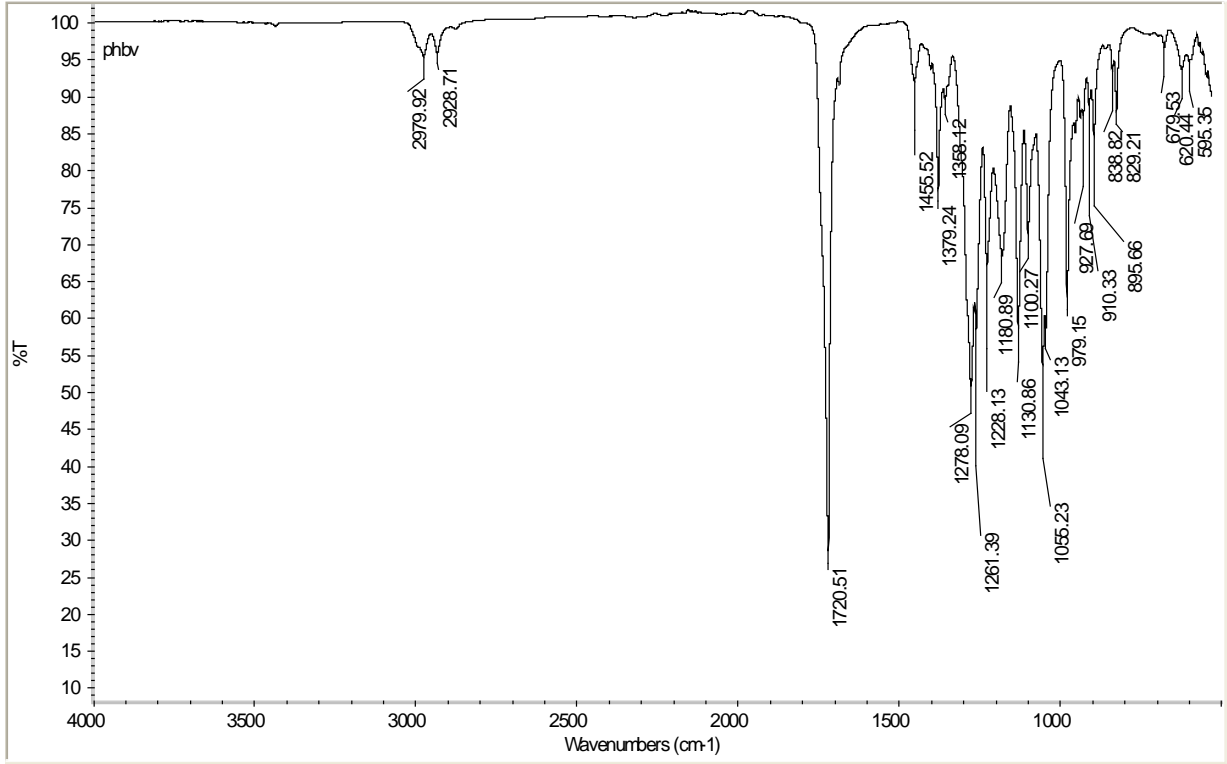
Şekil 4.2. PHBV nanopartiküllerin SEM görüntüsü

4.1.2. Kimyasal Karakterizasyon

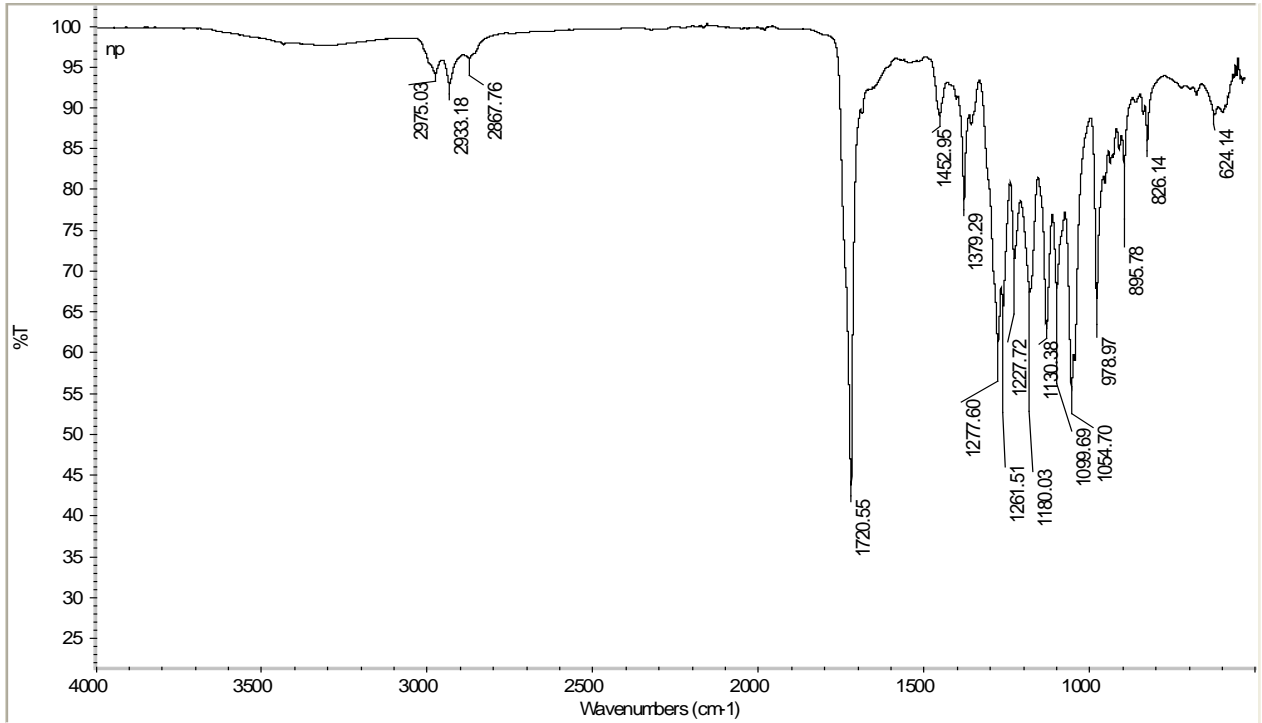
Çalışmanın bu bölümünde folik asit ile modifikasyonu ve ilaç enkapsülasyonunu kontrol etmek amacıyla, folik asit bağlanmış ve etoposid yüklü PHBV nanopartiküllerin FT-IR ile karakterizasyonu ile elde edilen pikler; PHBV, etoposid ve folik asite ait karakteristik pikler ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen FT-IR spektrumları Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8 de verilmiştir.

1476-1695 cm^{-1} dalga sayısı aralığında görülen folik asite ait karakteristik piklerden olan aromatik halka gerilim pikleri (piridin ve p-aminobenzoik asit için) ile 2960 ve 2842 cm^{-1} dalga sayısında görülmekte olan C-H gerilim pikleri folik asit modifikasyonunu doğrulamaktadır (Şekil 4.5). Ayrıca 3334 cm^{-1} dalga sayısında ortaya çıkan yeni pik folat ile PHBV arasında oluşan amit bağından kaynaklanmaktadır (Şekil 4.5). Folik asitle yapılan literatür çalışmalarında da benzer değerler bulunmuştur (Conroy S. ve ark, 2006).

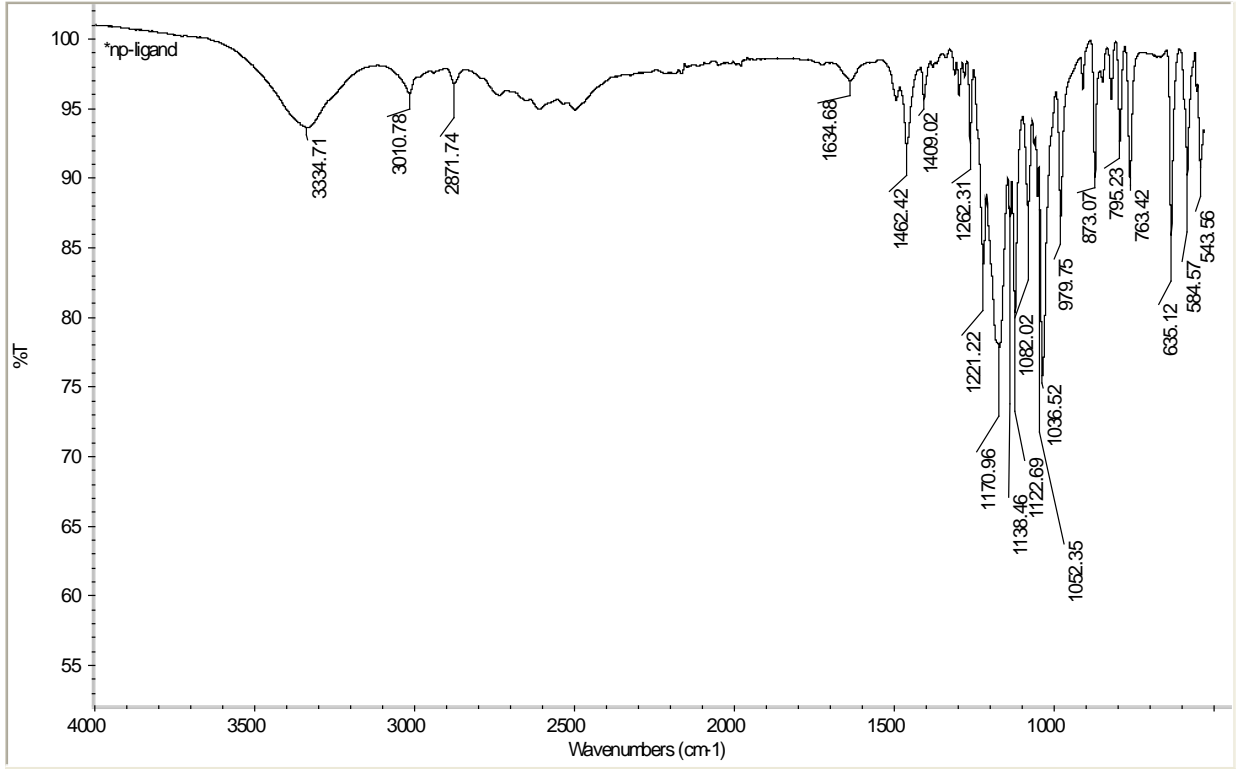
Yapılan çalışmalar kapsamında sentezlenen etoposid yüklü PHBV nanopartiküllerin FTIR spektrumlarına bakılarak ilaç yüklenmesi tespit edilmiştir. Etoposid yüklü PHBV nanopartiküllerin FTIR spektrumunda etoposide ait karakteristik pikler gözlenmiştir. 3300 cm^{-1} dalga sayısında O-H gerilim piki gözlenirken, 2900 (C-H gerilimi) ve 1200 cm^{-1} (C-O gerilimi) dalga sayısında görülen piklerde etken maddenin PHBV nanopartiküllere yüklendiğini göstermektedir.



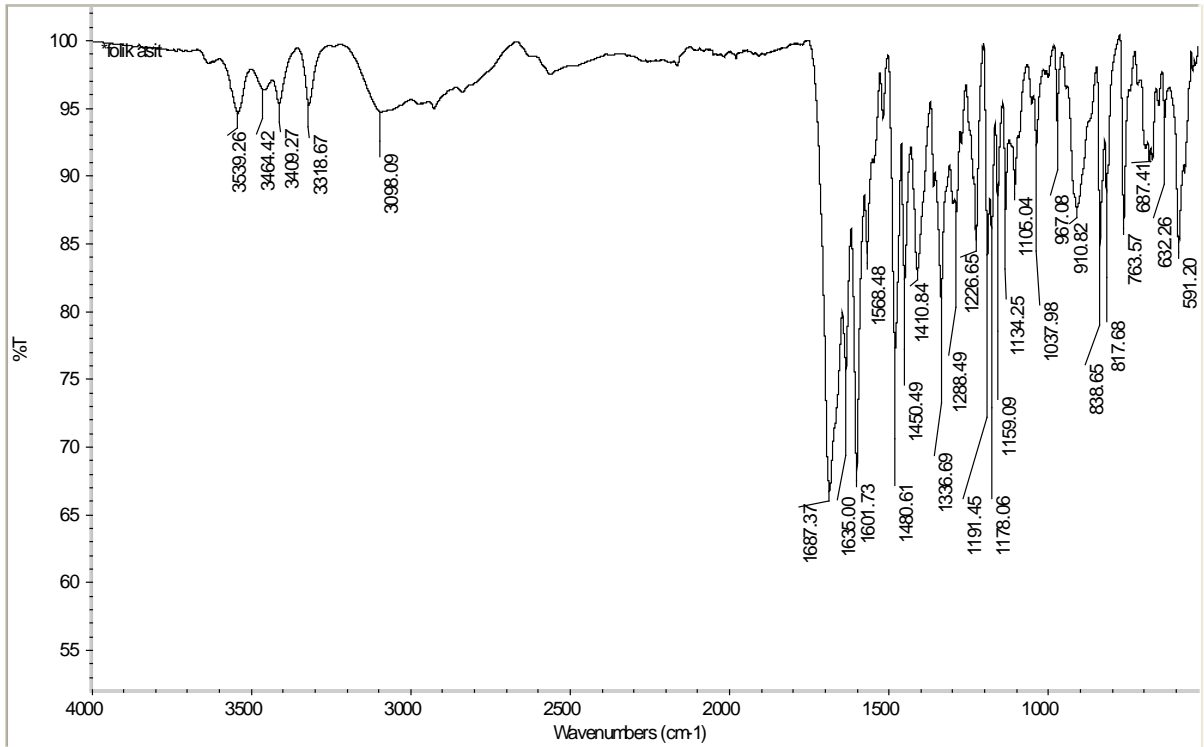
Şekil 4.3. PHBV polimerine ait FTIR spektrumu



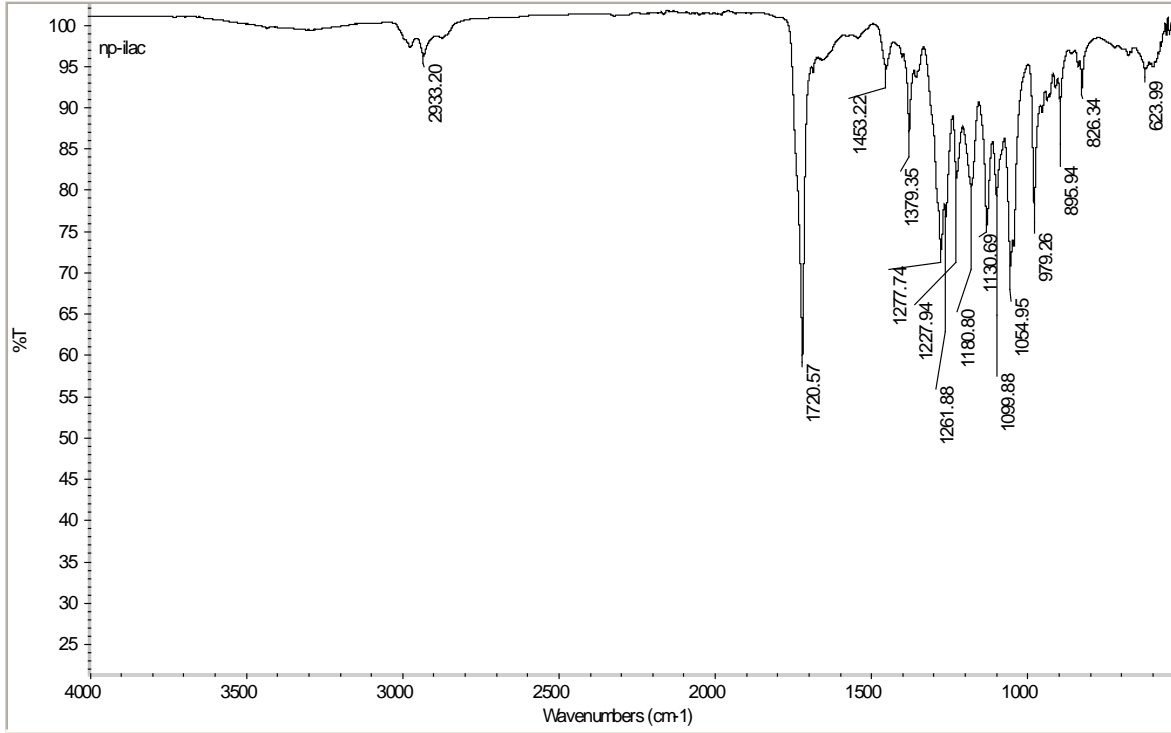
Şekil 4.4. PHBV nanopartiküllere ait FTIR spektrumu



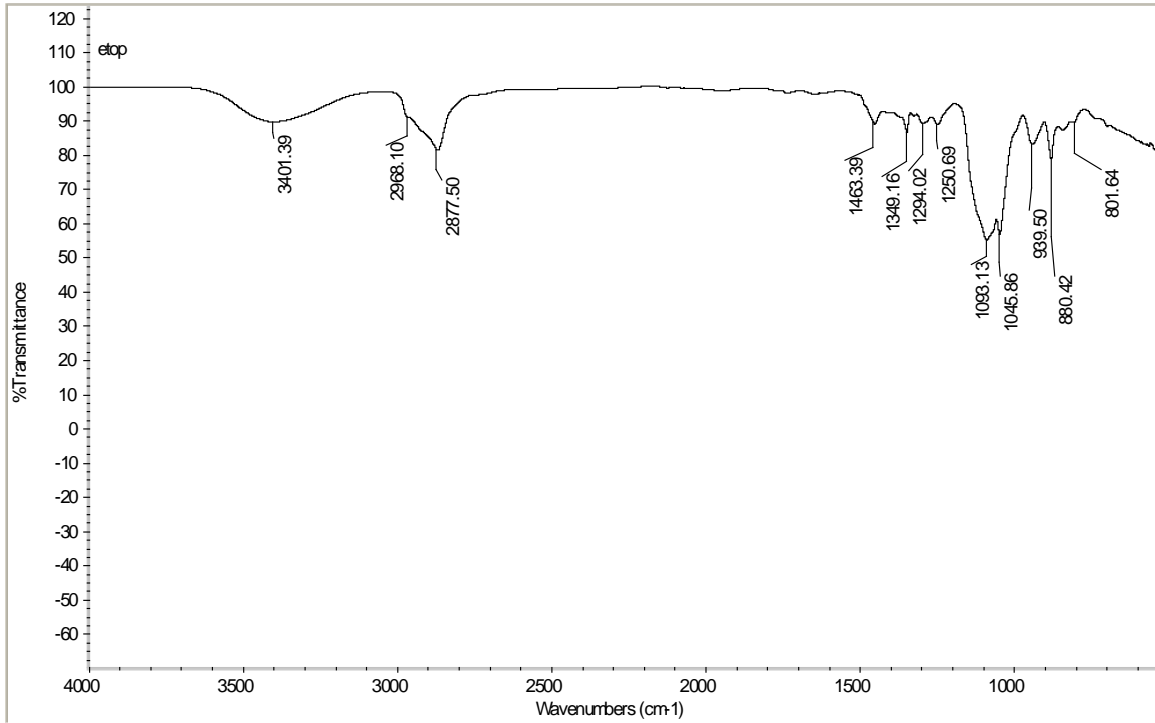
Şekil 4.5. Folik asit bağlı PHBV nanopartiküllere ait FTIR spektrumu



Şekil 4.6. Folik asite ait FTIR spektrumu



Şekil 4.7. Etoposid yüklü PHBV nanopartiküllere ait FTIR spektrumu



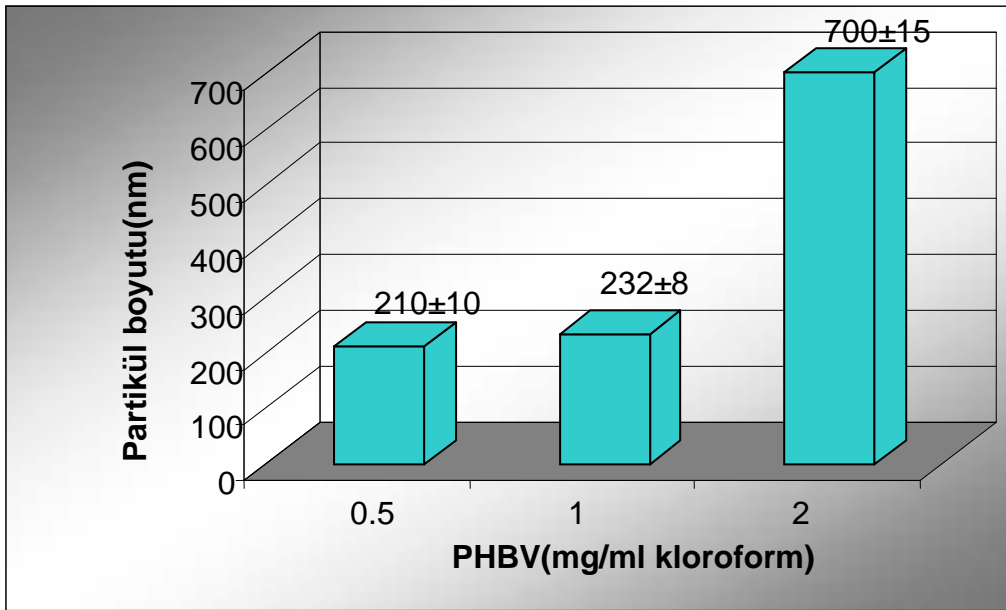
Şekil 4.8. Etoposide ait FTIR spektrumu

4.1.3. Nanopartikül Boyut Analizi

Yapılan çalışmalar kapsamında, süspansiyon ortamının homojenizasyon hızı, emülsifier konsantrasyonu ve polimer miktarı, PHBV nanopartiküllerin boyutuna etki eden parametreler olarak belirlenmiş olup, elde edilen sonuçlar detaylarıyla alt başlıklar altında verilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda 200-800 nm boyut aralığında PHBV nanopartiküller elde edilmiştir.

4.1.3.1. Polimer Konsantrasyonunun Nanopartikül Boyutuna Etkisi

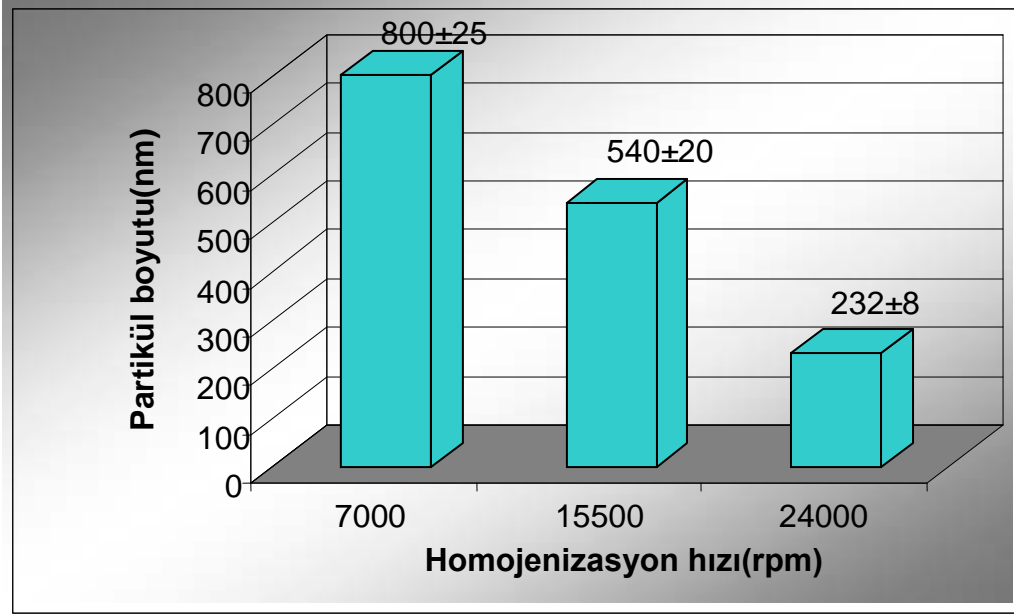
Polimer konsantrasyonu arttıkça viskozite artışından dolayı polimerin dispersiyon ortamında dağıtılması zorlaştığından partikül boyutunun artmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla Şekil 4.9 da da görüldüğü gibi ortamdaki polimer/çözücü oranı arttıkça viskozite artacağından dolayı nanopartiküllerin boyutu da artmaktadır



Şekil 4.9. Polimer miktarının partikül boyutuna etkisi

4.1.3.2. Homojenizasyon Hızının Nanopartikül Boyutuna Etkisi

Homojenizasyon hızının partikül boyutuna etkisini incelemek amacıyla; homojenizasyon hızı 7000-24000 rpm arasında değiştirilmiştir.

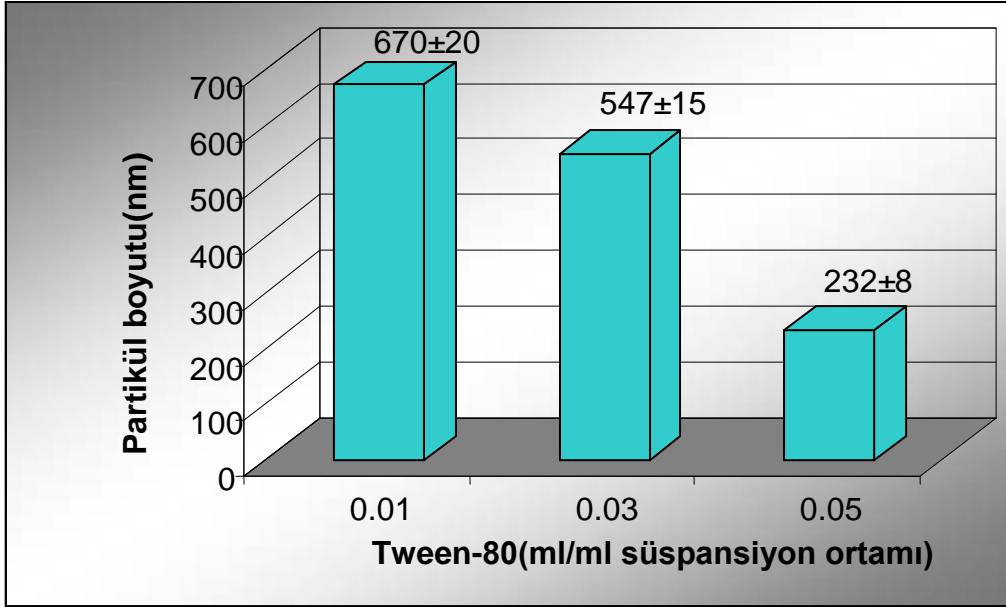


Şekil 4.10. Homojenizasyon hızının partikül boyutuna etkisi

Şekil 4.10 dan görüldüğü üzere süspansiyon ortamının homojenizasyon hızı 7000-24000 rpm aralığında arttırıldığında PHBV nanopartiküllerin boyutlarının azaldığı gözlenmiştir. Homojenizatör hızı arttırıldığında birim zamandaki yüksek kayma dayanımı nedeniyle damlacıkların boyutları azalmakta, buna bağlı olarak nanopartiküllerin boyutu küçülmektedir (Lee ve ark., 2004). Homojenizatör hızı 7000rpm'den 24000rpm'e yükseltildiğinde nanopartiküllerin boyutları ortalama olarak 800 nm'den 232 nm'ye düşmüştür.

4.1.3.3. Emülsifier Oranının Nanopartikül Boyutuna Etkisi

Emülsifier, sulu ortam ve polimer arasında ihtiyaç duyulan yüzey gerilimini sağlamaktadır. Emülsifier konsantrasyonunun artması polimer ve sulu ortam arasındaki yüzey gerilim farkının azalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle Şekil 4.11 den de görüldüğü gibi emülsifier konsantrasyonu arttıkça nanopartiküllerin boyutunun küçüldüğü gözlenmiştir.

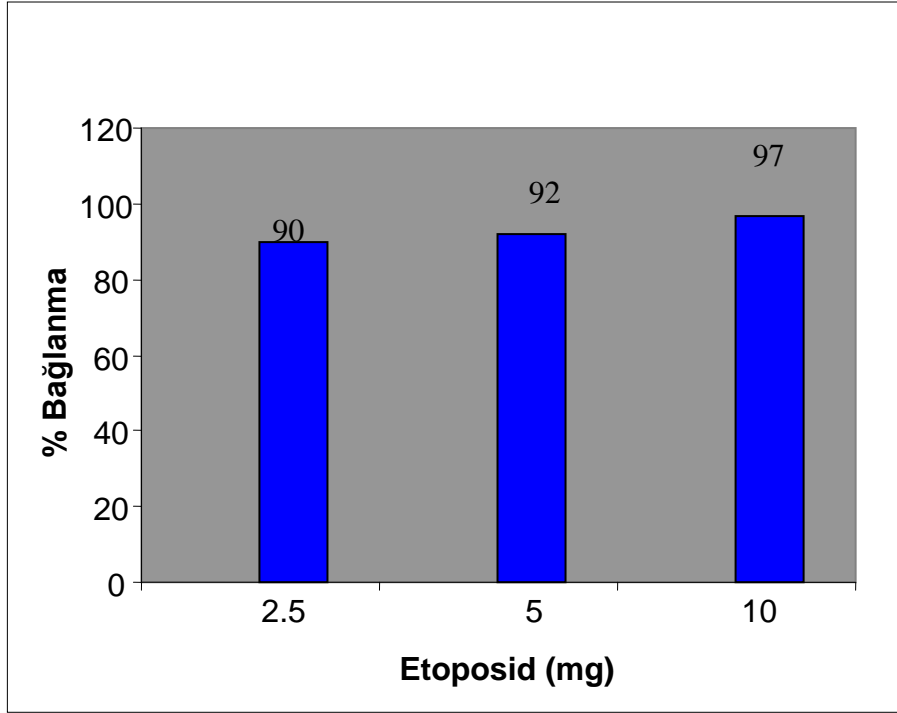


Şekil 4.11. Tween-80 miktarının partikül boyutuna etkisi

4.2. PHBV Nanopartiküllerin Folik Asit ile Modifikasyonu

4.2.1. PHBV nanopartiküllere folik asit bağlama verimliliği

Kanserli hücrelere ligand bağlı partiküllerin hedefleme çalışmaları ve sitotoksite testleri için 1000 µg folik asit içeren 1/1 ilaçlı, 1/0,5 ilaçlı, 1/0.25 ilaçlı nanopartiküller hazırlanmıştır. Buna göre nanopartiküldeki ligand bağlanma yüzdesi, 1/1 ilaçlı nanopartikülde % 97; 1/0.5 ilaçlı nanopartikülde % 92 ve 1/0.25 ilaçlı nanopartikülde ise % 90 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.12 .Etoposid yüklü PHBV nanopartiküllerine folik asit bağlanması

Elde edilen sonuçlara göre , PHBV nanotaşıyıcılara folik asit bağlanma kapasitesi ortalama % 93 olarak saptanmıştır.

4.3. PHBV nanopartiküllere ilaç yüklenmesi ve in-vitro ilaç salımı

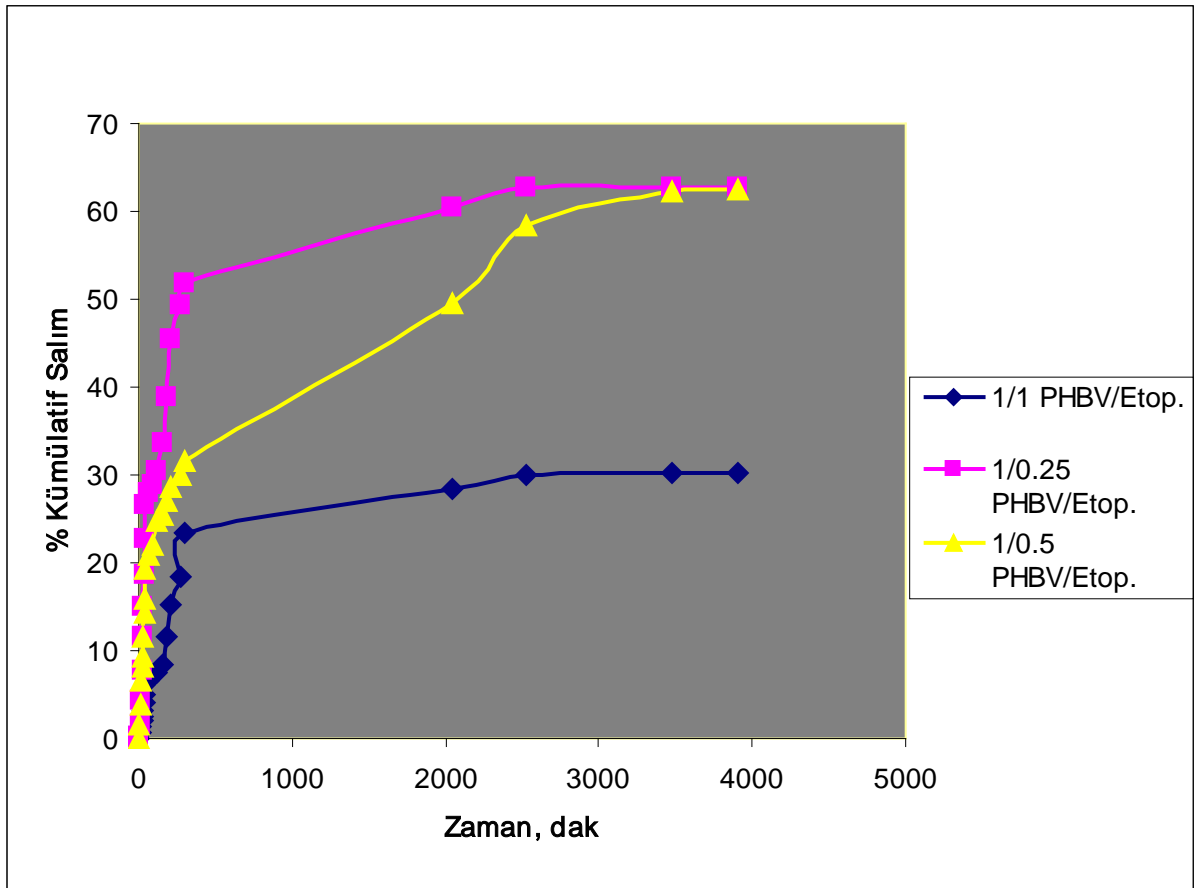
PHBV nanopartiküllere sırasıyla 1/1, 1/0.5 ve 1/0.25 (w/w) oranında etoposid yüklenmiştir. İlaç yüklü nanopartiküllerin 284 nm’de absorbansları ölçülmüştür. İlacın kalibrasyon grafiğinden elde edilen denkleme göre nanopartiküllere yüklenen etken madde miktarları hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. İlaç enkapsülasyon verimi

Polimer/ilaç(w/w)	% hapsedilen ilaç
1/1	%27
1/0.5	%29
1/0.25	%34

Kullanılan ilaç miktarı azaldıkça yüzde ilaç hapsedme miktarında artış gözlenmiştir. Bunun sebebi polimer matriks ve dış sulu faz arasındaki konsantrasyon gradienti arttıkça üretim prosesinde çok daha fazla ilaç kaybı olmakta ve dolayısıyla kullanılan ilaç miktarı arttıkça nanopartiküle ilaç hapsedme etkinliği azalmaktadır (Yun Lu ve ark., 2010).

Nanopartiküllerden salınan ilaç miktarlarını tayin etmek amacıyla absorbans ölçümleri nanodrop kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve farklı süreler için absorbans değerleri elde edilmiştir. Etoposid için elde edilen kalibrasyon eğrisi, absorbans değerleri ve yüzde hapsedilen ilaç miktarları kullanılarak salınan ilacın mikrogram cinsinden değeri bulunmuştur ve farklı konsantrasyonlardaki ilacın zamana karşı % kümülatif değerleri grafiğe geçirilmiştir



Şekil 4.13. PHBV nanopartiküllerden kümülatif etoposid salım grafiği

Şekil 4.13 'e baktığımızda 1/0.25 oranındaki nanopartikülün salım hızı en yüksek, buna karşılık 1/1 oranındaki nanopartikülün salım hızı ise en düşüktür. 1/1 oranında

ilaçlı nanopartikülde kullanılan ilaç miktarı en fazladır. İlaç yükleme içeriği arttıkça nanopartiküle hapsedilen ilaç miktarı azalmaktadır. Çünkü, nanopartiküle yüklenen ilaçtan dolayı partiküldeki konsantrasyonla dış sulu faz arasındaki konsantrasyon farkı arttığından dolayı daha fazla ilaç partikülden salınmakta ve dolayısıyla 1/1 oranındaki nanopartikülden ilaç daha çok difüze olduğu için daha az miktarda ilaç enkapsüle olmaktadır. Sonuçta diğer ilaç yüklü nanopartikül oranlarıyla karşılaştığımızda 1/1'deki % hapsedilme miktarı diğerlerine göre azmış gibi görünse de aslında daha fazla ilaç kullanıldığından ilaç yükleme etkinliği daha fazladır. Dolayısıyla da Şekil 4.13 de görüldüğü gibi 1/1 oranında ilaç yüklü nanopartiküldeki ilaç miktarı, 1/1 oranındaki partikülden fazla olduğu için daha uzun süreli salım söz konusudur. 1/0.25 oranında ilaç içeren nanopartikülde bulunan ilaç miktarı en az olduğundan dolayı en hızlı salım gerçekleşmiştir.

4.4. PHBV nanopartikül-Hücre Etkileşimleri

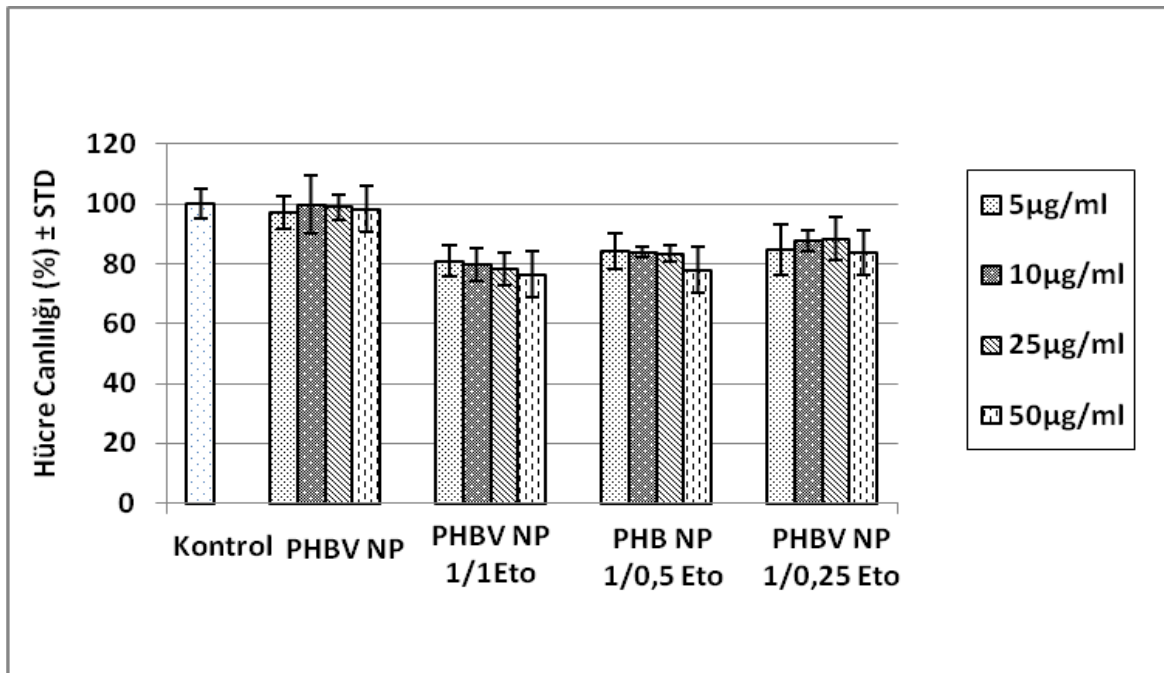
4.4.1. Sitotoksikite testleri

Bu çalışmada 5, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlardaki farklı formülasyonlara sahip PHBV nanopartiküllerin osteosarkoma hücreleri üzerine sitotoksikite testleri incelenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.2; 4.3; 4.4; 4.5 ve 4.6 deki gibidir.

Çizelge 4.2. PHBV ve farklı polimer/etoposid oranlarında hazırlanan PHBV-Etoposid nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 24 saatlik sitotoksik etkisinin sonuçları (ortalama formazan absorbans ve yüzde canlılık olarak verilmiştir)

	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama formazan absorbansı (570nm)± STD	%Canlılık ±STD
Kontrol	0	0,4973± 0,104	100
PHBV NP	5	0,4825± 0,028	97,082± 5,701
	10	0,496± 0,099	99,799± 9,914
	25	0,4916± 0,071	98,919± 4,200
	50	0,4881± 0,039	98,214± 7,905
PHBV NP-1/1 Etoposid	5	0,407± 0,051	80,944± 10,217
	10	0,396± 0,069	79,745± 3,935
	25	0,389± 0,041	78,270± 8,245
	50	0,380± 0,044	76,499± 8,846

PHBV NP- 1/0,5 Etoposid	5	0,419± 0,036	84,306± 7,292
	10	0,417± 0,011	83,781± 2,159
	25	0,415± 0,015	83,451± 3,097
	50	0,388± 0,100	78,001± 10,081
PHBV NP- 1/0,25 Etoposid	5	0,421 ± 0,033	84,622± 6,624
	10	0,436± 0,035	87,676± 6,994
	25	0,439± 0,035	88,229± 7,117
	50	0,416± 0,058	83,783± 10,701

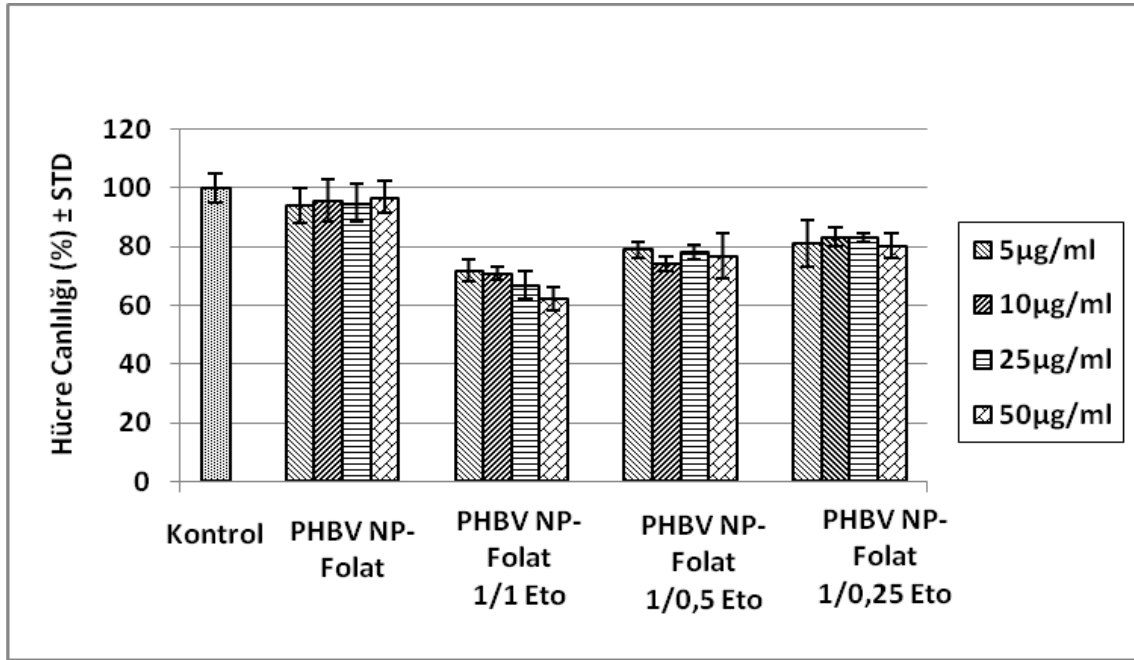


Şekil 4.14. PHBV-NP ve PHBV-Etoposid nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 24 saatlik sitotoksik etkisi

Bu sonuçlara göre; PHBV nanopartiküllerin hücreler üzerine kayda değer bir sitotoksitesi yoktur. 1/1, 1/0,5 ve 1/0,25 polimer/etoposid oranlarında hazırlanan nanopartiküllerin sitotoksik etkileri incelendiğinde 1/1 polimer/etoposid oranında hazırlanan nanopartiküllerin daha başarılı olduğu görülmüştür. 50 µg/ml konsantrasyonda, 1/1 polimer/etoposid oranında hazırlanan PHBV-etoposid nanopartiküllerin, kontrol çalışması ile karşılaştırıldığında %23,5±8,846 oranında sitotoksik olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.3. PHBV-Folat ve farklı polimer/etoposid oranlarında hazırlanan PHBV-Etoposid-Folat nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 24 saatlik sitotoksik etkisinin sonuçları (ortalama formazan absorbans ve yüzde canlılık olarak verilmiştir)

	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama formazan absorbansı (570nm) ± STD	%Canlılık ± STD
Kontrol	0	0,497±0,104	100
PHBV NP-Folat	5	0,467±0,032	94,039±6,44
	10	0,476±0,038	95,824±7,617
	25	0,471±0,033	94,797±6,682
	50	0,481±0,028	96,861±5,615
PHBV-NP-1/1 Etoposid-Folat	5	0,410±0,031	71,886±5,463
	10	0,407±0,018	70,913±3,173
	25	0,384±0,041	66,913±7,056
	50	0,357±0,035	62,202±6,129
PHBV-NP-1/0,5 Etoposid-Folat	5	0,393±0,017	79,074±3,497
	10	0,368±0,016	74,144±3,246
	25	0,388±0,065	78,068±3,145
	50	0,381±0,065	76,836±10,147
PHBV-NP-1/0,25 Etoposid-Folat	5	0,453±0,049	81,146±9,766
	10	0,414±0,018	83,299±3,703
	25	0,413±0,098	83,148±1,981
	50	0,409±0,027	80,360±5,492



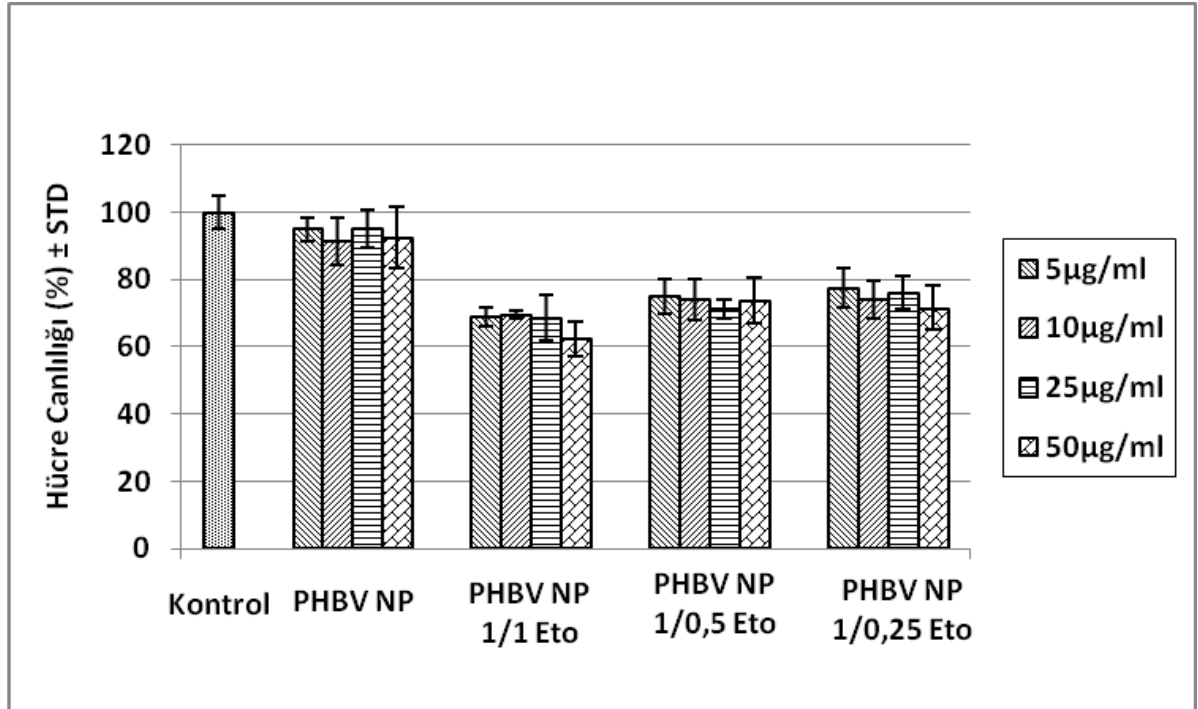
Şekil 4.15. Folat takımlı PHBV-NP ve Etoposid yüklü folat takımlı PHBV-NP'lerin osteosarkoma hücrelerine 24 saatlik sitotoksik etkisi

Bu grup çalışmada nanopartiküller ile hücreler 24 saat boyunca muamele edilmiştir ve folat ile yönlendirilmiş PHBV nanopartiküllerin sitotoksik etkileri incelenmiştir. Alınan sonuçlara göre nanopartiküllerin folat ile yönlendirilmesi sitotoksik etkilerini yaklaşık %3-12 oranlarında artırmıştır. Folat ile yönlendirime; PHBV nanopartiküllerin sitotoksitesini yaklaşık %1-2 oranlarında artırmıştır. Etoposid yüklü nanopartiküllere bakıldığında ise bu oran 1/1 polimer/etoposid oranında etoposid yüklenmiş nanopartiküllerde yaklaşık %15'e çıkmaktadır.

Çizelge 4.4. PHBV ve farklı polimer/etoposid oranlarında hazırlanan PHBV-Etoposid nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 48 saatlik sitotoksik etkisinin sonuçları (ortalama formazan absorbanı ve yüzde canlılık olarak verilmiştir)

	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama formazan absorbanı (570nm)±STD	%Canlılık ±STD
Kontrol	0	0,575±0,049	100,000
PHBV NP	5	0,546±0,022	95,072±3,788
	10	0,5246±0,102	91,234±7,777
	25	0,547±0,034	95,188±5,837
	50	0,532±0,056	92,550±9,792

PHBV NP-1/1 Etoposid	5	0,343±0,07	69,039±4,142
	10	0,345±0,055	69,517±1,073
	25	0,340±0,053	68,536±10,567
	50	0,309±0,043	62,323±8,626
PHBV NP-1/0,5 Etoposid	5	0,434±0,041	74,985±7,057
	10	0,425±0,047	73,937±8,164
	25	0,410±0,023	71,329±3,961
	50	0,424±0,052	73,804±9,051
PHBV NP-1/0,25 Etoposid	5	0,445±0,044	77,434±7,598
	10	0,426±0,102	74,086±7,716
	25	0,426±0,125	76,086±6,534
	50	0,411±0,053	71,536±9,213



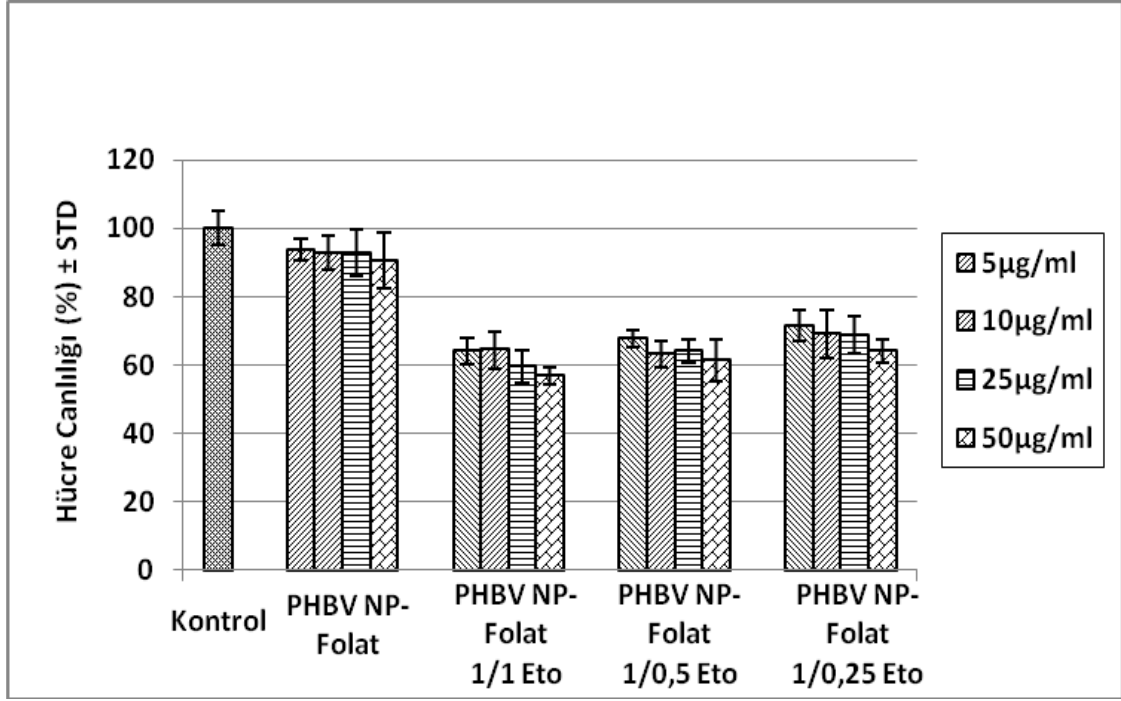
Şekil 4.16 . PHBV-NP ve PHBV-Etoposid nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 48 saatlik sitotoksik etkisi

Bu grup çalışmada nanopartiküller ile hücreler 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Alınan sonuçlara bakıldığında nanopartiküllerin sitotoksitesinin arttığı görülmüştür.

Bu çalışma sonucunda da 1/1 polimer/etoposid oranında hazırlanan nanopartiküllerin daha başarılı olduğu görülmüştür ve 50 µg/ml konsantrasyonda 48 saat sonra sitotoksosite, 24 saat'e göre %14,17 artmıştır.

Çizelge 4.5. PHBV-Folat ve farklı polimer/etoposid oranlarında hazırlanan PHBV-Etoposid-Folat nanopartiküllerin osteosarkoma hücrelerine 48 saatlik sitotoksik etkisinin sonuçları (ortalama formazan absorbanı ve yüzde canlılık olarak verilmiştir)

	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama formazan absorbansı (570nm) ±STD	%Canlılık ±STD
Kontrol	0	0,575±0,049	100
PHBV NP-Folat	5	0,539±0,020	93,782±3,409
	10	0,534±0,032	92,913±5,566
	25	0,533±0,042	92,826±7,233
	50	0,520±0,052	90,539±9,049
PHBV NP-1/1 Etoposid-Folat	5	0,369±0,034	64,282±5,915
	10	0,370±0,048	64,5±8,404
	25	0,342±0,044	59,630±7,81
	50	0,326±0,025	56,804±4,388
PHBV NP-1/0,5 Etoposid-Folat	5	0,389±0,0212	67,710±3,69
	10	0,363±0,035	63,173±6,095
	25	0,369±0,030	64,286±5,251
	50	0,353±0,0566	61,518±9,85
PHBV NP-1/0,25 Etoposid-Folat	5	0,412±0,0373	71,718±6,485
	10	0,397±0,0577	69,095±10,043
	25	0,396±0,0458	68,956±7,962
	50	0,368±0,09	64,115±5,660

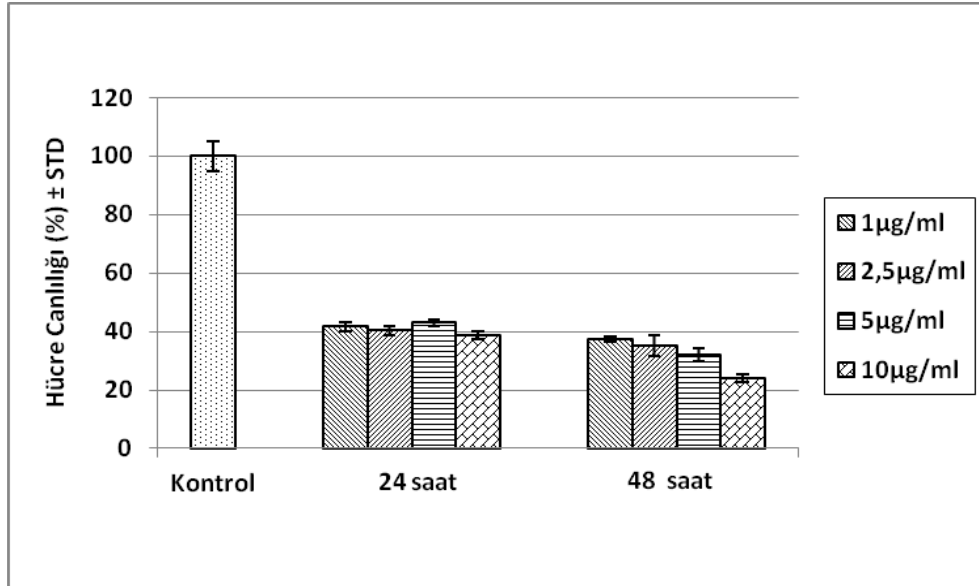


Şekil 4.17. Folat takılmış PHBV-NP ve Etoposid yüklü folat takılmış PHBV-NP'lerin osteosarkoma hücrelerine 48 saatlik sitotoksik etkisi

Bu grup çalışmada nanopartiküller ile hücreler 48 saat boyunca muamele edilmiştir ve folat ile yönlendirilmiş PHBV nanopartiküllerin sitotoksik etkileri incelenmiştir. Alınan sonuçlara göre nanopartiküllerin folat ile yönlendirilmesi sitotoksik etkilerini yaklaşık %4-12 oranlarında artırmıştır. Bu çalışmada en yüksek sitotoksisite 1/1 polimer/etoposid yüklenen PHBV nanopartiküllerde görülmüştür. Folat ile yönlendirme bu nanopartiküllerde %5 ile sınırlı kalırken 1/0,5 polimer/etoposid yüklü nanopartiküllerde %12'ye çıkmıştır.

Çizelge 4.6. Serbest etoposidin osteosarkoma hücrelerine 24 ve 48 saat süre sitotoksik etkisinin sonuçları (ortalama formazan absorban ve yüzde canlılık olarak verilmiştir)

	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)	Ortalama formazan absorbansı (570nm) \pm STD	%Canlılık \pm STD
24 saat inkübasyon			
Kontrol	0	0,497 \pm 0,104	100
Etoposid	1	0,207 \pm 0,068	41,716 \pm 3,879
	2,5	0,200 \pm 0,07	40,382 \pm 4,175
	5	0,214 \pm 0,014	43,058 \pm 2,845
	10	0,191 \pm 0,016	38,564 \pm 3,404
48 saat inkübasyon			
Kontrol	0	0,575 \pm 0,049	100
Etoposid	1	0,214 \pm 0,071	37,373 \pm 2,389
	2,5	0,201 \pm 0,119	35,043 \pm 10,86
	5	0,184 \pm 0,095	32,057 \pm 6,559
	10	0,137 \pm 0,032	23,913 \pm 5,589



Şekil 4.18.Serbest etoposidin sitotoksitesi

Bu çalışmada serbest etoposidin 24 ve 48 saat süre ile osteosarkoma hücreleri üzerine sitotoksik etkisi incelenmiştir. Çalışmada nanopartiküllere enkapsüle edilmiş etoposid oranları göz önüne alınarak serbest etoposid 1-2,5-5 ve 10 $\mu\text{g/ml}$ oranlarında osteosarkoma hücreleri ile etkileştirilmiştir. Sonuçlarına bakıldığında serbest etoposidin nanopartiküllere enkapsüle edilmiş etoposidden daha sitotoksik olduğu görülmüştür. Bu da enkapsülasyonun başarılı olduğu ve kontrollü ilaç saldığını göstermektedir.

Hazırlanan farklı polimer/etoposid oranlarına sahip PHBV nanopartiküllerin osteosarkoma hücreleri üzerine 24 ve 48 saat sitotoksitesine sonuçlarına bakıldığında 1/1 oranında polimer/etoposid yüklü partiküllerin sitotoksik etkilerinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ilaç salım çalışmaları ile örtüşmektedir. En yüksek ilaç yükleme oranı 1/1 polimer/etoposid oranına sahip nanopartiküllerde elde edilmiştir. Aynı zamanda folat ile nanopartiküllerin yönlendirilmesi de nanopartiküllerin sitotoksitesini artırmıştır. Bu sonuçlar apoptotik ve nekrotik indeks çalışmaları ile birbirlerini doğrulamaktadır. Etoposid yükleme oranları apoptotik- nekrotik indeks ve sitotoksitesine çalışmaları sonucunda kayda değer değişiklikler yapmıştır. Sitotoksitesine sonuçlarına göre her bir polimer/etoposid oranına sahip nanopartiküllerin toksisitesi kendi içlerinde değerlendirildiğinde nanopartikül konsantrasyonlarının değil zamanın ve etoposid yükleme oranlarının sitotoksitesine üzerinde daha önemli olduğu görülmüştür. Yapılan 24 ve 48 saatlik sitotoksitesine çalışmalarında, 48 saatlik çalışmada sitotoksitesine oranlarının 24 saatliğe göre yaklaşık %15 daha fazla olduğu görülmüştür. Etoposidin genel olarak, geç S fazındaki ve erken G2 fazındaki hücrelere etki ederek hücrelerin üretimini bloke ettiğinin bilinmesi bu sonuçları doğrulamaktadır.

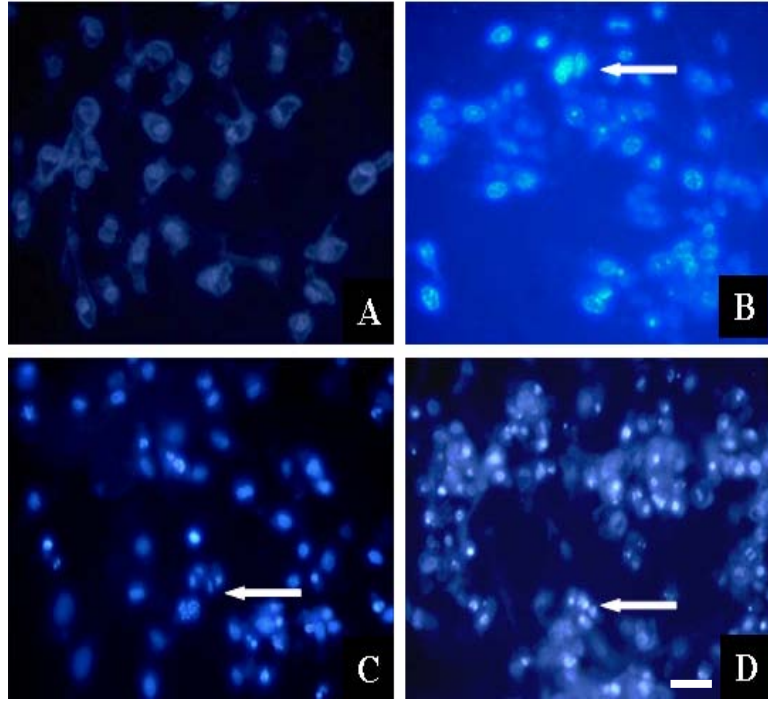
4.4.2 İkili boyama ve Aneksin-V florosein boyaması ile elde edilen apoptotik indeks sonuçları

Apoptotik oran iki şekilde elde edilmiştir. Birincisi hoechst 33342 boyama ile ikincisi ise Aneksin-Vflorosein boyama metodu ile tesbit edilmiştir. Çizelge 4.7 de metodun ortalaması verilmiştir. Yapılan çalışmadan elde edilen mikroskop fotoğrafları Şekil 4.19 da verilmiştir Şekil 4.19 da hoechst 33342 ile boyanmış hücrelerin kontrol grubunun fotoğrafı görülmekte olup hücre çekirdeklerinde morfolojik olarak farklılık görülmemektedir. Fakat Etoposid ilacı ve ilaç yüklü nanopartiküller folik asit ile hedeflendiklerinde hücre apoptotik hücre çekirdeklerinin parçalandığı apoptoza uğramayan hücrelere göre daha parlak mavi renkte olduğu görülmüştür (Şekil 4.19 b,c, d). Apotozun belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem Aneksin-Vflorosein boyama metodudur. Bu metotta kullanılan aneksin-V apoptotik hücrelerin zarlarını boyar ve floresan mikroskopta FITC filtresi ile hücrelerin yeşil görünmesini sağlar. Yapılan çalışmadan elde edilen apoptotik sonuçlara göre; Etoposid kanser ilacının

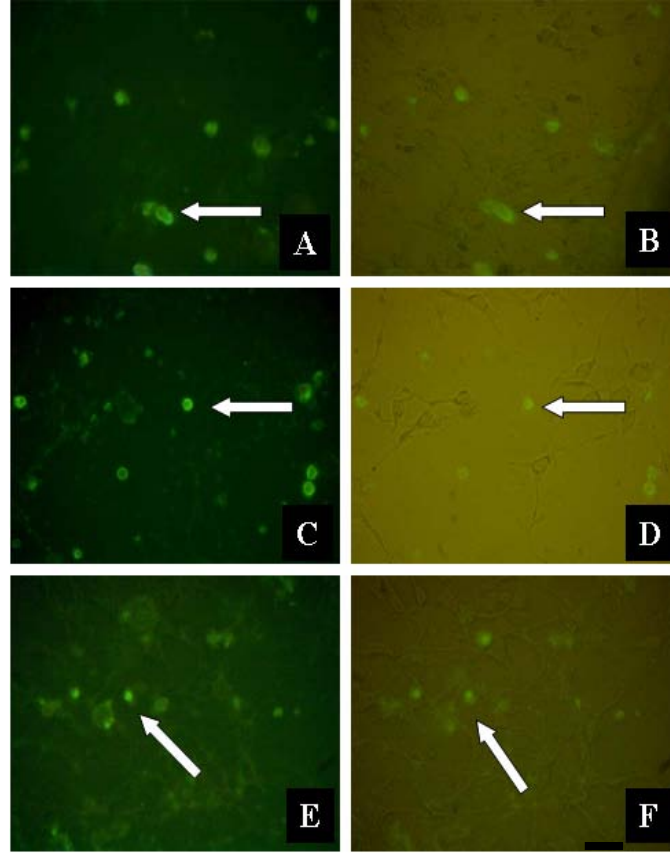
düşük konsantrasyonda apoptotik etkilerinin düşük olduğu tesbit edilmiştir. Fakat ilaç konsantrasyonu artırıldıkça apoptotik etkininde artışı gözlenmiştir. Aynı sonuç ilaç yüklü nanopartiküllerde ve folik asitle hedeflenmiş ilaç yüklü nanopartiküllerde de elde edilmiştir (Çizelge 4.7). Etoposid PHBV nanopartiküllere yüklenip kanser hücrelerine verildiğinde apoptotik indeksin düşük oranda yükseldiği gözlenmiştir. İlaç yüklü partiküllere kanser hücrelerine hedefleyici folik asit takıldığında ise ilacın kendisine göre ve ilaç yüklü hedeflenmemiş nanopartiküllere göre ise %5-10 arasında apoptotik etkinin arttığı gözlenmiştir. Özellikle 1/1 oranında ilaç yüklü folik asitle hedeflenmiş nano partiküllerde bu etki en yüksek oranda elde edilmiştir. Farklı oranlarda ilaç yüklü nanopartiküllerin apoptotik etkisi arasında çok fazla fark elde edilemezken, folik asit ile hedeflendiğinde apoptotik etkideki fark dikkat çekicidir. En yüksek etki 1/1 oranında folikasit ile hedeflenmiş partiküllerde elde edilmiş olup %24 civarındadır. Bu sonuç bize folik asit ile ilaç yüklü partiküllerin hedeflenmesinin ilacın kanser hücreleri tarafından daha yüksek oranda alındığını göstermektedir. Buna ilave olarak partiküller ilacı kontrollü şekilde salınım yaptıkları için serbest ilaca göre daha uzun süre etkisini gösteriyor olması apoptotik etkinin artmasına neden olmuştur. Bu etki Şekil 4.21 'ye bakıldığında daha iyi anlaşılacaktır. Şekil 4.20 'de hedeflenmemiş ilaç yüklü partiküllerde apoptotik (yeşil renkte görünen) hücre sayısı düşük iken, Şekil 4.21'de özellikle Şekil 4.21 e 'de apoptotik hücrelerin(yeşil rente) daha çok sayıda olduğu görülmektedir. Apoptotik etki hoechst 33342 boyama sonuçları ile paralel elde edilmiştir. Özellikle folik asit takılı ilaç yüklü nanopartiküllerin uygulandığı kuyucuklarda apoptotik etki çok net olarak görülmektedir. Özellikle 1/1, 1/0,5 ve 1/0,25 oranında 50µg/ml ilaç içeren folik asit ile hedeflenmiş partiküllerin etkisi Şekil 4.21'de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi kuyucuk tabanına yapışmış hücrelerin yeşil renge boyandığı yani apoptoza girdiği tesbit edilmiştir. Aynı zamanda apoptoza uğramamış hücreler floresan ve normal ışık altında bakıldığında renksiz olarak Şekil 4.21 b, d, f 'de görülmektedir.

Çizelge 4.7. Kanser ilacı Etoposid(E), farklı oranlarda etoposid yüklü nanopartiküller(NP) ve farklı oranlarda etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş nanopartiküllerin(PF) osteokarsinoma kanser hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % apoptotik indeksleri gösteren çizelge.

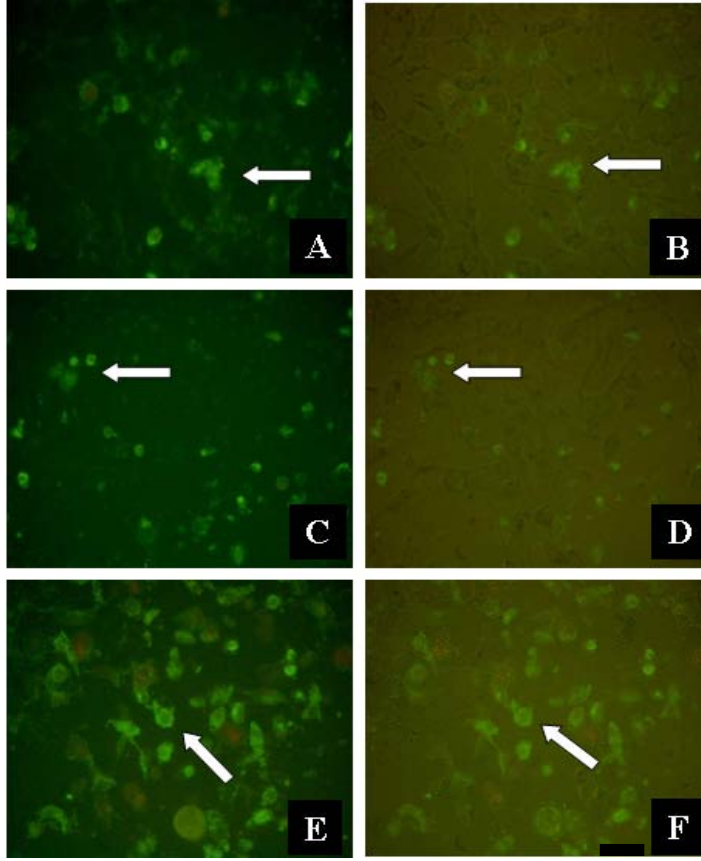
Etoposid miktarı (µg/ml)	E	1/0,25P	1/0,25PF	1/0,5P	1/0,5PF	1/1P	1/1PF
0	1±1	1±1	1±1	1±1	2±1	2±1	1±1
5	2±1	2±1	2±1	5±1	8±1	4±1	8±1
10	6±1	4±1	6±1	8±1	12±1	7±1	13±1
25	9±2	6±1	8±2	12±1	18±2	13±2	17±1
50	14±1	8±1	13±1	15±1	21±2	15±1	24±2



Şekil 4.19. Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan İkili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları; (A) Hoechst 33342 ile boyanmış ilaç ve nanopartiküllerle muamele edilmemiş osteokarsinoma hücreleri(kontrol grubu); Hücreler komplekslerle etkileştirilmediğinden hücreler apoptoza uğramamış ve hücre çekirdekleri soluk mavi görünmekte, çekirdek sınırları normal, çekirdek parçalanmamış, (B); 1:0,25oranında Etoposid yüklü NP (50µg/ml ilaç) ile etkileştirilmiş osteokarsinoma hücreleri, (C) 1:0.5 oranında Etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP (50µg/ml ilaç) ile etkileştirilmiş kanser hücrelerinin görüntüsü, (D) 1:1 oranında Etoposid yüklü Folik asit ile hedeflenmiş NP (50µg/ml) ile etkileştirilmiş osteokarsinoma hücrelerinin görüntüsü. Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Apoptoza uğramış hücre çekirdekleri parlak, parçalanmış, apoptoza uğramayanlar soluk mavi görünmektedir. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 20µm mesafeyi göstermektedir.



Şekil 4.20. Aneksin-V ve PI ile boyama metodundan elde edilen Etoposid yüklü NP fotoğrafları; (A) 1:0,25 oranında Etoposid yüklü NP (50µg/ml) ile etkileştirilmesi sonucu hücrelerin bir kısmı apoptoza uğramış hücreler yeşile boyanmıştır, (B) Fotoğraf A'daki hücrelerin floresan ve normal ışık altındaki fotoğrafları, apoptoza uğramayanlar renksiz görünmektedir. (C) 1:0,5 oranında Etoposid yüklü NP (50µg/ml) ile etkileştirilmesi sonucu hücrelerin bir kısmı apoptoza uğramış hücreler yeşile boyanmıştır, (D) Fotoğraf C'daki hücrelerin floresan ve normal ışık altındaki fotoğrafları, apoptoza uğramayanlar renksiz görünmektedir. (E) 1:1 oranında Etoposid yüklü NP (50µg/ml) ile etkileştirilmesi sonucu hücrelerin bir kısmı apoptoza uğramış hücreler yeşile boyanmıştır, (F) Fotoğraf E'daki hücrelerin floresan ve normal ışık altındaki fotoğrafları apoptoza uğramayanlar renksiz görünmektedir. Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 20µm mesafeyi göstermektedir.



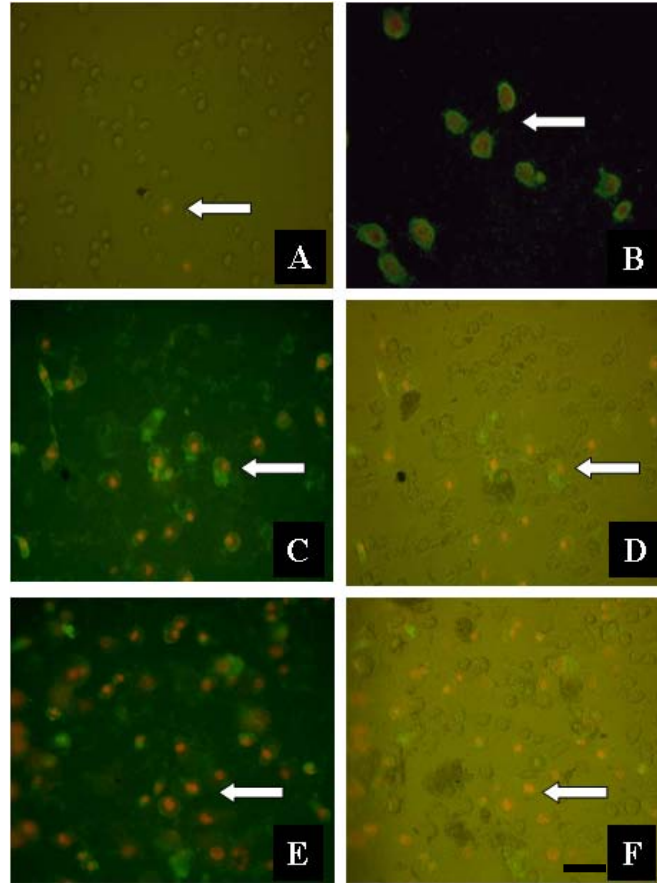
Şekil 4.21. Aneksin-V ve PI ile boyama metodundan elde edilen Etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP fotoğrafları; (A) 1:0,25 oranında Etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP (50µg/ml) ile etkileştirilmesi sonucu hücrelerin bir kısmı apoptoza uğramış hücreler yeşile boyanmıştır, (B) Fotoğraf A'daki hücrelerin floresan ve normal ışık altındaki fotoğrafları, apoptoza uğramayanlar renksiz görünmektedir. (C) 1:0,5 oranında Etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP (50µg/ml) ile etkileştirilmesi sonucu hücrelerin bir kısmı apoptoza uğramış hücreler yeşile boyanmıştır, (D) Fotoğraf C'daki hücrelerin floresan ve normal ışık altındaki fotoğrafları, apoptoza uğramayanlar renksiz görünmektedir. (E) 1:1 oranında Etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP (50µg/ml) ile etkileştirilmesi sonucu hücrelerin bir kısmı apoptoza uğramış hücreler yeşile boyanmıştır, (F) Fotoğraf E'daki hücrelerin floresan ve normal ışık altındaki fotoğrafları apoptoza uğramayanlar renksiz görünmektedir. Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 20µm mesafeyi göstermektedir.

4.4.3. İkili boyama ve Aneksin-V floresan boyaması ile elde edilen nekrotik indeks sonuçları

İkili boyama metodunda ve Aneksin-V ile birlikte kullanılan bir diğer boya ise PI(Propodiyum iyodid) floresan boyası olup ilaç ve ilaç yüklü partiküllerle etkileştirilen kanser hücrelerin nekrotik oranı tesbit edilmiştir. PI floresan boya ölü ve plazma membranı hasarlı hücrelerin zarlarından geçerek, çekirdeklerin floresan ışık altında kırmızı görünmelerini sağlar. Nekrotik olmayan hücreler propodium iyodid ile boyanmazken, apoptotik ve nekrotik hücre ise yeşil renkte olup FITC floresan filtresi ile görüntülendiğinde yeşil renkte görülmektedirler. Bizim yaptığımız çalışmada nekrotik indeks saptanması 480-520 nm dalga boyunda fuloresan ışık(FITC filtresi ile) altında incelenmiş ve bu dalga boyunda aynı anda nekrotik hücrelerin çekirdeği kırmızı ve hücrelerin zarları yeşil renkte görülmektedir. Nekrotik hücreleri gösteren fotoğraflar Şekil 4.22 'de ve % nekrotik indeksi Çizelge 4.8 de verilmiştir. Çizelge 4.8 de görüldüğü gibi, düşük konsantrasyonlarda nekrotik indeks çok yüksek değildir. Fakat konsantrasyonun artması toksisiteyi de artırdığı için nekrozunda artmasına sebep olmuştur. Özellikle folik asit ile hedeflenmiş ilaç yüklü nanopartiküllerin nekrotik etkisini yüksek olduğu saptanmıştır. Şekil 4.22 de de görüldüğü gibi folik asit ile hedeflenmiş nanopartiküllerin nekrotik etkisi(Şekil 4.22 c, e), hedeflenmemiş partiküllere göre daha yüksektir. Folik asit ile hedeflenmiş ilaç yüklü nanopartiküllerin nekrotik etkisi ise yalnız ilaç uygulanan örneklere göre ve hedeflenmemiş ilaç yüklü nanopartiküllere göre ise %5-7 daha yüksek elde edilmiştir. En yüksek nekrotik indeks 1/1 oranda folik asit ile hedeflenmiş 50µg/ml ilaç taşıyan nanopartiküllerden elde edilmiş olup %25 civarındadır.

Çizelge 4.8. Kanser ilacı Etoposid(E), farklı oranlarda etoposid yüklü nanopartiküller(P) ve farklı oranlarda etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş nanopartiküllerin(PF) osteokarsinoma hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % nekrotik indekleri gösteren çizelge.

Etoposid miktarı (µg/ml)	E	1/0,25P	1/0,25PF	1/0,5P	1/0,5PF	1/1P	1/1PF
0	1±1	2±1	1±1	1±1	2±1	2±1	1±1
5	4±1	3±1	1±1	3±1	5±1	3±1	8±1
10	8±1	5±1	7±1	9±1	13±2	6±1	11±1
25	12±2	12±1	14±2	11±1	16±2	12±2	19±2
50	17±3	17±1	21±2	15±2	20±1	18±1	25±2



Şekil 4.22. Aneksin-Vflorescein ve Propodium İyodid(PI) floresan boya kullanılarak elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları; (A) İlaç ve nanopartiküllerle muamele edilmemiş osteokarsinoma hücreleri(kontrol grubu); Hücreler komplekslerle etkileştirilmediğinden hücreler nekroza uğramamış ve hücre çekirdekleri kırmızı 1-2 hücre görünmekte(PI ile boyanmış) (B); 1-1 oranında Etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP (50µg/ml ilaç) ile etkileştirilmiş kanser hücreleri, (C) 1:0,5 oranında Etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP (50µg/ml ilaç) ile etkileştirilmiş kanser hücrelerinin görüntüsü, Nekroza uğramış hücre çekirdekleri kırmızı, hücre zarları ise aneksin-V ile boyandığından yeşil görünmektedir. (D) 1:0,5 oranında Etoposid yüklü

folik ait ile hedeflenmiş NP (50µg/ml ilaç) ile etkileştirilmiş hücrelerinin Floresan ve normal ışık altındaki görüntüsü, Nekroza uğramış hücre çekirdekleri kırmızı, uğramamış hücre çekirdekleri renksiz görünmektedir. (E) 1:1 oranında Etoposid yüklü folik ait ile hedeflenmiş NP (50µg/ml ilaç) ile etkileştirilmiş kanser hücrelerinin görüntüsü, Nekroza uğramış hücre çekirdekleri kırmızı, hücre zarları ise aneksin-V ile boyandığından yeşil görünmektedir.(F) 1:0,5 oranında Etoposid yüklü folik ait ile hedeflenmiş NP (50µg/ml ilaç) ile etkileştirilmiş hücrelerinin Floresan ve normal ışık altındaki görüntüsü, Nekroza uğramış hücre çekirdekleri kırmızı, uğramamış hücre çekirdekleri renksiz görünmektedir. Oklar nekrotik hüclerlerden bazılarını göstermektedir. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 20µm mesafeyi göstermektedir.

SONUÇLAR

Bu tez çalışması kapsamında hedefli kanser tedavisi amacıyla etoposid yüklü ve folik asit ile modifiye edilmiş nanopartiküler sistemler hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- Emülsifikasyon-difüzyon yöntemi ile hazırlanan PHBV nanopartiküllerin kimyasal karakterizasyonu FT-IR, morfolojik karakterizasyonu ise SEM ve AFM cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen FTIR bulguları sonucunda nanopartiküllerin folik asit ile modifiye edildiği ve ilacın nanopartiküllere yüklendiği doğrulanmıştır. Morfolojik incelemeler sonucu nanopartiküllerin genellikle küresel yapıya ve düzgün yüzeye sahip oldukları belirlenmiştir.
- PHBV nanopartiküllerin boyut analizi için Zeta Boyut Analizi cihazı kullanılmış olup; homojenizasyon hızı, polimer konsantrasyonu ve emülsifier konsantrasyonu nanopartikül boyutuna etki eden parametreler olarak değerlendirilmiştir. Homojenizasyon hızı ve stabilize edici ajan konsantrasyonu arttırıldığında, nanopartikül boyutunda düşüş gözlenmiştir. Polimer konsantrasyonundaki artış ise daha büyük nanopartikül eldesi ile sonuçlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda 210 nm elde edilen en düşük nanopartikül boyutu olarak bulunmuştur.
- PHBV nanopartiküllere ilaç yükleme çalışmalarında, kullanılan ilaç miktarı azaldıkça yüzde ilaç hapsedme miktarında artış gözlendiği bulunmuş olup yüzde hapsedilen ilaç miktarı, kullanılan ilaç miktarına bağlı olarak ortalama % 27 ile % 34 değerleri arasında hesaplanmıştır.
- PHBV nanopartiküllerin folik asit ile modifikasyonu çalışmalarında nanopartiküldeki ligand bağlanma yüzdesi, kullanılan ilaç miktarına bağlı olarak % 90 ile % 97 arasında bulunmuştur.

- İlaç salım çalışmaları sonucunda, farklı etken madde yükleme oranları için ilaç salım profilleri elde edilmiştir.
- Sitotoksisite çalışmaları kapsamında, hazırlanan farklı formülasyonlar (Folik asit ile modifiye edilmemiş ve etoposid yüklü olmayan PHBV nanopartikül, Folik asit ile modifiye edilmemiş ve etoposid yüklü PHBV nanopartikül, Folik asit ile modifiye edilmiş ve etoposid yüklü olmayan PHBV nanopartikül, folik asit ile modifiye edilmiş ve etoposid yüklü PHBV nanopartikül) ile osteosarkoma hücreleri etkileştirilerek PHBV nanopartiküllerin osteosarkoma hücreleri üzerine sitotoksik etkileri incelenmiştir, Alınan sonuçlara göre nanopartiküllerin folik asit ile yönlendirilmesi sitotoksik etkilerini artırmıştır.
- Tez çalışmasının son bölümünde PHBV nanopartiküllerin osteosarkoma kanser hücre kültürlerindeki apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır. Folik asit ile hedeflenmiş ilaç yüklü nanopartiküllerin nekrotik ve apoptotik etkisinin yalnız ilaç uygulanan örneklere göre ve hedeflenmemiş ilaç yüklü nanopartiküllere göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir,

KAYNAKLAR

- Au, J. L., Jang, S. H., Wientjes, M. G., 2002, Clinical Aspects of Drug Delivery to Tumors. *J Control Release* ;78(1-3):81-95.
- Bae, Y.H., Kim, S.W. , 1998, Drug delivery. In: Patrick CW, Mikos AG, McIntire LV (eds) *Frontiers in tissue engineering*. Pergamon, Oxford, p 261
- Brigger, I. et al. , 2002, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54: 631–651
- Cabrera M, Lavaggi ML, Hernandez P, Merlino A, Gerpe A, et al. , 2009, Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-T. cruzi 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction. *Toxicol Lett* 190: 140-9.
- Campobell IG, Jones TA, Foulkes WD, Trowsdale J, 1991, Folate binding protein is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res*, 51:5329–38.
- Cardin GB, Mantha M, Jumarie C., 2009, Resistance to cadmium as a function of Caco-2 cell differentiation: role of reactive oxygen species in cadmium- but not zinc-induced adaptation mechanisms. *Biometals* 22: 753-69
- Cesare Errico, Cristina Bartoli, Federica Chiellini, and Emo Chiellini, 2009, Poly(hydroxyalkanoates)-Based Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol.2009,1-10.
- Conroy S., Raymond S., Miqin Z., 2006, Folic acid-PEG conjugated superparamagnetic nanoparticles for targeted cellular uptake and detection by MRI. *J Biomed Mater Res Part A Appl Biomater*, 78A(3): 550-7
- Craig A. Almeida and Sheila A. Barry, 2010, *Cancer: Basic Science and Clinical Aspects*, John Wiley & Sons, Ltd.,1-3

- Dube D, Francis M, Leroux JC, Winnik FM, 2002, Preparation and tumor cell uptake of poly(N-isopropylacrylamide) folate conjugates. *Bioconjugate Chem*, 13:685–92.
- E.T.Baran, N.Özer and V.Hasirci, 2002, Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an in vitro study, *Journal of Microencapsulation*, Vol. 19, No. 3, Pages 363-376.
- Goya, G. F., Berquo, T. S., Fonseca, F. C., Morales, M. P., 2003, Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles, *Journal of Applied Physics*, 94: 3520–3528.
- Gürsoy, A, *Kontrollü Salım Sistemleri*, 2002, *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını*, 1.Baskı, İstanbul, 310-311
- Hideki Murakami , Masao Kobayashi , Hirofumi Takeuchi , Yoshiaki Kawashima, 1999, Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method, *International Journal of Pharmaceutics* 187: (1999) 143–152
- Hyung Park, Seulki Lee, Jong-Ho Kim, Kyeongsoon Park, Kwangmeyung Kim and Ick Chan Kwon, 2007, Polymeric nanomedicine for cancer therapy, *Progress in Polymer Science* Pages 113-137
- Ito A., Shinkai M., Honda H. ve Kobayashi T., 2005, Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 100, No. 1: 1–11
- Jae Hyung Park, Seulki Lee, Jong-Ho Kim, Kyeongsoon Park, Kwangmeyung Kim, Ick Chan Kwon, January 2008, Polymeric nanomedicine for cancer therapy, *Progress in Polymer Science*, Volume 33, Issue 1, , Pages 113-137

- Jaspreet K.Vasir, Maram K. Reedy and Vinod D. Labhasetwar, 2005, *Current Nanoscience*, *Nanosystems in Drug Targeting: Opportunities and Challenges*, 1:47-64
- Jorg Weyermann, Dirk Lochmann, Andreas Zimmer, 2005, A practical note on the use of cytotoxicity assays. *International Journal of Pharmaceutics* 288: 369–376
- J. Gabriel, 2007, *The Biology of Cancer*, Second Edition, John Wiley & Sons, Ltd, 3-4
- Kassab AC, Xu K, Denkbas EB, Dou Y, Zhao S, Piskin E, 1997, *J Biomater Sci Polym Ed* 8:947
- Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y., 2001, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47, 113-31.
- Katharine A. Parker and Geoffrey J. Pilkington, 2006, Apoptosis of human malignant glioma-derived cell cultures treated with clomipramine hydrochloride, as detected by Annexin-V assay. *Radiol Oncol*, 40(2): 87-93.
- Kwon, G.S.; Kataoka, K., 1995, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 16: 295-309.
- Kwon, G.S.; Okano, T., 1996, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 21: 107-16.
- Kwon, G.S.; Suwa, S.; Yokoyama, M.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K. J., 1994, *Control Release*, 29: 17-23.
- Liscovitch, M., Lavie, Y., 2002, Cancer multidrug resistance: A review of recent drug discovery research, *IDrugs* 5: 349-355.
- Lu, A.H. et al., 2007, Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46:1222–1244

- Luqmani, Y.A., 2005, Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy, Medical Principles and Practice, *Med Princ Pract* 2005;14 (Suppl. 1):35-48
- Majno G, Torisl A., 1995, Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 146: 3-15,
- Mao HQ, Kdaiyala I, Leong KW, Zhao Z, Dang W, 1999, Biodegradable polymers: poly (phosphoester)s. In *Encyclopaedia of Controlled Drug Delivery*, Vol 1. Edited by Mathowitz E. New York: John Wiley and Sons; 45-60
- Mathiowitz E (ed), 1999, *Encyclopedia of controlled drug delivery*, vols I & II. Wiley, New York
- Medintz, I.L. ve ark., 2005, Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.* 4: 435–446
- Nicolas, J. and Couvreur, P., 2009, Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1: 111–127.
- Nishioka, Y.; Yoshino, H., 2001, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47: 55-64.
- Omathanu Pillai and Ramesh Panchagnula, 2001, Polymers in drug delivery, *Current Opinion in Chemical Biology* , 5:447–451
- Philip S. Low, Asok C. Antony, 2004, Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases *Advanced Drug Delivery Reviews, Volume 56, Issue 8, 1055-1058*
- Polizu, S. et al., 2006, Applications of carbon nanotubes-based biomaterials in biomedical nanotechnology. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 1883–1904
- Reddy CSK, Ghai R, Rashmi Kalia VC, 2003, *Bioresour Technol* 87:137

Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M, 1994, Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo as in established cell lines physiological and clinical applications. *Cancer*, 73:2432–43.

Sanjeeb K.Sahoo and Vinod Labhasetwar, 2003, Nanotech Approaches to Delivery and Imaging, *Drug Discovery Today* Volume 8, Issue 24, Pages 1112-1120

Santini JT, Cima MJ, Langer R, 1999, *Nature* 397:335

Sheppard N.F., Langer R., 1992, “The use of ultrasound attenuation to characterize release of proteins from polymer matrix devices” *Journal of Controlled Release*, 22: 245-252

Sudimack J, Lee RJ, 2000, Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Del Rev*, 41:147–6

Torchilin, V.P.; Lukyanov, A.N.; Gao, Z.; 2003, Papahadjopoulos- Sternberg, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 6039-44.

Turek JJ, Leamon CP, Low PS, 1993, Endocytosis of folate-protein conjugates: ultrastructural localization in KB cells. *J Cell Sci*, 106:423–30.

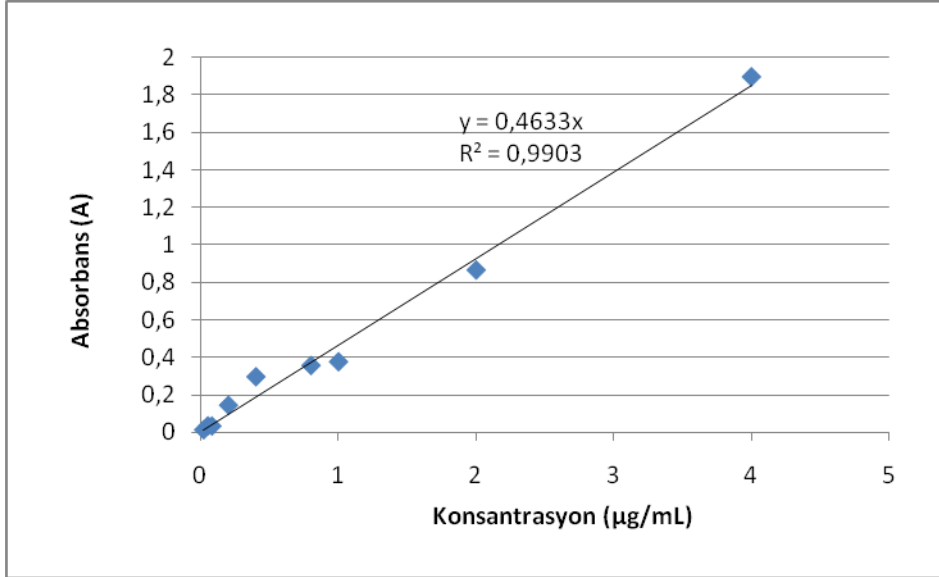
Vasir, J.K., Labhasetwar, V., 2005, Targeted Drug Delivery in Cancer Therapy; *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4:363–374.

Xinbo Zhang and Frederick Kiechle., 2001, Hoechst 33342-Induced Apoptosis is Associated with Decreased Immunoreactive Topoisomerase I and Topoisomerase I-DNA Complex Formation. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 31, no. 2,

- Weitman SD, Lark RH, Coney LR, Fort DW, Frasca V, Zurawski Jr VR, Kamen BA, 1992, Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res*, 52:3396–401.
- Wang S, Luo J, Lantrip DA, Waters DJ, Mathias CJ, Green MA, Fuchs P, Low PS, 1997, Design and synthesis of [¹²⁵I]DTPA-folate for use as a tumortargeted radiopharmaceutical. *Bioconjugate Chem*, 8:673–9..
- Zhang J., Misra R.D.K., 2007, Magnetic drug-targeting carrier encapsulated with thermosensitive smart polymer: Core–shell nanoparticle carrier and drug release response, *Acta Biomaterialia*, 3: 838–850
- Zhang K, Rossin R, Hagooly A, Chen Z, Welch M J, Wooley K L, 2008, Folate-mediated cell uptake of shell-crosslinked spheres and cylinders. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 46: 7578-7583.

EK 1.

Etoposide ait kalibrasyon eğrisi



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esmâ Alp
Doğum Yeri : Konya
Doğum Yılı : 1983
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lisans : 2003-2007, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü

Yüksek Lisans : 2008-2010, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı