

**İLAC TAŞIYICI OLARAK HALLOYSİT İÇEREN
NANOSÜNGERLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE
KARAKTERİZASYONU**

**DESIGN, SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF
HALLOYSITE CONTAINING NANOSPONGES
AS DRUG CARRIER**

BURCU AKAR

PROF. DR. HATİCE KAPLAN CAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2024

Canım aileme...

ÖZET

İLAÇ TAŞIYICI OLARAK HALLOYSİT İÇEREN NANOSÜNGERLERİN TASARIMI, SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Burcu AKAR

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice KAPLAN CAN

Haziran 2024, 127 sayfa

Günümüzde nanomalzemeler, özel nitelikleri ve kullanım alanları nedeniyle birçok endüstride oldukça önem taşımaktadır. Küçük boyutları ve yüksek yüzey alanı/hacim oranları nedeniyle nanomalzemeler benzersiz özellikler gösterirler. Hedefe yönelik bir ilaç taşıma sisteminin oluşturulması, nanoteknolojideki son gelişmelerin sonucudur. Bununla birlikte, bir molekülün, belirli bir bölgeye başarılı bir şekilde hedeflenmesi için özel bir ilaç taşıma sistemine ihtiyaç duyulmaktadır.

Hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları barındırabildikleri için nanosünger (NS) nanomalzemelerin geliştirilmesi, ilaç toksisitesi, düşük biyoyararlanım ve ilaç taşınımı gibi bazı sorunların çözümünde çok önemli bir adım haline gelmiştir. Nanosüngerlerin gözenekli yapısı onlara ilaç moleküllerini hapsedme ve istenen şekilde taşınımının sağlanması konusunda özel bir nitelik kazandırır. Nanosüngerler, vücutta hedef bölgelere doğru hareket edebilen ve yüzeylere yapışarak ilaçları istenen şekilde taşınmasını sağlayan viskoelastik yapıdaki nano boyutta süngerlerdir. Benzersiz yapıları nedeniyle nanosüngerler çok çeşitli kimyasalları absorplayebilir. Nanosüngerlerin yüksek yüzey

alanı en önemli özelliklerinden biridir. Yapıları nedeniyle nanosüngerler birim hacim başına çok sayıda gözenek içerebilir. Gözenekleri sayesinde sıvı veya gaz halindeki malzemeleri absorplaması mümkündür. Nanosüngerlerin uygulamaları oldukça çeşitlidir. Bunlar ilaç dağıtımı, tıbbi uygulamalar, çevre kirliliği, doku mühendisliği ve malzeme bilimi dahil olmak üzere çok çeşitli sektörlerde yer almaktadır. Örneğin nanosüngerler biyomedikal alanda belirli bölgeleri hedeflemek veya yara iyileşmesini hızlandırmak için kullanılabilir. Nanosüngerlerin özellikleri ve uygulamaları, nanoteknolojinin sağladığı yeni çözümlerde hayati bir rol oynamaktadır.

Bu tez çalışmasındaki temel amaç kanser tedavisinde kullanılan hidroksiürenin, farklı çapraz bağlayıcılar ile sentezlenen betasiklodekstrin (β CD) temelli nanosüngerler ile hem yan etkilerinin azaltılması hem de vücutta pasif taşınımının sağlanmasıdır. Ayrıca sentezlenen nanosünger malzemelerin halloysit kil ile konjugasyonunun elde edilmesi ile birlikte yüzey alanı çok daha yüksek ve ilacı kendine bağlayabilme kapasitesi arttırılmış nanomalzeme elde edilmiştir. Maleik anhidrit (MA), epiklorohidrin (EPI) ve maleik anhidrit-epiklorohidrin (MA-EPI) varlığında sentezlenen üç farklı nanosünger malzeme sentezlenirken çözelti yöntemi kullanılmış olup halloysit ile etkileşimleri ise *in-situ* ve *ex-situ* metodu ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen üç farklı yapı ile nanosünger-ilac konjugatları elde edilmiş olup, bu üç farklı nanosünger yapının HNT katkısı sonrasında elde edilen nanosünger-kil nanokompozitlerinin ve HNT katkısız nanosünger yapıların ilaç ile etkileşimi karşılaştırılmıştır.

Ayrıca çapraz bağlayıcılarla birlikte nanosünger yapılarının özellikleri incelenerek, malzemeler arasındaki farklılıklar belirlenmiş ve en az toksik etkiye sahip nanosünger yapıları belirlenmiştir. Tez çalışmasında, maleik anhidrit yapısının toksik etkisinin daha az olması nedeniyle, oldukça toksik olan epiklorohidrin yapısını içeren nanosüngerler ile karşılaştırılmış ve maleik anhidrit içeren nanosünger yapıları epiklorohidrin içeren nanosünger yapılarından farklılaştırılmıştır.

Tüm sentezlenen malzemelerin yapıları ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi), Proton Nükleer Manyetik Rezonans (1 H-NMR), X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) kullanılarak aydınlatılmıştır. Termal Gravimetrik Analiz (TGA) ile sentezlenen malzemelerin bozunma sıcaklıkları incelenmiştir.

Nanomalzemelerin camsı geçiş sıcaklığı ve ısıl geçişleri hakkında bilgi veren Dinamik Mekanik Analiz (DMA) ile malzemenin dinamik mekanik özellikleri hakkında bilgi edinilmiştir. Nanomalzemelerin yüzey morfolojisini inceleyebilmek için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında, sentezlenen nanosünger-hidroksiüre konjugatlarının hcesel etkileri HEK293 hücresi, insan embriyonik böbrek hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan sitotoksisite deneylerinde, konjugatların hücre içi etkileşimleri ve hücre üzerindeki etkileri incelenerek, potansiyel biyomedikal uygulamaları belirlemeye çalışılmıştır. Elde edilen bulgular, nanosünger-hidroksiüre konjugatlarının hücreler üzerindeki etkinliğinin anlaşılmasına ve gelecek çalışmalar için temel oluşturmuştur.

Anahtar Kelimeler: Hidroksiüre, Kanser, Halloysit, Nanokompozit, Nanosünger, Polimer-İlaç konjugat

ABSTRACT

DESIGN, SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HALLOYSITE CONTAINING NANOSPONGES AS DRUG CARRIER

Burcu AKAR

Master's Degree, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Hatice KAPLAN CAN

June 2024, 127 pages

Nanomaterials are of significant importance in many industries today due to their special properties and usage areas. Due to their small size and high surface area-to-volume ratios, nanomaterials exhibit unique characteristics. The development of a targeted drug delivery system is a result of recent advancements in nanotechnology. However, the successful targeting of a molecule to a specific region requires a specialized drug delivery system.

The development of nanosponges (NS) based on nanomaterials, capable of hosting both hydrophilic and hydrophobic drugs, has become a crucial step in addressing certain issues such as drug toxicity, low bioavailability, and drug transportation. The porous structure of nanosponges grants them a unique ability to trap drug molecules and facilitate their transportation as desired. Nanosponges are nano-sized, viscoelastic structures capable of moving towards target areas in the body and adhering to surfaces to facilitate the transportation of drugs in the desired manner.

Due to their unique structures, nanosponges can absorb a wide variety of chemicals. One of the most significant features of nanosponges is their high surface area. Their structures allow them to contain numerous pores per unit volume, enabling them to absorb materials in liquid or gas states. The applications of nanosponges are diverse, including drug delivery, medical applications, environmental remediation, tissue engineering, and materials science. For instance, nanosponges can be used in biomedicine to target specific areas or accelerate wound healing.

The properties and applications of nanosponges play a vital role in the novel solutions provided by nanotechnology. The primary aim of this thesis is to utilize β -cyclodextrin (β CD) based nanosponges synthesized with different binders to enhance the passive transportation and reduce the side effects of hydroxyurea, commonly used in cancer treatment. Additionally, by conjugating the synthesized nanosponge materials with halloysite clay, a nanomaterial with a significantly increased surface area and enhanced drug binding capacity is obtained. Three different nanosponge materials are synthesized in the presence of maleic anhydride (MA), epichlorohydrin (EPI), and maleic anhydride-epichlorohydrin (MA-EPI), using a solution method, and their interactions with halloysite are realized through *in-situ* and *ex-situ* methods. Three different structures of nanosponge-drug conjugates were obtained, and the interaction of these three different nanosponge structures with drugs was compared between nanosponge-clay nanocomposites obtained after the addition of HNT and nanosponge structures without HNT addition.

Additionally, by investigating the properties of nanosponge structures in conjunction with cross-linkers, differences between materials have been identified, and nanosponge structures with the least toxic effects have been determined. In the thesis study, nanosponges containing maleic anhydride structures were compared with nanosponges containing epichlorohydrin structures, which are highly toxic due to the lesser toxic effect of maleic anhydride structure.

The structures of all synthesized materials are elucidated using Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR), Proton Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$), and X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). Thermal Gravimetric Analysis (TGA) is utilized to examine the decomposition temperatures of the synthesized materials. Dynamic Mechanical Analysis (DMA)

provides insights into the dynamic mechanical structure of the material by providing information on the glass transition temperature and thermal transitions of nanomaterials. Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis is conducted to examine the surface morphology of nanomaterials.

In this thesis study, the cellular effects of synthesized nanosponge-hydroxyurea conjugates are evaluated on HEK293 cells, human embryonic kidney cells. Through cytotoxicity experiments, the intra-cellular interactions and effects on cells of the conjugates are investigated to determine potential biomedical applications. The findings obtained contribute to the understanding of the effectiveness of nanosponge-hydroxyurea conjugates on cells and lay a foundation for future studies.

Keywords: Cancer, Halloysite, Hydroxyurea, Nanocomposite, Nanosponge, Polymer-Drug Conjugate

TEŞEKKÜR

Lisans eğitimimin ilk gününde dersime giren ilk hocam, şimdi ise Yüksek Lisans eğitimimde her zorlukta yanımda olan ve bana bambaşka aydınlık kapılar açan, akademik anlamda her daim bilgileriyle ve tecrübeleriyle bana destek veren ve beni güvende hissettiren sayın hocam; hayatı sadece akademik bir yolculuk olmaktan çıkarıp, bana yaşamı da öğreten, duygularımı paylaşabildiğim bir sığınak olan, mutluluklarımı ve üzüntülerimi onunla paylaşabilmekten dolayı kendimi son derece şanslı hissettiğim, bana olan desteği, bilgisi ve ilgisiyle hiçbir zaman sınır tanımayan, düşüncelerine ve öğretilerine her zaman derin bir saygı duyacak olduğum sayın hocam Prof. Dr Hatice KAPLAN CAN'a içtenliklerimle teşekkür ederim.

Bana iş yerinde mutluluk veren bir ortam olabileceğini ve sahip olduğum arkadaşlarımı sayesinde tanıdığım, ne zaman laboratuvarlarına gitsem en güzel cümlelerle karşılandığım, en çok güldüğüm, en çok ağladığım yer olan, ne zaman yardıma ihtiyacım olsa çekinmeden bilgilerini benimle paylaşan ve bana yardım eden, bu mutlu laboratuvar ortamını yarattığı için sayın Prof. Dr. Lokman UZUN hocama teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez süresince kongrelerde bir araya geldiğimiz ve onu her gördüğümde içimi ısıtan enerjisiyle, güzelliğiyle ve bilgi birikimiyle beni kendine hayran bıraktıran sayın hocam Prof. Dr. Gülderen KARAKUŞ'a ve yine bu zorlu tez süresince akademik anlamda yanımda olan ve her gördüğümde pozitifliğiyle beni gülümseten, sabahları laboratuvara gelip örneklerimin analizleri için uğraşan, gördüğüm en kibar insanlardan biri olan sayın hocam Doç. Dr. Serap KAVLAK'a teşekkür ederim.

Çalışmalarımınla alakalı ne zaman zora düşsem ve yardıma ihtiyacım olsa her zaman bana yardım eli uzatan, yeri geldiğinde bir dost, yeri geldiğinde hocam olan ve benim yüzümü her daim güldürebilen Tunca KARASU'ya,

Her zaman yanımda olup beni anlayıp dinleyen, beni sakinleştiren ve bana her koşulda tam destek olan, en zor günümde bile benim elimden tutan ve beni kaldıran, yüzü gibi kalbi de güzel, canım arkadaşım, dostum Sena PİŞKİN'e,

Beni hep koruyup kollayan kendisine hayran kaldığım ablam Merve Asena ÖZBEK'e ve iyi ki var dediğim beni hep güldüren sayın hocam Merve ÇALIŞIR'a teşekkür ederim.

Ne zaman bir şeye ihtiyacım olsa hemen hallettikleri için, en zor dönemlerimde ne yaparız da bu kızın işini kolaylaştırabiliriz dedikleri için, benimle yeri geldiğinde ders çalışan, hep arkamda olan, ne olursa olsun kızları olduğum için hep beni şanslı hissettiren ve beni ayakları yere sağlam basan, dürüst, sevgi dolu biri olarak yetiştirdikleri için annem Pınar DİREKÇİ, abim Nezih Burak AKAR ve babam Bülent DİREKÇİ'ye; benim bir kız kardeşim olsa böyle olurdu dediğim, kendisine bu dünyadaki her şeyden daha çok güvendiğim, her koşulda bana destek olan, beni hep dinleyen ve her mutsuzluğumda yüzünü bir kez gördüğümde günümü düzelten bir tanecik yeğenim Atlas'ın annesi sevgili Monika AKAR'a teşekkür ederim.

Hayatıma girdiğinden beri her şeyi daha da kolaylaştıran, ne sorun yaşarsam yaşayayım her şeye çözüm bulan, zor günümde tek bir gülümsemesiyle beni sakinleştiren, beni her zaman dinleyen, destek olan, bütün sinirimi stresimi benden alıp bana huzur veren canım nişanım, sırdaşım, yoldaşım, yol arkadaşım Dr. Yiğit DİLAVER'e teşekkür ederim.

Son olarak yüksek lisans tez sürecim boyunca 2210-A Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Programı Başkanlığı'na (BİDEB) teşekkürlerimi sunarım.

Burcu AKAR

Haziran 2024, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.2. Nanoteknoloji Bazlı İlaç Taşıyıcı Sistemler	6
2.3. Siklodekstrinler.....	8
2.4. Siklodekstrin Bazlı Nanosüngerler	13
2.5. Çapraz Bağlayıcılar: Maleik Anhidrit ve Epiklorohidrin	17
2.6. Halloysit Nanotüp.....	20
2.7. Kanser.....	21
2.8. İlaç Taşıma Sistemlerinin Kanser Tedavisindeki Yeri ve Etki Mekanizması	23
2.8.1. Bir Kanser İlacı: Hidroksiüre.....	26
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	28
3.1. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar	28
3.2. Sentez Yöntemleri	28
3.2.1. Nanosüngerlerin Üretimi.....	28
3.2.1.1. Maleik Anhidrit ile Sentezlenen Betasiklodekstrin Nanosüngerler (β CD-MA-NS).....	29
3.2.1.2. Epiklorohidrin ile Sentezlenen Betasiklodekstrin Bazlı Nanosüngerlerin Sentezi (β CD-EPI-NS).....	30
3.2.1.2. Maleik anhidrit ve Epiklorohidrin ile Sentezlenen Betasiklodekstrin Bazlı Nanosüngerler (β CD-MA-EPI-NS).....	32
3.2.2. Nanosünger-Halloysit Kil Nanokompozitlerinin Hazırlanması.....	33

3.2.2.1. <i>In-situ</i> Yöntemle Nanosünger-Halloysit Kil Nanokompozitlerinin Hazırlanması	34
3.2.2.1.1. Maleik Anhidrit ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile <i>In-situ</i> Yöntemle Sentezi (I- β CD-MA-HNT)	34
3.2.2.1.2. Epiklorohidrin ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile <i>In-situ</i> Yöntemle Sentezi (I- β CD-EPI-HNT)	35
3.2.2.1.3. Maleik Anhidrit-Epiklorohidrin ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile <i>In-situ</i> Yöntemle Sentezi (I- β CD-MA-EPI-HNT).....	35
3.2.2.2. <i>Ex-situ</i> Yöntemle Nanosünger-Halloysit Kil Nanokompozitlerinin Hazırlanması	36
3.2.2.2.1. Maleik Anhidrit ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile <i>Ex-situ</i> Yöntemle Sentezi (E- β CD-MA-HNT).....	37
3.2.2.2.2. Epiklorohidrin ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile <i>Ex-situ</i> Yöntemle Sentezi (E- β CD-EPI-HNT)	37
3.2.2.2.3. Maleik Anhidrit-Epiklorohidrin ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile <i>Ex-situ</i> Yöntemle Sentezi (E- β CD-MA-EPI-HNT).....	37
3.2.3. Nanosüngerlerin ve HNT Katkılı Nanosüngerlerin İlaç Konjugatlarının Hazırlanması.....	38
3.3. Karakterizasyon ve Analiz Yöntemleri.....	41
3.3.1. Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (ATR-FTIR) Ölçümleri	41
3.3.2. Termal Gravimetrik Analiz (TGA)	41
3.3.3. Proton Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) Spektroskopisi.....	41
3.3.4. X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)	42
3.3.5. Dinamik Mekanik Analiz (DMA) Ölçümleri.....	42
3.3.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	42
3.3.7. Sitotoksosite Deneyleri	43
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	44
4.1. β CD-MA Nanosüngerin, HNT Katkılı Nanosüngerin ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapıların Karakterizasyonları	44

4.1.1. β CD-MA Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi	44
4.1.2. β CD-MA Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjugasyonuna Ait Termal Analiz (TGA)	49
4.1.3. β CD-MA Nanosünger Yapıya Ait $^1\text{H-NMR}$ Analizi.....	53
4.1.4. β CD-MA Nanosünger Yapıya Ait Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	55
4.1.5. β CD-MA Nanosünger ve HNT Katkılı Nanosünger Yapılara Ait Dinamik Mekanik Analiz (DMA).....	56
4.1.6. β CD-MA Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait X-Işını Fotoelektron Spektroskopi (XPS) Analizi.....	61
4.1.7. Sitotoksisite Deneyleleri.....	64
4.2. β CD-EPI Nanosüngerin, HNT Katkılı Nanosüngerin ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapıların Karakterizasyonları.....	68
4.2.1. β CD-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi	68
4.2.2. β CD-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Termal Analiz (TGA)	71
4.2.3. β CD-EPI Nanosünger Yapıya Ait $^1\text{H-NMR}$ Analizi	74
4.2.4. β CD-EPI Nanosünger Yapıya Ait Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	75
4.2.5. β CD-EPI Nanosüngerin, β CD-EPI Katkılı Yapıların ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait X-Işını Fotoelektron Spektroskopi (XPS) Analizi.....	75
4.2.6. Sitotoksisite Deneyleleri.....	78
4.3. β CD-MA-EPI Nanosüngerin, HNT Katkılı Nanosüngerin ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapıların Karakterizasyonları.....	82
4.3.1. β CD-MA-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi	82
4.3.2. β CD-MA-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Termal Analiz (TGA).....	86

4.3.3 β CD-MA-EPI Nanosünger Yapıya Ait $^1\text{H-NMR}$ Analizi.....	89
4.3.4. β CD-MA-EPI Nanosünger Yapıya Ait Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	90
4.3.5. β CD-MA-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Dinamik Mekanik Analiz (DMA)	90
4.3.6. β CD-MA-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait X-Işını Fotoelektron Spektroskopi (XPS) Analizi.....	94
4.3.7. Sitotoksosite Deneyleri	97
5. SONUÇLAR	101
6. KAYNAKLAR.....	107
EKLER.....	119
TEZDEN ÜRETİLMİŞ PROJE, YAYIN ve SUNUMLAR.....	125
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU.....	126
ÖZGEÇMİŞ.....	127

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Nanomalzemeye ilaç kapsüllenmesinin şematik bir gösterimi.	4
Şekil 2.2. Potansiyel ilaç transfer sistemi için nano yapılı lipid taşıyıcılar	5
Şekil 2.3. Nanoölçeği gösteren yapılar	6
Şekil 2.4. Çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler	7
Şekil 2.5. Siklodekstrinlerin kimyasal gösterimi ve üç boyutlu yapısı.	9
Şekil 2.6. Siklodekstrin yapıları	10
Şekil 2.7. β -Siklodekstrin yapısındaki oksijen atomlarının türleri	11
Şekil 2.8. Siklodekstrinlerin uygun konuk molekül ile inklüzyon kompleksi oluşturması	12
Şekil 2.9. Siklodekstrinlerin çapraz bağlanarak nanosünger oluşturması	13
Şekil 2.10. Siklodekstrin nanosüngerleri ve farklı çapraz bağlama ajanları.....	14
Şekil 2.11. Epiklorohidrin kimyasal yapısı.	18
Şekil 2.12. Maleik anhidritin kimyasal yapısı.	19
Şekil 2.13. Üç değişik şekilde bulunan Halloysit Killerin TEM görüntüleri	20
Şekil 2.14. a-b) Halloysit'in (10 Å) Kristal Yapısı c-d) Halloysit'in TEM ve AFM Görüntüleri.....	21
Şekil 2.15. Tümör mikroçevresini modellemek için 3 boyutlu hücre kültürleri	22
Şekil 2.16. Sentetik polimerik ilaçlar için Ringsdorf modeli	24
Şekil 2.17. EPR etkisinin mekanizması	24
Şekil 2.18. Nanomalzemelerin pasif ve aktif hedeflenmesinin şematik gösterimi.....	25
Şekil 2.19. Hidroksiürenin kimyasal yapısı.	27
Şekil 2.20. Hidroksiürenin biyolojik sistemdeki etki mekanizması.	27
Şekil 3.1. Nanosünger sentez aşamaları.	29
Şekil 3.2. Betasiklodekstrinin maleik anhidritle esterleşme reaksiyonu.	30
Şekil 3.3. Betasiklodekstrin ile epiklorohidrinin reaksiyonu.	31
Şekil 3.4. Nanosüngerler ile halloysit nanotüp etkileşimi	33
Şekil 3.5. Nanosüngerlere halloysit nanotüpün <i>in-situ</i> yöntemle sentez aşamaları.....	34
Şekil 3.6. Nanosüngerlere halloysit nanotüpün <i>ex-situ</i> yöntemle sentez aşamaları	36
Şekil 3.7. Nanosüngerler ile ilaç konjugatı hazırlanması.	38
Şekil 4.1. β CD ile MA'nın bazik ortamdaki reaksiyonunun gösterimi.	44

Şekil 4.2. β CD, MA ve β CD-MA NS'e ait FTIR spektrumları	46
Şekil 4.3. HNT, I- β CD-MA-HNT ve E- β CD-MA-HNT NS'lere ait FTIR spektrumları...	47
Şekil 4.4. β CD-MA nanosüngerin hidroksiüre ile konjugat oluşumunun reaksiyon gösterimi.....	48
Şekil 4.5. HU, β CD-MA-HU, I- β CD-MA-HNT-HU ve E- β CD-MA-HNT-HU NS'lere ait FTIR spektrumları	49
Şekil 4.6. β CD-MA NS, HNT katkılı NS ve bu nanosüngerlerin-ilaç konjugatlarının termogramları	50
Şekil 4.7. β CD yapısının sandalye konformasyon gösterimi	54
Şekil 4.8. β CD-MA nanosünger yapısının $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.	54
Şekil 4.9. β CD-MA nanosünger yapısının SEM görüntüsü.....	55
Şekil 4.10. β CD-MA nanosünger yapının ve HNT katkılı nanosünger yapıların Depolama Modülü (SM) (GPa)-Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) grafiği.....	57
Şekil 4.11. β CD-MA nanosünger yapının ve HNT katkılı nanosünger yapıların Kayıp Modülü (LM) (GPa)-Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) grafiği	58
Şekil 4.12. β CD-MA nanosünger yapının ve HNT katkılı nanosünger yapıların $\text{Tan}\delta$ -Sıcaklık grafiği	59
Şekil 4.13. β CD-MA nanosünger ve <i>in-situ</i> yöntemle HNT katkılı nanosünger ve nanosünger-ilaç konjugatlarına ait XPS genel taraması.....	61
Şekil 4.14. β CD-MA nanosünger ve <i>in-situ</i> yöntemle HNT katkılı nanosünger ve nanosünger-ilaç konjugatlarına ait 0-400 eV arası XPS taramasının büyütülmüş hali.....	62
Şekil 4.15. β CD-MA NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği	64
Şekil 4.16. β CD-MA-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği	65
Şekil 4.17. I- β CD-MA-HNT NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği	66
Şekil 4.18. I- β CD-MA-HNT-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği	67
Şekil 4.19. β CD ile EPI'nin bazik ortamdaki reaksiyon gösterimi.....	68
Şekil 4.20. β CD ve β CD-EPI NS'e ait FTIR spektrumları	69
Şekil 4.21. HNT, I- β CD-EPI-HNT ve E- β CD-EPI NS'e ait FTIR spektrumları.....	70

Şekil 4.22. HU, β CD-EPI-HU, I- β CD-EPI-HNT-HU ve E- β CD-EPI-HNT-HU NS'e ait FTIR spektrumları.....	71
Şekil 4.23. β CD-EPI nanosüngerin, β CD-EPI-HNT nanosünger yapının ve nanosünger-ilaç konjuge yapıya ait termogramlar	72
Şekil 4.24. β CD-EPI nanosünger yapısı	74
Şekil 4.25. EPI ile sentezlenmiş β CD bazlı nanosüngerlerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.....	74
Şekil 4.26. EPI ile sentezlenen β CD bazlı nanosüngerlerin SEM görüntüleri	75
Şekil 4.27. β CD-EPI nanosünger yapıya ait ve <i>in-situ</i> yöntemle HNT katkılı nanosünger yapıya ait ve katkılı ve katkısız nanosünger yapıların ilaç konjuge durumdaki yapılarına ait XPS genel taraması.	76
Şekil 4.28. β CD-EPI nanosünger ve <i>in-situ</i> yöntemle HNT katkılı nanosünger ve nanosünger-ilaç konjugatlarına ait 0-400 eV arası XPS taramasının büyütülmüş hali	77
Şekil 4.29. β CD-EPI NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği	78
Şekil 4.30. β CD-EPI-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği	79
Şekil 4.31. I- β CD-EPI-HNT NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği.....	80
Şekil 4.32. I- β CD-EPI-HNT-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği.....	81
Şekil 4.33. β CD ile MA ve EPI'nin aynı anda bulunduğu bazik ortamdaki reaksiyon gösterimi.	82
Şekil 4.34. β CD, MA ve β CD-MA-EPI NS'e ait FTIR spektrumları	83
Şekil 4.35. HNT, I- β CD-MA-EPI-HNT ve E- β CD-MA-EPI-HNT NS'e ait FTIR spektrumları	85
Şekil 4.36. HU, β CD-MA-EPI-HU, I- β CD-MA-EPI-HNT-HU, E- β CD-MA-EPI-HNT NS'e ait FTIR spektrumları	86
Şekil 4.37. β CD-MA-EPI nanosüngerlerin, β CD-MA-EPI-HNT nanosünger yapıların ve nanosünger-ilaç konjuge yapıya ait termogramlar.....	87
Şekil 4.38. MA-EPI ile sentezlenen β CD bazlı nanosüngerlerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu...89	
Şekil 4.39. MA-EPI ile sentezlenen β CD bazlı nanosüngerlerin SEM görüntüleri.	90
Şekil 4.40. β CD-MA-EPI nanosünger yapının ve HNT katkılı nanosünger yapıların Depolama Modülü (SM) (GPa)-Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) grafiği.	91

Şekil 4.41. β CD-MA-EPI nanosünger yapının ve HNT katkıli nanosünger yapıların Kayıp Modülü (LM) (GPa)-Sıcaklık ($^{\circ}$ C) grafiği.	92
Şekil 4.42. β CD-MA-EPI nanosünger yapının ve HNT katkıli nanosünger yapıların Tan δ -Sıcaklık grafiği.....	93
Şekil 4.43. β CD-MA-EPI nanosünger ve <i>in-situ</i> yöntemle HNT katkıli nanosünger yapıya ait ve nanosünger- ilaç konjugatlarına ait XPS genel taraması	94
Şekil 4.44. β CD-MA-EPI nanosünger ve <i>in-situ</i> yöntemle HNT katkıli nanosünger ve nanosünger-ilaç konjugatlarına ait 0-400 eV arası XPS taramasının büyütölmüş hali.....	95
Şekil 4.45. β CD-MA-EPI NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği	97
Şekil 4.46. β CD-MA-EPI-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği	98
Şekil 4.47. I- β CD-MA-EPI-HNT NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği	99
Şekil 4.48. I- β CD-MA-EPI-HNT-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Siklodekstrinlere ait bazı özellikler	12
Çizelge 2.2. Epiklorohidrine ait bazı özellikler	18
Çizelge 2.3. Maleik anhidrite ait bazı özellikler	19
Çizelge 3.1. Nanosüngerlerin adlandırma, kısaltma ve içerikleri	39
Çizelge 3.2. HNT katkılı nanosüngerlerin adlandırma, kısaltma ve içerikleri	39
Çizelge 3.3. HU ile konjuge olan nanosüngerlerin adlandırma, kısaltma ve içerikleri	40
Çizelge 4.1. β CD-MA NS, HNT katkılı NS ve bu nanosüngerlerin ilaç konjugatlarının Sıcaklık ($^{\circ}$ C) - % Kütle Kaybı değerleri	53
Çizelge 4.2. β CD-MA, E- β CD-MA-HNT ve I- β CD-MA-HNT yapılarına ait SM, LM ve tan δ eğrilerinde gözlenen sıcaklık geçişleri	60
Çizelge 4.3. β CD-EPI NS, HNT katkılı NS ve bu nanosüngerlerin ilaç konjugatlarının Sıcaklık ($^{\circ}$ C) - % Kütle Kaybı değerleri	73
Çizelge 4.4. β CD-MA-EPI NS, HNT katkılı NS ve bu nanosüngerlerin ilaç konjugatlarının Sıcaklık ($^{\circ}$ C) - % Kütle Kaybı değerleri	88
Çizelge 4.5. β CD-MA-EPI, E- β CD-MA-EPI-HNT ve I- β CD-MA-EPI-HNT yapılarına ait SM, LM ve tan δ eğrilerinde gözlenen sıcaklık geçişleri	93

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
Å	Angström
Da	Dalton
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre

Kısaltmalar

¹ H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
CD	Siklodekstrin
CDNS	Siklodekstrin Nanosünger
DMA	Dinamik Mekanik Analiz
EPI	Epiklorohidrin
EPR	Artmış Geçirgenlik ve Tutunma
E-βCD-EPI-HNT	<i>Ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı epiklorohidrin ile sentezlenen nanosünger
E-βCD-EPI-HNT-HU	<i>Ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı epiklorohidrin ile sentezlenen nanosünger-ilaç konjugatı
E-βCD-MA-EPI-HNT	<i>Ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı maleik anhidrit ve epiklorohidrin ile sentezlenen nanosünger

E- β CD-MA-EPI-HNT-HU	<i>Ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı maleik anhidrit ve epiklorohidrin ile sentezlenen nanosünger-ilaç konjugatı
E- β CD-MA-HNT	<i>Ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı maleik anhidrit ile sentezlenen nanosünger
E- β CD-MA-HNT-HU	<i>Ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı maleik anhidrit ile sentezlenen nanosünger-ilaç konjugatı
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflection-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HNT	Halloysit Nanotüp
HU	Hidroksiüre
I- β CD-EPI-HNT	<i>In-situ</i> yöntemle HNT katkılı epiklorohidrin ile sentezlenen nanosünger
I- β CD-EPI-HNT-HU	<i>In-situ</i> yöntemle HNT katkılı epiklorohidrin ile sentezlenen nanosünger-ilaç konjugatı
I- β CD-MA-EPI-HNT	<i>In-situ</i> yöntemle HNT katkılı maleik anhidrit ve epiklorohidrin ile sentezlenen nanosünger
I- β CD-MA-EPI-HNT-HU	<i>In-situ</i> yöntemle HNT katkılı maleik anhidrit ve epiklorohidrin ile sentezlenen nanosünger-ilaç konjugatı
I- β CD-MA-HNT	<i>In-situ</i> yöntemle HNT katkılı maleik anhidrit ile sentezlenen nanosünger
I- β CD-MA-HNT-HU	<i>In-situ</i> yöntemle HNT katkılı maleik anhidrit ile sentezlenen nanosünger-ilaç konjugatı
MA	Maleik Anhidrit
NaOH	Sodyum Hidroksit
NS	Nanosünger
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu

TEA	Trietilamin
TGA	Termogravimetrik Analiz
XPS	X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi
β CD	Betasiklodekstrin
β CD-EPI	Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodesktrin bazlı nanosünger
β CD-EPI-HU	Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodesktrin bazlı nanosünger-hidroksiüre konjugatı
β CD-MA	Maleik anhidrit ile sentezlenen betasiklodesktrin bazlı nanosünger
β CD-MA-EPI	Maleik anhidrit ve epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodesktrin bazlı nanosünger
β CD-MA-EPI-HU	Maleik anhidrit-epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger-hidroksiüre konjugatı
β CD-MA-HU	Maleik anhidrit ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger-hidroksiüre konjugatı

1. GİRİŞ

Son dönemde kanser terapisinde tercih edilen ilaçların etkinliklerinin sınırlı olması ve biyoyararlanımın düşük olması, araştırmacıları, bu ilaçların terapötik etkisini artıracak yeni çözümler aramaya itmiştir. Bu aşamada, nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, polimer-ilaç bileşenleri, polimerik nanopartiküller ve nanokapsüller gibi çeşitli nano yapıdaki materyallerin araştırılması teşvik edilmiştir [1]. Nanosüngerler, bu nano ölçekte geliştirilen polimerik ilaç taşıyıcı sistemler içinde son derece dikkat çeken bir konu olmuştur. Nanosüngerler, ilaç taşımada önemli bir potansiyel sunan ve kanser gibi hastalıkların iyileştirilmesinde daha etkin ve güvenilir bir şekilde kullanılmasına izin veren biyotıp alanındaki faydalar arasında hedefe yönelik taşınım, artırılmış yüzey alanı, daha fazla dolaşım süresi ve ilaç dayanıklılığını artırma özellikleri gösterilebilir [2].

Nanosüngerlerin çeşitli kaynaklardan elde edilebildiği bilinmektedir. Bu kaynaklar arasında, polimerler, lipitler, metal bileşikleri, karbon yapıları malzemeler ve organik polimerler yer almaktadır. Ancak, doğal kökenli bir polimer olan betasiklodekstrin, çeşitli kimyasal ögeler arasında dikkate değer bir konumdadır [3]. Bu nitelik, suyu seven hidrofilik ve suyu sevmeyen hidrofobik ilaçları nakletme kabiliyeti, ilaçların kararlılığını iyileştirme, biyolojik anlamda uyumlu olması, suda iyi çözünebilmesi ve yapısının kolayca eklemelerle değiştirilebilir olması gibi faydalarla bir araya gelir. Bu sebeple, nanosünger üretiminde öncelikli olarak kullanılan materyallerden biri olmuştur [4].

Bu tez çalışmasında, su içinde çözünebilen ve toksik olmayan biyo-uyumlu betasiklodekstrin bazlı nanosüngerlerin yapıları incelenmektedir. Bu nanosüngerlerin ilaç moleküllerini hapsedebilme yetenekleri ve kanser tedavisinde kullanılan antitümöral ilaçların yan etkileri göz önünde bulundurularak, bu tür anti-kanser ilaçlarının uzun süreli kullanımının potansiyel risklerini azaltma amacı güdülmektedir.

CD temelli nanosüngerler, epiklorohidrin gibi epoksi grubu içeren çapraz bağlayıcılarla oluşturulabilir. Bu tür nanosüngerlerin yüksek kimyasal direnç ve ayarlanabilir şişme kapasitesi gibi özellikleri bulunmaktadır fakat bu özelliklerinin yanı sıra, epiklorohidrinin başlıca dezavantajı toksisitesidir. Bu madde, çevre için tehlikeli ve potansiyel bir kanserojendir, dolayısıyla çevre ve insan sağlığına temas ettiğinde ciddi

endişelere neden olmaktadır [5]. Epiklorohidrinin toksisitesine rağmen, literatürde rapor edilen CD-NS araştırmalarının çoğu, epiklorohidrin ile çapraz bağlanmış olanlara odaklanmaktadır [6]. Benzer bir şekilde, siklik organik anhidritlerden biri olan maleik anhidrit kullanılarak karboksillenmiş nanosüngerler de elde edilebilir [7]. Tez kapsamında, alternatif çapraz bağlayıcı olarak toksik etkisi bulunmayan maleik anhidrit önerilmektedir. Yüksek karboksilik içerikli maleik anhidrit esaslı polimerlerin yüksek biyolojik aktiviteler sergilediği bilinmektedir [8]. Maleik anhidrit, karboksil grubu içerdiğinden birçok ilacın terapötik aktivitesini indükleyebilir, bu nedenle yeni biyolojik olarak aktif anhidrit içeren polimerlerin önemli ölçüde biyolojik aktivite göstermesi beklenmektedir [9-13].

Sentezlenen tüm malzemeler için çapraz bağlayıcılarla birlikte nanosünger yapıdaki farklılıklar karşılaştırılmış olup toksisitesi en aza indirgenmiş nanosünger yapının bulunması amaçlanmıştır. Tez kapsamında maleik anhidrit yapısının toksik etkisinin çok daha az olması sebebiyle toksik epiklorohidrin yapısını içeren nanosüngerler ile karşılaştırılması ve epiklorohidrin içeren yapılardan ayrılması amaçlanmıştır.

Nanosüngerlerin hazırlanmasında, silindir şeklindeki, biyolojik açıdan uyumlu ve zararsız olan “yeşil malzeme” olarak adlandırılan halloysit kil (HNT) kullanılmıştır. Nanosünger-HNT nanokompozit yapılar oluşturularak ilaçla uyum sağlanması ve aynı zamanda yüzey alanının artırılmasıyla ilaç moleküllerinin etkili bir şekilde tutunması amaçlanmıştır.

Tez kapsamında sentezlenen nanosünger yapıların yüzey morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak karakterize edilmiştir. Yine tez kapsamında elde edilen nanosüngerlerin yapıları Proton Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) ile karakterize edilip incelenmiştir.

Nanosünger, nanosünger-HNT katkılı yapı ve bu yapıların kanser ilacı olarak seçilmiş hidroksiüre ile konjugasyonundan elde edilmiş taşıyıcı yapıların; spektroskopik (FTIR, XPS), termal (TGA) ve dinamik mekanik özellikleri (DMA) incelenerek kimyasal yapılar aydınlatılmıştır. Halloysit ile etkileştirilen nanosünger yapıların sentezi *in-situ* ve *ex-situ* olmak üzere iki farklı sentez yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Nanosünger-HNT örneklerinin, yapıları spektroskopik olarak (FTIR, XPS), termal özellikleri (TGA) ve dinamik-mekanik özellikleri (DMA) ile incelenmiştir. Bu karakterizasyon

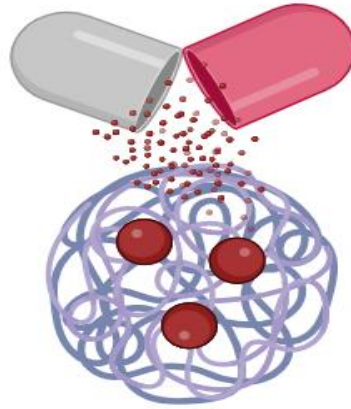
çalışmalarına ek olarak, en iyi sonuçları veren nanosünger yapılar için HEK293 hücreleri ile sitotoksikite deneyleri gerçekleştirilmiştir.

HNT katkısız ve HNT katkılı nanosünger yapılar; antitümör ilaç olarak günümüzde kullanılmakta olan hidroksiüre ilaç yapısı ile polimer-kil-ilaç konjugatları tasarlanmıştır. Aydınlatılan nanosünger ve katkılı nanosünger-HNT yapılarının yapı özellikleri, kanser tedavisinde kullanılan hidroksiüre (HU) ile hazırlanmış ve trietilamin (TEA) katalizörü varlığında çözelti yöntemiyle sentez gerçekleştirilerek kimyasal ilaç konjugasyonu sağlanmıştır. Nanosünger ve HNT katkılı yapılar ile ilaç konjugasyonları gerçekleştirilen bu malzemelerin karakterizasyonları yapılarak ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılması öngörülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

İstenen bölgeye ilaçların taşınmasına yarayan yeni teknoloji ürünü yapılar, ilaç taşıyıcı sistem olarak adlandırılmaktadır. Bu yapıların geliştirilme amacı, ilaç bileşenlerinin dış etkilerden etkilenmeden güvenli bir biçimde muhafaza edilerek nakledilmesi ve istenilen bölgeye taşınmasıdır. Bu teknolojik ürünlerin ilaç kullanım etkinliğini iyi derecede artırdığı, istenmeyen etkilerini azalttığı, su içerisinde çözünürlüğü az olan bileşenlerin çözünürlüğünü artırdığı ve tedavinin olumlu sonuçlarını artırırken olumsuz sonuçlarını azalttığı tespit edilmiştir [14].

Nano taşıyıcıların etkin bir şekilde üretilebilmesi için ölçüsü, geometrisi, yüzey özellikleri, tedavi edilecek bireye has bilgiler ve diğer unsurların birlikte göz önünde bulundurulması gerekmektedir [15]. Mükemmel bir taşıyıcının güvenli, etkili ve en üst düzeyde biyolojik fayda sağlaması önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra, iyi bir kararlılık, mutasyon yaratmayan ve zararsız özellikler taşıması ve özel bir bölgeye doğru taşınma kabiliyeti göstermesi beklenir. Bu hedefle, nanomalzeme sistemleri olan nanosüngerler, lipozomlar, dendrimerler, polimerik yapılar, nanotüpler, hidrojeller gibi farklı tipler geliştirilmiş, dizayn edilmiş ve üretilmiştir [16].

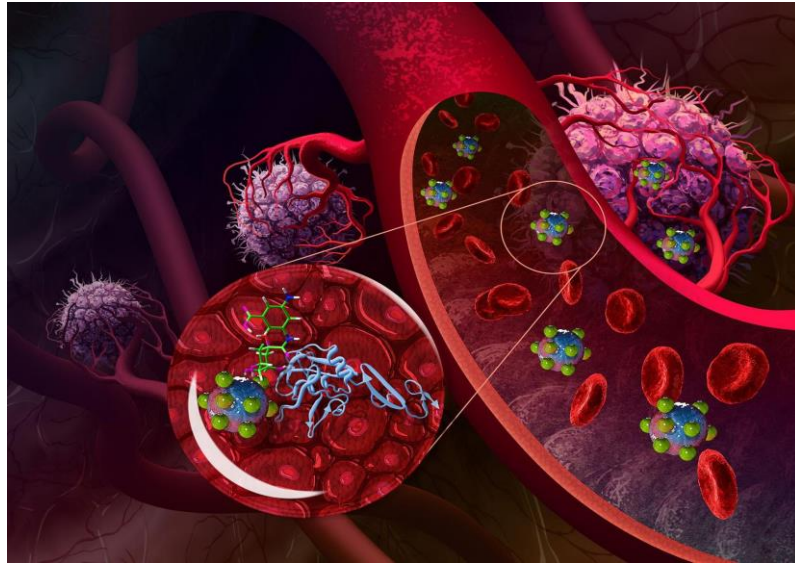


Şekil 2.1. Nanomalzemeye ilaç kapsüllenmesinin şematik bir gösterimi.

Nanotaşıyıcıların dezavantajları nedeniyle, optimum bir ilaç transfer sistemi oluşturulmaya çalışıldığında arzu edilen yöntemin sağlanması daha zor olur. Örnek olarak, lipozomların sınırlı ilaç taşıma yeteneği, ekonomik olarak fiyatlarının yüksek

olmaları ve düşük kararlılığa sahip olması gibi olumsuz özelliklere sahip oldukları belirtilebilir [17].

Farklı bir ifadeyle, diğer nanomalzemelerin ilaç taşıma sistemlerinde uygulanmasını engelleyen toksik etkileri ve biyolojik olarak parçalanmama gibi istenmeyen nitelikleri bulunmaktadır. Bu yüzden, ilaç taşıma sistemleri için kullanılacak materyalin niteliklerini iyi anlamak ve negatif etkilere yol açmayacak taşıyıcı sistemin tercih edilmesi önemlidir [18].



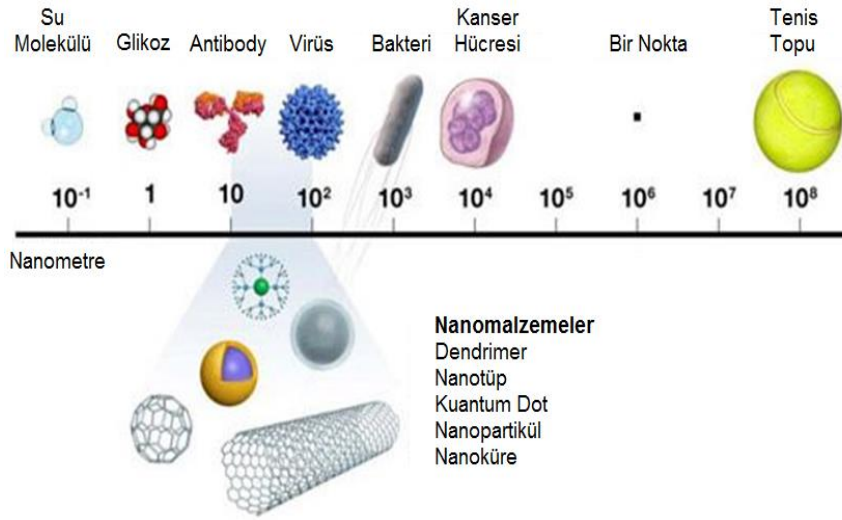
Şekil 2.2. Potansiyel ilaç transfer sistemi için nano yapılı lipid taşıyıcılar [19].

Yakın dönemlerde, ilaç taşıma sistemleriyle ilgili gerçekleştirilen araştırmalar, suda çözünürlüğü düşük olan ilaçların su içindeki çözünürlüğünün artırılması önemli bir odak noktası olmuştur. Zira ilaçların çözünürlük özellikleri, vücuttaki taşınım ve yayılımı açısından son derece önem arz eder. İlaç dozajının artırılmasıyla birlikte, ilaçların çözünürlüğünü artırmak, mevcut yan etkilerin yani toksik etkilerin artmasına ve ilacın vücuttaki etkinliğinden daha fazla toksik etkilerin öne çıkmasına yol açabilir [20].

Günümüzdeki teknoloji sayesinde, değişik metotlarla meydana getirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin nano boyutta yapılarıyla birlikte, ilaçlar ve taşıyıcılar için anlatılan negatif faktörlerin giderilmesi sağlanmaktadır. Bu araştırmalar, ilaç taşıma sistemleri sahasında yeni bir bakış açısı sağlamış ve bu materyallerin etkileri üzerinde yapılan incelemelerle ilaç taşıma sistemlerinde ileriye doğru önemli gelişmeler kaydetmiştir [21].

2.2. Nanoteknoloji Bazlı İlaç Taşıyıcı Sistemler

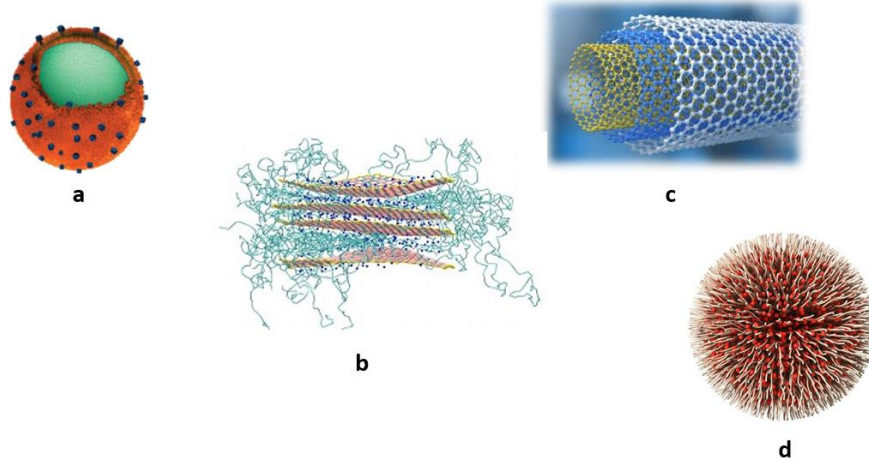
Nanometre, bir metrenin bir milyarda biri boyutundaki birimdir ve 1 ila 100 nanometre arasındaki malzemelere nanomalzeme adı verilir [22]. Nanoteknoloji, sağlık alanında gelişmiş nitelikler gösteren bir yaklaşım oluşturmak için nano boyutta materyallerin düzenlenmesiyle farmasötik keşif, hastalık tanısı ve terapötik uygulamalarda özgün çözümler sunar [23, 24].



Şekil 2.3. Nanoölçeği gösteren yapılar [25].

Nanopartiküller, aktif bileşenin düzenlenmiş, hapsedilmiş veya adsorbe edilmiş olduğu, katı kolloidal polimerik partikül sistemleridir ve bu partiküller genellikle 10 ile 1000 nm arasında farklılık gösteren boyutlara sahiptir ve çeşitli endüstriyel, tıbbi ve bilimsel uygulamalarda kullanılırlar [26].

Polimerik partikül tabanlı yapılar, etkili bileşenin bozunmadan güvenli bir şekilde korunmasına destek olurken, istenen dokusal hedefe erişim ihtimalini yükseltebilirler [27]. Bundan dolayı, polimerik yapıların yerine getirdiği işlev, aktif maddeleri saklayarak ve emniyette tutarak onları istenen doku iletir. Aynı zamanda, aktif bileşenin istenen bölgeye transferini, bu maddenin istenen bölgedeki yayılımının denetimini ve devam ettirilmesini sağlayan nanopartiküllerin polimerik düzenidir. Kullanıldıktan sonra uzun bir süre boyunca aktif bileşenin yayılımını sağlar, hatta bu haftalarca devam edebilir [28].



Şekil 2.4. Çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler: a) nanosünger, b) kil nanokompozit, c) karbon nanotüp, d) nanopartikül.

Polimerik nanoölçekli parçacıklar, alternatif koloidal dağıtım tipleriyle değerlendirildiğinde vücut sıvılarında daha büyük dayanıklılık özelliğine sahiptirler. Küçük boyutları dolayısıyla, kanser hücrelerine kolayca giriş yapmayı ve hücreler vasıtasıyla yakalanmayı gerçekleştirir. Bununla birlikte, biyolojik yapıda tesir etmesi hedeflenen alanda arzulanan aktif bileşenin transferini gerçekleştirir. Nanopartiküller, taşınımını sağladıkları aktif bileşenin istenen alana transferini yönlendirerek bu bileşenin biyolojik yapıda yayılmasını düzenler ve organizma genelindeki toksik etkisini düşürür ve terapötik etkiyi dengeler.

Bu şekilde, nanopartiküllerin uygulanmasıyla, etkin maddelerin tedavi edici etkileri maksimize edilirken yan etkilerin minimize edilmesi hedeflenir [29].

Nanotaşıyıcı sistemlerin çalışmalarda kullanımları artmaktadır. Bu sistemler, farklı yapısal organizasyonlara sahip olan polimerik nanopartiküller, katı-fosfolipid nano parçacıkları, nanoemülsiyonlar, karbon nanotüpleri ve nanosüngerler gibi materyalleri içermektedir. Bu sistemler, farklı özelliklere sahip malzemelerin taşınmasına olanak sağlamaktadır. Dolayısıyla, nanotaşıyıcı sistemler, araştırmacıların ilaç taşıyıcı ve teslimat sistemleri olarak kullanımını çok yönlü ve etkili bir araç olarak öne çıkarmaktadır [30]. Nanoteknolojik taşıyıcıların verimliliğini artırmak için, hedeflemeye dayalı yöntemlerin hem pasif hem de aktif varyasyonları üzerinde yoğun araştırmalar sürdürülmektedir [31].

İlerleyen zamanlarda, nanoteknoloji tabanlı taşıyıcı sistemlerin daha fazla iyileştirilmesi ve ilerleme kaydetmesi umut edilmektedir [32]. Bu yöntemler, ilaç araştırma ve geliştirme, tıbbi tanı ve iyileştirme benzeri çeşitli sahalarda özgün yanıtlar verebilir. Pasif ve aktif hedefleme yöntemlerinin yanında, nanotaşıyıcı sistemlerin etkinliğini iyileştirmek adına gerçekleştirilen araştırmalarla birlikte, nanoteknoloji sahasında gelişmelerin hız kazanması, yeni malzemelerin ve metotların buluşuyla da umulmaktadır. Nanoteknolojinin ileriye dönük imkânlarını kapsamlı bir şekilde anlayabilmek adına daha çok inceleme ve ilerleme kaydedilmesi gereklidir [33].

2.3. Siklodekstrinler

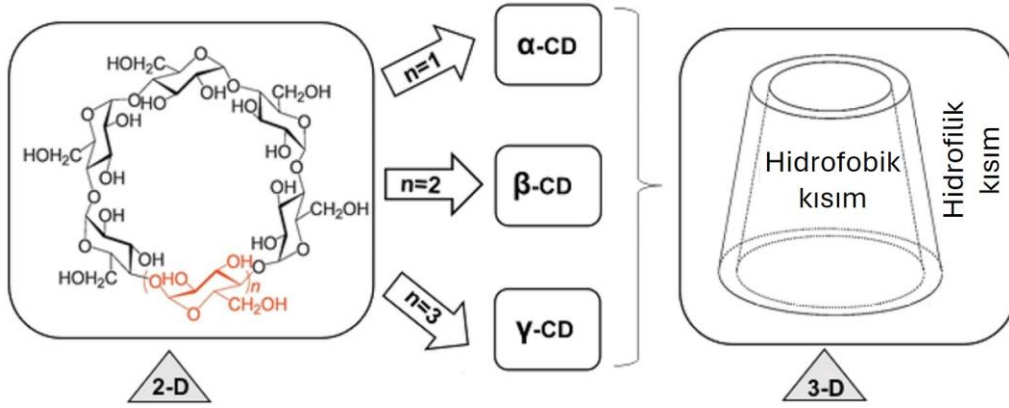
Çeşitli siklik oligosakkaritler, glikoz moleküllerinin kendiliğinden halka oluşturması ve nişastanın yıkımı ile açığa çıkar. Glikozun ardışık glikoz molekülünün anomerik karbon atomuna bağlanması sonucu meydana gelen bu düzen, çoğunlukla altı glikoz bileşiminden oluşan bir halka yapısını meydana getirir ve siklodekstrinin yapısını inşa eder. Altı glikozun nasıl bir araya geldiği, siklodekstrin moleküler düzenini şekillendirir.

Siklodekstrinlerin ortaya çıkışı ve ilerleyişi dikkat çekici bir tarihe sahiptir; Alman kimyager Andreas Marggraf, 1903 senesinde nişasta yıkımı esnasında bazı enzimlerin etkisiyle oluşan şekerler arasında bir bileşimi fark etmiştir: Siklodekstrin bileşimi [34].

Bakteriyel enzimlerin, nişasta yıkımının bir parçası olarak siklodekstrinler ürettiğini bulan İsveçli bilim insanı Cornelius Van Niel, 1947 yılında yaptığı bir araştırmada bu rolü inceledi. Bu araştırma, siklodekstrinlerin nişasta metabolizmasında kritik bir rol oynadığını ve bunların biyolojik kökenli olduğunu belirtmiştir [35].

Siklodekstrinlerin ticari kullanımları ve pratik uygulamaları ilerleyen zamanlarda artmıştır. Siklodekstrinlerin kimyasal açıdan ve ayrıca da fiziksel nitelikleri, 1960'ların ve 1970'lerin ortalarında detaylı bir şekilde çalışılmış ve farklı pratik kullanım sektörlerinde uygulanabileceği tespit edilmiştir. Bugün, siklodekstrin bileşiklerinin kullanım alanları oldukça çeşitlenmiş durumdadır. İlaç endüstrisindeki önemli rollerinin yanı sıra, gıda ve kozmetik sektörlerinde de yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu, onların çeşitli endüstrilerdeki çok yönlü uygulamalarının bir göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir [36, 37].

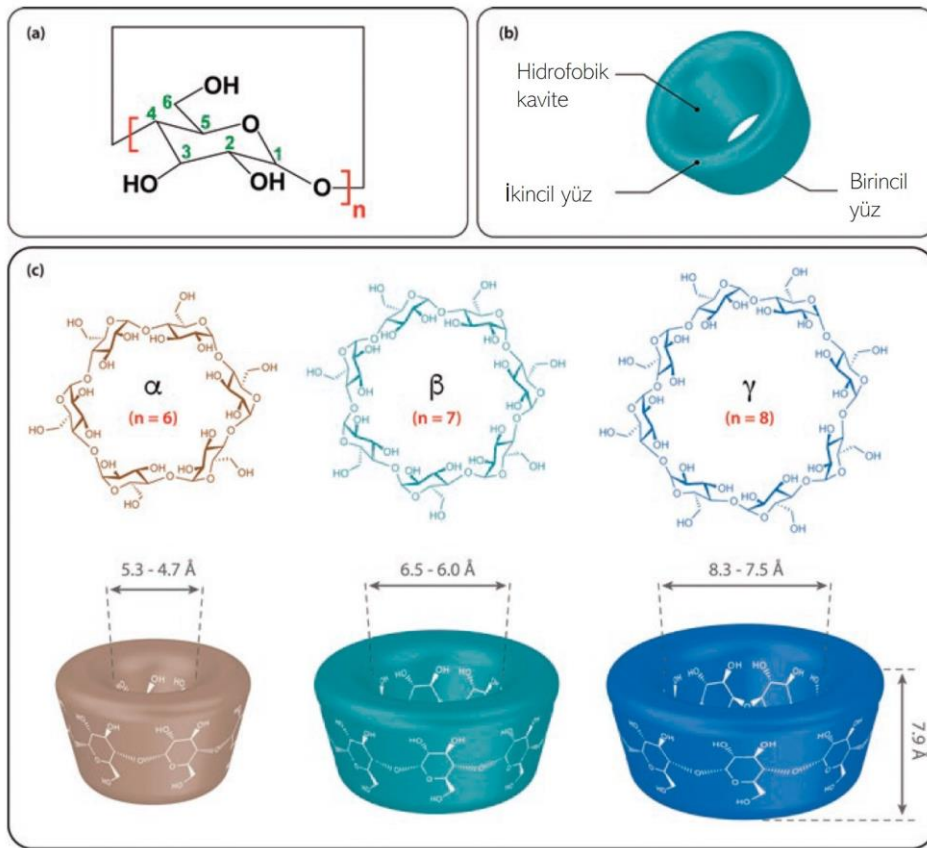
Başlangıç olarak, siklodekstrin oluşturulma kademesinde tercih edilen bir nişasta kaynağı belirlenir. Belirlenen nişastanın parçalanması ardından, nişasta molekülünün parçalanma sürecinde, enzimatik veya asidik ortamlara maruz kalan glikoz monomerleri açığa çıkar. Bu aşamada, nişasta molekülleri glikoz, maltoz ve küçük karbonhidratlara bölünür. Glikoz monomerleri, özel bir düzenleme sürecini takiben bir araya gelir ve siklodekstrin döngülerini meydana getirir. Siklodekstrinler, alfa (α), beta (β) ve gama (γ) yapılarında olabilir, bu yapılar glikoz monomerlerinin birleşme biçimine göre farklılık gösterir [38]. Belirli bir düzenin sürdürüldüğü bu süreç, farklı yapıların birçok uygulamada kullanılabilir olduğunu ortaya koyar. Betasiklodekstrinlerde, glikoz molekülleri 1-6 glikozidik bağlarla bir araya gelirken, alfa siklodekstrinlerde ise bu bağlar 1-4 glikozidik bağlarla meydana gelir. Bu, siklodekstrinlerin farklı yapılarının, kimyasal bağlanma özelliklerine bağlı olarak değiştiğini gösterir [39].



Şekil 2.5. Siklodekstrinlerin kimyasal gösterimi ve üç boyutlu yapısı [40].

Glikozun birbirleriyle bağ kurması sonucunda oluşan siklodekstrin halkaları, bir kimyasal sentez yöntemi olarak tanımlanır. Bu durumda, belirli bir kimyasal tepkime sürecinde, glikozun hidroksil fonksiyonel grupları etkileşerek siklodekstrin konfigürasyonundaki halka yapısını meydana getirir. Bu tepkimeler tipik olarak belirli bir katalizör mevcutken ortaya çıkar ve belirli şartlar altında düzenlenir. Belirli bir sıralamayla döngü oluşturarak tanımlanan siklodekstrinlerin yapısı, çok sayıda glikoz monomerinden meydana gelir. Bu halkalar sıklıkla dışarıdan bir su molekülünü kapsayabilir, bu durum siklodekstrinlerin suyu seven hidrofilik özellikler sergilemesine yol açar. Bu özellik, siklodekstrinlerin farklı akademik ve ticari alanlarda değerlendirilmesine olanak tanır [41].

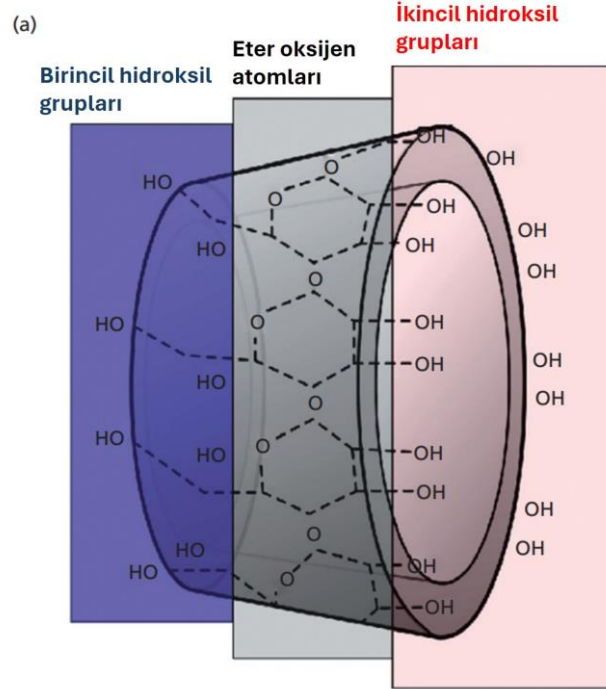
Siklodekstrin yapısı, iç bölgesinde kavite şeklinde bir boşluk bulundurur ki, bu boşluk siklodekstrinin suya karşı ilgi çekme özelliğini artırır ve suya karşı ilgisiz olan yani, hidrofobik bileşikler yapısındaki bu kavitede tutabilir. Kesik bir koni şeklini anımsatan ve yağda çözünebilen lipofilik bir boşluk yaratan siklodekstrinler, spesifik dairesel bir döngü halinde düzenlenmiş halka yapısını oluştururlar. α -(1-4) glikoz bağlarıyla birleşmesiyle meydana gelen α -D-glikopiranoz parçaları siklodekstrin (CD) moleküllerini meydana getirir. Bu yapılar, benzersiz bir karaktere sahiptir; iç bölgede bir yağ seven (lipofilik) merkezi bir oyuğu bulunurken, dış yüzey su seven (hidrofilik) özellik gösterir [42].



Şekil 2.6. Siklodekstrin (CD) yapıları: a) Monomer birimleri, b) Genel şekilleri c) α -, β - ve γ -CD yapıları [43].

Siklodekstrinlerin konik şekillerinin büyüyen genişleyen bölgesinde C-2 ve C-3 hidroksil fonksiyonel gruplar (-OH) oluştururken, konik şeklin küçülen darlaşan bölgesinde C-6 hidroksil fonksiyonel (-OH) grupları yer alır. Siklodekstrinlerin bahsedilen bu bileşimindeki -OH fonksiyonel grupların nanosüngerlerin yapısal özelliklerini meydana getirmesinde oldukça önem arz eder. Bu durumda, siklodekstrinin

bu -OH grupları, baz bulunan bir ortamda diğer -OH grupları ile etkileşir ve hidrojen iyonunu ortamdaki uzaklaştırarak serbest oksijen grupları ile çapraz bağlanmalar meydana getirir [44].



Şekil 2.7. β -Siklodekstrin yapısındaki oksijen atomlarının türleri [45].

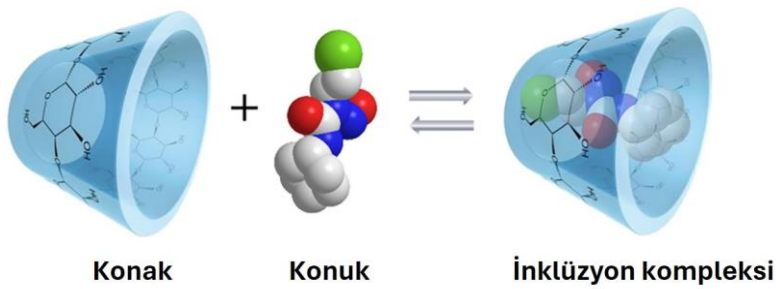
Şekil 2.7'deki gözlemlere göre konik yapının dar bölgesinde birincil hidroksil (C-6) grupları bulunurken, genişleyen bölgesinde ise ikincil hidroksil (C-2 ve C-3) grupları yer almaktadır. Bu konumlandırma, siklodekstrinlerin suda çözünürlüğünü etkilemiştir. β CD'lerdeki yapısal özellikler tanımlanmak istenirse bu konik yapının geniş bölgesinde 14 sekonder hidroksil grubu mevcuttur ve merkezindeki kavite boşluğunun iç kısmındaki C-3 ve C-5 hidrojen atomlarının meydana getirdiği köprü gibi görev sağlayan yapı sayesinde bu boşluk hidrofobik olmuştur. Kavitesindeki bu boşlukta şeker kalıntılarında oluşan karbon ve eterik oksijen birleşerek şekillenir. Bahsedilen özellikler sayesinde konik yapının iç yüzeye hidrofobik veya lipofilik özellikler sağlarken, dış yüzeye polar hidrofilik özellikler gösterir [46].

Çizelge 2.1. Siklodekstrinlere ait bazı özellikler [47].

Özellik	α -CD	β -CD	γ -CD
Glikoz birimi sayısı	6	7	8
Molekül Ağırlığı (g/mol)	972	1135	1297
25 °C'de Sudaki Çözünürlüğü (%w/v)	14.5	1.85	23.2
Dış Çevresinin Çap Boyutu(Å)	14.6	15.4	17.5
İç Kavitesinin Çap Boyutu(Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Yapının Yüksekliği(Å)	7.9	7.9	7.9
İç Kavitenin Hacmi (Å ³)	174	262	427

Siklodekstrinler için sıcaklık arttıkça çözünürlük değişmektedir ve çözünürlük birçok çalışma gibi siklodekstrinlerle çalışırken de önemli bir işlev üstlenir. Saf siklodekstrinler için durum sıcaklığın artışı ile birlikte çözünürlüğün de artması beklenir ama metil grubu eklenen siklodekstrinlere bakılırsa sıcaklık artışı çözünürlüğü azaltır. Tablo 2.1.'de α , β ve γ -CD'ler için verilen 25 °C sıcaklıktaki çözünürlük değerleri oldukça farklılık göstermektedir [47].

Boşluk bölgesi, CD molekülü başka bir maddeyi içine alarak bir inklüzyon kompleksi oluşturduğunda, artan boşluk boyutuyla birlikte apolar bölgelerde konuk edilebilecek su miktarı da artar. Bu kompleksin meydana gelmesiyle, siklodekstrin kavitesinden çözelti ortamına su molekülleri hareket eder [48].

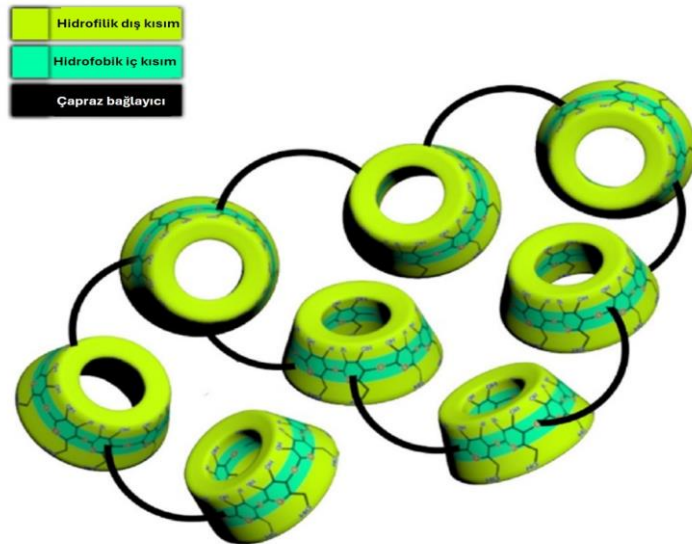


Şekil 2.8. Siklodekstrinlerin uygun konuk molekül ile inklüzyon kompleksi oluşturması.

Bu inklüzyon kompleksinin oluşabilmesi için, CD'lerin konuk edeceği molekülün, siklodekstrinin konik yapısındaki kavitesine uygun boyutta olması gerekir. Siklodekstrin yapısının konuk molekül ile arasında oluşturduğu inklüzyon kompleksini etkileyen güçler; konuk molekülün suyu sevmeyen bölgesi ile CD'nin konik şeklindeki iç kısmının boşluğundaki van der Waals etkileşimleri ve ayrıca konuk molekülün polar grupları ile CD molekülünde daha önce de bahsi geçen hidroksil (-OH) fonksiyonel grupları arasındaki oluşan hidrojen bağlarıdır. Kompleksin kararlılığını sağlayan ve konuk molekülün CD kavitesi içinde tutulmasını mümkün kılan bu etkileşimlerdir [49].

2.4. Siklodekstrin Bazlı Nanosüngerler

Uzun süredir araştırmacılar için bir sorun haline gelen ilaçların taşınması, vücutta hedeflenen yerlere ulaştırılmasını nasıl gerçekleştirecekleri konusu bir problem olmuştur. Gelişmiş moleküllerin geliştirilmesi, bu problemlerin üstesinden gelebilecek niteliklere sahip nanosüngerlerin keşfine yol açmıştır. Nanosüngerler, ilaç taşıma sürecinde yönlendirilmiş bir rol üstlenen yenilikçi bir nanomateryal sınıfını temsil eder. Mikroskobik taneciklerden meydana gelen ve içerisinde farklı maddelerin hapsedilebileceği bir dizi nanometre boyutundaki boşluklara sahip olan yeni bir materyal türü olan nanosüngerler, son derece ilginç bir keşif olmuştur [50].



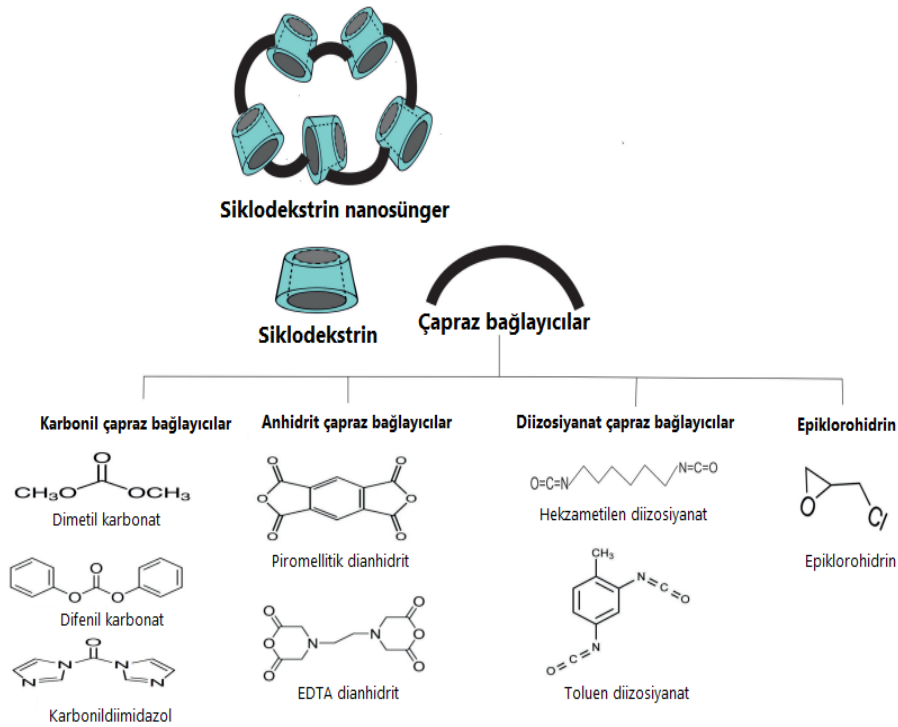
Şekil 2.9. Siklodekstrinlerin çapraz bağlanarak nanosünger oluşturması [3].

Farklı ilaçların CDNS'lerle kompleks oluşturması ve istenen bölgeye yönelik ilaç taşınımının gerçekleştirilmesi amacıyla kullanılması mümkündür. Bu tanecikler, hem

yağda çözünen hem de suda çözünen maddeleri içerisinde hapsederek taşıyabilme yeteneğine sahiptir ve suda çözünürlüğü düşük olan yapıların çözünürlüğünü artırarak ilaç taşımada bir öncü haline gelmiştir [51].

Küresel, biyolojik olarak uyumlu yapıya sahip olan nanosüngerler, doğal olarak hidrolize poliester iskeletine ve virüs büyüklüğünde olan küçük bir üç boyutlu iskelet ağ yapısına sahiptir ve bu yapı, ilaç moleküllerinin hapsolabileceği çeşitli kavitelere olanak sağlar [52].

Çeşitli çapraz bağlayıcılarla birlikte çözelti ortamında karıştırılan siklodekstrinler, piromellitik dianhidrit (PMDA), N,N'-karbonil diimidazol (CDI), dimetil dikarbonat (DMDC), epiklorohidrin (EPI), maleik anhidrit (MA) gibi çapraz bağlayıcı ajanlarla polimerize edilerek, üç boyutlu çapraz bağ yapısına sahip siklodekstrin bazlı nanosünger yapılar elde edilebilir. Bu süreçte, farklı çapraz bağlayıcılar ve reaktifler, siklodekstrin bazlı nanosüngerin yapısal özelliklerini ve kullanım alanlarını belirleyen önemli bileşenlerdir [53].



Şekil 2.10. Siklodekstrin nanosüngerleri ve farklı çapraz bağlama ajanları [54].

Kullanılan polimer türü, nanosüngerin yapılanması ve etkinliği üzerinde kritik bir rol oynar, bu nedenle nanosünger kompozisyonu üzerine tesir eden faktörler bulunmaktadır. Belirli hacimdeki ilaç moleküllerini kabul edebilecek nanosüngerlerin

kavitesindeki boşluk büyüklüğü, hapsedilecek molekülle etkileşme durumunda önem arz eder. Başka bir husus ilacın özellikleridir; nanosünger ile birleşecek ilaç molekülünün belli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özellikler arasında, ilaç molekülünün 100-400 Da aralığını kapsayan bir mol kütlesine sahip olması gereklidir. Ayrıca, ilaç molekülü halka yapısı içeriyorsa, en fazla 5 sıkışık halka içermelidir. Su içinde çözünürlüğü 10 mg/mL'den az olmalı ve erime noktası 250 °C'den düşük olmalıdır [55].

Başka bir etken ise sıcaklıktır. Sıcaklığın artışıyla birlikte, nanosünger-ilaç konjugasyonunun kararlılığı düşebilir ve bu durum, nanosünger-ilaç etkileşiminin azalmasına yol açabilir. Nanosüngerlerle etkileşim yöntemi, ilaç-nanosünger konjugasyonunu da etkileyebilir. Nanosüngerlerin etkileşim kabiliyeti, temel moleküldeki çeşitli yan zincirlerin türü, sayısı ve yerleşimi gibi faktörlerden güçlü bir şekilde etkilenir. Bu faktörler, ilaç-nanosünger etkileşimlerinin karmaşıklığını ve sonuç olarak kompleks oluşumunu belirler [56].

Nanosünger partikülleri suya karışabilir, ancak kimyasal yapıları bozulmaz. Bu durum, nanosüngerlerin taşıma sıvısı olarak kullanılabilmesini sağlar. Çapraz bağlama ajanları nanosüngerleri istenen hedeflenmiş bölgeye doğru yönlendirebilir ve farklı yollar izleyerek hareket etmelerine olanak sağlarken biyolojik anlamda bozunabilen maddeleri içindeki kavitede hapseder ve onları güvenle koruyarak hedef bölgeye taşırlar [57].

CDNS'lerin ilaç taşıyıcı olarak işlev görmesindeki önemli faydalar aşağıda sıralanmıştır:

CDNS'ler ilaçların dayanıklılığını artırır ve çeşitli formüllerle uyum sağlar. Bu nedenle, ilaçlar bozunmaya karşı korunur ve CDNS gibi nanoteknolojik materyaller, mutasyona neden olabilecek, fiziksel zarar verebilecek veya zehirli etkileri bulunan yapılar değildir.

Yağda çözünen ilaçların hidrofobik yapısını dikkate alarak, onların çözünürlüğünü hidrofilik anlamda geliştirirken, etken maddelerin yakalanmasını kolaylaştırır ve olası yan etkileri minimize eder.

- İlaç tahrişini azaltarak, ilacın etkinliğini korur.
- CDNS'ler, hasta-ilaç uyumunu geliştirerek, ilaç dozlarının daha uzun aralıklarla alınmasını sağlarlar.

- Biyolojik olarak parçalanabilir, biyoyumludur ve hedeflenen yere ilaç taşınımını sağlar.
- Suda veya birçok organik çözücüde çözünürlükleri vardır.
- Yapılarındaki gözeneklere istenilen molekülleri alırlar ve bu molekülleri gözenekleri sayesinde istenen bölgeye taşıyabilirler.
- 300 °C'ye kadar yapısını koruyabilir ve 1-11 pH aralığı ile 130 °C sıcaklığa kadar bozunmazlar.
- Steril, dezenfekte malzemelerdir.
- Ticari üretim için kolayca ölçeklendirilebilirler [57-59].

NS'lerin 4 farklı üretim yöntemi aşağıda sıralanmıştır:

Çözücü yöntemi

Polimer, uygun çözücüsü olan polar aprotik çözücüde karıştırılır ve karışım, fazla miktarda çapraz bağlayıcı, tercihen polimer oranının 1:4 olduğu çapraz bağlayıcı polimer molar oranına eklenir. Bu işlem, çözücünün reflüks sıcaklığına kadar değişen sıcaklıklarda ve 1 ila 48 saat arasında değişen sürelerde gerçekleştirilir. Ardından reaksiyon tamamlandıktan sonra, çözelti oda sıcaklığında soğutulur ve ürün büyük miktarda damıtılmış su ile yıkanır. Ürünün geri kazanımı vakum altında filtrasyon ile gerçekleştirilir.

Nanosüngerlerin hiper çapraz bağlı β -siklodekstrinlerden oluşturulması yöntemi

Siklodekstrinlerin çapraz bağlayıcılarla reaksiyona girmesiyle elde edilir ve bu yöntemde çapraz bağlayıcı oranı istenen oranda kullanılarak nanosüngerin ilaç taşıma kapasitesi artırılabilir. Örneğin, toz β CD, uygun çözücü ile karıştırılır ve karışıma çapraz bağlayıcı olarak seçilen malzeme eklenir ve daha sonrasında reaksiyona katılmayan maddeleri ortamdan uzaklaştırmak adına etanol ile yıkanarak ekstraksiyon gerçekleştirildikten sonra madde kurumaya bırakılır. Kuruyan katı madde ile nanosüngerler elde edilir.

Emülsiyon çözücü difüzyonu yöntemi

Organik disperse fazdaki, çözücü içerisindeki ilaç ve polimer, emülsifiye edici madde içeren dış fazın içine eklenir. Karışım oda sıcaklığında 3 saat boyunca 1000-2000 rpm hızda karıştırılır. Oluşan nanosüngerler filtrelenir, yıkanır ve oda sıcaklığında kurutulur.

Ultrasound yardımcı sentez

Bu metot, çapraz bağlayıcılarla polimerin çözücüsüz ve ultrasonik durum altında tepkimeye girmesiyle nanosünger sentezini kapsar. Sonuç olarak elde edilen nanosüngerler, homojen ve küresel yapıda olur. Polimer ve çapraz bağlayıcı, belirli bir mol oranında bir balonda karıştırılır ve bu karışım, su ile doldurulmuş bir ultrasonik banyoda 90 °C sıcaklıkta reaksiyona sokulur. Karışım, 5 saat boyunca ultrasonik ses dalgalarına maruz bırakılır. Ardından, karışım soğumaya bırakılır ve katı ürün kırılarak ayrılır. Reaksiyona girmemiş maddeleri uzaklaştırmak için materyal, saf su ile yıkanır ve daha sonra etanol ile uzun süreli Soxhlet ekstraksiyonuna tabi tutulabilir. Elde edilen ürün, vakum altında kurutulur.

2.5. Çapraz Bağlayıcılar: Maleik Anhidrit ve Epiklorohidrin

Moleküler boşlukları nano ölçekte değiştirerek, çapraz bağlayıcılar üç boyutlu ağ yapısına sahip nano gözenekli polimer yapılarına dönüşürler. Polimerlerin içinde bulunan bu yapı, yağda çözünebilir özellik sağlayarak küçük organik molekülleri içerisine alırken, hidrojen bağı kurma isteğinde olan su hidrofilik bölgeye doğru çekilir ve bu özelliğiyle organik moleküller için elverişli bir alan sağlar.

Polimerik malzemenin nitelikleri çapraz bağlanma dolayısıyla etkilenebilir. Çapraz bağlanma, polimer molekülleri arasında kimyasal bağların oluşması anlamına geldiğinden bu polimerik moleküler yapı değişir ve bu durumda da polimerlerin kristal yapısında meydana gelen değişikliklerle, polimerin genel özelliklerinde belirgin değişiklikler meydana getirir. Nanosüngerler, içlerinde küçük molekülleri hapsedebilen polimerik yapılar olduğundan, polimerin çapraz bağlanma derecesi arttıkça, bu polimerin içindeki boşluklar azalabilir ve dolayısıyla nanopartikülleri hapsedebilme yeteneği de azalabilir. Bu durum, nanosüngerlerin uygulama alanlarını ve performansını

etkileyebilir; çünkü daha az inklüzyon kompleksi yapabilen nanosüngerler, istenen maddeleri tutma veya taşıma kapasitelerini azaltabilir [60].

CDNS elde etmek için çok çeşitli çapraz bağlayıcılar kullanılabilir. EPI ve MA ise nanosünger eldesinde kullanılan çapraz bağlayıcılardan sadece ikisidir. EPI, sıvı ve renksiz iken; MA, katı, renksiz ve kristal formdadır.



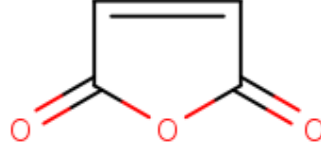
Şekil 2.11. Epiklorohidrin kimyasal yapısı.

Epiklorohidrin (EPI), C_3H_5ClO kimyasal formülü ile gösterilir ve yaygın olarak kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır. Genellikle epoksi reçine hazırlamada kullanılır ve epiklorohidrininden hazırlanan epoksi reçineler oldukça yüksek yapışma, iyi kimyasal kararlılık, yüksek darbe dayanımı gibi özellikler gösterir. Bunun dışında, kauçuk, plastikleştirici, ilaç, yüzey aktif madde gibi alanlarda da kullanılmaktadır. Çizelge 2.2.'de EPI için fiziksel ve kimyasal özelliklerin bazıları verilmiştir [61].

Çizelge 2.2. Epiklorohidrine ait bazı özellikler

Molekül ağırlığı	92.52 g/mol
Yoğunluk (25 °C)	1.183 g/mL
Kaynama Noktası	115-117 °C
Erime Noktası	-57 °C
Saklama Sıcaklığı	30 °C'nin altında
Fiziksel Durum	Sıvı form
Renk	Şeffaf
Koku	Keskin, kloroform gibi
Buhar Basıncı (21.1 °C)	13.8 mmHg
Sudaki çözünürlüğü (10 °C)	6 g/100 mL

Maleik anhidrit (MA), ise $C_4H_2O_3$ kimyasal formülüne sahip maleik asidin siklik anhidrit hali olan, siklik bir dikarboksilik asittir ve organik bir kimyasaldır. Birçok endüstriyel kimya alanında kullanılan reaktif bir kimyasaldır.



Şekil 2.12. Maleik anhidritin kimyasal yapısı.

Tekstilde, yüzey aktif maddelerde, reçine üretiminde, farmasötikte, plastik katkısı olarak, çapraz bağlayıcı olarak maleik anhidritin kullanıldığı birçok alan vardır. Çizelge 2.3'te MA için fiziksel ve kimyasal özelliklerin bazıları verilmiştir [62].

Çizelge 2.3. Maleik anhidrite ait bazı özellikler

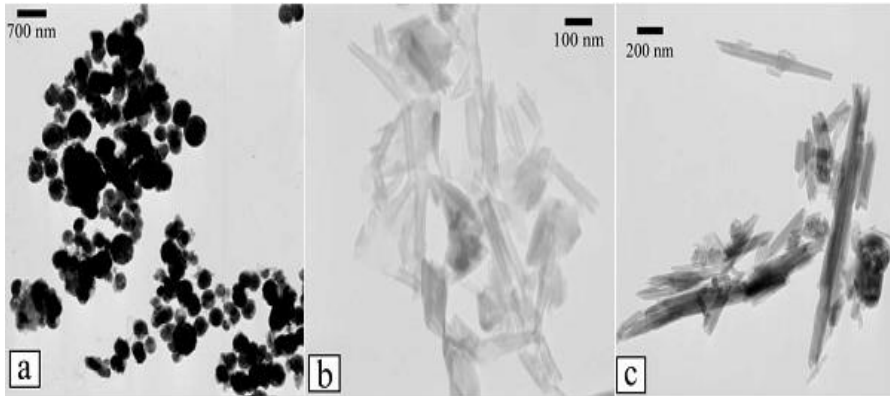
Molekül ağırlığı	98.06 g/mol
Yoğunluk (25 °C)	1.48 g/mL
Kaynama Noktası	200 °C (L)
Erime Noktası	51-56 °C (L)
Saklama Sıcaklığı	30 C'nin altında
Fiziksel Durum	Toz form
Renk	Beyaz
Koku	Hafif buruk bir koku
Buhar Basıncı (20 °C)	0.16 mmHg
Sudaki çözünürlüğü (25°C)	79 g/100 mL

Anhidrit nanosüngerler, piromellitik dianhidrit, maleik anhidrit gibi çapraz bağlayıcılarla birlikte piridin veya trietilamin gibi bir baz varlığında polimerizasyonun hızlandırılmasıyla birlikte çözücü yöntemi ile hazırlanabilir. Siklodekstrin: çapraz bağlayıcı molar oranları, nanosüngerin hazırlanma amacına göre 1:2'den 1:8'e kadar değişebilir. Birçok çalışmada, doksorubisin, meloksikam, ibuprofen ve asetilsalisilik asit gibi ilaçların kapsüllenmesinde bu tipte nanosüngerlerin kullanıldığı literatüre geçmiştir [12, 63-67].

2.6. Halloysit Nanotüp

Polimer-nanokompozitlerin oluşumunda, kilin oldukça önemli bir rolü vardır. Kil mineralleri, yüzeyde değişiklikler yaparak veya hiç değişim yapmaksızın polimerik malzemelerle birlikte kullanılabilir ve bu şekilde nanokompozit malzeme elde edilebilir. Killer, su içinde kolayca şekil alabilen ve genellikle ince tanecikli minerallerden meydana gelen kurutulmuş doğal materyallerdir. Kil mineralleri doğal oldukları için ve nanometre ölçeğindeki yapısıyla, geniş bir yelpazede kullanımları vardır. Kil mineralleri, daha işlevsel bir yapı oluşturmak veya malzemenin belirli bir kullanım amacına göre uyarlanması için yüzey değişikliklerine uğratılabilir. Bu şekilde organik moleküllerle birleşerek organokil denilen yapı meydana getirilir. Halloysit, bir kil mineralidir ve kristal yapısı iki tabakalıdır. Bu tabakalar, tetrahedral Si_4O_{10} ve oktahedral $\text{Al}_4\text{O}_4(\text{OH})_8$ yapılarından oluşur. Halloysit kil, kaolin grubundan farklılaşır çünkü katmanlarının arasına su molekülleri girer. Bu durum, onu kaolinden ayıran bir özelliktir [68].

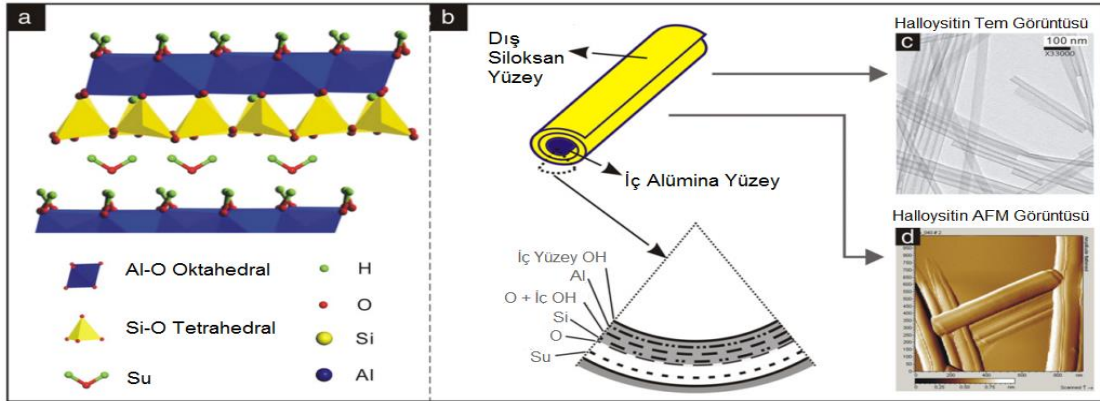
Halloysit minerallerinin farklı boyutlarda ve şekillerde olması, buldukları yatakların ve oluşum koşullarının bir sonucudur. Bu, çeşitli jeolojik süreçlerin etkisi altında şekil alabildiklerini gösterir. Örneğin, belirli bir yatakta halloysit mineralleri tüp şeklinde oluşabilirken, başka bir yatakta küresel veya çubuğumsu şekillerde bulunabilirler. Bu farklılık, minerallerin oluştuğu ortamların kimyasal bileşimi, sıcaklık, basınç ve diğer çevresel faktörler gibi birçok değişkene bağlı olabilir [69].



Şekil 2.13. Üç değişik şekilde bulunan Halloysit Killerin TEM görüntüleri [70].

Halloysit minerallerinin kristal yapısının belirli bir şekilde katlanması ve kıvrılması sonucunda büyük bir çapa sahip alüminasilikat levha ruloları oluşur. Halloysit nanotüplerinde nanometre boyutunda boşluklar bulunur ve bu boşluklar, kimyasal

yapıları, nanoparçacıklar ve küresel biçimdeki biyolojik moleküller gibi büyük boyutlu moleküllerin yakalamaya olanak tanır [71].



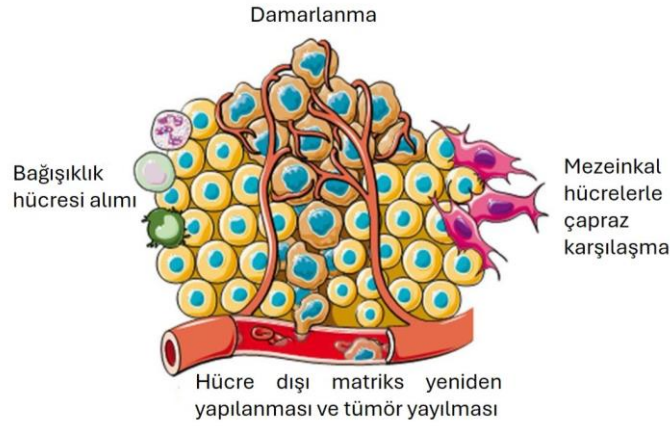
Şekil 2.14. a-b) Halloysit'in (10 Å) Kristal Yapısı c-d) Halloysit'in TEM ve AFM Görüntüleri [69].

Halloysit kil yüzeyi çok basit bir şekilde modifiye edilerek değiştirilebilir. Çevreye zararı olmayan özellikleri, birçok etken maddeyi taşıyabilme yetenekleri, yüksek orandaki en-boy oranı, üstün gözeneklilikleri, oldukça fazla adsorpsiyon yapabilme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle bu nanotüpler büyük ilgi görmektedir [72]. Halloysit, kurduğu kimyasal bağları sayesinde iç boşluğunda hidrofobik özellik sergilerken, dış yüzeyinde hidrofilik özellik sergiler. Halloysit, iç ve dış kimyasal yapılarının farklılığı sayesinde yüzey ve iç kısımda seçici değişikliğe olanak tanır [73, 74].

2.7. Kanser

Kanser, bazı hücrelerin kontrol edilemeyen bir şekilde çoğalarak vücudun farklı bölgelerine yayılmasına neden olan bir hastalıktır. Vücudun neredeyse her bölgesinde ortaya çıkabilen kanser, trilyonlarca hücrenin aşırı çoğalmasıyla oluşur. İnsan hücreleri normalde, hücre bölünmesiyle birlikte yeni hücreler üretir ve bu hücreler büyümeye başlar. Büyüyen bu hücreler zamanla yaşlandıklarında veya zarar gördüklerinde ölürlere ve hücrelerin yenilenmesi sağlanır. Bazen bu anlatılan düzenli süreç düzgün şekilde gitmez ve bu bahsedilen yaşlanmış, hasar almış hücreler büyüyüp çoğalmamaları gerekirken çoğalmaya ve yayılmaya devam ederler. Bu hücreler, doku kümeleri oluşturarak tümörleri meydana getirebilirler ki bu tümörler iyi veya kötü huylu olarak sınıflandırılabilir. Kanserli tümörler veya malign tümörler olarak da adlandırılabilir,

metastaz denilen bir olayla yakındaki çevre dokulara yayılabilir hatta vücudun uzak bölgelerine bile ulaşarak çoğalmaya devam edebilir [75].



Şekil 2.15. Tümör mikroçevresini modellemek için 3 boyutlu hücre kültürleri [76].

Kanser, oldukça kompleks ve tek bir tedavisi olmayan bir hastalıktır. Kanserın hızlı bir şekilde tedavi edilememesinin nedeni kanserin tek bir hastalık olmamasından kaynaklıdır. Bunun yerine, 200’den fazla farklı hastalık içinde barındırır. Her kanser tipinin birçok alt tipi vardır ve genetik ve moleküler düzeyde farklı oldukları için bu kanser hücreleri de farklı görünür ve davranır. Bunun nedeni, kanserin her bir insanın kendi hücresinden yani, her bir kişinin farklı DNA’sından kaynaklanmasıdır. 200’den fazla farklı kanser türünün altında sayısız farklı genetik mutasyon yatmaktadır. Her kansere farklı mutasyonlar neden olur ve tümör büyüdükçe daha fazla mutasyon birikir. Bu, her tümörün ayrı bir mutasyon setine sahip olduğu anlamına gelir, bu nedenle bir kanser hastasına iyi gelen bir ilaç, bir başka hasta üzerinde hiçbir etki yaratmayabilir. Bir tümördeki her kanser hücresi, komşu kanser hücresiyle aynı genetik mutasyonlara sahip olamaz. Bu, tedavilerin genellikle bir tümördeki bir hücre tipini öldürebileceği, diğerleri ise tedaviden etkilenmeyerek tümörün tekrar büyümesine izin verebileceği anlamına gelir. Kanser hücrelerinin zamanla edindiği genetik mutasyonlar, hücrelerin davranış biçimlerini değiştirdiği anlamına gelir. Bu durum, tedavi sırasında oldukça zorlayıcı bir problem yaratır, çünkü mutasyonlar kanser hücrelerinin zamanla tedaviye direnç geliştirmesine neden olarak ilaçları etkisiz hale getirebilir. Böyle bir durumda, hastanın farklı bir tedavi alması gerekir. Normal hücreler, onları çok fazla büyümekten veya bölünmekten alıkoyan belirli mekanizmalara sahiptir. Kanser hücreleri bu kontrol

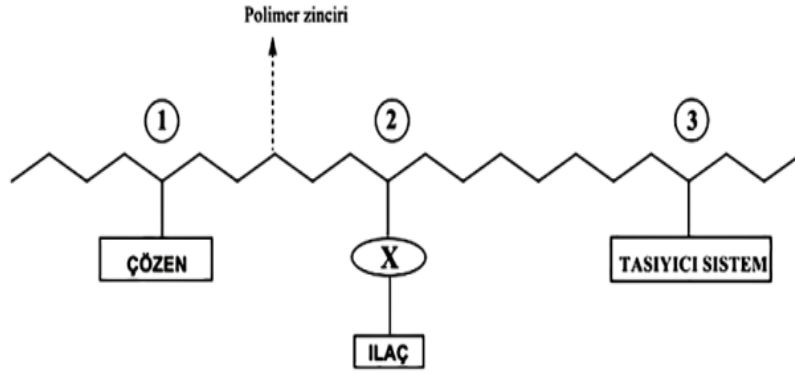
mekanizmalarını kaybetmiştir ve öldürülmekten kaçınmak için kendilerini geliştirebilir [77-79].

Hücrelerde kalıtsal materyalin sentezi (DNA), ribonükleozid difosfat redüktaz olarak da bilinen demir bağımlı bir enzim olan ribonükleotid redüktazın (RR) katalitik etkisiyle deoksiribonükleotitlere dönüştürülen ribonükleotitler tarafından gerçekleştirilir. RR aktivitesi ile kanser hücrelerinin replikasyon hızı arasında çarpıcı bir korelasyon vardır. DNA biyosentezinde, ribonükleotitlerin deoksiribonükleotitlere indirgenmesi kritik ve hız belirleyici basamaktır. Kemoterapi için RR, DNA sentezi için biyosentetik yolun ilk reaksiyonunu kataliz ettiği için önemli bir hedefdir. RR'nin inhibisyonu, hücre içi deoksinükleotid havuzlarının tükenmesine neden olarak DNA sentezinin ve onarımının bozulmasına neden olur. Hücre içi deoksinükleotid havuzlarının ve sitotoksitesinin azaltılması tamamen ilacın hem konsantrasyonuna hem de maruz kalma süresine bağlıdır. Bu nedenle, bu önemli adım üzerinde etkili olabilecek ve RR'yi etkisiz hale getirebilecek hedefe özgü anti-tümör ajanlarının sentezlenmesine oldukça ihtiyaç vardır [80-82].

2.8. İlaç Taşıma Sistemlerinin Kanser Tedavisindeki Yeri ve Etki Mekanizması

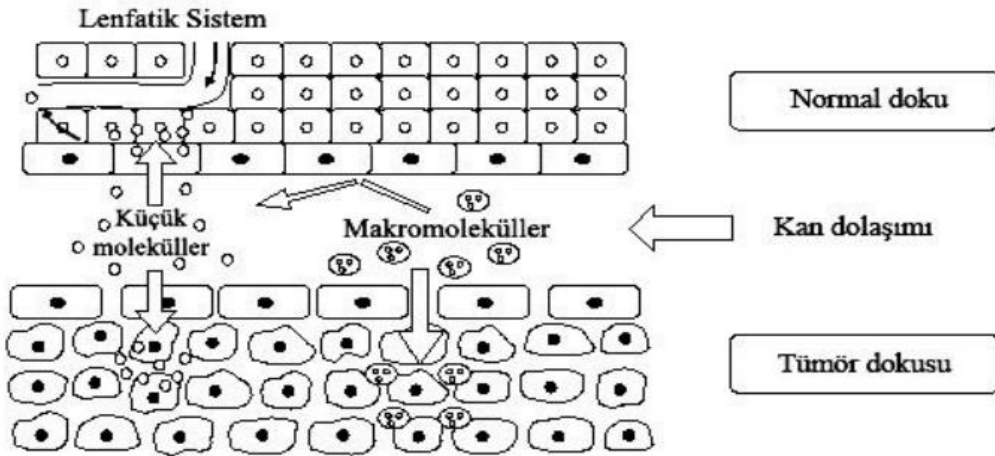
Tıbbi çalışma yapan bilim insanları için ilaç taşınması ve istenen yere yönlendirilmesi, ilacın vücutta doğru hedefe ulaşmasını ve aşırı dozun önüne geçilmesini amaçlayarak farmakolojik yararlanımının optimal durumunu sağlamak konusunda zorlu bir görev haline olmuştur. İlaç taşıma mekanizması mükemmel olmalıdır; çünkü ilacın çözünürlüğünü artırmalı, tedaviyi istenen bölgeye yönlendirmeli ve hastanın kişisel ihtiyaçlarını ve hastalığın ilerleme aşamasının gerekliliklerini karşılaması için en büyük etkiyi sağlamalıdır. Polimerik temelli materyallerin modifiye edilmesiyle sağlanan nanomalzemelerin ilerleyen teknolojiyle birleştirilmesi, tuzaklanmış ilaçların istenen yere transferini gerçekleştirmek amacıyla yeni bir altyapı sağlamıştır [11, 67, 83].

1975 yılında Ringsdorf'un çalışmalarıyla başlayarak, lipozomlarla gerçekleştirilen çalışmalar, kanser hücreleri için anti-kanser ilaçların hedeflenmesi amacıyla nano taşıyıcı sistemlerin erken dönemdeki kullanımına ilişkin gayretleri göstermiştir. Suda çözünen polimerlerin kullanımıyla, ilaçlar vücutta istenen bölgeye taşınmak için en uygun araçlar haline gelmiştir. Bu stratejiler, ilacın daha etkili ve güvenli bir şekilde kullanılmasını sağlayarak "akıllı ilaç taşınımı" olarak adlandırılmıştır [84].



Şekil 2.16. Sentetik polimerik ilaçlar için Ringsdorf modeli [85].

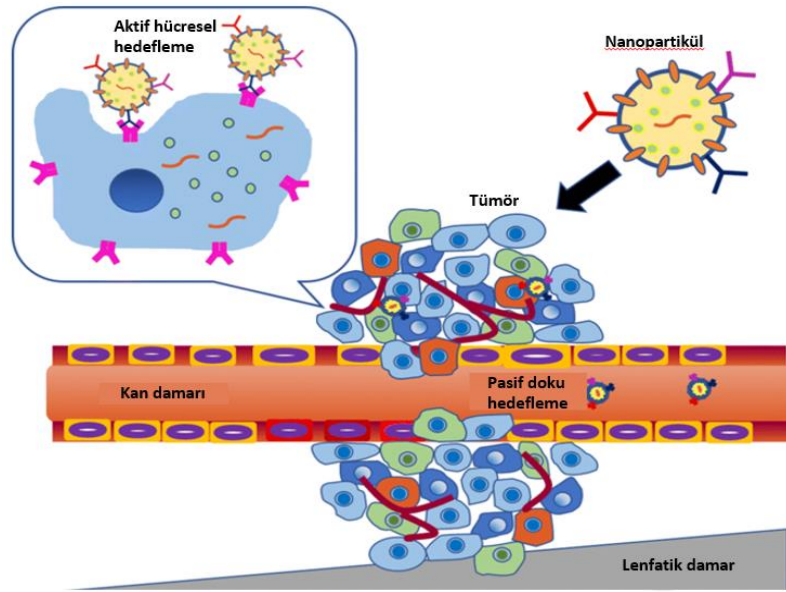
Polimerik tedavi edici ilaçlar, yakın zamanda yaygın olarak polimer-ilaç kompleksinin polimerik misel kullanımlarından meydana gelir [66, 86]. Polimer-ilaç kompleksinden oluşan makromoleküler yapının kullanışa elverişli dizaynı günümüzde üç yapıtaşından oluşur: suda çözünürlüğü olan polimerik bir transfer ajanı, biyoyumlu ve biyolojik sistemde parçalanabilen bağlayıcı polimer ve biyolojik olarak etkin bir farmasötik ilaç. Mantıklı bir düzende dizayn edilmiş polimer-ilaç konjugatlarının bu üç ana taşı, tümörler için hedeflenmiş bir yol sağlayarak “artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi (EPR)” ile açıklanır [87].



Şekil 2.17. EPR etkisinin mekanizması [88].

EPR etkisi, “Artmış Geçirgenlik ve Tutunma”nın kısaltmasıdır. Tümörlerin büyümesi ve damarlanması genellikle daha hızlı ve daha karmaşık olduğundan, normal dokulardan farklıdır. Normal dokulara kıyasla, tümör içinde bulunan kan damarlarının

karmaşık olması ve sızıntı olmasına yatkınlığıyla sonuçlanır. Bununla birlikte, tümörlerin çevresindeki lenfatik drenaj ağı çoğunlukla zayıf kalır; bu da ilaçların tümör içerisinde daha kolay nüfuz etmesine ve daha fazla zaman süresince orada durmasını sağlar. Bu nedenle, EPR etkisi, ilaçların tümör hücrelerine daha etkin bir şekilde ulaşmasını ve tedavisinin sağlayarak, tümörlerin bu spesifik damarlanma ve drenaj özelliklerinden kaynaklanır [89-92].



Şekil 2.18. Nanomalzemelerin pasif ve aktif hedeflenmesinin şematik gösterimi [93].

Kanser tedavisini iyileştirmek adına birçok olumlu etki sağlayan polimer-ilaç konjugatları, yan etkileri minimize ederek, terapötik faydayı olabildiğince artırarak, ilaçların uygulamalarını kolaylaştırarak ve hasta-ilaç etkileşimini uyumlu hale getirerek bir dizi olumlu sonuçlar doğurmuştur. İlaç taşınımı çoğunlukla ilaç hedeflemesi yoluyla, vücudun gereksinim duyduğu alanlara, otomatik olarak veya dışarıdan bir etki ile sağlanır. (1) Pasif ve (2) Aktif hedefleme olmak üzere nanomalzemelerin taşınım stratejileri iki ana kategoriye ayrılır. Bu hedefleme stratejileri, sağlıklı organ ve hücrelerde nano ölçekteki malzemelerin birikmesini en düşük seviyeye getirirken, nanomalzemelerin, tümörlü dokulara ve tedavi/diagnostik yüklerinin öncelikli olarak taşınmasını amaçlar. Her iki strateji de tümör nano-ilacı için, tümörün fizyopatolojik niteliklerinden ötürü nanomalzeme birikimini artırır. Böylece, bilim insanları

çoğunlukla tümör dağılımını artırmak amacıyla deney tabanlı geliştirilmiş nano malzeme dizayn yöntemlerine başvururlar [94].

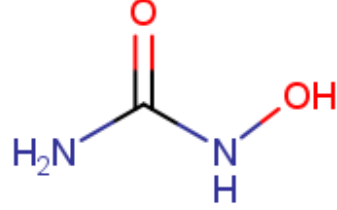
Katı tümörlerdeki nanomateryallerin artarak birikimini tanımlamak amacıyla çoğunlukla kullanılan bir terim olan “pasif taşıma” ifadesi bulunmaktadır. Büyük moleküllü ilaç taşıyıcı sistemlerin kendiliğinden birikimi, ilk safhada, sızan damarlarla beslenen katı tümör alanlarında uygulandığı görülmüştür. Daha sonrasında ise, zarar görmüş lenfatik drenaj sebebiyle tümörün iç kısmında nanomateryallerin yakalandığı görülmüştür. Bu iki gözlem, EPR kavramının tanımını belirlemede katkıda bulunmuştur. Pasif hedefleme ve EPR etkisi arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır [95].

Tümörler için beslenme ve oksijen gereksinimi arttığında damar geçirgenliği de artar. Tipik damar yapılarında, 2 nanometreden büyük moleküler yapılar, endotel hücreleri arasındaki güçlü bağlantılar sebebiyle geçemezler. Fakat tümörlü alanlarda, bu güçlü bağlantıların yapısal olarak bozunduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda, 10 ile 500 nanometre arasında değişen büyüklükteki makromoleküller, dokulara doğru geçebilir ve tümör dokusunda birikme sağlarlar. Dahası, bu bahsedilen bölgelerde bulunan lenfatik drenajdan dolayı birikme sağlayan moleküller dışarı çok zor çıkar veya çıkamaz. Pasif hedefleme denilen bu stratejik yaklaşım, tümör bölgesindeki damar yapısının bahsedilen niteliklerinden yararlanılarak gerçekleşir [96].

2.8.1. Bir Kanser İlacı: Hidroksiüre

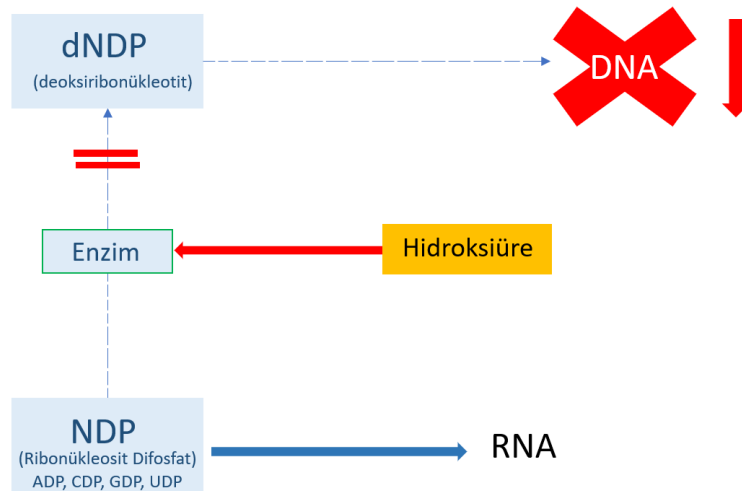
Hidroksiüre malign melanom, dirençli kronik miyelositik lösemi ve yumurtalığın tekrarlayan, metastatik veya ameliyat edilemeyen karsinomunu ve baş-boyundaki primer skuamöz hücreli (epidermoid) karsinomları tedavi etmek için kullanılan bir anti-kanser ajandır. İlk olarak 1869’da Dresler ve Stein tarafından sentezlenmiştir. Ancak, anti-tümör ajanı olarak kullanımı 1960’larda başlamıştır. Lösemi tedavisinde, orak hücre anemisi tedavisinde, HIV enfeksiyonu tedavisinde, temel trombositemi tedavisinde, sedef hastalığında ve polisitemi vera tedavisinde kullanılmaktadır. Birincil etkileşim bölgesi olarak RR enzimine sahip olan bir grup bileşiğin temsilcisidir. Oldukça polardır, hızlı bir şekilde hidrolize ve biyotransforme olur ve bu nedenle sık ve nispeten yüksek doz alınımı gereklidir. HU’nin yan etkilerinden bazıları şunlardır:

bulantı, kusma, baş ağrısı, kemik iliği baskılanması, anemi ve trombositopeni ve dermatolojik reaksiyonlar [97].



Şekil 2.19. Hidroksiürenin kimyasal yapısı.

HU, S-faz hücre döngüsüne özgü bir RR inhibitörü ve nükleotid tüketen bir ajandır. Yüksek dozda, *in vitro* ve hafif toksisiteyle birlikte nükleotitlerle DNA'daki boşlukların doldurulmasını inhibe ederek DNA onarımını indirger. HU, NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesini inhibe ederek ribonükleosit difosfatın deoksiribonükleotide indirgenmesini baskılar. HU, diferik tirozil radikal merkezindeki en küçük R2 alt birimine bir elektron transfer ederek indirger ve ribonükleotit redüktaz enzimini inhibe eder. İndirgeyici enzim olarak görev yapan ribonükleotit redüktaz enziminin yapısını bozan hidroksiüre, DNA sentezini bu şekilde durdurur. Sonuç olarak DNA oluşumu engellenir ve kanserli hücrenin çoğalması da böylece önlenmiş olur [98].



Şekil 2.20. Hidroksiürenin biyolojik sistemdeki etki mekanizması.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Malzemeler ve Kimyasallar

Polimerizasyonda kullanılan Betasiklodekstrin (β CD, $C_{42}H_{70}O_{35}$, mol kütlesi:1134.99 g/mol, % 98 saflıkta) ThermoFisher Scientific'ten temin edilmiştir. Polimerizasyonda olarak kullanılan Maleik Anhidrit (MA, $C_4H_2O_3$, mol kütlesi:98.06 g/mol, ≥ 99.0 % saflıkta) Fluka'dan temin edilmiştir. Polimerizasyonda kullanılan Epiklorohidrin (EPI, C_2H_5ClO , mol kütlesi: 92.52 g/mol, ≥ 99.0 % saflıkta) Sigma-Aldrich firmasından alınmıştır. HNT-nanosünger nanokompozitlerini elde etmek için kullanılan Halloysit Nanotüp (HNT) 100 nm'den daha küçük tanecik boyutunda (min. %35 Al_2O_3 , max. % 0.7 Fe_2O_3 , max. % 1.2 SO_3) ESAN Eczacıbaşı firmasından temin edilmiştir. Nanosüngerlere ilaç konjuge etmek için kullanılan Hidroksiüre (HU, $NH_2CONHOH$, mol kütlesi: 76.05 g/mol, % 98 saflıkta) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Nanosünger sentez tepkimelerinde kullanılan Sodyum Hidroksit (NaOH, mol kütlesi: 40 g/mol, ≥ 99.0 % saflıkta) Merck Milliapore firmasından temin edilmiştir. İlaç konjugasyonu tepkimelerinde kullanılan N,N-Dimetilformamid (DMF, C_3H_7NO , mol kütlesi: 73.09, ≥ 99.0 % saflıkta) Sigma Aldrich firmasından alınmıştır. İlaç konjugasyonunda katalizör olarak kullanılan Trietilamin (TEA, Et_3N , $(C_2H_5)_3N$, mol kütlesi: 101 g/mol, ≥ 99.0 % saflıkta) Sigma Aldrich firmasından temin edilerek kullanılmıştır. Çöktürme işlemlerinde kullanılan Aseton (CH_2COCH_3 , mol kütlesi: 58.08, ≥ 99.5 % saflıkta) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

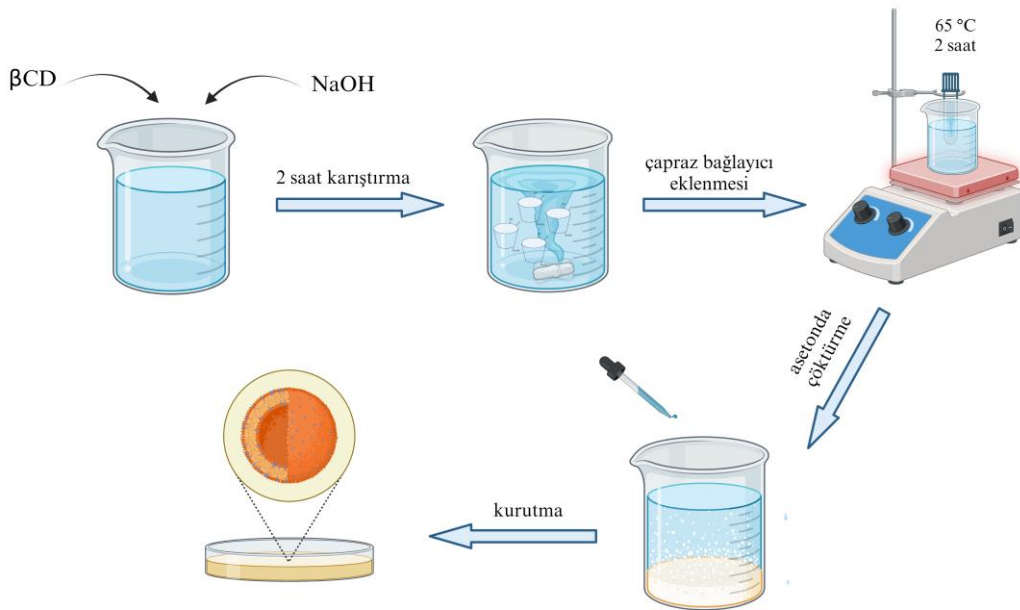
3.2. Sentez Yöntemleri

3.2.1. Nanosüngerlerin Üretimi

Nanosüngerlerin üretimi maleik anhidrit, epiklorohidrin ve maleik anhidrit ile epiklorohidrinin aynı ortamda bulunmasıyla sentezlenerek üç farklı nanosünger eldesi ile tamamlanmıştır. Çeşitli reçetelerin defalarca denenmesi sonucunda, çözünebilir bir yapıda nanosünger oluşturmayı sağlayacak en uygun reçete belirlenmiştir. Bu reçete, nanosüngerin çözünürlüğünün bir limit olduğu noktada uygulanmıştır. Nanosünger, çapraz bağlı bir yapıya sahiptir ve genellikle çözünmeme özelliği taşır; ancak literatürde, belirli bir noktaya kadar çözünebilir ve daha sonra çözünmeyen yapılar da

bulunmaktadır. Belirli kimyasal işlemler veya tasarımlar sonucunda, nanosüngerler çözünebilirlik özelliği taşıyabilir. Bu, nanosüngerlerin çapraz bağlı yapılarına ve kimyasal bileşenlerine bağlı olarak değişebilir [57, 99]. Tez çalışmasında sentezlenen malzemeler, çözünme limitine kadar olan çapraz bağlı nanosünger yapısına sahiptir.

Şekil 3.1’de β CD monomerlerinin farklı kimyasallar ile reaksiyonunun nasıl gerçekleştiği özetlenmiştir. Buna göre sentez 5 aşamadan oluşmaktadır; oksianyon oluşumu, çapraz bağlayıcının ortama eklenmesi, çöktürme, yıkama ve kurutma. Bu yöntemle elde edilen nanosüngerlerin sentez aşamaları başarıyla tamamlanmıştır.



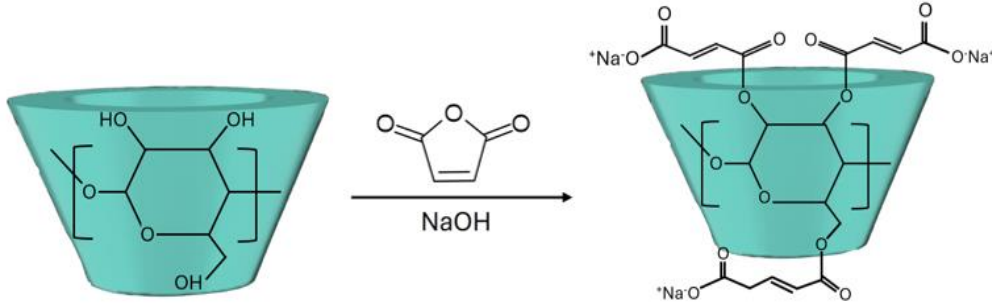
Şekil 3.1. Nanosünger sentez aşamaları.

3.2.1.1. Maleik Anhidrit ile Sentezlenen Betasiklodekstrin Nanosüngerler (β CD-MA-NS)

İlaç taşımada kullanılmak üzere betasiklodekstrin monomerleri maleik anhidrit ile bağlanarak nanosünger elde etmek için bir yöntem geliştirilmiştir. Nanosünger elde edilmesinde β CD monomeri üzerinde oksianyonlar oluşturmak amacıyla sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmıştır.

Buna göre bir reaksiyon tüpü içerisinde 3 mL, 5 M NaOH çözeltisine 1.80 g β CD eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca 300 rpm hızda sürekli karıştırılarak çözelti ortamında β CD üzerinde oksianyonlar oluşması sağlanmıştır.

Sonrasında maleik anhidritin yapıya katılması için aynı reaksiyon tüpüne 2.28 g MA eklenerek karıştırma işlemi 65 °C sıcaklıktaki yağ banyosunda 600 rpm hızda 12 saat boyunca devam ederek esterleşme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2.)



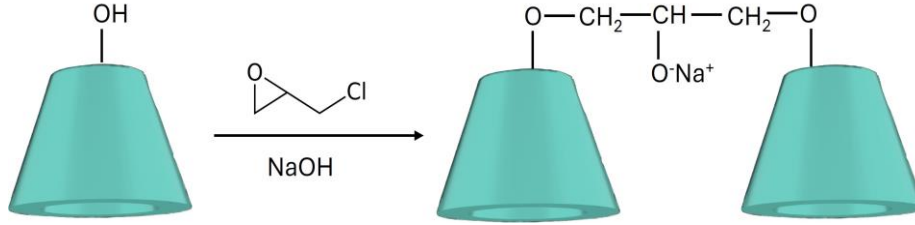
Şekil 3.2. Betasiklodekstrinin maleik anhidritle esterleşme reaksiyonu.

Tepkime sonunda elde edilen nanosüngerlerin çökmesi için çözeltiye damla damla soğuk aseton eklenmiş ve oluşan ürünlerin reaksiyon tüpünün dibine çöktüğü gözlenmiştir. Yukarıda kalan sıvı faz ortamdaki uzaklaştırılarak katı faza birkaç kez daha damla damla soğuk aseton eklenmiş ve tepkime sonunda reaksiyona girmeyen maddeler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Ardından çöken katı madde temiz bir petri kabına alınarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi sonunda petri kabından kazıyarak çıkarılan beyaz renkli toz katı formda nanosüngerler elde edilmiştir. Reaksiyonun verimi % 72 olarak bulunmuştur.

3.2.1.2. Epiklorohidrin ile Sentezlenen Betasiklodekstrin Bazlı Nanosüngerlerin Sentezi (β CD-EPI-NS)

İlaç taşımada kullanılmak üzere betasiklodekstrin monomerleri epiklorohidrin ile bağlanarak nanosünger elde etmek için bir yöntem geliştirilmiştir. Buna göre nanosünger eldesinde β CD monomeri üzerinde oksianyonlar oluşturmak amacıyla sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmıştır. Bir reaksiyon tüpü içerisinde 3 mL, 5M NaOH çözeltisine 1.80 g β CD eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca 300 rpm hızda sürekli karıştırılarak çözelti ortamında β CD üzerinde oksianyonlar oluşması sağlanmıştır. Ardından 0.54 g EPI hızlı bir şekilde reaksiyon tüpüne eklenerek 65 °C sıcaklıktaki yağ

banyosunda önce 600 rpm hızda sürekli karıştırılarak 12 saat boyunca reaksiyona sokulmuştur.



Şekil 3.3. Betasiklodekstrin ile epiklorohidrinin reaksiyonu.

Betasiklodekstrin (β CD), birçok hidroksil fonksiyonel grubu içeren bir halka şeklinde moleküldür. Epiklorohidrin (EPI) ile β CD molekülünün tepkimeye girmesi, EPI molekülündeki reaktif grupların β CD molekülündeki hidroksil gruplarıyla etkileşime girmesiyle gerçekleşir. Bu tepkimeyle birlikte, β CD molekülü içindeki boşlukta bulunan bir kavitede, yan zincirdeki epoksit halkası diğer bir β CD molekülündeki bir hidroksil grubu ile birleşerek gliseril köprüsü oluşturur. Bu reaksiyon, üç boyutlu ağ yapısının oluşmasına yol açar, çünkü bu tür bağlar reaksiyon sırasında tekrarlanarak artar. Diğer bir olası senaryo ise, epoksit halkasının açılmasıdır. Bu durumda, halka halindeki epoksit parçalanır ve iki β CD molekülü arasında bir gliserol köprüsü oluşur. Bu iki farklı mekanizma ile epiklorohidrin ve β CD tepkimeye girerek değişik yapıların oluşturur.

Reaksiyonun sonunda, elde edilen nanosüngerlerin çökmesi için çözeltiliye yavaşça damla damla soğuk aseton eklenmiş ve gözlenen tepki sonucu, ürünler reaksiyon tüpünün dibinde çökelmiştir. Kalan sıvı faz, süzülerek uzaklaştırılmış ve katı faz birkaç kez daha damla damla soğuk aseton eklenerek, tepkimeye girmeyen maddelerin ayrılması sağlanmıştır. Sonrasında, çöken katı madde temiz bir petri kabına alınmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi tamamlandığında, petri kabından kazıyarak alınan şeffaf renkli katı jel formunda nanosüngerler elde edilmiştir. Reaksiyonun verimi % 67 olarak bulunmuştur.

3.2.1.2. Maleik anhidrit ve Epiklorohidrin ile Sentezlenen Betasiklodekstrin Bazlı Nanosüngerler (β CD-MA-EPI-NS)

İlaç taşınması için kullanılmak üzere betasiklodekstrin (β CD) monomerleri, maleik anhidrit ve epiklorohidrin ile bağlanarak nanosünger elde etmek için bir yöntem geliştirilmiştir.

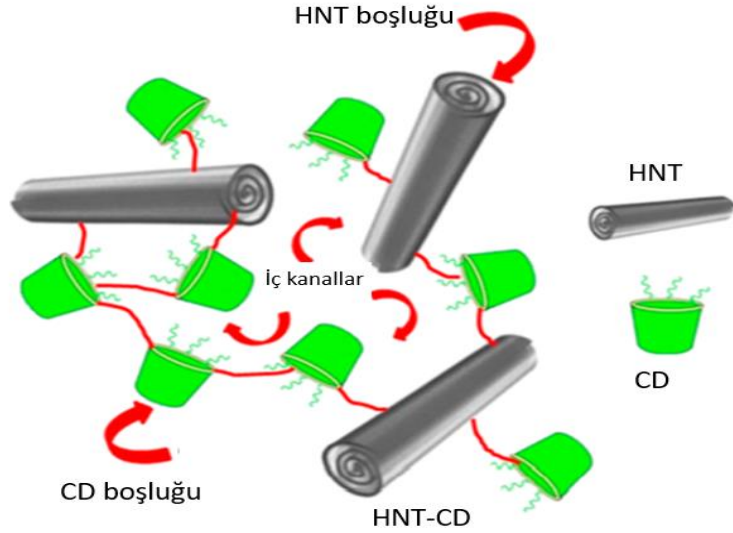
Bu süreçte, nanosünger eldesinde β CD monomeri üzerinde oksianyonlar oluşturmak amacıyla sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmıştır. Reaksiyon tüpü içerisinde, 1.80 g β -CD, 3 mL 5M NaOH çözeltisine eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca 300 rpm hızda sürekli karıştırılarak çözelti ortamında β CD üzerinde oksianyonların oluşması sağlanmıştır. Ardından 0.009 g EPI ve 0.45 g MA aynı anda hızlı bir şekilde reaksiyon tüpüne eklenerek 65 °C'teki yağ banyosunda 600 rpm hızda sürekli karıştırılarak çözeltideki maddeler, 12 saat boyunca reaksiyona sokulmuştur.

Gerçekleştirilen bu reaksiyonda, epiklorohidrinin epoksit grubu, betasiklodekstrin moleküllerinin hidroksil gruplarına bağlanırken, maleik anhidrit ise, betasiklodekstrin ile reaksiyona girdiğinde maleik anhidritin çift bağlı karbon atomları, betasiklodekstrin moleküllerinin hidroksil grupları ile reaksiyona girerek bağlar oluşturur. Bu süreçte, epiklorohidrin ve maleik anhidritin bağ oluşturma yetenekleri, betasiklodekstrin moleküllerinin farklı hidroksil gruplarına bağlanarak nanosünger yapısının oluşmasını sağlar.

Elde edilen nanosüngerlerin çökmesi için, reaksiyon sonunda çözeltiliye kontrollü bir şekilde soğuk aseton damlatılmıştır. Bu işlem sonucunda, reaksiyonun ürünleri reaksiyon tüpünün tabanında çökelmiştir. Daha sonra, kalan sıvı faz dikkatlice süzülerek uzaklaştırılmış ve katı faza birkaç kez daha aseton eklenerek, reaksiyona girmeyen maddelerin ayrılması sağlanmıştır. Ardından, çöken katı madde, temizlenmiş bir petri kabına aktarılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi tamamlandığında, beyaz renkli toz halindeki katı nanosüngerler petri kabından dikkatlice kazınarak elde edilmiştir. Reaksiyon verimi % 74 olarak bulunmuştur.

3.2.2. Nanosünger-Halloysit Kil Nanokompozitlerinin Hazırlanması

Halloysit kili, nanosüngerin niteliklerini, nanosüngere tutunarak geliştirir ve bu da malzemenin kimyasal ve termal olarak daha iyileştirilmiş çeşitli alanlarda kullanımını artırır. Bu çalışmada, halloysit kil nanokompozitlerini hazırlamak için iki sentez yöntemi geliştirilmiştir: *In-situ* ve *ex-situ*.

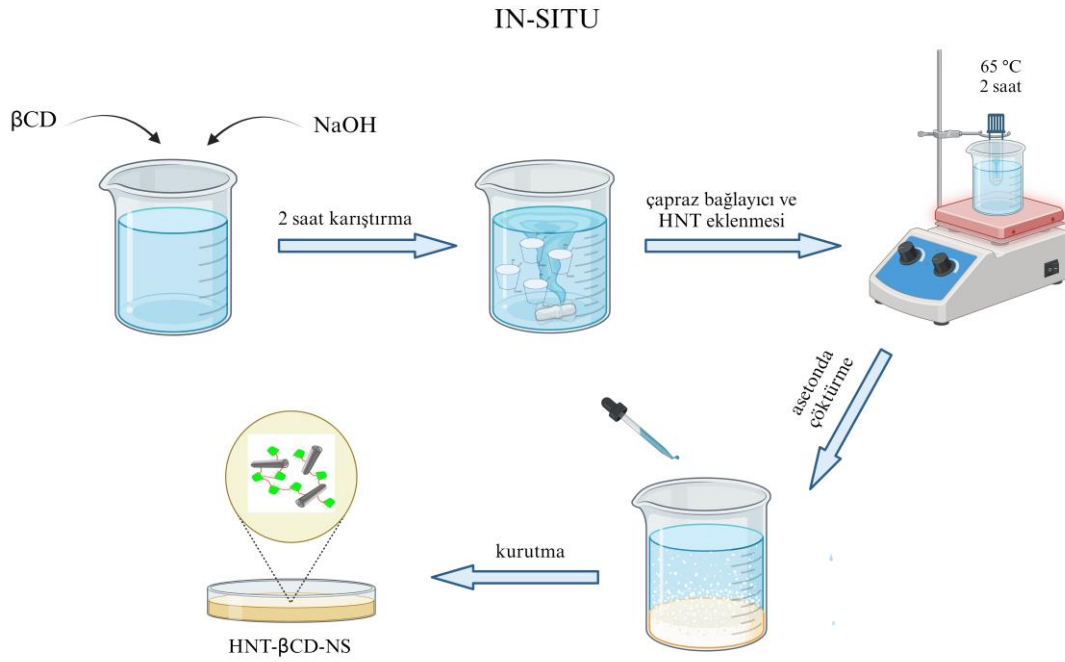


Şekil 3.4. Nanosüngerler ile halloysit nanotüp etkileşimi [100].

Bu yöntemler, HNT katkılı nanosünger yapılarının oluşturulmasını sağlamaktadır. Tekniğin incelikleri, halloysit kilin yapısal özellikleri ile malzemenin değişimine yol açar ve böylelikle amaçlanan niteliklere sahip nanosüngerlerin sentezlenmesini hedefler.

3.2.2.1. *In-situ* Yöntemle Nanosünger-Halloysit Kil Nanokompozitlerinin Hazırlanması

Bu kısımda, Şekil 3.5.'te de gösterildiği gibi HNT katkısının nanosünger ile etkileşimi *in-situ* yöntemle gerçekleştirilmiştir. *In-situ* yöntemde nanosünger sentezi yapılırken ortama halloysit kil eklenmiş ve nanokompozit ürünler bu şekilde sentezlenmiştir.



Şekil 3.5. Nanosüngerlere halloysit nanotüpün *in-situ* yöntemle sentez aşamaları.

3.2.2.1.1. Maleik Anhidrit ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile *In-situ* Yöntemle Sentezi (I-βCD-MA-HNT)

Nanosünger üretiminde, betasiklodekstrin (βCD) monomeri üzerinde oksianyonlar oluşturmak için sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmıştır. Bu amaçla, bir reaksiyon tüpü içinde 1.80 g βCD, 3 mL 5M NaOH çözeltisine eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca 300 rpm hızında sürekli karıştırılarak çözelti ortamında oksianyonların βCD üzerinde oluşması sağlanmıştır. Daha sonra, aynı reaksiyon tüpüne 2.28 g maleik anhidrit (MA) eklenmiş ve nanosüngere katkı malzemesi olarak 1.22 g halloysit (HNT) eklenmiştir. Karışım, 60-65 °C sıcaklığındaki yağ banyosunda 12 saat boyunca 600 rpm hızında karıştırılarak monomerlerin bağlanması ve nanosüngerler ile halloysitin

etkileşmesi sağlanmıştır. Tepkime sonunda elde edilen HNT katkıli nanosüngerlerin çökmesi için çözeltiliye aseton eklenmiş ve oluşan ürünlerin reaksiyon tüpünün dibine çöktüğü gözlenmiştir. Kalan sıvı faz süzülerek uzaklaştırılmış ve çöken katı madde temiz bir petri kabına alınarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi tamamlandığında, petri kabından kazıyarak alınan sarı renkli katı formda toz HNT katkıli nanosüngerler elde edilmiştir.

3.2.2.1.2. Epiklorohidrin ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile In-situ Yöntemle Sentezi (I- β CD-EPI-HNT)

Nanosünger eldesinde, betasiklodekstrin (β CD) monomeri üzerinde oksianyonlar oluşturmak için sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmıştır. Bu amaçla, bir reaksiyon tüpü içerisine 1.80 g β CD, 3 mL 5M NaOH çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca 300 rpm hızında sürekli karıştırılarak çözelti ortamında β CD üzerinde oksianyonlar oluşması sağlanmıştır. Ardından, 0.54 g epiklorohidrin (EPI) hızlı bir şekilde reaksiyon tüpüne eklenmiş ve hemen sonrasında ortama 2.01 g halloysit (HNT) eklenmiştir. Reaksiyon tüpü, 65 °C'teki yağ banyosunda 12 saat boyunca 600 rpm hızında sürekli karıştırılarak reaksiyona sokulmuştur. Bu süreçte, EPI'nin β CD ile etkileşime girmesi ve HNT'nin nanosünger yapısı ile katkılanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Tepkime sonunda elde edilen HNT katkıli nanosüngerler, çökmesi için çözeltiliye aseton eklenerek reaksiyon tüpünün dibine çökmüştür. Ardından, kalan sıvı faz süzülerek uzaklaştırıldı ve çöken katı madde temiz bir petri kabına alınarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruma işlemi tamamlandığında, petri kabından kazıyarak alınan sarı renkli jel formdaki HNT katkıli nanosüngerler elde edilmiştir.

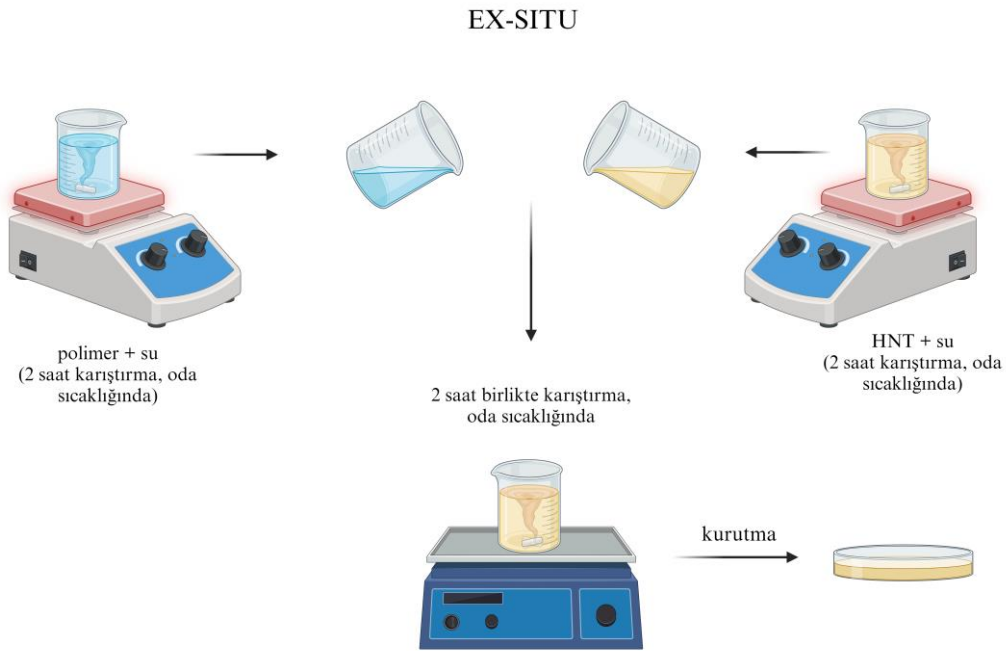
3.2.2.1.3. Maleik Anhidrit-Epiklorohidrin ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile In-situ Yöntemle Sentezi (I- β CD-MA-EPI-HNT)

Nanosünger üretiminde, β CD monomeri üzerinde oksianyonlar oluşturmak amacıyla sodyum hidroksit (NaOH) kullanılmıştır. Reaksiyon tüpü içinde, 1.80 g β CD, 3 mL 5M NaOH çözeltisine eklenerek oda sıcaklığında 2 saat boyunca 300 rpm hızda sürekli karıştırılarak oksianyonlar β CD üzerinde oluşturulmuştur. Daha sonra, 0.009 g EPI ve 0.45 g MA aynı anda reaksiyon tüpüne eklenmiş ve hemen sonrasında 0.56 g HNT çözeltiye eklenerek 65 °C'teki yağ banyosunda 600 rpm hızda sürekli karıştırılarak 12 saat boyunca reaksiyona sokulmuştur. Tepkime sonunda elde edilen HNT katkıli nanosüngerler, çökmesi için çözeltiliye aseton eklenerek reaksiyon tüpünün dibine

çökmüştür. Ardından, kalan sıvı faz süzülerek uzaklaştırıldı ve çöken katı madde temiz bir petri kabına alınarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruma işlemi tamamlandığında, petri kabından kazıyarak alınan sarı renkli katı formdaki toz HNT katkıli nanosüngerler elde edilmiştir.

3.2.2.2. *Ex-situ* Yöntemle Nanosünger-Halloysit Kil Nanokompozitlerinin Hazırlanması

Bu aşamada, Şekil 3.6.'da gösterildiği gibi nanosüngerin halloysit kil ile modifikasyonu, *ex-situ* yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. *Ex-situ* yöntemde, nanosünger sentezi yeniden gerçekleştirilmeden daha önceden sentezlenmiş nanosünger yapıları su ortamında disperse edilir ve bu disperse ortama halloysit kil eklenir.



Şekil 3.6. Nanosüngerlere halloysit nanotüpün *ex-situ* yöntemle sentez aşamaları.

Ex-situ yöntemi, suda disperse edilen malzemelerin birbirine yüzeylerine tutunmasını içerir. Halloysit kil, nanosüngerlerin yüzeyine adsorbe olur ve katılma süreci, nanosünger yapılarının yüzeyindeki halloysit kil partiküllerinin birbirine ve nanosüngerlere tutunmasını sağlar.

3.2.2.2.1. Maleik Anhidrit ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile *Ex-situ* Yöntemle Sentezi (E- β CD-MA-HNT)

Daha önce Başlık 3.2.1.1.'de anlatılan sentez yöntemi ile elde edilen β CD-MA nanosüngerden 1 g alınarak temiz bir tüpte üzerine 2 mL su eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca 400 rpm'de sürekli karıştırılmıştır. Başka bir temiz deney tüpünde ise 0.3 g HNT kil üzerine 2 mL su eklenmiş ve yine aynı şekilde oda sıcaklığında 2 saat boyunca 400 rpm'de sürekli karıştırılmıştır. Her iki maddenin de su içinde iyice disperse olması amaçlanmıştır. Daha sonrasında, su içinde disperse olan HNT, nanosüngerin bulunduğu tüpe aktarılmış ve iki madde oda sıcaklığında 2 saat boyunca 400 rpm hızda birlikte karıştırılmıştır. 2 saatin sonunda bu dispersiyon, petri kabına alınarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra kuruyan madde petri kabından kazanmış ve sarı renkli HNT katkılı nanosünger elde edilmiştir.

3.2.2.2.2. Epiklorohidrin ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile *Ex-situ* Yöntemle Sentezi (E- β CD-EPI-HNT)

Daha önce Başlık 3.2.1.2.'de elde edilen β CD-EPI nanosüngerden 1.00 g alınarak temiz bir tüpe konulmuş ve üzerine 2 mL su eklenmiştir. Bu karışım, oda sıcaklığında 2 saat boyunca 400 rpm hızında sürekli olarak karıştırılmıştır. Diğer bir taraftan, temiz bir deney tüpüne 0.30 g HNT kil konulmuş ve üzerine 2 mL su eklenmiştir. Bu karışım da aynı şekilde oda sıcaklığında 2 saat boyunca 400 rpm hızında sürekli karıştırılmıştır. Daha sonra, HNT kil su içinde dağıldıktan sonra, bu dispersiyon nanosüngerin bulunduğu tüpe aktarılmıştır. İki madde birlikte oda sıcaklığında 2 saat boyunca 400 rpm hızında karıştırılmıştır. 2 saatlik karıştırma süresinin sonunda, tüpteki bu dispersiyon petri kabına alınarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan madde daha sonra petri kabından kazanmış ve sarı renkli jel formulu HNT katkılı nanosünger elde edilmiştir.

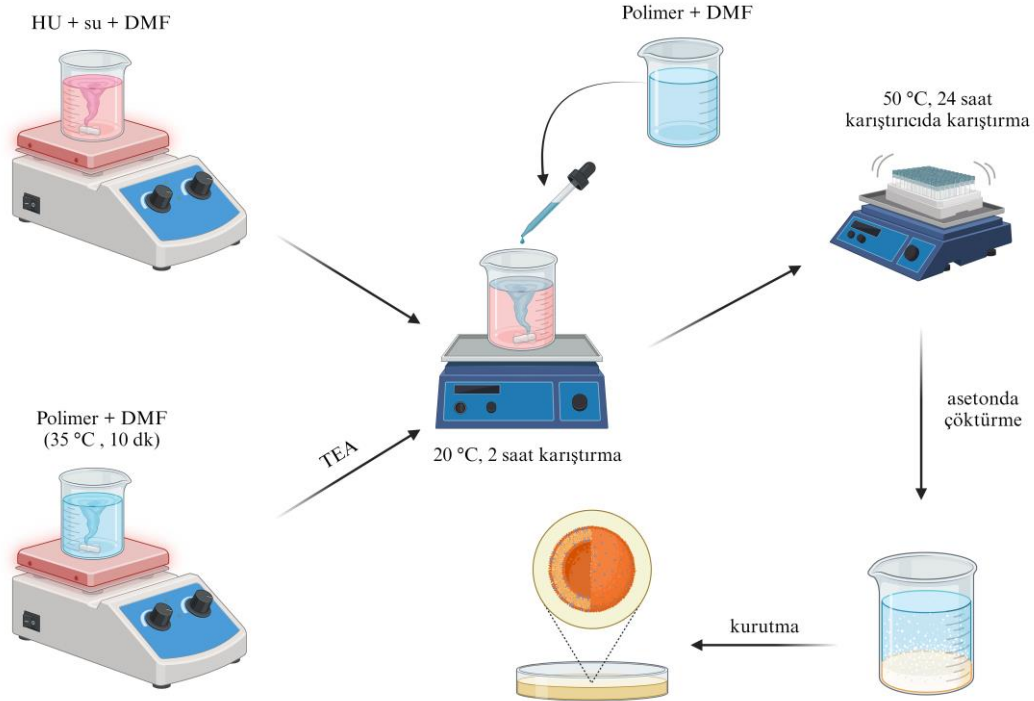
3.2.2.2.3. Maleik Anhidrit-Epiklorohidrin ile Sentezlenen Nanosüngerlerin Halloysit Kil ile *Ex-situ* Yöntemle Sentezi (E- β CD-MA-EPI-HNT)

Daha önce Başlık 3.2.1.3.'de elde edilen β CD-MA-EPI nanosünger maddeden 1.00 g alınmış ve temiz bir tüpe yerleştirilmiştir. Üzerine 2 mL su eklenerek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca 400 rpm hızında sürekli karıştırılmıştır. Aynı şekilde, temiz bir deney tüpüne 0.30 g HNT kil eklendi ve üzerine 2 mL su eklenerek karıştırılmıştır. Bu karışım da oda sıcaklığında 2 saat boyunca 400 rpm hızında sürekli olarak

karıştırılmıştır. Daha sonra, HNT kil su içinde dağıldıktan sonra, bu dispersiyon nanosüngerin bulunduğu tüpe aktarılmıştır. İki madde birlikte oda sıcaklığında 2 saat boyunca 400 rpm hızında karıştırılmıştır. 2 saatlik karıştırma süresinin sonunda, tüpteki bu dispersiyon petri kabına alınmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan madde daha sonra petri kabından kazınmış ve sarı renkli HNT katkı nanosünger elde edildi.

3.2.3. Nanosüngerlerin ve HNT Katkılı Nanosüngerlerin İlaç Konjugatlarının Hazırlanması

Bu kısımda HNT katkısız ve HNT katkı nanosüngerler için ilaç konjugasyonu sentez yöntemi aynıdır ve deneysel yöntemler Şekil 3.7.'de gösterildiği gibi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7. Nanosüngerler ile ilaç konjugatı hazırlanması.

Bir reaksiyon tüpünde 0.13 g polimer maddeye 8.75 mL DMF eklenmiş ve 10 dakika boyunca 35 °C sıcaklıkta karıştırılmıştır. Polimer-DMF karışımına 30 µL TEA eklenerek karıştırma işlemine oda sıcaklığında 2 saat daha devam edilmiştir.

Bir başka tüpte 0.0057 g hidroksiüre 0.375 mL saf suda çözülmüş ve ardından bu tüpe 1.875 mL DMF eklenmiştir. Ardından ilaç çözeltisine polimer çözeltisi damla damla eklenmiş ve reaksiyon tüpü önce 20 °C sıcaklıkta 2 saat sonrasında 50 °C sıcaklıkta 24 saat boyunca karıştırıcıda çalkalanmıştır. 24 saat sonunda soğuk asetonda çöktürme işlemi yapılmış ve çöken madde petri kabına alınarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan madde kazınarak petri kabından çıkarılmış ve hem *in-situ* hem de *ex-situ* yöntemlerle HNT katkılı nanosüngerler için ve HNT katkısız nanosüngerler için ilaç konjugasyonu tamamlanmıştır. Sonuç olarak her üç katkısız nanosünger ve *in-situ* ve *ex-situ* yöntemle hazırlanmış HNT katkılı nanosünger örneği için toplamda 9 tane ilaç konjuge edilmiş nanosünger yapı hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1., Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.'te sırasıyla nanosüngerler, HNT-nanosünger nanokompozitleri ve bu nanomalzemelerin ilaç konjugasyonundan elde edilen yapılara ilişkin adlandırma, kısaltma ve içerikleri hakkında bilgi verilmiştir.

Çizelge 3.1. Nanosüngerlerin adlandırma, kısaltma ve içerikleri

Örnek Adı	Kısaltması	İçeriği
Maleik Anhidrit ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger	β CD-MA	Betasiklodekstrin, Maleik Anhidrit
Maleik Anhidrit ve Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger	β CD-MA-EPI	Betasiklodekstrin, Maleik Anhidrit, Epiklorohidrin
Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger	β CD-EPI	Betasiklodekstrin, Epiklorohidrin

Çizelge 3.2. HNT katkılı nanosüngerlerin adlandırma, kısaltma ve içerikleri

Örnek Adı	Kısaltması	İçeriği
<i>ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı Maleik Anhidrit ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger	E- β CD-MA-HNT	Betasiklodekstrin, Maleik Anhidrit, Halloysit
<i>in-situ</i> yöntemle HNT katkılı Maleik Anhidrit ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger	I- β CD-MA-HNT	Betasiklodekstrin, Maleik Anhidrit, Halloysit
<i>ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı Maleik Anhidrit ve Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger	E- β CD-MA-EPI	Betasiklodekstrin, Maleik Anhidrit, Epiklorohidrin, Halloysit
<i>in-situ</i> yöntemle HNT katkılı Maleik Anhidrit ve Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger	I- β CD-MA-EPI	Betasiklodekstrin, Maleik Anhidrit, Epiklorohidrin, Halloysit
<i>ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger	E- β CD-EPI	Betasiklodekstrin, Epiklorohidrin, Halloysit
<i>in-situ</i> yöntemle HNT katkılı Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger	I- β CD-EPI	Betasiklodekstrin, Epiklorohidrin, Halloysit

Çizelge 3.3. HU ile konjuge olan nanosüngerlerin adlandırma, kısaltma ve içerikleri

Örnek Adı	Kısaltması	İçeriği
Maleik Anhidrit ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger-ilaç konjugatı	β CD-MA-HU	Betasiklodesktrin, Maleik Anhidrit, Hidroksiüre
<i>ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı Maleik Anhidrit ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger-ilaç konjugatı	E- β CD-MA-HNT-HU	Betasiklodesktrin, Maleik Anhidrit, Halloysit, Hidroksiüre
<i>in-situ</i> yöntemle HNT katkılı Maleik Anhidrit ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger-ilaç konjugatı	I- β CD-MA-HNT-HU	Betasiklodesktrin, Maleik Anhidrit, Halloysit, Hidroksiüre
Maleik Anhidrit ve Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger-ilaç konjugatı	β CD-MA-EPI-HU	Betasiklodesktrin, Maleik Anhidrit, Epiklorohidrin, Hidroksiüre
<i>ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı Maleik Anhidrit ve Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger-ilaç konjugatı	E- β CD-MA-EPI-HNT-HU	Betasiklodesktrin, Maleik Anhidrit, Epiklorohidrin, Halloysit, Hidroksiüre
<i>in-situ</i> yöntemle HNT katkılı Maleik Anhidrit ve Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger-ilaç konjugatı	I- β CD-MA-EPI-HNT-HU	Betasiklodesktrin, Maleik Anhidrit, Epiklorohidrin, Halloysit, Hidroksiüre
Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger-ilaç konjugatı	β CD-EPI-HU	Betasiklodesktrin, Epiklorohidrin, Hidroksiüre
<i>ex-situ</i> yöntemle HNT katkılı Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger-ilaç konjugatı	E- β CD-EPI-HNT-HU	Betasiklodesktrin, Epiklorohidrin, Halloysit, Hidroksiüre
<i>in-situ</i> yöntemle HNT katkılı Epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger-ilaç konjugatı	I- β CD-EPI-HNT-HU	Betasiklodesktrin, Epiklorohidrin, Halloysit, Hidroksiüre

3.3. Karakterizasyon ve Analiz Yöntemleri

Sentezlenen nanosünger, *in-situ* ve *ex-situ* yöntemlerle hazırlanan HNT-nanosünger kompozitleri ve HNT katkılı ve katkısız nanosünger yapıların ilaç konjugatlarının karakterizasyonu için Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (ATR-FTIR), Termogravimetrik Analiz (TGA), Dinamik Mekanik Analiz (DMA), X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) ölçümleri yapılmıştır. Boş nanosüngerler için Proton Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) ölçümleri alınmıştır. Ayrıca nanosüngerlerin morfolojisini anlamak için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri incelenmiştir. Karakterizasyon sonrasında sentezi başarılı bulunan nanosünger yapılar ile HEK293 hücreleri ile sitotoksite deneyleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (ATR-FTIR) Ölçümleri

Sentezlenen nanosünger, *in-situ* ve *ex-situ* yöntemlerle hazırlanan HNT-nanosünger kompozitleri ve HNT katkısız ve HNT katkılı nanosünger yapıların ilaç konjugatlarının karakterizasyonları için ATR-FTIR analizleri yapılmıştır. ATR-FTIR spektrofotometre olarak Perkin Elmer 400 FTIR cihazı ile $4000-400\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında, çözünürlük 4 cm^{-1} ve 16 tarama ile ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Nanosüngerlerin, HNT-nanosünger nanokompozitlerin ve bunların ilaç konjuge yapılarının bozunma davranışının ve kullanılan kil katkısının ve ayrıca da yapıya eklenen hidroksiürenin termal kararlılık üzerine etkilerini araştırmak için Termogravimetrik Analiz (TGA) yönteminden yararlanılmıştır. Discovery SDT650 marka Termogravimetrik Analiz Cihazı ile numunelerin analizleri $25-1200\text{ }^\circ\text{C}$ aralığında ve ısıtma hızı $10\text{ }^\circ\text{C/dak}$ olarak azot atmosferinde gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Proton Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) Spektroskopisi Ölçümleri

Nanosüngerlerin karakterizasyonunda, örneklerin Proton Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) analizi için Bruker 400MHz AV model NMR spektrometresi kullanılmıştır. Bu cihaz, nanosüngerlerin moleküler yapılarını ayrıntılı bir şekilde incelemek adına yüksek çözünürlüklü $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarının görüntülenmesini sağlamıştır. Çözücü olarak *Dimetilsülfoksit-d6* (*DMSO-d6*) kullanılmıştır. $^1\text{H-NMR}$ spektrumu analizi,

nanosüngerlerin moleküler yapıları, çapraz bağlı grupları ve diğer kimyasal özellikleri hakkında bilgi sağlamıştır.

3.3.4. X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS), yüzey kimyasının incelenip analiz edilmesi amacıyla etkili bir biçimde kullanılan tekniktir. Bu metot, örneğin yüzeyinde bulunan atomik ve moleküler yapıları, X-Işınları ile ilişkilendirerek tespit eder. Elektronları farklı derinliklerde inceleyerek, numunenin elementel olarak yüzde bileşimini, kimyasal bağlanma özelliklerini ve yüzeyin kimyasını belirleyen veriler elde eder. XPS, sentezlenen nanosünger, HNT-nanosünger nanokompozit yapısı ve bunların ilaç konjugatları hakkında yüzeydeki elementlerin çeşitliliği ve miktarıyla ilgili bilgi sağlama kapasitesiyle ilgili içerikleri sunmuştur. PHI 5000 VersaProbe XPS cihazı ile yapılan bu analiz yüksek hassasiyet ve çözünürlük sağlamış ve karmaşık yüzeyler yorumlanmıştır.

3.3.5. Dinamik Mekanik Analiz (DMA) Ölçümleri

Dinamik Mekanik Analiz (DMA), sıcaklıkla ilişkili olarak incelenen malzemelerin viskoelastik özelliklerini belirlemede kullanılan bir araçtır. Nanosünger, HNT-nanosünger nanokompozitleri ile Al_2O_3 ağırlıkça eşit oranlarda bir toz karışımı hazırlanmıştır. TA Q800 cihazı, DMA eğrileri için kullanılmıştır. Bu cihaz 25-270 °C arasında sıcaklık değerlerinde, 3 °C/dakika sabit hızda ve 1 Hz frekansta çalışarak malzemenin viskoelastik özelliklerini belirler.

3.3.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Nanosüngerlerin yapısal analizi için Quanta 400F Field Emission SEM cihazı kullanılmıştır. Bu taramalı elektron mikroskobu, nanosüngerlerin detaylı bir şekilde incelenebilmesi için 1.2 nm çözünürlüğe sahiptir. SEM analizi öncesi numune hazırlama işlemi yapılmış ve sonrasında nanosüngerlerin yüzey şekli, yapısal karakteristikleri ve parçacık boyutları görüntüler sayesinde açığa çıkarılmıştır. Bu incelemeler, nanosüngerlerin boşluklu yapılarını, parçacık formlarını ve yayılımlarını ortaya koymuştur.

3.3.7. Sitotoksisite Deneyleri

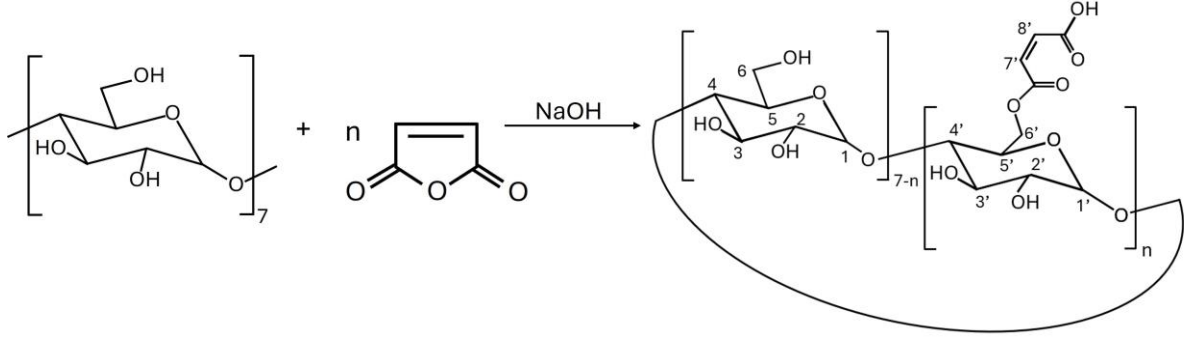
Elde edilen nanosünger yapıların, bu yapıların *in-situ* yöntemle HNT katkılı nanokompozitleri ve nanosüngerlerin ilaç konjugatlarının çözeltileri farklı derişimlerde (5, 10, 20, 50, 100 µg/mL) insan embriyonik böbrek (HEK293) hücrelerine ait sitotoksisite değeriendirilmesi için tetrazolyum tuzu 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Almanya) yapılmıştır. HEK293 hücreleri %10FBS, 2 µM L-glutamine, % 1 Penisilin-Streptomisin DMEM-F12 besi ortamında kültüre edilmiştir. Farklı derişimde hazırlanan numunelerin (5-100 µg/mL) besi ortamında çözünmesi sağlanarak 0.22'lik filtreden geçirilmiş ve sterilizasyonu sağlanmıştır. HEK293 hücreleri, $1,5 \times 10^4$ hücre/mL yoğunlukta 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 37 °C'de ve % 5'lik CO₂ altında inkübasyonu sağlanmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında farklı konsantrasyonlarda hazırlanan numuneler hücrelere uygulanmış, uygulama yapılmayan grup kontrol grubu olarak değeriendirilmiştir. Hücreler 24 saat ve 48 saat boyunca inkübasyona tabi tutulmuştur. Her inkübasyon periyodu sonunda MTT testi yapılmıştır. Hücrelerin üzerindeki numuneleri içeren besi ortamı toplanmış ve MTT içeren besi ortamı eklenmiştir. Bütün grupların MTT içeren besi ortamı ile 4 saatlik inkübasyonu sonucunda besi ortamı toplanmış ve İzopropil alkol eklenerek absorbans (OD), UV görünür spektrofotometrenin (EZ Read 400 Microplate Reader, Biochrom, UK) parçası olan bir mikroplaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. β CD-MA Nanosüngerin, HNT Katkılı Nanosüngerin ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapıların Karakterizasyonları

4.1.1. β CD-MA Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi

Şekil 4.1.'de β CD ile MA'nın bazik ortamda reaksiyonu gösterilmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan ürünün başarılı şekilde sentezlendiğini kanıtlamak amacıyla gerekli FTIR karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. β CD ile MA'nın bazik ortamdaki reaksiyonunun gösterimi.

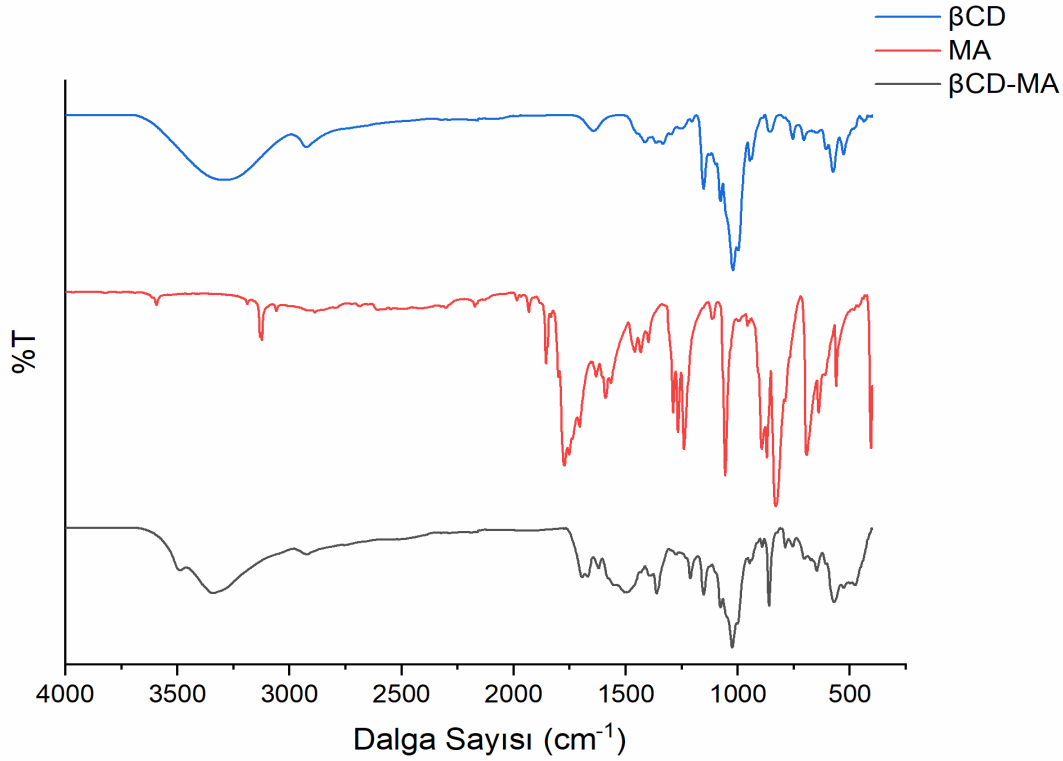
β CD için FTIR pikleri $3320-3271\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen O-H gerilme titreşimi, $2933-2925\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen $-\text{CH}_2$ asimetrik gerilme titreşimi, 1157 cm^{-1} 'de gözlenen C-C gerilme titreşimi, 1080 cm^{-1} 'de gözlenen C-O gerilme titreşimidir. Ayrıca $1400-1200\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde β CD'in birincil ve ikincil hidroksil gruplarındaki C-H bağlarına ait olan deformasyon titreşimleri, $1200-1030\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde β CD'in eter ve hidroksil gruplarındaki C-O bantlarına ait olan gerilme titreşimleri ve $950-700\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde C-H bağlarının deformasyon gerilme titreşimleri mevcuttur [101-104].

Şekil 4.2.'de deneylerde kullanılan β CD'in FTIR-ATR spektrumu yer almaktadır ve bu spektrumda literatürle benzer olarak 3300 cm^{-1} dalga sayısında O-H gerilme titreşimi, 2924 cm^{-1} dalga sayısında $-\text{CH}_2$ gerilme titreşimi, $1400-1200\text{ cm}^{-1}$ aralığında β CD'in birincil ve ikincil hidroksil gruplarındaki C-H bağlarına ait olan deformasyon titreşimleri ($1413, 1366, 1335, 1300, 1247\text{ cm}^{-1}$), 1157 cm^{-1} dalga sayısında C-C gerilme titreşimi, β CD'in eter ve hidroksil gruplarındaki C-O bantlarına ait olan gerilme

titreşimleri (1075 , 1023 cm^{-1}) ve 938 cm^{-1} , 851 cm^{-1} , 754 cm^{-1} dalga sayılarında C-H deformasyon gerilme titreşimleri ile glikopiranoz halkası gerilme titreşimleri görülmektedir.

MA yapısındaki ana bağlardan kaynaklanan absorpsiyon bantları Şekil 4.2.'de sunulmuştur. Şekildeki, 1856 cm^{-1} ve 1778 cm^{-1} 'de belirgin pikler gözlemlenmiştir. Bu pikler, sırasıyla siklik anhidritteki asimetrik ve simetrik karbonil (C=O) gruplarının gerilmesine aittir. Siklik eterlere özgü olan grubun (=C-O-C=) asimetrik ve simetrik halka gerilmeleri 1242 cm^{-1} ve 1054 cm^{-1} 'de net bir şekilde görülmüştür. Yaklaşık olarak 689 cm^{-1} civarındaki pik, olefinik bağın (C=C) gerilmesi olarak tanımlanmıştır [105, 106].

β CD-MA nanosüngerler, maleik anhidritin siklodekstrin halkalarının hidroksil gruplarıyla esterleşmesi ile meydana gelmektedir. Bu tepkime sonucunda beta-siklodekstrinin hidroksil gruplarından biri veya daha fazlası, maleik anhidrit molekülü ile bir ester bağı oluşturmuştur. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürün, maleik anhidritin beta-siklodekstrin ile esterleşmiş formudur. Bu esterleşme sonucunda, beta-siklodekstrin molekülünde yer alan hidroksil grupları ester bağları oluşturarak değişmiştir. Bu nedenle ester grubunun varlığı (C=O), tipik olarak yaklaşık 1700 cm^{-1} civarında bir pik olarak gözlemlenmektedir ve bu pik ile birlikte maleik anhidritin β CD yapısına katıldığı anlaşılmaktadır. Beta-siklodekstrin molekülündeki hidroksil gruplarının bir kısmı esterleşme reaksiyonuyla kaybolurken, diğer hidroksil gruplarında değişiklikler gerçekleşir. Bu nedenle, beta-siklodekstrin molekülünde yer alan hidroksil gruplarına ait piklerde değişiklikler gözlemlenir. 3400 cm^{-1} dalga boyu civarındaki hidroksil grubunun O-H gerilme pik bölgesinde değişiklik gözlenmiştir. Maleik anhidrite ait karbonil halkası açıldığında iki taraftan oluşan hidroksil gruplarının bir kısmının serbest -OH olarak kalması ve bir kısmının esterleşme ile çapraz bağlanma sağlaması nedeniyle 3500 - 3000 cm^{-1} arasındaki -OH pikleri gözlenmiştir ve burada birkaç tipte hidrojen bağı görülmektedir. MA yapısındaki çift bağdan kaynaklı FTIR spektrumunda 1626 cm^{-1} 'de C=C bağlarına ait gerilme piki görülmektedir.



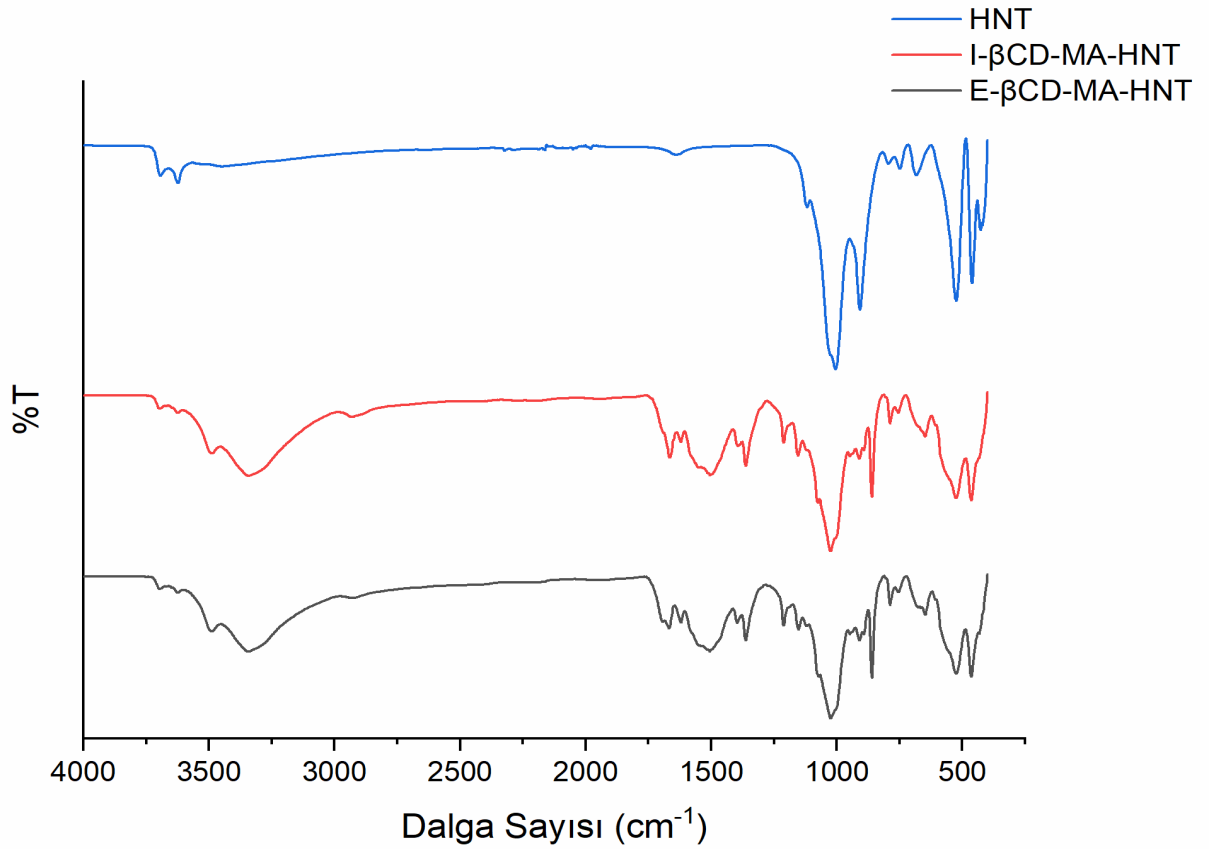
Şekil 4.2. β CD, MA ve β CD-MA NS'e ait FTIR spektrumları

Şekil 4.3.'e bakıldığında saf halloysit ve halloysit katkılı nanosünger yapılar için FTIR spektrumları verilmiştir. HNT için 3696 cm^{-1} ve 3625 cm^{-1} dalga boylarındaki iki spektrum halloysit kilin iç yüzeyindeki alümina katmanındaki hidroksil gruplarının gerilmelerine aittir. 3448 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen pik nanotüp yapısının tabakalar arası ve yüzeyindeki su gruplarının varlığı ile birlikte -OH grup gerilmelerini göstermektedir.

HNT için spektrumlara bakıldığında siloksan katmanındaki Si-O-Si bağların simetrik ve asimetric gerilme bantları 1120 cm^{-1} ve 1033 cm^{-1} 'de gözlenmektedir. Nanotüpün iç yüzeyindeki hidroksil grupların deformasyon bandı 910 cm^{-1} 'de gözlenirken, Al-O-Si için 527 cm^{-1} dalga boyunda deformasyona ait bant gözlenmiştir [107, 108]. Halloysit, alüminyum, silikon ve oksijen içeren bir mineraldir ve yapısında Si-O-Si ve Si-O-Al bağları bulunur.

Betasiklodekstrin ile halloysit arasında etkileşim gerçekleştirilmiş ve oluşan yeni bağların FTIR spektrumunda karakteristik piklerde değişiklikler gözlemlenmiştir. 3700 cm^{-1} ve 3638 cm^{-1} 'de gözlenen pikler Al-OH ve Si-OH gruplarının -OH titreşim bantlarıdır. Özellikle, 1120 cm^{-1} ve 1033 cm^{-1} 'de Si-O-Si simetrik ve asimetric titreşim bantları gözlenmektedir. Hem beta-siklodekstrin hem de halloysit molekülleri hidroksil

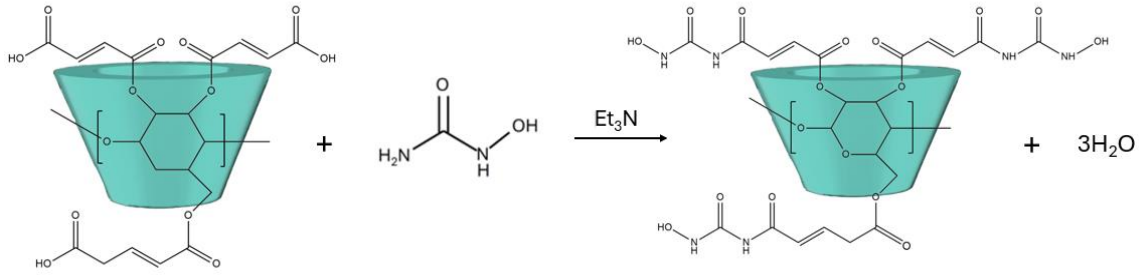
grupları içermektedir. 3500-3300 cm^{-1} arasında hidroksil gruplarının O-H gerilme pikinde değişiklikler görülmektedir. 3498 cm^{-1} gözlenen pik maleik anhidrit halkasının açılarak bir uçtaki hidroksil grubunun esterleşmesi ve diğer uçta bulunan hidroksil grubunun serbest kalmasıyla gözlenen -OH pikleridir. 3356 cm^{-1} 'de gözlenen pik ise βCD yapısına ait olan -OH grubunun gerilmesine aittir. Halloysit minerali içinde Al-Si bağları bulunur. Beta-siklodekstrin ile halloysit arasındaki etkileşim sonucunda, bu bağlarda da değişiklikler meydana gelmiştir. Bu değişiklikler, 800-1100 cm^{-1} arasında Al-Si bağlarının gerilme piklerinde gözlemlenmiştir. *In situ* ve *ex situ* HNT katkı yöntemi arasında FTIR piklerine bakıldığında büyük farklar gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.3. HNT, I- βCD -MA-HNT ve E- βCD -MA-HNT NS'lere ait FTIR spektrumları

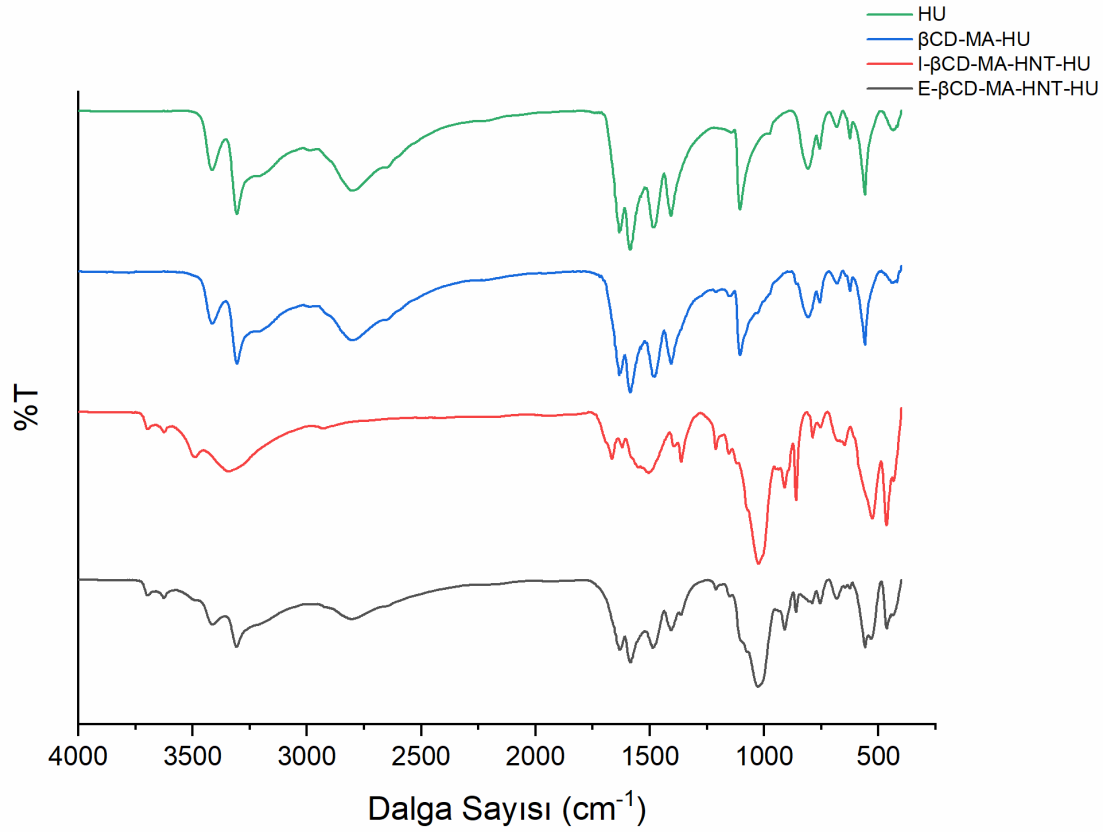
Şekil 4.5. incelenirse saf hidroksiüre (HU) için FTIR piklerine bakılırsa, 3438 cm^{-1} (-NH₂'nin asimetrik gerilmesine ait), 3314 cm^{-1} (-NH bağını işaret eden gerilmeye ait), 3321 cm^{-1} (-NH₂'nin simetrik titreşimlerine ait), 1641 cm^{-1} (amid 1, C=O bağı), 1596 cm^{-1} (amid 2'nin deformasyon titreşimleri) ve 1496 cm^{-1} (-NH'ın deformasyon titreşimleri) hidroksiüre için karakteristik piklerdir [109].

Elde edilen β CD-MA nanosünger, hidroksiüre ile konjuge edildiğinde FTIR spektrumunda bazı karakteristik değişikler gerçekleşmiştir. Betasiklodekstrin ve maleik anhidrit arasındaki bağların oluşması, FTIR spektrumundaki yeni piklerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Özellikle genelde $1700-1800\text{ cm}^{-1}$ arasında pik veren ve Şekil 4.5'te 1706 cm^{-1} 'de gözlenen ester bağlarının pikleri gözlemlenmektedir. Hidroksiüenin nanosüngerle kompleks oluşturmasıyla birlikte hidroksiüreye özgü pikler olan, 3311 cm^{-1} 'de -NH bağının gerilmesine ait pikler gözlemlenmiştir. 1652 cm^{-1} 'de C=O gerilme pikleri olarak ortaya çıkmıştır.



Şekil 4.4. β CD-MA nanosüngerin hidroksiüre ile konjugat oluşumunun reaksiyon gösterimi

Halloysit ile katkılanan nanosüngerler, hidroksiüre ile konjuge yapı oluşturduğunda özellikle kil minerallerine özgü Si-O-Si ve Al-OH bağlarına ait piklerin gözlemlenmesi beklenir. Şekil 4.5.'e bakıldığında Si-O-Si gerilme pikleri 1120 cm^{-1} ve 1033 cm^{-1} 'de simetrik ve asimetrik olmak üzere ve Al-OH bağlarına ait pikler ise 3708 cm^{-1} ve 3617 cm^{-1} 'de görülmektedir. Hidroksiüreye ait 3314 cm^{-1} -NH bağını işaret eden gerilmeye ait pikler gözlemlenmiştir. Hidroksiüreye ait 1641 cm^{-1} (amid 1, C=O bağı), 1596 cm^{-1} (amid 2'nin deformasyon titreşimleri) gözlemlenmiştir. β CD-MA nanosünger ile ilişkili pikler de gözlemlenmektedir. Özellikle, $1700-1800\text{ cm}^{-1}$ arasındaki ester bağları ve 1100 cm^{-1} 'deki -C-O-C- grubuna ait gerilmeler dikkat çekmektedir. 3700 cm^{-1} ve 3632 cm^{-1} 'de görülen pikler amin, amid ve maleik anhidrit kısmından gelen serbest ve bağlı -OH gruplarına ait molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağlarını da kapsamaktadır. *Ex-situ* yöntemlerle sentezlenen malzemedeki hidroksiüreye ait bantlar daha belirgin görülmektedir ve bu durum *ex-situ* yönteminde karıştırma sırasında tepkimeye girmeden kalan hidroksiüre moleküllerine işaret etmektedir. *In-situ* ve *ex-situ* yöntemlerle sentezlenen ilaç ile konjuge edilmiş halloysit katkılı nanosüngerlerde ise 1100 cm^{-1} 'deki eter bandının şiddetinin artmasıyla birlikte ikisi arasında büyük farklar gözlemlenmemiştir.

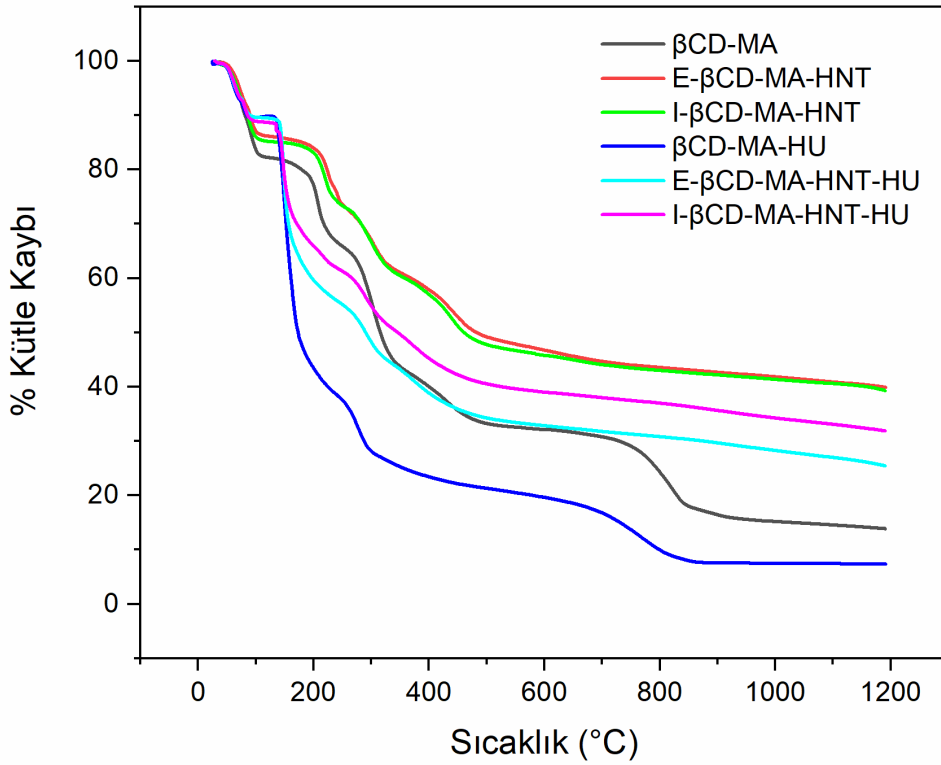


Şekil 4.5. HU, β CD-MA-HU, I- β CD-MA-HNT-HU ve E- β CD-MA-HNT-HU NS'lere ait FTIR spektrumları

Maleik anhidrit ile sentezlenen betasiklodekstrin temelli nanosünger yapıya, bu nanosünger yapıların *in-situ* ve *ex-situ* yöntemlerle HNT-nanosünger nanokompozitlerine ve nanosünger-ilaç konjuge yapılara ait FTIR spektrumları incelenmiştir. Bu spektrumlar, sentezlenmek istenen yapıların başarıyla elde edildiğini doğrular niteliktedir.

4.1.2. β CD-MA Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjugasyonuna Ait Termal Analiz (TGA)

Maddenin bileşimine ve moleküler ağırlığına bağlı olarak değişen bozunma sıcaklıkları, Termogravimetrik Analiz (TGA) yöntemi ile ölçülmektedir. Malzemenin kütlesi, Termogravimetrik Analizde, zaman veya sıcaklıkla ilişkili olarak kayıt tutulur. Aşağıda Şekil 4.6.'da nanosünger, HNT katkılı nanosünger ve bunların ilaç konjugasyonlarına ait TGA termogramları verilmiştir.



Şekil 4.6. βCD-MA NS, HNT katkılı NS ve bu nanosüngerlerin-ilaç konjugatlarının termogramları

TGA termogramı incelendiği zaman; βCD-MA nanosüngerine ait dört termal bozunma basamağı gözlemlenmiştir. İlk kütle kaybı incelenirse; nanosüngerin TGA grafiğinde, düşük sıcaklık aralığında (50-150 °C civarı), başlangıç ağırlık kaybı gözlemlenmiştir. TGA termogramında 105 °C civarındaki kütlece % 17.2'lik bu kayıp, nanosüngerin içerdiği suyun buharlaşması veya adsorbe suyun kaybı gibi nedenlerden kaynaklanabilir. Daha yüksek sıcaklıklarda (150-300 °C arası), bağların ayrışması nedeniyle bir ağırlık kaybı daha gözlemlenmiştir. 225 °C civarındaki kütlece % 31.4'lük bu kayıp, bağların termal bozulması veya parçalanması sonucunda meydana gelir. Daha yüksek sıcaklıklara çıktığında (250-400 °C arası), betasiklodekstrin ve maleik anhidritin ayrışması gerçekleşmiştir. Bu aşamada, her iki bileşenin de ayrışma sıcaklıklarına bağlı olarak ek ağırlık kaybı gözlemlenmiştir. Şekil 4.6.'daki termogramdaki 332 °C civarında gözlenen kütlece % 54.0'lük kayıp monomer ve maleik anhidrit arasındaki bağların ayrışması olarak yorumlanabilir. Son olarak, TGA termogramı yüksek sıcaklık bölgelerinde (400 °C üzeri), nanosüngerin kalıntı kalan katı kısmı belirginleşir. Bu

kalan katı kalıntı, nanosüngerin termal olarak stabil kalan kısmını temsil eder ve genellikle mineral bileşenlerden kaynaklanır. 502 °C civarında gözlenen kütlece % 66.8'lik kayıp nanosünger yapısının termal olarak bozunduğunu göstermektedir. Sıcaklık 840 °C civarına çıktığında ise yapı kütlece % 82.0'lik bir kayıba uğramış ve artık nanosünger yapısı tamamen bozunmuş olup yerini karbon kalıntılara bırakmıştır.

βCD-MA nanosüngerin *in-situ* ve *ex-situ* yöntemlerle halloysit ile oluşturduğu nanokompozite ilişkin termogram incelendiğinde; ilk ağırlık kaybının yine 100 °C civarında gözlemlendiği görülmektedir. Kütlece % 15'lik bu kayıp, nanosüngerin içerdiği suyun buharlaşması veya adsorbe suyun kaybı gibi nedenlerden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. İkinci basamakta ise 200-350 °C aralığında gözlemlenen kütlece % 23'lük kayıp ester bağlarına atfedilebilir. İkinci basamakta, halloysit kilinin ayrışmasına ilişkin kütle kaybı gözlemlenmektedir. Yüksek sıcaklıklardaki (400 °C civarı), halloysit kilin termal ayrışması meydana gelmektedir. Bu aşamada, kilin içerdiği su moleküllerinin buharlaşması veya kil minerallerinin termal bozunması nedeniyle kütlece % 12'lik bir kayıp gözlemlenmiştir. Daha yüksek sıcaklıklara gelindiğinde (480-580 °C arası), nanosüngerin içerdiği bağların ayrışması ve organik bileşenlerin termal bozunması gerçekleşmiştir. Bu aşamada, nanosüngerin organik yapıları ve bağlar parçalanarak kütle kaybı gerçekleşmiştir. Son olarak, TGA grafiğinin yüksek sıcaklık bölgelerinde (genellikle 500 °C üzeri), nanosüngerin kalıntı kalan katı kısmı belirginleşir. Bu kalan katı kalıntı, nanosüngerin termal olarak sabit kalan kısmını temsil eder ve genellikle mineral bileşenlerden kaynaklanır.

Anlatılan bu nanosünger ve halloysit katkılı nanosünger yapılara ilaç konjuge edildiğinde bu nanosüngerlerin termal davranışında bazı farklılıklar meydana gelmektedir. HNT katkısız nanosüngerin hidroksiüre ile konjugasyon oluşturması, başlangıçta daha düşük bir kütle kaybına neden olur. 83 °C civarında gözlenen termogram piki kütlece % 10 kayıp ile bu söyleneni doğrular niteliktedir. İlaç konjugasyonu işlemi sırasında, nanosüngerin içerdiği su miktarı azalabilir veya nanosüngerin yüzeyindeki hidroksil grupları ilaç molekülleriyle etkileşerek stabil hale gelebilir, bu da başlangıç ağırlık kaybının azalmasına neden olabilir. Konjuge yapı, nanosünger termal kararlılığını artırabilir. İlaç molekülleri, nanosüngerin yapısına katıldığından, nanosüngerin termal bozunma sıcaklığı artabilir. Bu, nanosüngerin daha yüksek sıcaklıklara dayanıklı olabileceği anlamına gelir. Termal bozunma profili üzerinde belirgin değişikliklere neden olabilir. İlaç molekülleri, nanosüngerin iç yapısına

nüfuz ederek termal bozunma mekanizmasını etkiler. Bu nedenle, TGA analizi sırasında farklı ağırlık kaybı oranları veya farklı termal bozunma adımları gözlenir. İlaç ve nanosünger yapının oluşturduğu yapıda başlangıçta bir ağırlık kaybı gözlemlenir.

Bu, konjugasyon işlemi sırasında kullanılan çözücülerin veya diğer uçucu maddelerin nanosüngerden uzaklaştırılmasıyla ilişkilendirilebilir. Hidroksiüre ilacının nanosüngere konjugasyonu, nanosüngerin termal kararlılığını etkilemiştir.

130-260 °C aralığındaki kütlece % 54'lük kayıp hidroksiürenin nanosünger yapısından serbest bırakıldığı TGA termogramındaki kütle kaybından görülmektedir. Hidroksiüre ilacının termal bozunması, bu sıcaklık aralığında gözlenebilir. 260-725 °C aralığındaki kütlece % 21'lik kayıp ise hidroksiürenin ikinci bozunma basamağına karşılık gelmektedir. Bu ikinci bozunma basamağı, hidroksiüre molekülünün içindeki atomların ve bağların kırılmasıyla gerçekleşir. Yapıdan ayrılan gruplar arasında hidroksil grupları ve amonyak bulunur. Termal bozunma sürecinde, hidroksiüre molekülü yüksek sıcaklıklarda ayrışır ve hidroksil grupları ve amonyak gibi uçucu gazlar serbest kalır. 171 °C civarında nanosüngerde kütlece % 50 kayıp gözlenmektedir. 710 °C civarında ise, nanosünger yapısı tamamen termal olarak bozunur. Betasiklodekstrin, maleik anhidrit ve hidroksiüre ilacının tamamen ayrışması ve geriye kalan katı karbon artıklarının kaldığı bir aşamadır. TGA analizi yüksek sıcaklıklarda devam ettiğinde nanosünger yapısının tamamının termal olarak bozunmuş olduğu ve geriye kalan katı karbon artıklarının kaldığı görülmektedir. Kalan katı kalıntı, nanosünger yapısının termal kararlılığı veya yanma direnci hakkında bilgi sağlayabilir.

Halloysit ile katkılanmış β CD-MA nanosüngerin hidroksiüre ile konjuge yapısının termogramına bakıldığında yine *ex-situ* ve *in-situ* deneysel yöntemlerin termogravimetrik analiz termogramlarında çok farklılık göstermediği fakat *in-situ* deneysel yöntemle elde edilen HNT katkılı nanosüngerin az bir farkla da olsa *ex-situ* yöntemiyle elde edilen nanosüngere göre termal olarak daha dayanıklı olduğu görülmektedir. 104 °C civarında görülen kütlece % 15 kayıpla nanosünger yapısında bulunan uçucu bileşenlerin ve/veya hafifçe bağlanmış yan zincirlerin kaybı görülebilir. 150-500 °C aralığında halloysit katkısının termal bozunması gerçekleşmektedir ve yapı kütlece % 37'lik bir kütle kaybına uğrar. 200-320 °C aralığında betasiklodekstrin ve maleik anhidrit arasındaki bağların bozunması gerçekleşir ve bu bağların termal bozunması, nanosünger yapısının temel bileşenlerinin termal olarak parçalanmasıyla sonuçlanır ve bu aralıktaki kütlece % 21'lik kayıp bu parçalanmaya aittir.

350-460 °C aralığında, hidroksiüre ilacının nanosünger yapısından serbest bırakılmasına ait kütlece % 6'lık kayıp görülmektedir. Hidroksiüre termal bozunması, bu sıcaklık aralığında gözlenebilir. 470 °C civarına gelindiğinde yapıda kalan kütlelerinin % 50'sinin azaldığı görülmektedir. 600 °C'lere gelindiğinde betasiklodekstrin, maleik anhidrit ve hidroksiüre tamamen ayrışır ve geriye katı karbon atığı kalır. 600 °C üzerinde ise kalan katı kalıntı, nanosünger yapısının tamamen termal olarak bozunmuş olduğunu gösterir.

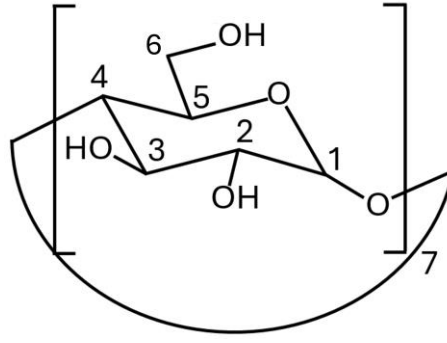
Çizelge 4.1. β CD-MA NS, HNT katkılı NS ve bu nanosüngerlerin ilaç konjugatlarının Sıcaklık (°C) - % Kütle Kaybı değerleri

Sıcaklık (°C) - %Kütle Kaybı										
Numune	100 °C	200 °C	300 °C	400 °C	500 °C	600 °C	700 °C	800 °C	900 °C	1000 °C
β CD-MA	16.3	22.7	44.1	60.0	66.8	67.9	69.2	75.7	83.6	84.8
β CD-MA-HU	9.79	55.8	71.2	75.9	78.1	79.7	83.5	89.9	91.8	91.9
I- β CD-MA-HNT	13.6	16.5	38.9	42.6	51.9	53.9	55.5	56.6	57.46	58.3
I- β CD-MA-HNT-HU	11.1	34.1	45.1	54.7	59.5	61.05	62.0	63.1	64.4	65.8
E- β CD-MA-HNT	12.7	15.8	32.7	41.9	50.6	53.2	55.1	56.3	57.1	58.0
E- β CD-MA-HNT-HU	10.4	40.3	51.7	61.1	65.8	67.2	68.3	69.2	70.4	71.7

4.1.3. β CD-MA Nanosünger Yapıya Ait $^1\text{H-NMR}$ Analizi

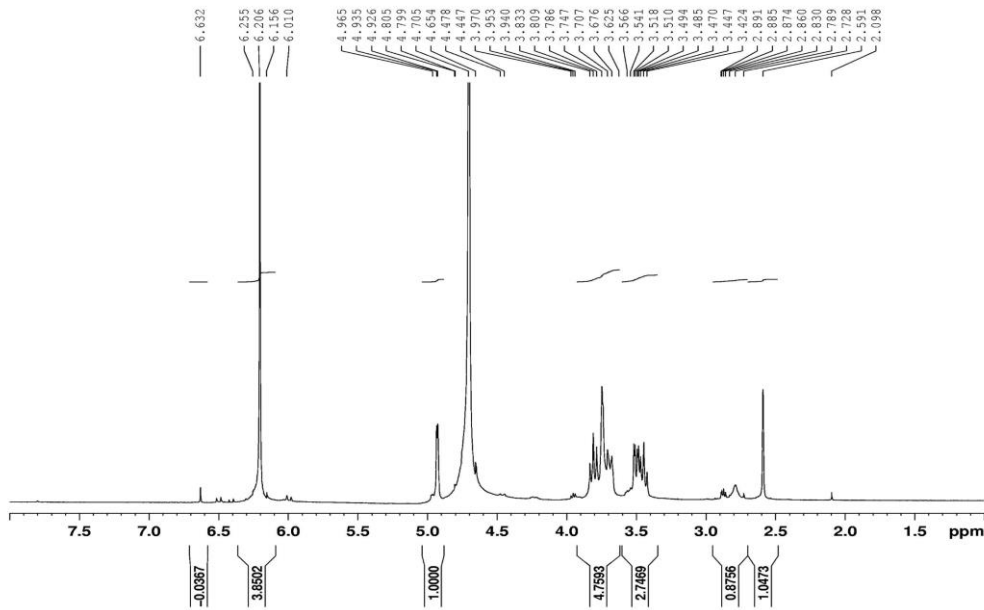
Nanosüngerin yapısı $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda belirlenen kimyasal kayma (ppm) değerleriyle açıklanmaktadır. Şekil 4.8.'de gösterilen $^1\text{H NMR}$ spektrumunda kimyasal kayma (ppm) değerleri incelenerek nanosüngerin yapısı hakkında bilgi edinilmiştir.

β CD'nin kavitesinin geniş tarafında bulunan H-3 atomlarına atanan δ 3.79–3.87 ppm'de pikler gösterir. Ek olarak, δ 4.69 ppm'de H-1 atomlarına (boşluğun dışında, H-4 ve H-2 atomları arasında bulunan) atanan pik görülmektedir. Ayrıca, H5, H6' ve H6'' atomları için örtüşen rezonanslar δ 3.76–3.74 ppm'de bulunur [110, 111]. Maleik anhidritin protonları, δ 6.26-6.20 ppm arasında geniş bir çiftli piktir. Bu simetrik pik, çift bağın hidrojenlerinden kaynaklanır [112-114].



Şekil 4.7. βCD yapısının sandalye konformasyon gösterimi.

Maleik anhidrit ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosüngerlerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 4.8.'de görülmektedir. Bu nanosüngerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda, betasiklodekstrine ait karakteristik sinyaller ve maleik anhidritin sinyalleri gözlemlenebilir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda δ 6.20 ppm'deki rezonans için MA yapısından söz edilirken; δ 4.65 ppm ve δ 3.85-3.50 ppm'deki pikler için βCD yapısına bağlı olarak gözlenmektedir.



Şekil 4.8. βCD-MA nanosünger yapısının $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

DMSO-d6 çözücüsü içinde 25 ± 0.1 °C

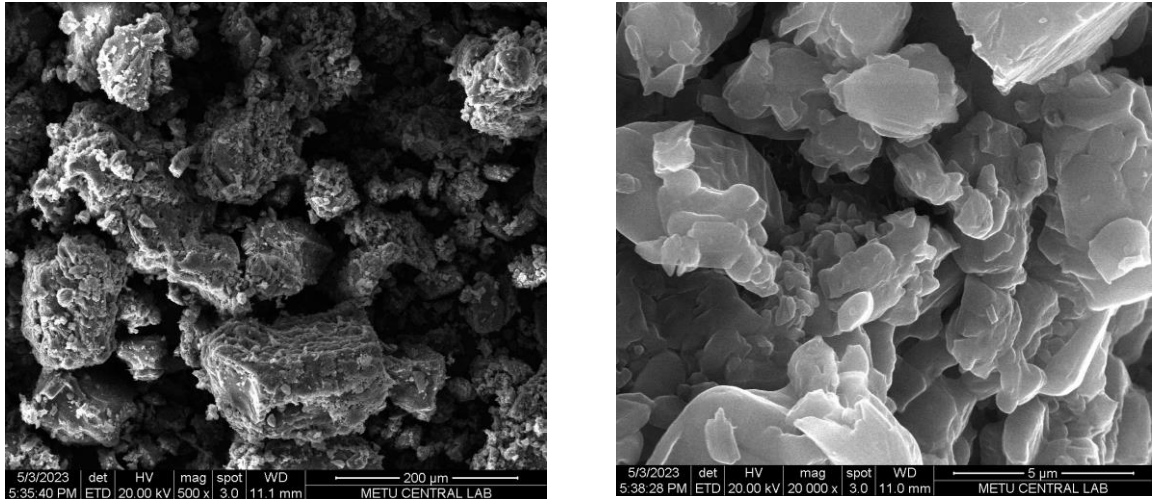
Bu sonuçlar, MA'nın βCD yapısına eklenmesi nedeniyle beklenen kimyasal modifikasyonun etkili şekilde meydana geldiğini kanıtlar niteliktedir. $^1\text{H-NMR}$ analizi,

MA'nın β CD zincirine başarılı bir şekilde bağlandığını ve nanosüngerin istenen özelliklerini kazandığını doğrulamaktadır.

4.1.4. β CD-MA Nanosünger Yapıya Ait Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu analizi (SEM) Elektron Mikroskopi Laboratuvarında Quanta 400F Field Emission SEM mikroskobu ile ölçüm yapılmıştır. Sentez ile elde edilen nanosünger malzemelerin yüzey niteliklerinin araştırılması, polimer karakterizasyonu için büyük bir öneme sahiptir.

Hazırlanan maleik anhidrit ile sentezlenen β CD temelli nanosüngerlerin yüzey gözenekliliği hakkında bilgi edinebilmek amacıyla SEM mikrografları alınmıştır. Farklı büyütme kullanılarak elde edilen görüntüler Şekil 4.9.'da sunulmuştur. Görsel olarak SEM görüntüleri, ağ yapının neden olduğu gözenekler hakkında bilgi vermektedir. Mikrograflar incelendiğinde yüzeylerde gözenek ve porlar görülmektedir. SEM görüntülerine bakıldığında nanosünger malzemedeki ağı yapının dağılımı izlenmektedir. Nanosüngerlerin düzenli ve eşit şekilde dağıldığı ve partikül şekillerinin oval şekil aldığı görülmektedir. Poroz yüzeyleri ve yüzey alanlarının genişliği nanosüngerlerin gözenek ve boşluklarından kaynaklıdır.



Şekil 4.9. β CD-MA nanosünger yapısının SEM görüntüsü.

Şekil 4.9. incelendiğinde, nanosüngerin moleküler yapısı ve gözenekleri net şekilde görülmektedir. SEM görüntüleri, nanosüngerin içyapısını göstermektedir ve gözeneklerin homojen dağılımı görülebilir. Nanosüngerin etkin ilaç taşıma kapasitesine katkı sağlayan, gözenekler arasındaki düzenli mesafe, maksimum yüzey alanını sağlar.

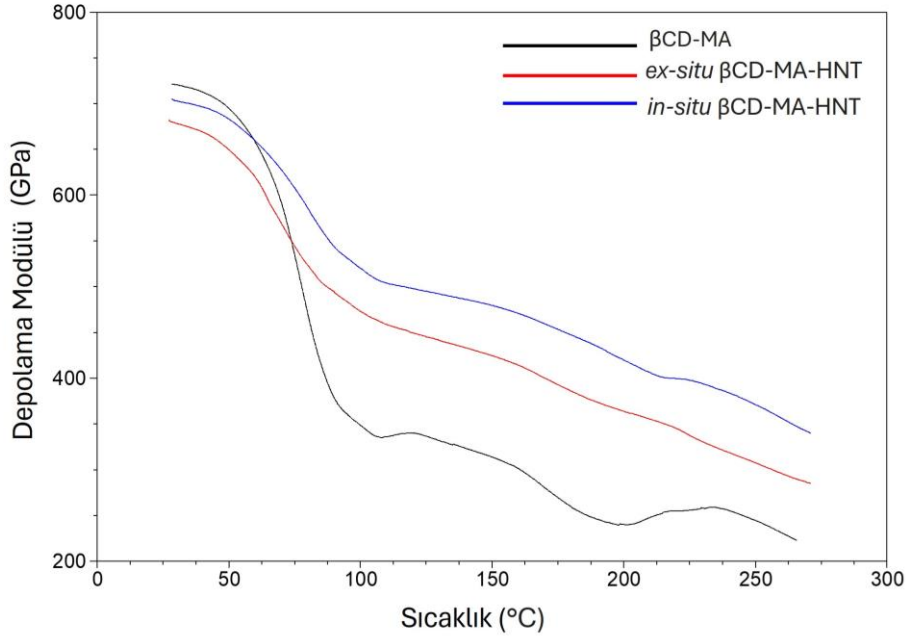
4.1.5. β CD-MA Nanosünger ve HNT Katkılı Nanosünger Yapılara Ait Dinamik Mekanik Analiz (DMA)

Materyalin veya yapısal sistemdeki karakteristik davranışın zamanla değişimini inceleyen bilimsel teknik olan Dinamik Mekanik Analiz, önemli bir karakterizasyon aracıdır. Bu analiz, materyalin mekanik niteliklerini zaman, frekans veya sıcaklık gibi değişkenlere bağlayarak belirler [115]. Sentezlenen maleik anhidrit ile sentezlenen betasiklodekstrin temelli nanosüngerlerin ve bu nanosüngerlerin halloysit kil ile katılanmış formlarının dinamik mekanik analizi yorumlanmıştır.

Depolama Modülü (SM)-Sıcaklık eğrisi, bir materyalin sıcaklıkla birlikte depolama modül değerinin nasıl değiştiğini gösterir. Elde edilen verilere göre, depolama modülü, incelenen malzemenin elastik veya viskoelastik özelliklerini tanımlayan bir değerlendirmedir.

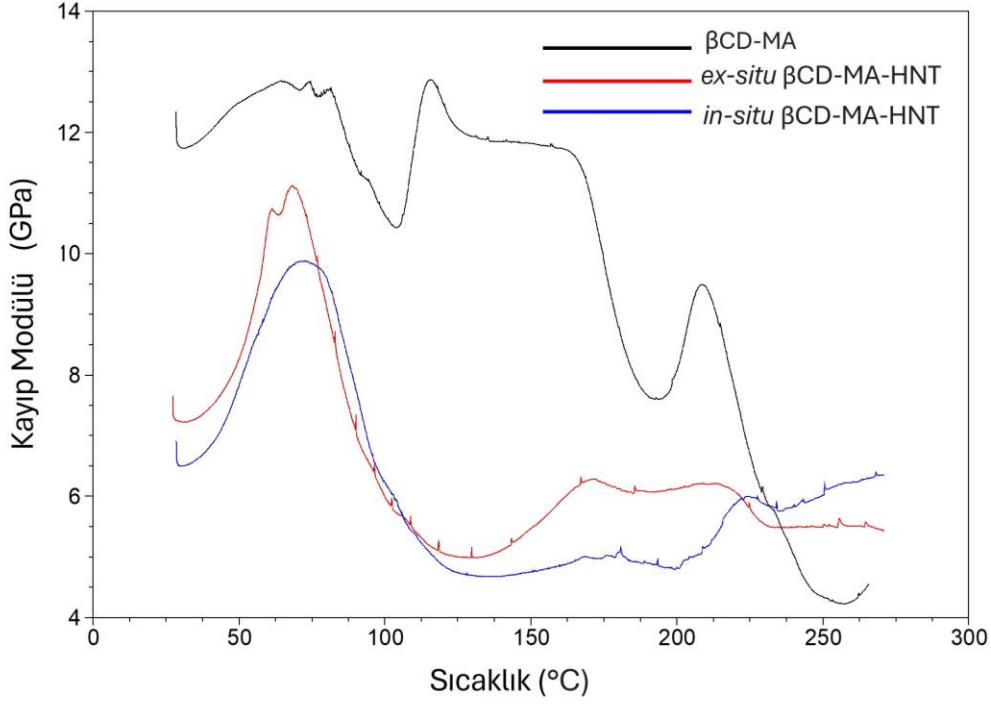
Buna göre, Şekil 4.10.'daki β CD-MA nanosüngere ait depolama modülü-sıcaklık eğrisi değerlendirildiğinde grafiğin düşük sıcaklıklarda başlayan kısmı, malzemenin camsı geçiş sıcaklığının altında bulunmaktadır. Bu bölge, malzemenin katı durumda olduğu bölgedir. Sıcaklığın artışıyla depolama modülünün düştüğü gözlemlenmektedir. Bu, polimerin yavaş yavaş formunun değiştiğini ve sıcaklığın etkisiyle sertliğinin değiştiğini göstermektedir. Nanosünger için SM'de (T_g1) 78.0 °C sıcaklığa gelindiğinde depolama modülünün hızla düşme eğilimi gösterdiği görülmektedir. Burada, polimer zincirlerinin esnekliklerini arttırarak malzemenin esnek davranış gösterdiği bir durum söz konusudur. Depolama modülünün daha yüksek sıcaklıklarda daha da düşük değerlere sahip olmaya başladığı görülmektedir, bu da malzemenin katı formunun değiştiğini ve malzeme sertliğinin bozulduğunu göstermektedir. Daha yüksek sıcaklıklarda, depolama modülü daha fazla düşmeye başlamıştır. Bu bölge, malzemenin sıcaklık arttıkça termal hareketliliğinin artması ve moleküler düzeninin bozulmasıyla ilişkilendirilebilir ve (T_g2) değeri olarak 114 °C'de bu anlatılanlar gerçekleşir. Nanosünger polimerik malzeme zincirleri arasındaki bağlar zayıflar ve malzeme daha dayanıksız hale gelir.

Nanosünger yapıya halloysit kil katkısı yapıldığında oluşan yeni nanokompozitler için ısıl dayanımın azaldığı gözlemlenmiş olup ve *ex-situ* örnek için SM'de (T_g1) 64.9 °C iken *in-situ* örnek için (T_g1) 80.5 °C olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10. βCD-MA nanosünger yapının ve HNT katkılı nanosünger yapıların Depolama Modülü (SM) (GPa)-Sıcaklık (°C) grafiği.

Şekil 4.10.'daki SM grafiğinde, düşük sıcaklıklarda başlayan bölge incelenirse, malzemenin katı halde olduğu ve depolama modülünün genellikle yüksek olduğu bölge görülmektedir. Bu, malzemenin sıcaklık düşüken genellikle katı bir yapıya sahip olduğunu ve mekanik dayanıklılığının yüksek olduğunu göstermektedir. *In-situ* yöntemle HNT katkılı nanosünger malzemeye bakılırsa, HNT katkısız nanosünger gibi düşük sıcaklıklarda depolama modülü yine yüksektir, katı bir yapıyı göstermektedir. Ancak, camsı geçiş sıcaklığına (T_g) yaklaştıkça, depolama modülü daha yavaş bir hızda düşer ve HNT katkısız nanosünger göre daha yüksek bir değerde sabit kalır. Bu malzemenin, elastik özelliklerinin daha uzun süre korunduğunu ve daha yüksek bir sıcaklığa kadar katı bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. *In-situ* yöntemle HNT katkılı nanokompozitin yüksek sıcaklıklarda, depolama modülü, HNT katkısız nanosüngerden daha yüksek bir değerde kalır ve daha yavaş bir şekilde düşer. Bu, halloysit katkısının malzemenin termal kararlılığını artırdığını ve moleküler yapıların daha uzun süre dayanıklı kaldığını göstermektedir. Sonuç olarak, Depolama Modülü (SM)-Sıcaklık grafiği halloysit katkılı nanosüngerin, sıcaklık artışına karşı daha dayanıklı olduğunu ve elastik özelliklerini daha uzun süre koruduğunu göstermektedir.

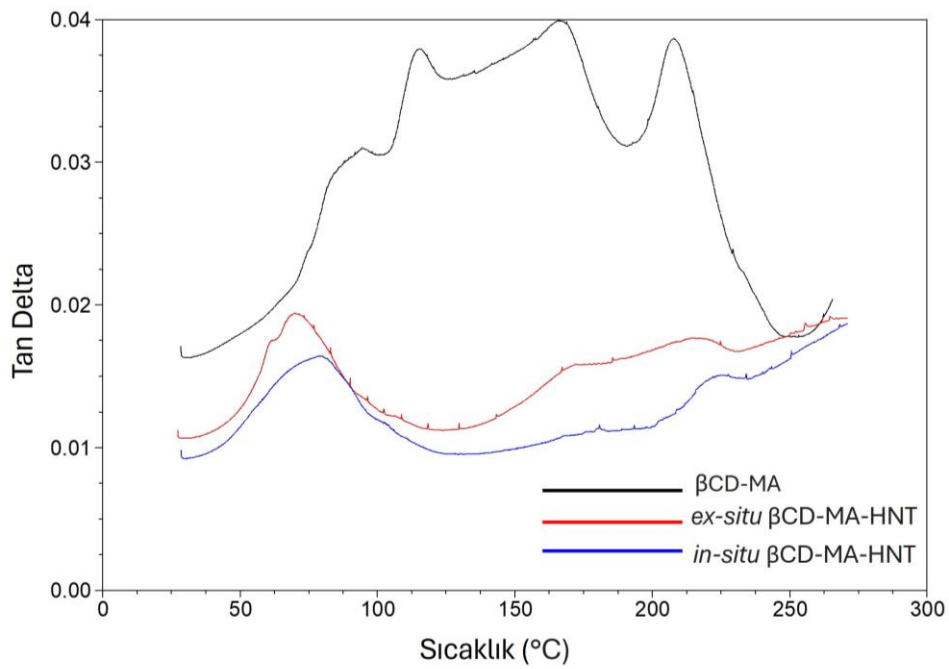


Şekil 4.11. βCD-MA nanosünger yapının ve HNT katkılı nanosünger yapıların Kayıp Modülü (LM) (GPa)-Sıcaklık (°C) grafiği.

Nanosüngerlere ait sıcaklık-kayıp modül (LM) eğrisi değerlendirildiğinde ısıl geçişler Şekil 4.11.'deki grafikten incelenmiştir. βCD-MA nanosünger için (Tg1) değeri 74.5 °C olarak bulunmuştur. Bu nanosüngere ait (Tg2) LM'de 114 °C'de kuvvetli pik göz önüne alınarak belirlenmiştir. Yapılara halloysit kil eklendiğinde ise *in-situ* ve *ex-situ* örnekler için oluşturulan grafikler hemen hemen benzer özellikler göstermektedir. *Ex-situ* örnek için LM'de (Tg1) 68.6 °C civarlarındaki şiddetli geçiş, aynı şekilde *in-situ* örnekte LM'de (Tg2) 72.5 °C'de kendini göstermiştir. Yüksek sıcaklıklarda gözlenen geçişler, nanosüngerin bozunma sıcaklıklarına ait geçişler olarak yorumlanmıştır.

HNT katkısız nanosüngerin düşük sıcaklıklarda kayıp modülü (LM) yüksektir. Bu, malzemenin viskoz bir karaktere sahip olduğunu ve sıcaklık arttıkça deformasyon direncinin arttığını gösterir. Sıcaklık arttıkça, kayıp modülü düşmeye başlar. Bu, malzemenin viskoz özelliklerinin sıcaklık artışıyla birlikte azaldığını ve daha az deformasyon direncine sahip olduğunu göstermektedir. Yüksek sıcaklıklara gelindiğinde, kayıp modülü daha da düşmüştür ve belirgin bir şekilde azalmıştır. Bu da, malzemenin daha sıcak ortamlarda daha da viskoz hale geldiğini ve deformasyona daha fazla yatkın olduğunu göstermektedir.

In-situ yöntemle HNT katkılı nanosünger yapı için ise, düşük sıcaklıklarda HNT katkısız nanosüngerden daha düşük bir kayıp modülüne sahip olduğu görülmektedir. Bu da, HNT katkısının malzemenin viskoz özelliklerini artırdığını ve daha düşük sıcaklıklarda daha sert bir yapı sağladığını göstermektedir. Ancak, sıcaklık arttıkça, kayıp modülü daha yüksek bir hızda azalmıştır. Bu, halloysit katkısının malzemenin viskoz özelliklerini sıcaklık arttıkça daha hızlı bir şekilde etkilediğini göstermektedir. Yüksek sıcaklıklarda, kayıp modülü HNT katkısız nanosüngerden daha düşük bir seviyede kalır. Bu, katkısız nanosüngerden daha termal olarak kararlı olduğunu bir göstergesidir.



Şekil 4.12. β CD-MA nanosünger yapının ve HNT katkılı nanosünger yapıların Tan δ -Sıcaklık grafiği.

Nanosüngere ait Şekil 4.12.'deki Tan δ -Sıcaklık eğrisi incelendiğinde sıcaklık artışı ile maksimum pikler gözlemlenmiştir. Nanosünger için Tg değeri Tan δ -Sıcaklık kullanılarak bulunmaktadır. Bu nedenle nanosünger için tan δ (Tg1) değeri 94.3 °C ve (Tg2) değeri 114.7 olarak bulunmuştur. HNT katkılı nanosünger yapılara bakıldığında *in-situ* ve *ex-situ* örnekler burada da benzer özellikler göstermektedir. Bu yapıların (Tg1) değeri ise birbirine yakın olarak tan δ *ex-situ* örnek için 70.1 °C ve *in-situ* örnek için 80.6 °C civarı olarak bulunmuştur.

Buna göre, HNT katkısız nanosünger için düşük sıcaklıklarda malzemenin viskozite özelliklerinin belirgin olmadığını veya termal olarak kararlı olduğunu göstermektedir. Sıcaklık arttıkça, $\tan\delta$ değerleri artmaya başlar. Bu da malzemenin sıcaklık arttıkça içsel sürtünme ve viskozite özelliklerinin arttığını ve belirgin termal geçişlere doğru ilerlediğini gösterir. Camsı geçiş sıcaklığına gelindiğinde, $\tan\delta$ hızla artar ve malzemenin moleküler düzeydeki düzeni bozulmaya başlamıştır. Yüksek sıcaklıklarda $\tan\delta$ değerinin yüksek değerlerde olduğu ve daha da artış gösterdiği görülmektedir. Bu da, malzemenin sıcaklık artışıyla birlikte daha fazla içsel sürtünme ve viskozite özellikleri sergilediğini ve belki de termal çöküş veya erime gibi belirgin termal olaylar olduğunu göstermektedir.

HNT katkılı nanosünger için grafik incelendiğinde, düşük sıcaklıklarda, $\tan\delta$ değeri HNT katkısız nanosüngere göre daha düşük seyrederek. Bu durum, katkı malzemesi olan HNT'nin viskozite özelliklerini azalttığını veya termal olayların daha yüksek sıcaklıklara ertelendiğini göstermektedir. Ancak, sıcaklık artışıyla yine burada $\tan\delta$ değeri artış gösterir. Daha yüksek sıcaklıklara gelindiğinde, HNT katkılı nanosünger, HNT katkısız nanosüngere göre daha düşük bir seviyede $\tan\delta$ değerleri gösterir ve daha yavaş şekilde artar. Bunun nedeni olarak, katkının malzemenin içsel sürtünme özelliklerini azalttığı ve erime gibi belirgin termal olayların başlangıcını geciktirdiği söylenebilmektedir.

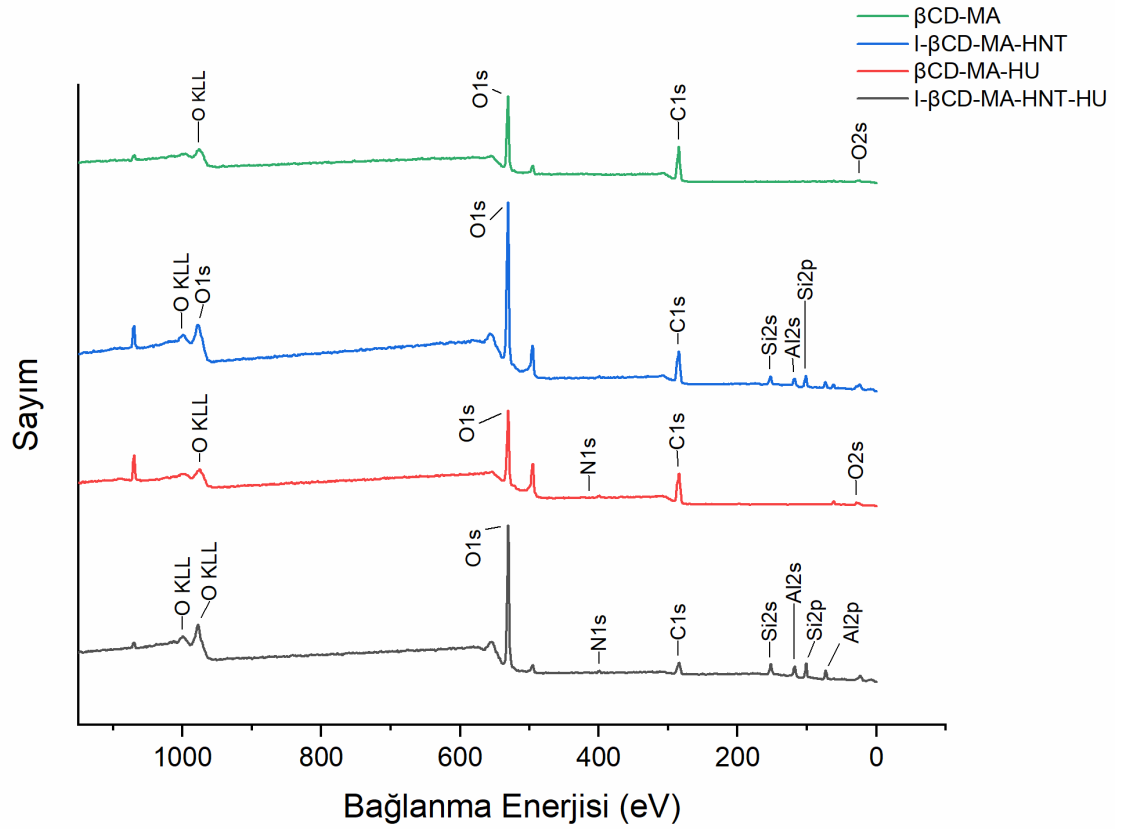
Çizelge 4.2. β CD-MA, E- β CD-MA-HNT ve I- β CD-MA-HNT yapılarına ait SM, LM ve $\tan \delta$ eğrilerinde gözlenen sıcaklık geçişleri

Numune \ Sıcaklık (°C)	SM (Tg1)	SM (Tg2)	LM (Tg1)	LM (Tg2)	Tan δ (Tg1)	Tan δ (Tg2)
β CD-MA	78.0	114	74.5	114	94.3	114
E- β CD-MA-HNT	64.9	-	68.6	-	70.1	-
I- β CD-MA-HNT	80.5	-	72.5	-	80.6	-

4.1.6. β CD-MA Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) Analizi

Maleik anhidrit ile sentezlenmiş betasiklodekstrin temelli nanosünger, bu nanosüngerin ilaç konjuge yapısı, HNT katkısının *in-situ* yöntemle yapıldığı nanosünger yapı ve bunun ilaç konjuge yapısının yüzey özelliklerinin belirlenmesi adına X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi, katı yüzeylerin kimyasal etkileşimi ve elementel analizi hakkında bilgi toplamak için kullanılmıştır.

XPS spektrumu ile β CD-MA nanosünger yapı ve türevlerine bakıldığında oksijen (O), karbon (C), azot (N), silisyum (Si) ve alüminyum (Al) elementlerinin kimyasal bağlanma enerjileri ölçülerek oluşturulmuş grafik Şekil 4.13.'te değerlendirilmiştir.

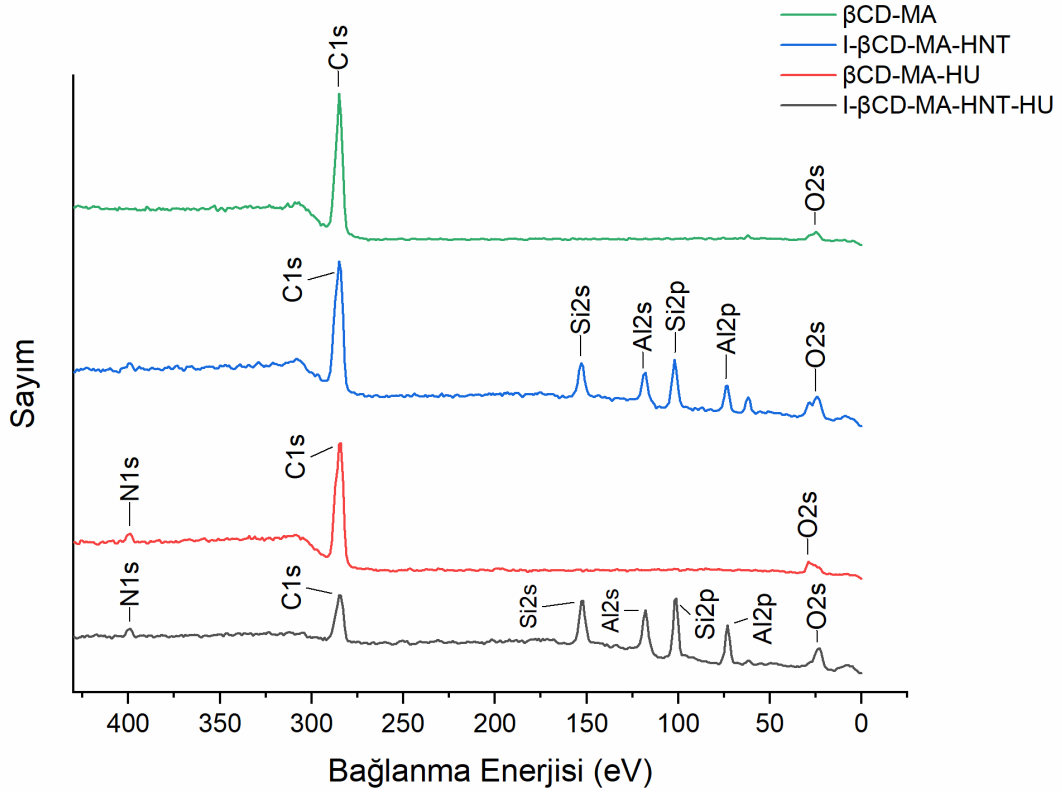


Şekil 4.13. β CD-MA nanosünger ve *in-situ* yöntemle HNT katkılı nanosünger ve nanosünger-ilaç konjugatlarına ait XPS genel taraması.

Betasiklodekstrin yapısının maleik anhidrit ile bağlandığını ve bu nanosünger yapının HNT ile olan nanokompozit yapının elde edildiğini ve ayrıca tüm bu yapıların ilaç ile konjuge yapı oluşturduğunu kanıtlamak için XPS analizi gerçekleştirilmiştir. β CD-MA nanosünger için XPS analizinde C1s elementinin 285 eV'ta % 52.1 olması, ana

bileşenin karbon olduğunu göstermektedir. Bu da β CD bazlı nanosüngerin yapısının büyük ölçüde karbon içerdiğini belirtmektedir. 530 eV'ta O1s elementinin % 42.8 olması ise betasiklodekstrin ve maleik anhidrit moleküllerinin içerdiği oksijen atomlarından kaynaklanmaktadır. XPS analizinde düşük yüzde oranında Na1s pikinin gözükmesi, sentez sırasında kullanılan NaOH'tan kaynaklandığı düşünülmüştür.

In-situ yöntem ile HNT katkısı sağlanan nanosüngerlerde ise oksijen oranı β CD-MA nanosüngere göre artmış ve kendini 530 eV'ta % 51.4 oranında O1s piki ile göstermiştir. Yapıdaki karbon C1s piki ile 286 eV'ta % 31.7 değeri ile görülmektedir. Yapıya katılan halloysit, 119 eV'ta % 4.50 oranındaki Al2p ve 102 eV'taki % 6.50 oranında Si2p pikleri ile anlaşılmaktadır.



Şekil 4.14. β CD-MA nanosünger ve *in-situ* yöntemle HNT katkılı nanosünger ve nanosünger-ilaç konjugatlarına ait 0-400 eV arası XPS taramasının büyütülmüş hali β CD-MA nanosüngere hidroksiüre katkısı sağlanmasıyla elde edilen yapıda gözlenen pikler 285 eV'ta % 52.1 oranında C1s piki, 530 eV'ta % 42.1 ile O1s piki, 430 eV'ta % 3.50 oranında N1s piki ve % 2.30 oranında Na1s pikleridir. Bu pikler nanosünger yapının ana taşıma oluşturan betasiklodekstrinde ve konjuge ilaç yapısı hidroksiürede

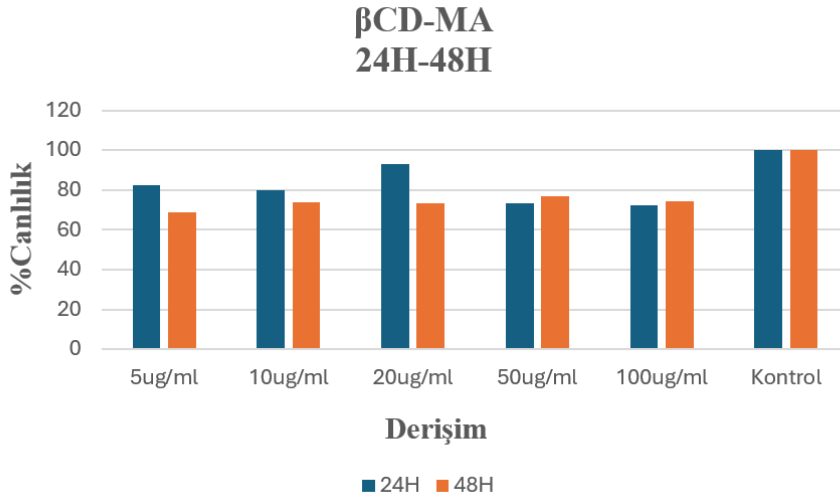
bulunan karbon atomlarına ve oksijen atomlarına atfedilirken, azot elementinin verdiği pik hidroksiüre yapısının nanosünger yapı ile bağ kurduğunu göstermektedir.

Son olarak *in-situ* yöntem ile elde edilen HNT-nanosünger yapı ile ilaç konjugasyonundan oluşan bu yeni yapının XPS piklerine bakıldığında 530 eV'ta O1s piki % 60.8 oranında görülmektedir ki bu da β CD, HNT ve HU yapısında bulunan oksijen atomlarına işaretir. 285 eV'taki C1s piki % 16.9 ile β CD ve HU yapısındaki karbon atomlarına atfedilebilir. XPS piklerine bakıldığında Si2p ve Al2p pikleri sırasıyla 100 eV'ta % 10.8 ve 74 eV'ta % 8.80 olarak görülmektedir ve HNT yapısının nanosünger yapıyla etkileştiğini kanıtlar niteliktedir. Nanosünger yapıya giren hidroksiürenin yapısındaki azot, Şekil 4.14.'te kendini 400 eV'ta % 1.10 oranında N1s piki ile göstermiştir.

4.1.7. Sitotoksisite Deneyleri

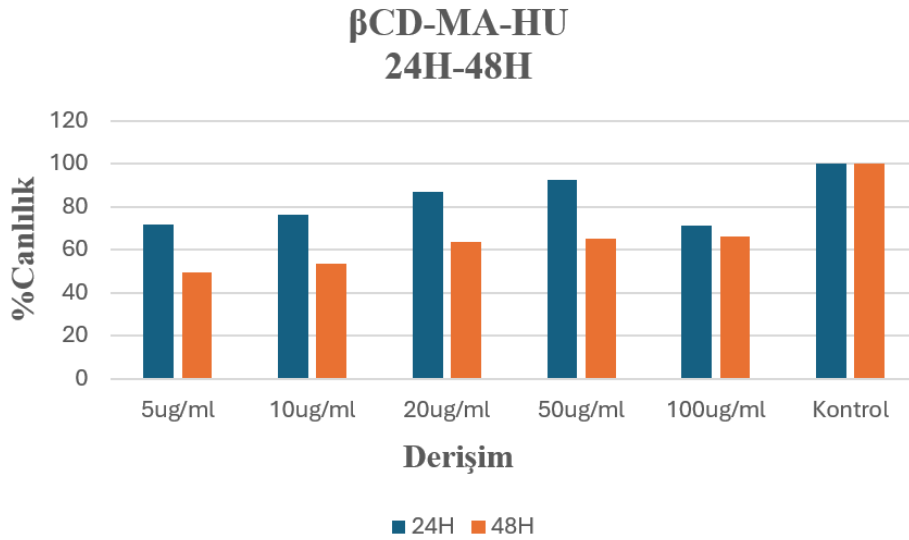
İlaç konjugasyonu sağlanmamış ve ilaç konjugasyonu sağlanmış *in-situ* yöntem ile HNT katkılı ve HNT katkısız nanosünger yapıların karşılaştırılması amacıyla ilaç içeren numunelerin çözeltisi, farklı derişimlerde (5, 10, 20, 50, 100 µg/mL) hazırlanmış ve insan embriyonik böbrek (HEK293) hücrelerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksisite etkileri araştırılmıştır [116].

Buna göre, Şekil 4.15.'te görüldüğü üzere henüz ilaç konjuge edilmemiş βCD-MA nanosünger yapıda hücre canlılığı değerleri kontrol grubunun hücre canlılığıyla neredeyse benzer değerlere sahip olduğu görülmüştür. Hücelere inkübe edilen nanosünger çözeltisinin derişimi artsa dahi hücre canlılığında fazla bir düşüşe sebep olmadığı söylenebilmektedir. Nanosünger çözeltisinin 24 saatlik inkübasyondaki 20 µg/mL derişim değerinde kontrol grubuna en yakın değeri göstermesiyle sitotoksik etki göstermediği anlaşılmaktadır. Nanosünger çözeltisinin 48 saatlik inkübasyonundaki en yüksek derişim olan 100 µg/mL'de hücreler %74 oranında canlı kalmıştır. Bu sonuçlar, nanosünger yapının toksik etkisinin bulunmadığı, biyolojik sistemde olumsuz bir yan etkisinin olabildiğince en aza indirgendüğünü gösterir niteliktedir.



Şekil 4.15. βCD-MA NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği

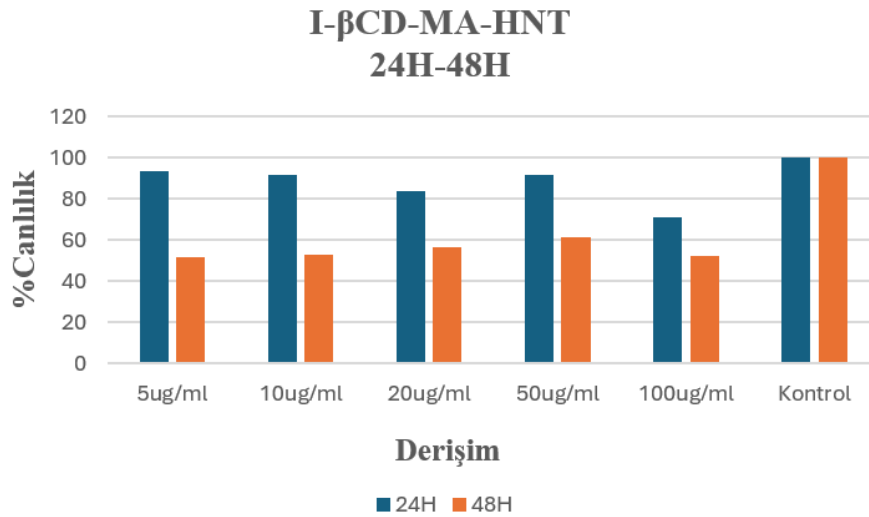
Şekil 4.16.'daki verilere göre, nanosünger-ilaç konjugatının hücre canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. β CD-MA-HU yapısı HEK293 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresinde, ilacın hücrelere fazla bir etkisi olmamıştır. Ancak, bu süre boyunca 100 μ g/mL derişimde hücrelerle etkileşimin iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Hem 24 saat hem de 48 saatlik inkübasyon süresi boyunca, nanosünger-ilaç konjugatı hücre canlılığı üzerinde benzer ve kontrol grubuna göre olumlu sonuçlar vermiştir. Ayrıca, 48 saatlik inkübasyon süresinde, hücre ile etkileşim süresinin artmasıyla birlikte ilacın hücrelerle etkileşiminde % canlılık değerlerinde bir azalma gözlemlenmiştir. Grafik incelendiğinde, 48 saatlik inkübasyon süresi için, nanosünger-ilaç konjugatının derişiminin artmasına rağmen hücre canlılığının neredeyse benzer değerler gösterdiği görülmüştür. 48 saatlik inkübasyonda 100 μ g/mL konsantrasyonda hücreler % 64 oranında canlılıklarını kaybetmişlerdir. Bu durum 48 saat uygulamada düşük konsantrasyonların oldukça etkin bir canlılık baskılayıcı özellik gösterdiği sonucunu vermektedir.



Şekil 4.16. β CD-MA-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği

Halloysit katkısı gerçekleştirilen maleik anhidrit ile sentezlenen betasiklodekstrin bazlı nanosünger yapılar için hazırlanan farklı derişimlerdeki I- β CD-MA-HNT çözeltileri hazırlanmış ve farklı sürelerde hücreler ile inkübasyon çalışması yapılmıştır. Buna göre Şekil 4.17.'de derişime karşı % canlılık grafiği verilmiştir. Sonuçlar, 24 saatlik inkübasyonda nanosünger-HNT yapının derişimi arttıkça % canlılık değerlerinin düştüğü ve 48 saatlik inkübasyonun tüm derişimlerde benzer % canlılık değerleri gösterdiği ve buna göre kontrol grubuna kıyasla her iki inkübasyon süresi için 48 saatlik inkübasyonda % canlılık değerlerinin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

24 saatlik inkübasyon süresinde, nanosünger-HNT yapının derişimi arttıkça % canlılık değerlerinin düşmesi, nanosüngerlerin hücrelerle etkileşimlerinin artmasıyla ilişkilidir. 48 saatlik inkübasyonda süresinde 100 μ g/mL konsantrasyonda hücreler % 48 oranında baskılanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla her iki inkübasyonda % canlılık değerlerinin daha düşük olması, uzun süreli inkübasyonun hücreler üzerinde daha belirgin bir etkiye sahip olmasıyla ilişkilidir.

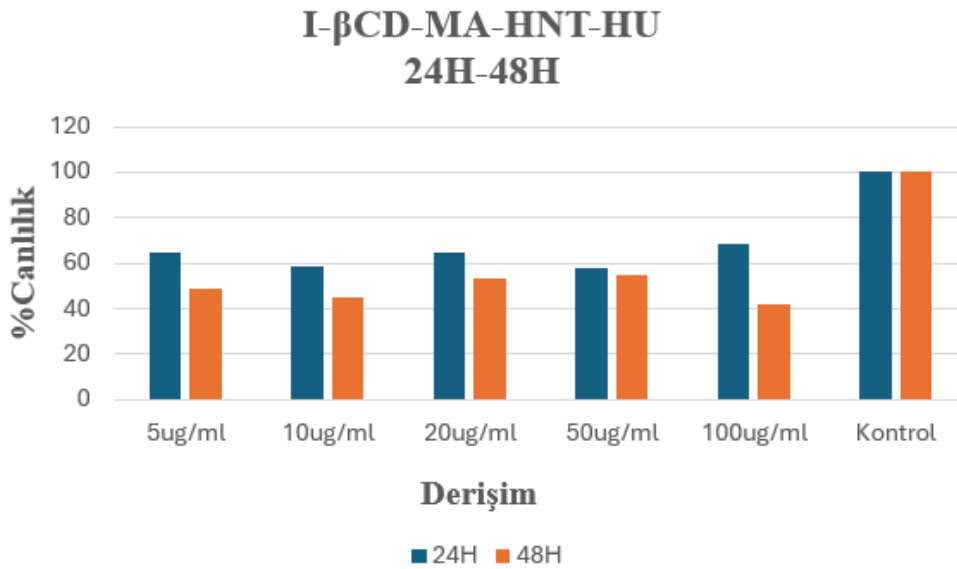


Şekil 4.17. I- β CD-MA-HNT NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği

HNT katkılı nanosünger yapının ilaç ile konjugasyonundan oluşan yapılarla farklı derişimlerde hazırlanan çözeltileri için 24 saat ve 48 saat HEK293 hücre çalışmaları gerçekleştirilmiş ve bu sonuçlar doğrultusunda derişime karşı % canlılık grafiğı Şekil 4.18.'de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre, derişim arttıkça % canlılık değerlerinde bir düşüş gözlemlenmiş ve % canlılığın en düşük olduğu nokta, 48 saatlik inkübasyon süresindeki 100 µg/mL derişimde tespit edilmiştir. 48 saatlik inkübasyonda süresinde 100 µg/mL konsantrasyonda hücreler % 58 oranında baskılanmıştır.

Her iki inkübasyon süresinde de hücrelerin canlılıklarını kaybettiğı gözlenmiş, ancak 48 saatlik inkübasyon süresinin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bu durum, hücrelerin uzun süreli maruziyeti sonucunda HNT-NS-ilaç konjugatının daha belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

İlaç konjuge edilmemiş yapıya kıyasla, ilaç konjuge edilmiş yapıda % canlılık değerlerinin daha düşük çıkması, hidroksiürenin hücreler üzerinde etkin şekilde çalıştığını ve bu etkinin HNT katkısı sonucunda daha da güçlendiğini işaret eder niteliktedir. Bu bulgular, HNT-NS-ilaç konjugatının kanser hücrelerine yönelik potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.



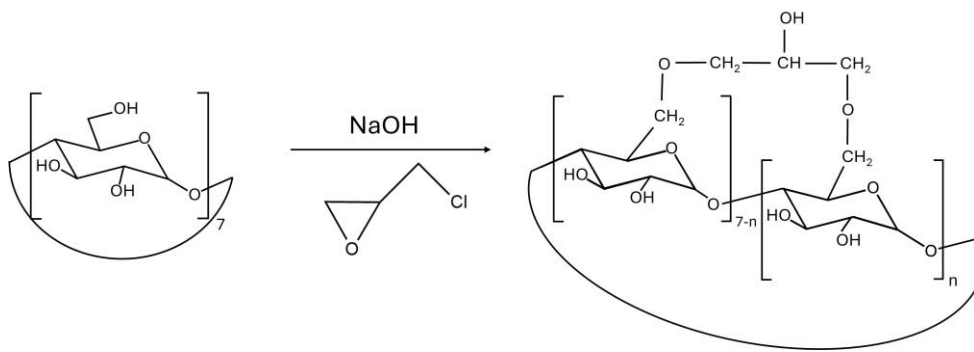
Şekil 4.18. I-βCD-MA-HNT-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiğı

4.2. β CD-EPI Nanosüngerin, HNT Katkılı Nanosüngerin ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapıların Karakterizasyonları

Tez çalışmasının bu kısmında, epiklorohidrin ile sentezlenen β -siklodekstrin temelli nanosüngerin, halloysit ile katkılı nanosüngerin ve bu yapıların ilaç konjugasyonundan elde edilen yapılarının detaylı karakterizasyonunu amaçlanmıştır. Attenuated Total Reflection-Fourier Dönüşümü Kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi, Termogravimetrik Analiz (TGA), Proton Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$), Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) gibi çeşitli karakterizasyon teknikleri, bu yapıların kimyasal ve yapısal özelliklerini anlamamıza ve ilaç konjugasyonunun bu yapılar üzerindeki etkilerini değerlendirmemize olanak sağlayacaktır. Bu çalışma, nano ölçekteki bu yapıların biyomedikal uygulamalarda potansiyel kullanımını değerlendirmek için önemli bir adım olabilir.

4.2.1. β CD-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi

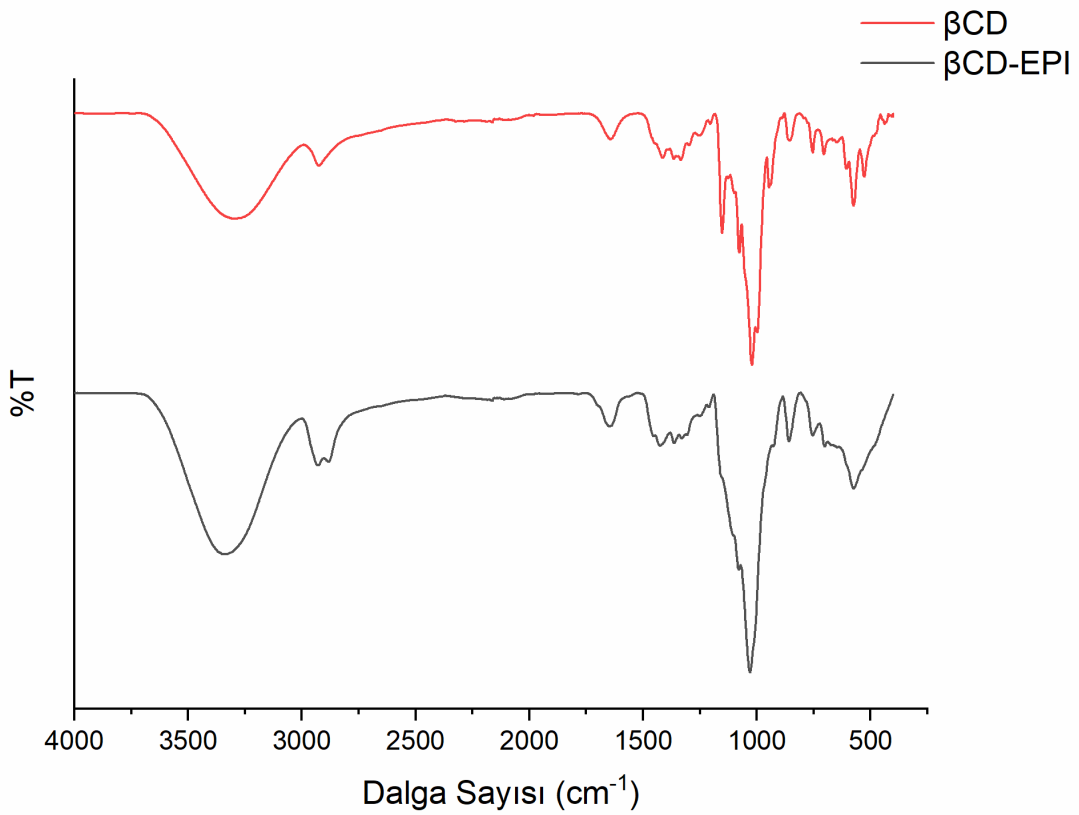
Bağlama ajanı olarak sıkça kullanılan bir yapı olan epiklorohidrin, endüstriyel ve bilimsel alandaki araştırmalarda geniş kullanım alanına sahiptir. Tez çalışmasının bu aşamasında, β CD ve epiklorohidrinin bazik ortamdaki tepkimesi Şekil 4.19.'da verilmiş ve FTIR spektroskopisi kullanılarak epiklorohidrin- β CD temelli nanosüngerlerin yapısal ve kimyasal özelliklerine olan etkisi değerlendirilmiştir.



Şekil 4.19. β CD ile EPI'nin bazik ortamdaki reaksiyon gösterimi [117].

EPI'nin spesifik piklerini gösteren FTIR spektrumu Ekler kısmında Şekil 1.'de verilmiştir. EPI'nin karakteristik pikleri 1288.36 cm^{-1} , 1266 cm^{-1} , 1249.79 cm^{-1} ve 721.33 cm^{-1} dalga sayısında görülen $\text{CH}_2\text{-Cl}$ bandındaki sallanma titreşimler ve $800\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen şiddetli pik olarak C-Cl bağ gerilmesinden oluşmaktadır [118, 119].

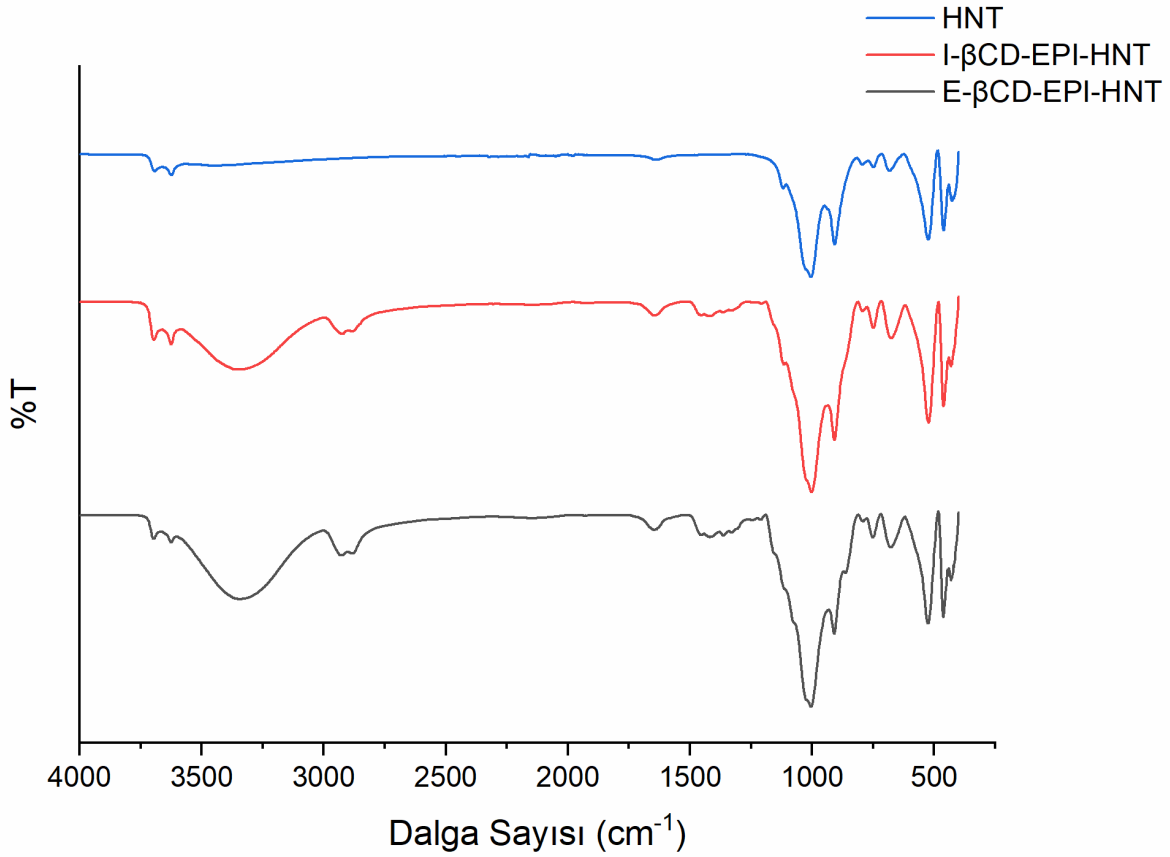
Şekil 4.20.'de görüldüğü üzere β CD-EPI nanosüngerlerinin FTIR spektrumları C-C bağ titreşimleri için 1038 cm^{-1} ve C-O bağ titreşimleri için 1091 cm^{-1} 'de ve C-O-C asimetrik gerilme titreşimi 1164 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. $-\text{CH}_2$ için titreşim bandı 2876 cm^{-1} 'de gözlenirken bu pik değişimlerinin EPI ile β CD molekülleri arasında bağ kurulduğunu kanıtlar niteliktedir. 2900 cm^{-1} 'lerde EPI'nin alifatik zincir piki gözlenmektedir. β CD'deki alifatik zincir pikinin nanosünger spektrumundaki pikte artması ve değişime uğraması -C-O-C- eterik grubun değişiminden kaynaklıdır. Nanosünger için 800 cm^{-1} civarında gözlenen pik ise epiklorohidrin yapısındaki C-Cl bağlarına ait gerilmelerden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.20. β CD ve β CD-EPI NS'e ait FTIR spektrumları.

Nanosünger ile HNT etkileşmesi sonucunda elde edilen nanokompozit malzemenin Şekil 4.21.'de verilen FTIR spektrumlarında nanosünger FTIR spektrumlarında çıkan piklere ek olarak, HNT yapısından kaynaklanan 3695 cm^{-1} ve 3620 cm^{-1} 'de Al-OH gruplarına ait iç yüzeyde bulunan hidroksil gruplarının (-OH) gerilmesi görülmektedir. 1120 cm^{-1} ve 1005 cm^{-1} gözlenen pikler halloysitin düzlem için Si-O-Si gerilmeleri ve 905 cm^{-1} 'deki pik içerideki Al-OH gruplarının O-H deformasyon bandından

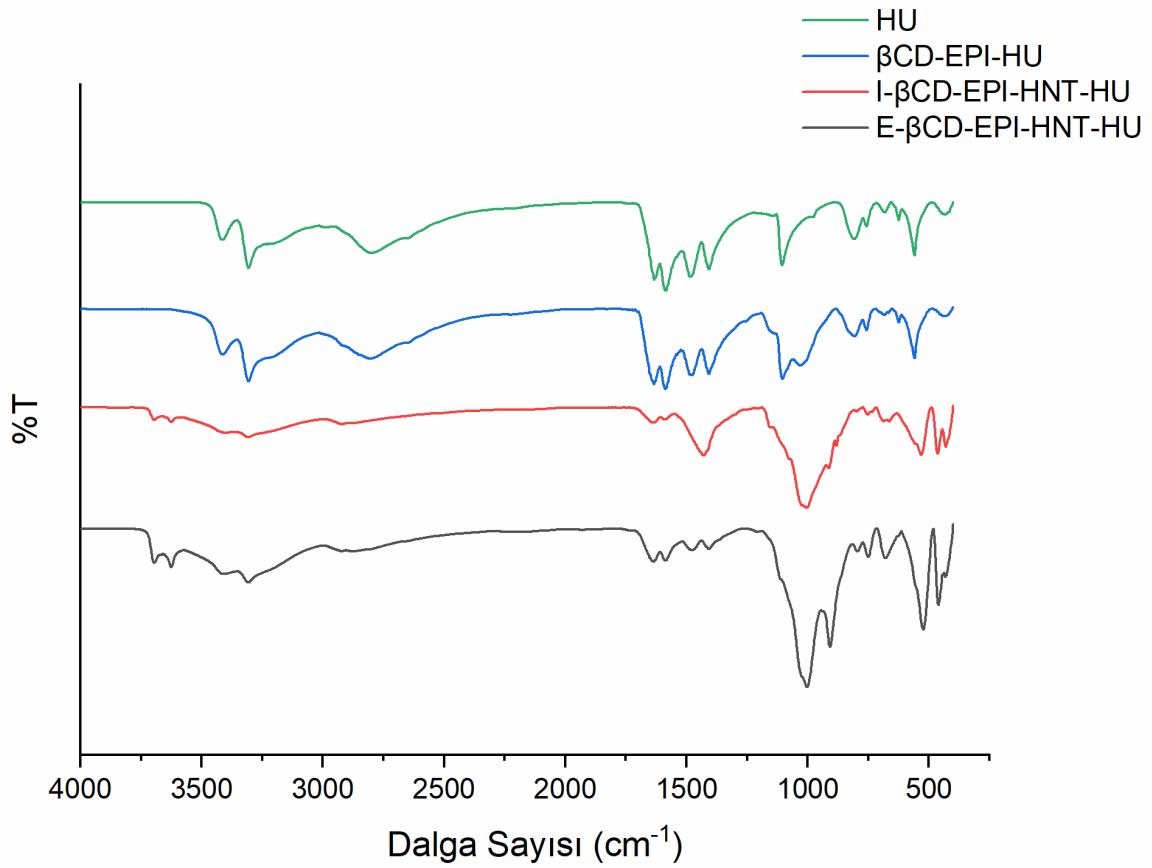
gelmektedir. *In-situ* ve *ex-situ* yöntemle sentezlenen nanosünger-HNT kompozitleri için FTIR spektrumlarında büyük farklar gözlenmemiştir.



Şekil 4.21. HNT, I-βCD-EPI-HNT ve E-βCD-EPI-HNT NS'e ait FTIR spektrumları

Şekil 4.22.'de hidroksiüre konjuge edilen yapılara ait spektrumlarında ise epiklorohidrin ile sentezlenen betasiklodekstrin nanosünger yapıda gözlenen spektrumlara ek olarak hidroksiüreye ait en spesifik bantlar olan 3314 cm^{-1} -NH bağımlı işaret eden gerilmeye ait pikler gözlenmiştir. Hidroksiüreye ait 1641 cm^{-1} (amid 1, C=O bağı), 1596 cm^{-1} (amid 2'nin deformasyon titreşimleri) gözlenmiştir. 3700 cm^{-1} ve 3600 cm^{-1} 'de görülen pikler halloysit yapısındaki Si-OH ve Al-OH ve ayrıca su çıkışları ile oluşan hidrojen bağlarından kaynaklanan hidroksil gruplarına atfedilmiştir. $3400\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pikler, molekül içi ve moleküller arası amid, amin grupları ve OH grupları arasında oluşan kuvvetli hidrojen bağlarına ait titreşimlere aittir. 1110 cm^{-1} 'de gözlenen şiddetli pikler -C-O-C- eterik gruplarının gerilmelerine aittir. 1600 cm^{-1} 'de gözlenen pikler ise C=O karbonil grubuna ait bağ titreşimlerine atfedilir. Ayrıca HU için gösterilen spektrumdaki 3000 cm^{-1} civarında gözlenen pikin nanosüngerlerin spektrumlarındaki

şiddetinin azalması, etkileşimin hidroksiüreye ait amin veya amid grubundan olduğunu göstermektedir.

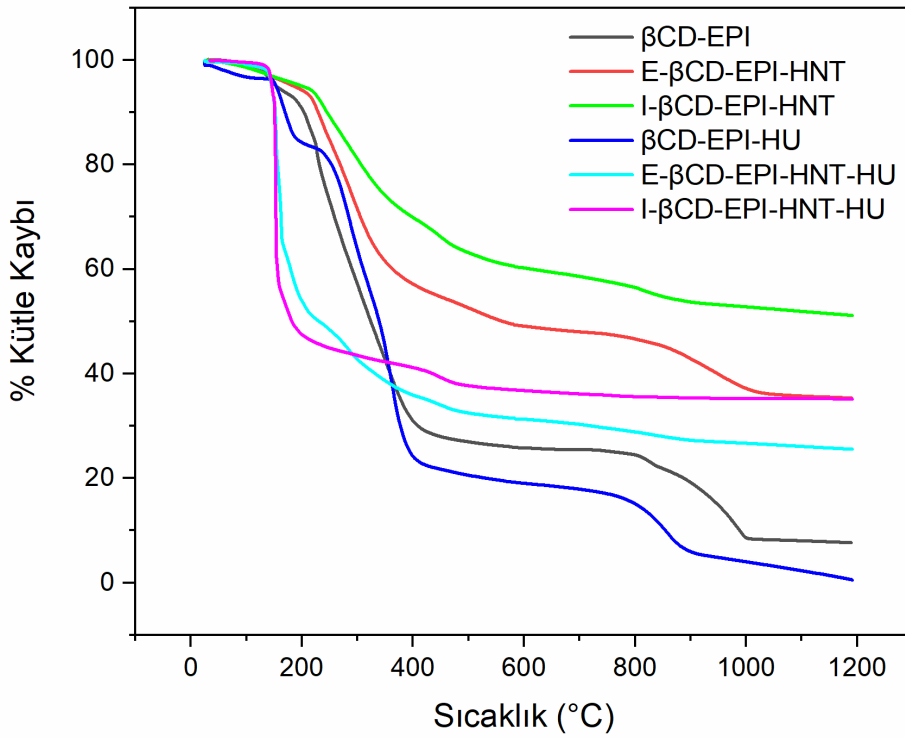


Şekil 4.22. HU, β CD-EPI-HU, I- β CD-EPI-HNT-HU ve E- β CD-EPI-HNT-HU NS'e ait FTIR spektrumları

4.2.2. β CD-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Termal Analiz (TGA)

Nanosüngerlerin termal kararlılığını aydınlatmak için sentezlenen β CD-EPI numunelerin TGA termogramları incelendi ve Şekil 4.23.'te gösterilmiştir. Termogramda görüldüğü üzere, β CD-EPI-NS malzemenin termal bozunma başlangıcı 200 °C'de gözlenmiştir. Fakat bundan önce 93 °C civarında kütlede çok küçük bir azalma yaşanmıştır bu da nemden kaynaklanan su moleküllerinin kütle kaybına atfedilebilir. β CD-EPI-NS malzeme için esas kütle kaybının yaşandığı sıcaklık 300 °C olarak gözlenmektedir. 300 °C sıcaklığa gelindiğinde β CD-EPI nanosünger toplam kütesinin kütlece % 55'ini kaybetmektedir. 870 °C sıcaklığa gelindiğinde nanosünger

yapı kütesinin kütlece % 83'ünü kaybetmiştir ve yapının burada termal bozunmaya uğradığı söylenebilir.



Şekil 4.23. βCD-EPI nanosüngerin, βCD-EPI-HNT nanosünger yapının ve nanosünger-ilaç konjuge yapıya ait termogramlar

Öte yandan, βCD-EPI nanosünger yapısına HNT yapının katılmasıyla termal bozunma başlangıç sıcaklığı 216 °C civarlarına çıkmıştır. Hem *in-situ* hem de *ex-situ* deneysel yöntemlerle HNT katkısı yapılan nanosünger örnekleri için, ana kütle kaybı sıcaklığı 220 ile 760 °C arasındadır ve burada kütlece % 37.0'lik bir kayıp görülmektedir. HNT katkılı nanosüngerlerde termal dayanım halloysitten kaynaklanmaktadır.

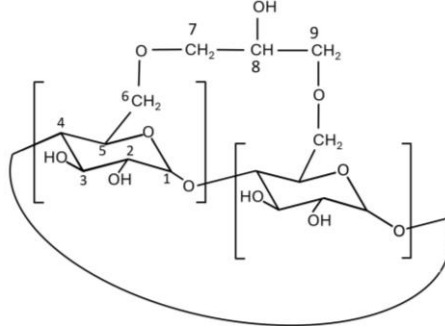
Nanosünger yapılarına hidroksiüre eklendiğinde HNT katkısız nanosünger yapı daha uzun sürede bozunurken, kil yapının eklendiği yapıların bozunması ise daha kısa sürede gerçekleşmiştir. Halloysit katkısız nanosünger-ilaç konjuge yapı ilk bozunma basamağını 230 °C'de gösterir ve 400 °C'lere gelindiğinde nanosünger yapı kütlece % 77.0'lik kısmını kaybetmiştir. Halloysit katkılı nanosünger yapı ile hidroksiüre konjugasyon oluşturduğunda ise 138 °C'de kütlece % 3.00'lük ilk kütle kaybı yaşanır ve bu kütle kaybı 257 °C'ye gelindiğinde kütlece % 53.0'lük bir kayıp ile kendisini takip eder. 740 °C'lere gelindiğinde yapı tamamen bozunmuş ve kütlece kalan % 30.0'lük kısmı sadece karbon kalıntıları oluşturmaktadır.

Çizelge 4.3. β CD-EPI NS, HNT katkılı NS ve bu nanosüngerlerin ilaç konjugatlarının Sıcaklık (°C) - % Kütle Kaybı değerleri

Sıcaklık (°C) - %Kütle Kaybı										
Numune	100 °C	200 °C	300 °C	400 °C	500 °C	600 °C	700 °C	800 °C	900 °C	1000 °C
β CD-EPI	0.91	9.21	42.8	69.0	73.1	74.2	74.6	75.6	80.8	91.4
β CD-EPI-HU	3.30	15.8	36.2	75.8	79.5	81.0	82.1	84.9	94.1	96.0
I- β CD-EPI-HNT	1.51	5.00	19.0	31.1	36.9	39.8	41,4	43.5	46.3	47.2
I- β CD-EPI-HNT-HU	0.52	52.5	56.5	58.9	62.34	63.3	63.9	65.0	64.7	64.8
E- β CD-EPI-HNT	1.12	46.0	28.55	42.9	47.4	50.9	52.0	53.4	57.2	62.9
E- β CD-HNT-EPI-HU	0.92	52.5	57.3	64.1	67.5	68.7	69.7	97.2	72.8	73.4

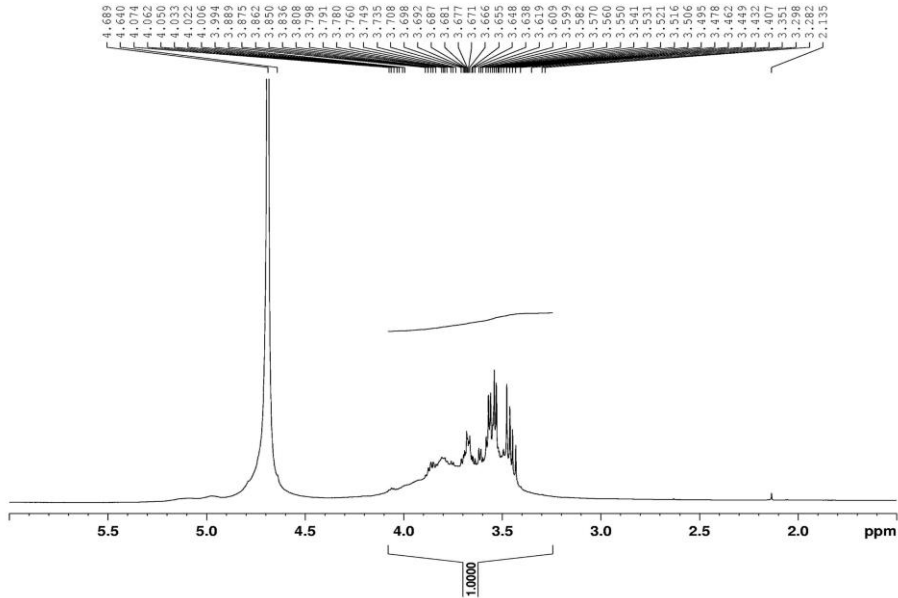
4.2.3. β CD-EPI Nanosünger Yapıya Ait $^1\text{H-NMR}$ Analizi

Nanosünger bileşenin ve β CD içeriğinin tespitinde $^1\text{H-NMR}$ spektrumu kullanılmıştır. Şekil 4.25.'teki gösterimde, δ 3.3 ppm ile δ 4.5 ppm arasındaki çoklu pikler görülmektedir.



Şekil 4.24. β CD-EPI nanosünger yapısı

Geniş olarak gözlenen pikler, ağ yapısındaki zincirlerin C-7, 8 ve 9'a ait protonlar ile β CD yapısında bulunan piranoz halkalarının C-2, 3, 4, 5 ve 6'sından gelen protonlara atfedilmektedir. δ 4.68 ppm'de gözlenen tek pik β CD'deki glikozların C-1 protonuna aittir. EPI'den gelen pikler δ 3.3 ppm ve δ 4.5 ppm arasındaki hidrojenlerden görülmektedir [120, 121].

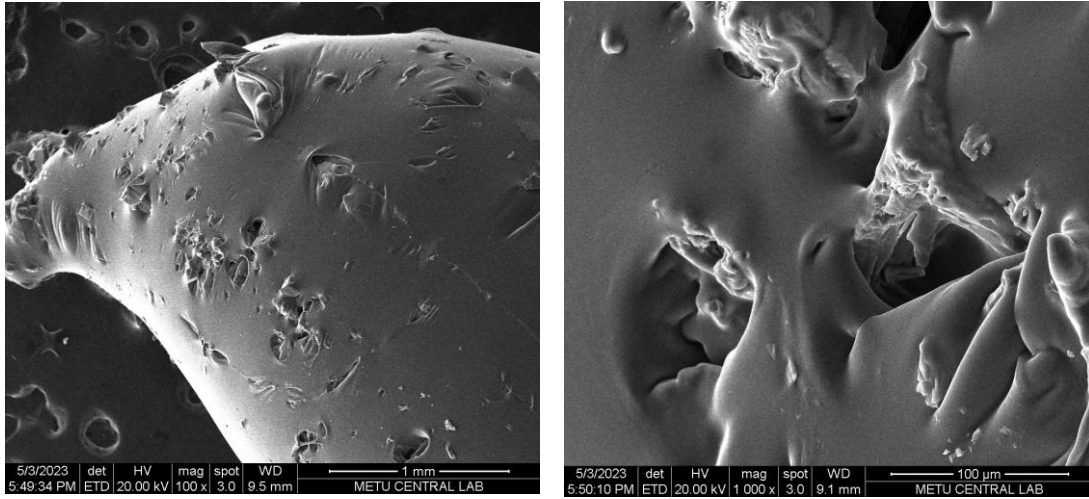


Şekil 4.25. EPI ile sentezlenmiş β CD bazlı nanosüngerlerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

DMSO-d6 çözücüsü içinde 25 ± 0.1 °C

4.2.4. β CD-EPI Nanosünger Yapıya Ait Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

β CD-EPI-NS için yüzey morfolojisi SEM tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Epiklorohidrin ile sentezlenen nanosünger yapıların yüzey dokularını, gözenekliliğini, porozitelerini ve boyutlarını görüntülemek için bu teknik kullanılmıştır.



Şekil 4.26. EPI ile sentezlenen β CD bazlı nanosüngerlerin SEM görüntüleri.

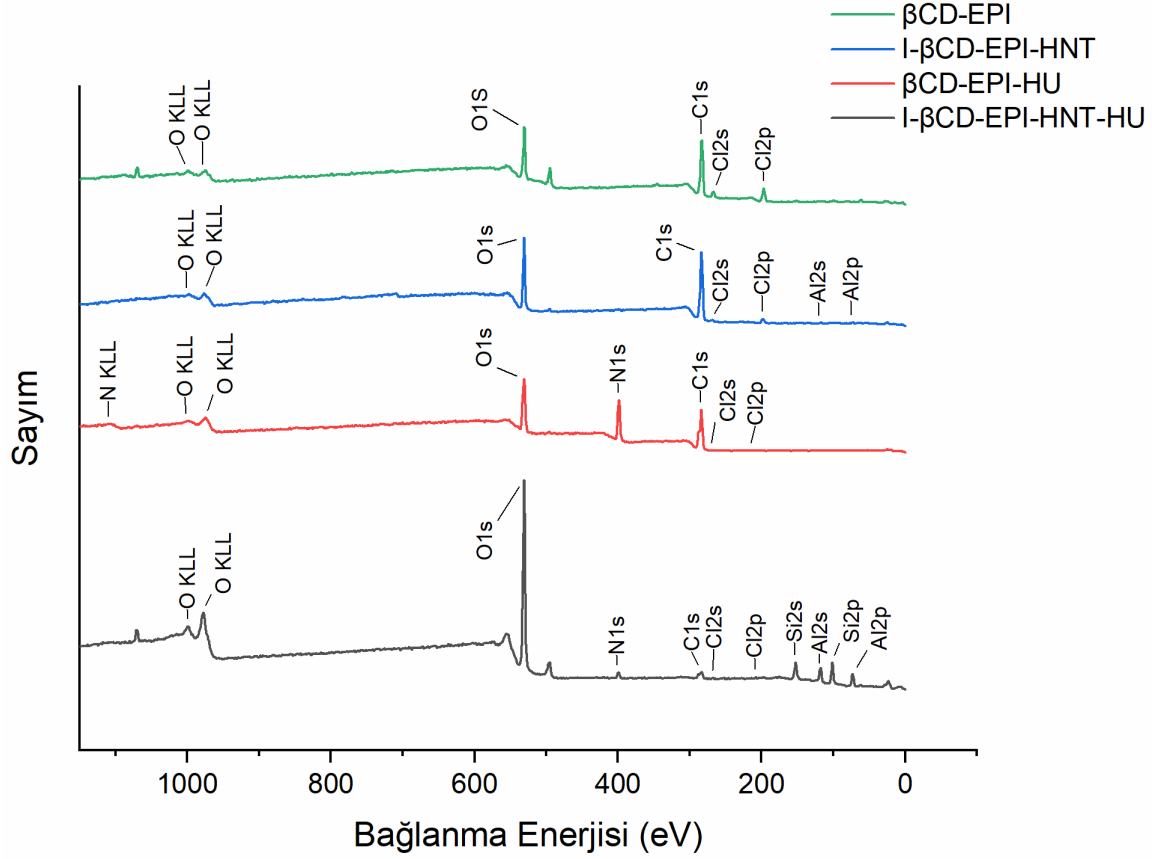
Şekil 4.26.'da gösterilen β CD-EPI-NS, çeşitli birden fazla β CD yapısını içeren bir yapıya sahiptir ve dolayısıyla yapı açısından incelendiğinde gözenekli bir görüntü sunar; ayrıca düzgün bir şekli vardır. Pürüzsüz yapısı SEM görüntülerinde göze çarpmaktadır, bu durum üç boyutlu polimer ağlarının bulunduğunu kanıtlar niteliktedir.

4.2.5. β CD-EPI Nanosüngerin, β CD-EPI Katkılı Yapıların ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait X-Işını Fotoelektron Spektroskopi (XPS) Analizi

Epiklorohidrin ile sentezlenen β CD bazlı nanosünger, *in-situ* yöntem ile elde edilen HNT-nanosünger ve bu yapıların ilaç konjusesi ile elde edilen nanomalzemelerin yüzeylerin kimyasal bağlanma ve elementel analizi hakkında bilgi edinilmek için XPS yöntemi kullanılmıştır.

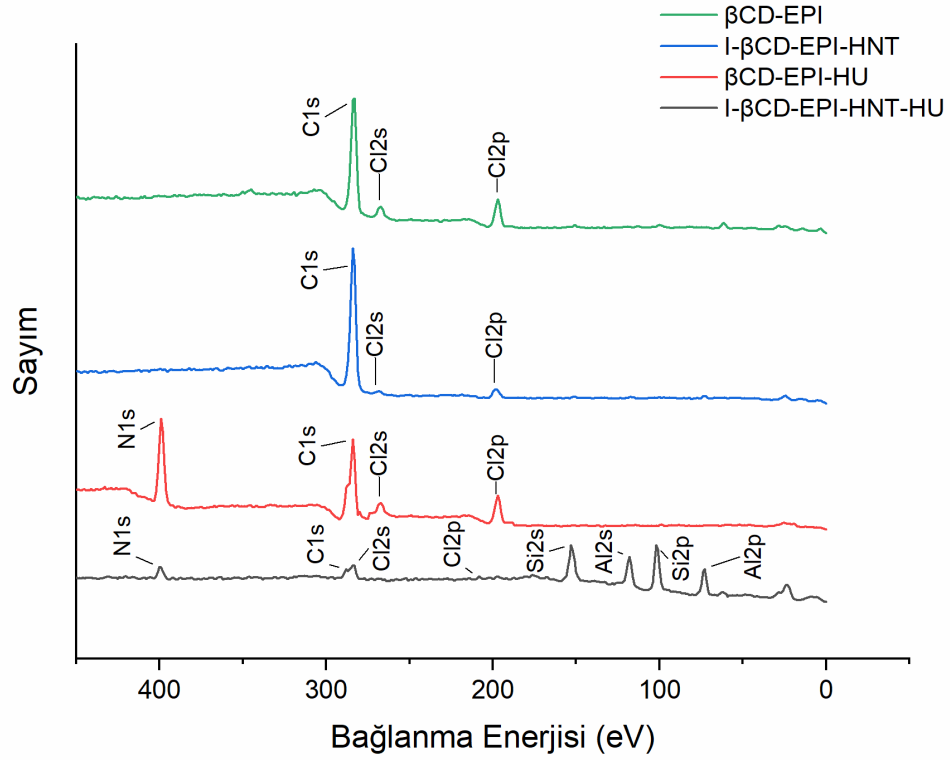
Şekil 4.27.'deki β CD-EPI nanosüngere ait pik incelendiğinde betasiklodekstrin ve epiklorohidrin yapısında bulunan karbon atomları 284 eV'ta % 65.3 oranında C1s piki ile ve hem β CD yapısındaki hem de EPI yapısındaki oksijen atomları 531 eV'ta % 24.2

oranında O1s piki ile gözlemlenmiştir. Epiklorohidrin yapısındaki klor atomları Cl2p piki ile 267 eV'ta % 4.90 oranında yapıda bulunmaktadır.



Şekil 4.27. βCD-EPI nanosünger yapıya ait ve *in-situ* yöntemle HNT katkılı nanosünger yapıya ait ve katkılı ve katkısız nanosünger yapıların ilaç konjuge durumdaki yapılarına ait XPS genel taraması.

In-situ yöntemle HNT katkılı βCD-EPI nanosüngerler için karbon C1s piki % 71.0'e artmıştır. Bu artışın nedeni olarak *in-situ* yöntem esnasında βCD yapısının EPI ile daha verimli bağlanarak daha yüksek verimde bir ağ yapıları malzeme elde edilmesi olarak ileri sürülebilir. XPS spektrumu incelendiğinde sentezlenen yapıdaki oksijen atomları O1s ile % 25.6 oranında kendini göstermektedir. HNT yapısındaki alüminyum elementi Al2p piki ile 77 eV'ta % 0.90 oranında gözlenmiştir.



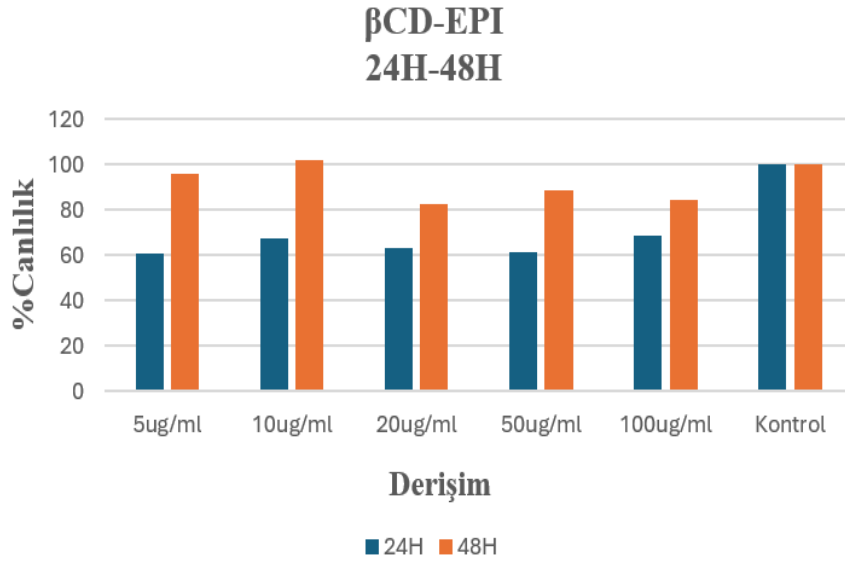
Şekil 4.28. βCD-EPI nanosünger ve *in-situ* yöntemle HNT katkılı nanosünger ve nanosünger-ilaç konjugatlarına ait 0-400 eV arası XPS taramasının büyütülmüş hali

HNT katkısız nanosüngere ilaç konjuge edildiğindeki konjugat yapısı için C1s karbon piki 284 eV'ta % 47.6, 530 eV'ta O1s oksijen piki % 26.5 ve hidroksiüre molekülündeki azottan kaynaklanan 400 eV'ta % 25.8 oranında XPS spektrumundaki pikler gözlenmektedir. Yüksek orandaki azot yüzdesinin, nanosünger malzemenin ilacı tutma yeteneğinin oldukça iyi olmasına yorumlanabilir.

HNT katkılı nanosünger nanokompozit malzemeye ilaç konjuge edildiğinde ise yapıda bulunan tüm elementlerin pikleri görülmektedir. Oksijen piki O1s ile 530 eV'ta % 63.0 oranında, halloysit kilden gelen silisyum ve alüminyum pikleri sırasıyla 102 eV'ta % 12.9 ve 73 eV'ta % 9.80 oranında, C1s karbon piki 288 eV'ta % 8.50 oranında ve hidroksiüreden gelen 400 eV'ta % 2.80 oranındaki azot N1s piki spektrumda yerini almıştır.

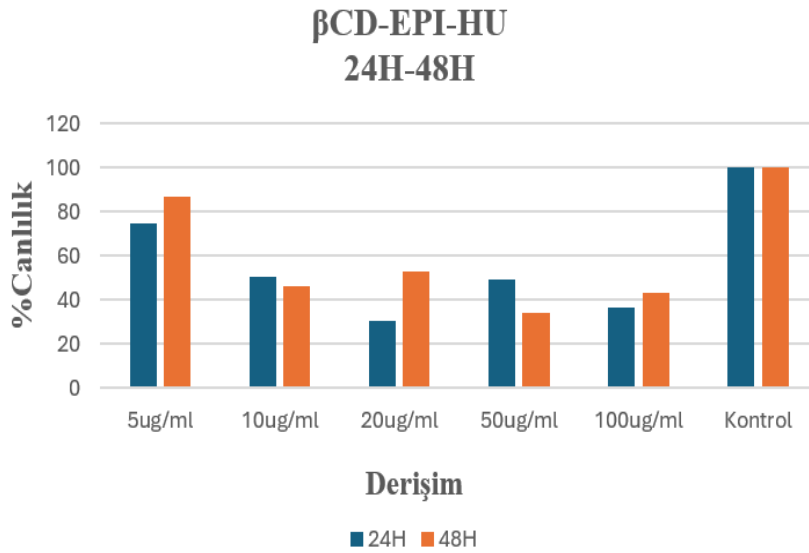
4.2.6. Sitotoksosite Deneyleri

Epiklorohidrin (EPI) ile sentezlenen betasiklodekstrin (β CD) temelli nanosüngerlerin farklı derişimlerde hazırlanan çözeltileri ile sitotoksosite deneyleri 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde gerçekleştirilmiş ve Şekil 4.29.'da bu deneyler sonucu elde edilen verilerle artan derişime karşı % canlılık grafiği verilmiştir. Grafikte görüldüğü üzere β CD-EPI nanosüngerlerin kontrol grubuna benzer canlılık değerleri, bu nanosüngerlerin biyolojik sistemde toksik etki yaratmadığını gösterir niteliktedir. 48 saatlik inkübasyonda hücreler normal çoğalma profilini devam ettirmişlerdir ve 48 saatlik inkübasyon süresinde 100 μ g/mL konsantrasyonda hücreler % 16 oranında baskılanmıştır.



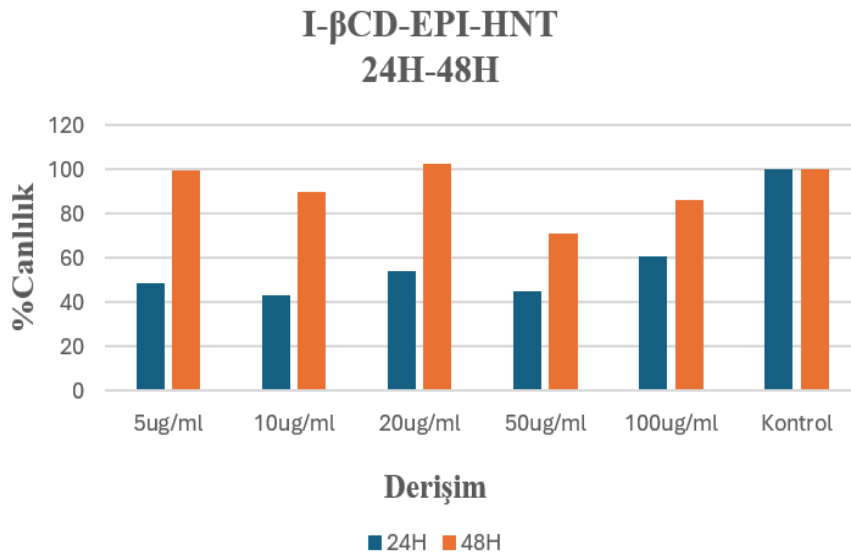
Şekil 4.29. β CD-EPI NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği

β CD-EPI nanosüngerler ile HU'nin konjugasyonundan elde edilen nanosüngerler için yapılan sitotoksite deneylerinden elde edilen sonuçlar ile Şekil 4.30.'daki artan derişime karşı % canlılık değerleri verilmiştir. Her iki inkübasyon süresinde de beklendiği üzere artan derişimle birlikte % canlılık değerleri azalmış ve hücrelerin azalan canlılık değerleri ilaç konjuge nanosünger yapının biyolojik sistemdeki etkisini anlamaya yardımcı olmuştur. En uzun süre ve en derişik ortam incelenecek olursa 48 saatlik inkübasyon süresinde 100 μ g/mL konsantrasyonda hücreler % 57 oranında baskılanmıştır. Her iki inkübasyon süresinde de benzer canlılık değerleri gözlenmiş olup derişim arttıkça hücre canlılığı değerleri azalma eğilimine gitmiştir. Bu sonuç, nanosünger-ilaç konjuge yapıdan beklenen etkinin alındığını gösterir niteliktedir.



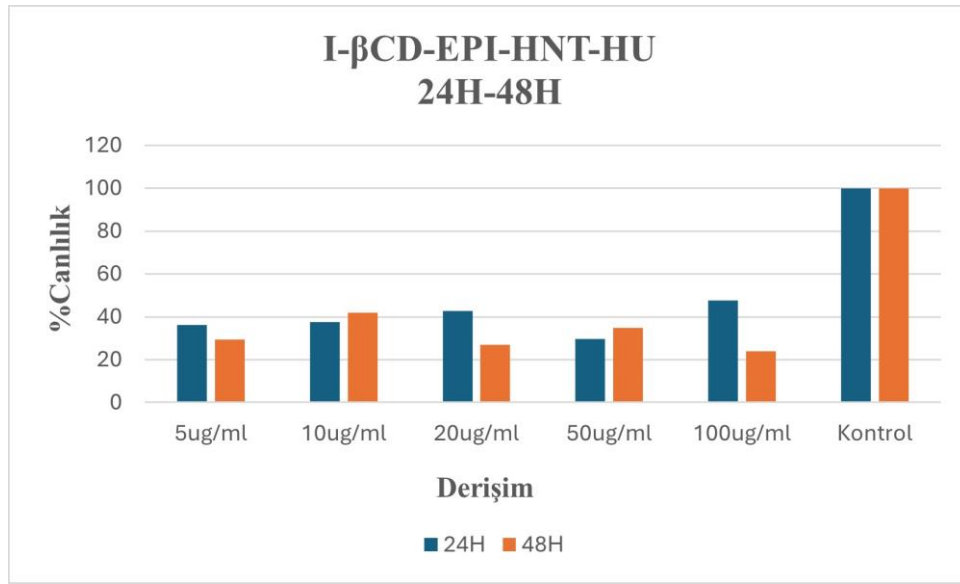
Şekil 4.30. β CD-EPI-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği

HNT katkısı ile elde edilen nanosünger yapı için gerçekleştirilen sitotoksikite çalışmalarına ait verilerle oluşturulan artan derişime karşı % canlılık grafiği Şekil 4.31.'de verilmiştir. 48 saatlik inkübasyon süresinin 24 saatlik inkübasyon süresine göre daha az toksik etki gösterdiği anlaşılmaktadır. 48 saatlik inkübasyonda artan derişimle birlikte % canlılık büyük bir değişiklik göstermemiştir Burada sadece her iki inkübasyon süresinde artan derişimle canlılıkta azalma görülmüştür, düşük derişimlerde ise kontrole yakın bir canlılık gözlemlenmiştir. En uzun süre ve en derişik ortam incelenecek olursa 48 saatlik inkübasyon süresinde 100 µg/mL konsantrasyonda hücreler % 16 oranında baskılanmıştır.



Şekil 4.31. I-βCD-EPI-HNT NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği

HNT katkılı nanosünger-ilaç konjugat yapının farklı derişimlerde hazırlanan çözeltileri ile gerçekleştirilen hücre deneylerine ait artan derişime karşı % canlılık grafiği Şekil 4.32.'de görölmektedir. Buna göre beklendiği üzere HNT-NS-ilaç konjugat yapı hücreler üzerinde öldürücü bir etki yaratmış ve inkübasyon süresinin uzamasıyla birlikte bu etki daha yüksek seviyelere gelmiştir. 24 saat ve 48 saatlik inkübasyon süreleri kıyaslandığında 48 saatlik inkübasyonda nanosünger-ilaç konjugatı hücrelere daha çok etki etmiş olup yapıya HNT'nin katılmasıyla birlikte nanosünger yapının tutabileceği ilaç molekölü arttığından, hücreler üzerinde %canlılığın daha fazla oranda düştüğü gözlenmektedir. En uzun süre ve en derişik ortam incelenecek olursa 48 saatlik inkübasyon süresinde 100 µg/mL konsantrasyonda hücreler % 76 oranında baskılanmıştır ve bu sonuç da nanosünger-HNT kompozit yapıdan istenen etkinin olduğunu göstermektedir.

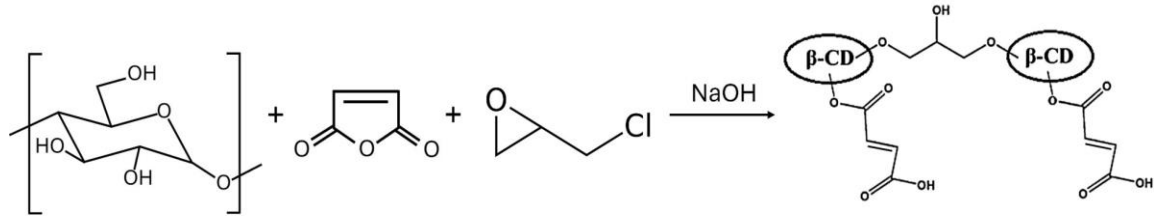


Şekil 4.32. I-βCD-EPI-HNT-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği

4.3. β CD-MA-EPI Nanosüngerin, HNT Katkılı Nanosüngerin ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapıların Karakterizasyonları

4.3.1. β CD-MA-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizi

Maleik anhidrit ve epiklorohidrinin bir arada bulunduğu ortamda betasiklodekstrin bazlı nanosüngerler elde edilmiş ve Şekil 4.33.'te bazik ortamdaki reaksiyon verilmiştir. Şekil 4.34.'te gösterilen FTIR spektrumları belirli karakteristik özellikler göstermiştir.



Şekil 4.33. β CD ile MA ve EPI'nin aynı anda bulunduğu bazik ortamdaki reaksiyon gösterimi.

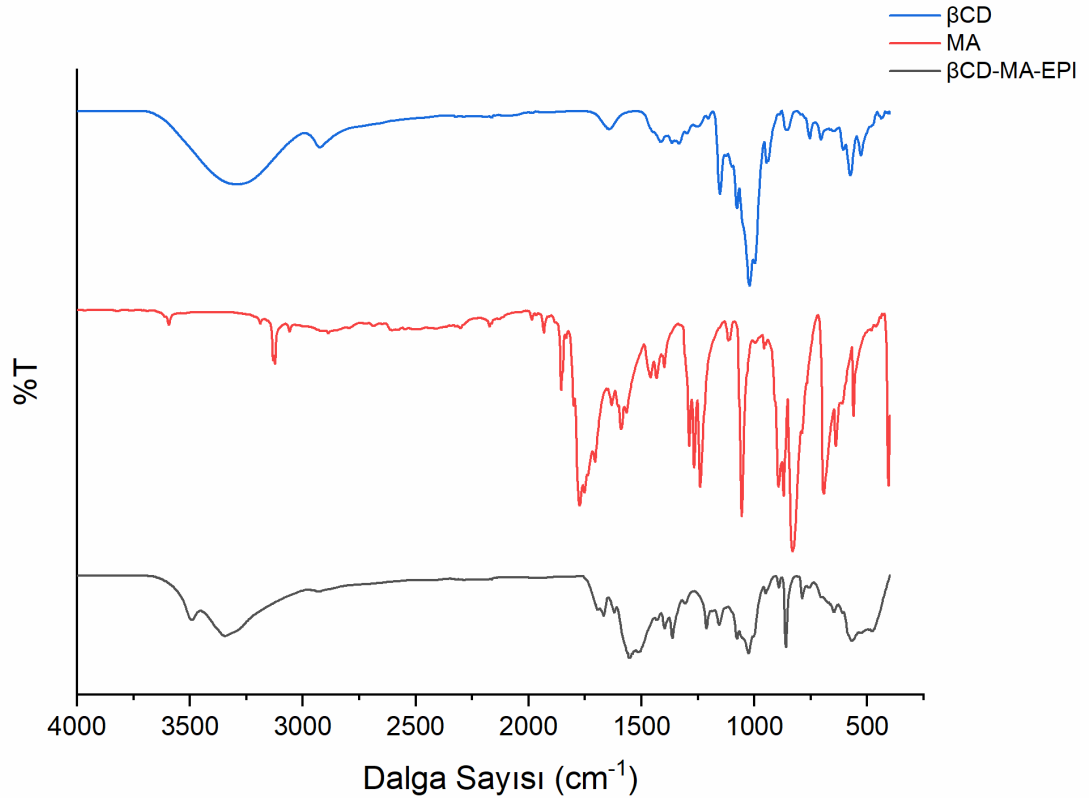
EPI'nin spesifik piklerini gösteren FTIR spektrumu Ekler kısmında Şekil 1.'de sunulmuştur. EPI'nin spesifik pikleri 1288.36 cm^{-1} , 1266 cm^{-1} , 1249.79 cm^{-1} ve 721.33 cm^{-1} dalga sayısında görülen $\text{CH}_2\text{-Cl}$ bandındaki sallanma titreşimler ve $600\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ 'deki C-Cl bağ gerilmesinden oluşmaktadır [118, 119].

Buna göre maleik anhidrit ve epiklorohidrinin bağlayıcı ajan olarak bulunduğu ortamda betasiklodekstrin bazlı nanosüngerler elde edildiğinde, bu nanosüngerlerin Şekil 4.34.'teki FTIR spektrumunda çeşitli absorban pikleri gözlemlenmiştir. FTIR spektrumunda piklerin dalga sayıları, nanosüngerin bileşimindeki farklı bağlara ve fonksiyonel gruplara bağlı olarak değişkenlik göstermiştir.

Şekil 4.34.'e bakıldığında β CD yapısında benzerlik gösteren spesifik piklerin NS yapısında da gözlenmesi nanosünger sentezi sonucunda elde edilen CDNS'lerde temel β CD yapısının bozunmamış olduğunu kanıtlamaktadır. Polimerizasyon tepkimesinin gerçekleştiğini kanıtlamak adına FTIR spektrumunda 1266 cm^{-1} 'deki EPI'ye ait epoksi halkasının karakteristik piki β CD-MA-EPI nanosünger için kaybolmuştur. Yani burada epoksi halkası açılarak EPI'nin reaksiyona katıldığı ve polimerizasyon sürecinde bağ kuran ajan olarak yer edindiğini göstermektedir. Spektrumda maleik anhidrit ve

epiklorohidrinin nanosünger oluşumu için kullanıldığı durumdaki β CD temelli nanosüngerlerin oluşumu daha çok maleik anhidrit üzerinden gerçekleştiği görülmektedir. Çünkü bu pikler genellikle maleik anhidritin karboksil grubuna ait olan absorban piklerinden meydana gelmektedir ve yaklaşık 1750 cm^{-1} dalga sayısında görülmektedir. $1657\text{-}1659\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısındaki pikin β CD'nin yapısında var olan suyun H-O-H deformasyon bandını göstermektedir.

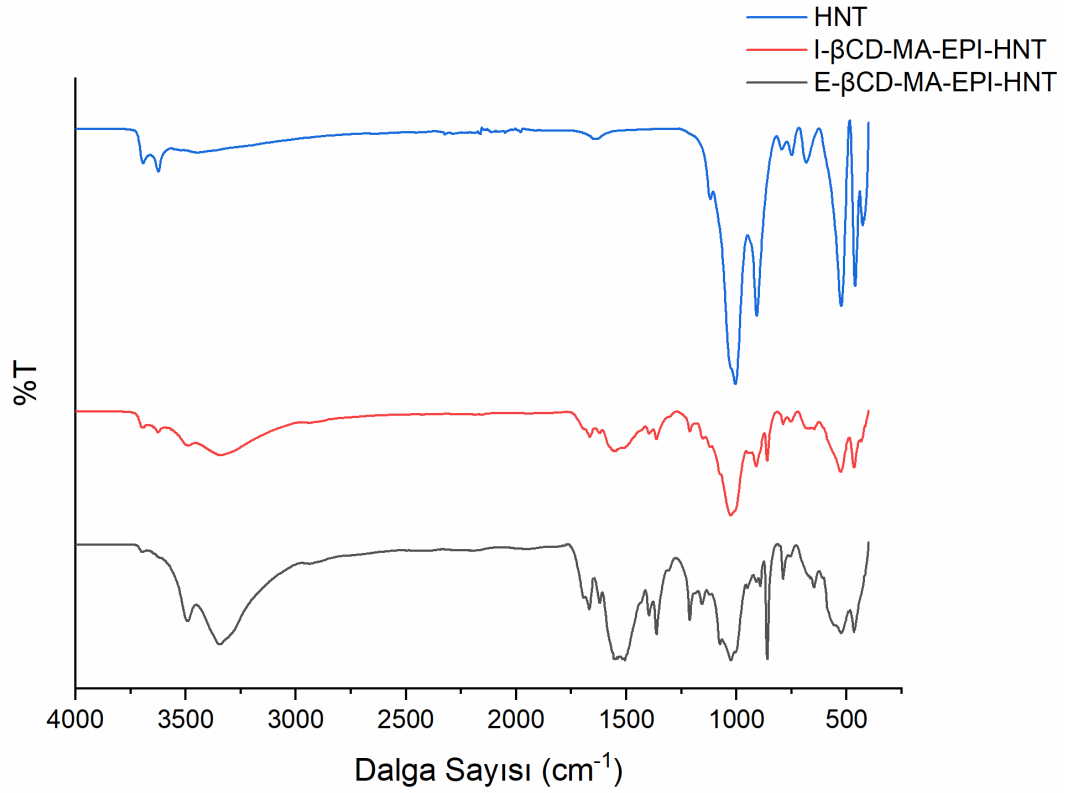
1540 cm^{-1} 'de görülen pik, yapıdaki maleik anhidrit (MA) ve epiklorohidrin (EPI) temelli β CD nanosüngerlerinde genellikle alken (C=C) bağlarına aittir. Bu pik, nanosünger yapısında bulunan çift bağların bükülme (deformasyon) titreşimine karşılık gelir. Maleik anhidrit ve epiklorohidrin, β CD ile reaksiyona girerek nanosünger yapısına bağlanır. Bu çift bağlar, nanosüngerin kimyasal yapısının önemli bir parçasını oluşturur ve FTIR spektrumunda 1540 cm^{-1} 'de karakteristik bir pik olarak görülür.



Şekil 4.34. β CD, MA ve β CD-MA-EPI NS'e ait FTIR spektrumları

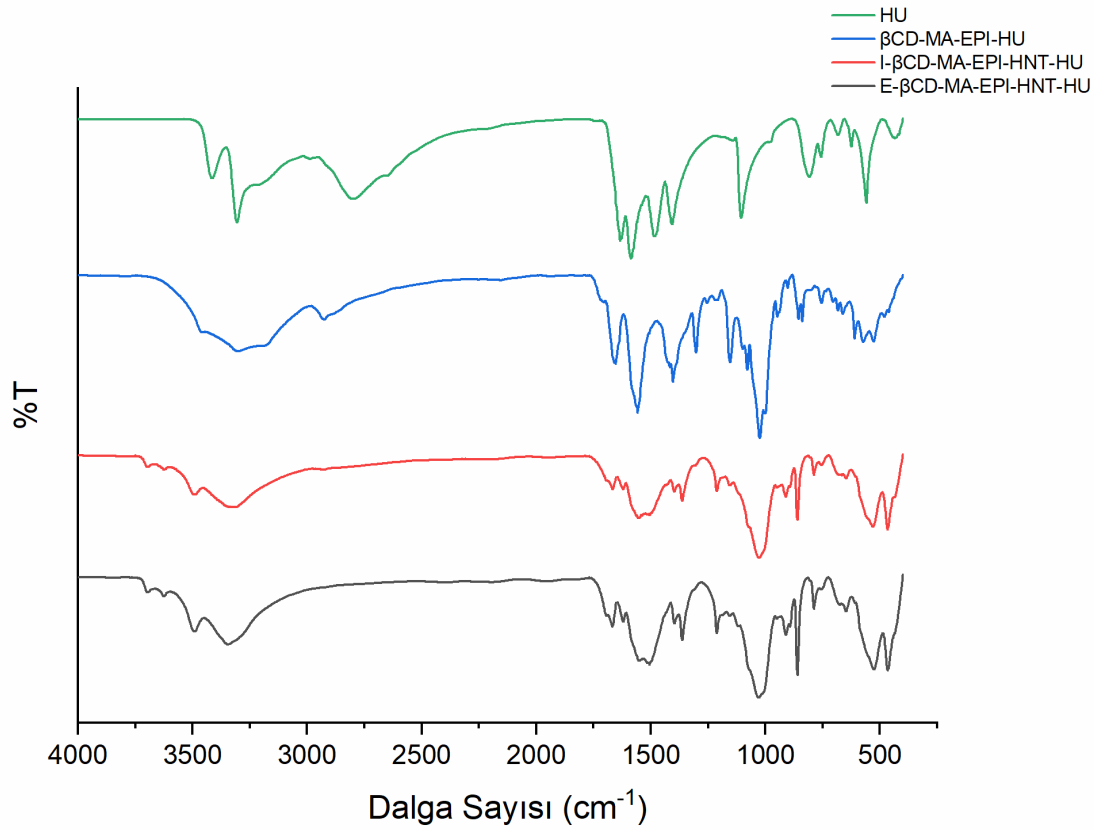
Nanosüngere halloysit kilinin katkılanması *ex-situ* ve *in-situ* yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.35.'teki her iki yöntem ile sentezlenen yapılar için FTIR spektrumlarına bakıldığında maleik anhidritin 3120 cm^{-1} civarındaki pikin kaybolmasının nanosünger oluşumunun gerçekleştiğini göstermektedir. Bu pik, maleik anhidritin serbest karboksilik asit grubunun, $-\text{COOH}$ simetrik gerilme moduna karşılık gelir. Pikin kaybolmasının nedeni, maleik anhidritin ile bağlanarak nanosünger yapısına entegre olmasıdır. Reaksiyon sırasında, maleik anhidritin karboksilik asit grubu, betasiklodekstrin ile reaksiyona girerek ester bağı oluşturabilir veya diğer fonksiyonel gruplarla etkileşime girebilir. Bu kimyasal değişiklikler, maleik anhidritin FTIR spektrumunda yer alan karakteristik piklerin kaybolmasına neden olur. 1690 cm^{-1} 'de görülen pik, maleik anhidrit (MA) ve epiklorohidrin (EPI) ile sentezlenen βCD nanosüngerlerde genellikle karboksil grubuna ($\text{C}=\text{O}$) aittir. Bu pik, nanosünger yapısında bulunan ester bağlarının karbonil grubunun gerilme titreşim pikine karşılık gelir. Bu ester bağları, nanosüngerin kimyasal yapısının önemli bir parçasını oluşturur ve FTIR spektrumunda 1690 cm^{-1} 'de karakteristik bir pik olarak görülür.

MA ve EPI ile sentezlenen βCD bazlı nanosüngerler, HNT ile nanokompozit oluşturduğunda, FTIR spektrumlarında belirli değişiklikler gözlemlenmiştir. EPI'nin tepkimeye az katıldığı ve çoğunlukla MA üzerinden bağlandığı görülen nanosünger spektrumunda, özellikle EPI'ye ait karakteristik piklerin azalması gözlenmiştir. Bunun yerine, MA ile oluşan ester bağlarına işaret eden pikler güçlenmiştir. Ayrıca, HNT'nin spesifik bantları olan $1100\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ ve $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ 'de sırasıyla Si-O-Si simetrik ve asimetrik gerilmeleri ile $3700\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ arasındaki Si-OH gerilme bantları, FTIR spektrumunda belirginleşmiştir. Bu değişiklikler, nanosüngerlerin yapısal özelliklerindeki değişiklikleri ve HNT'nin nanosüngere başarıyla yapıya katıldığını göstermektedir.



Şekil 4.35. HNT, I-βCD-MA-EPI-HNT ve E-βCD-MA-EPI-HNT NS'e ait FTIR spektrumları

Şekil 4.36.'yabakılırsa HNT katkısız ve HNT katkılı nanosüngerlere hidroksiüre konjuge edildiğindeki numuneler için spektrumlar alındığında Hidroksiüreye ait 3314 cm^{-1} 'de -NH bağını işaret eden gerilmeye ait pikler gözlenmiştir. Hidroksiüreye ait 1641 cm^{-1} 'de (amid 1, C=O bağı), 1596 cm^{-1} 'de ise (amid 2'nin deformasyon titreşimleri) gözlenmiştir. Ayrıca HNT katkılı nanosüngerlerde HNT'ye ait Si-OH gerilme bantları gözlenmiştir.



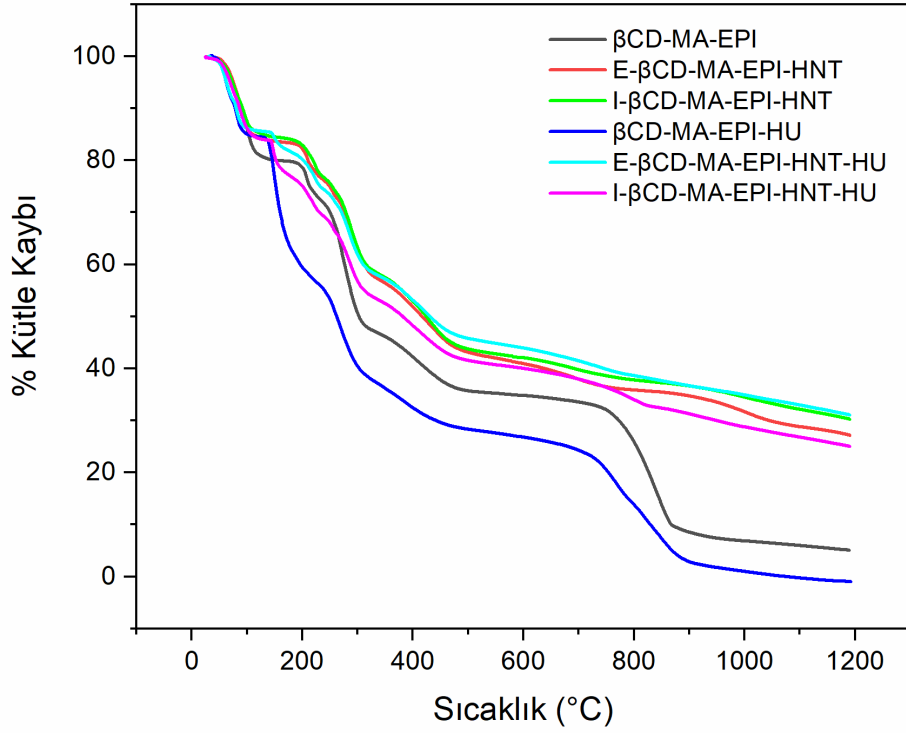
Şekil 4.36. HU, βCD-MA-EPI-HU, I-βCD-MA-EPI-HNT-HU, E-βCD-MA-EPI-HNT NS'e ait FTIR spektrumları

4.3.2. βCD-MA-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Termal Analiz (TGA)

Bu çalışmada, maleik anhidrit ve epiklorohidrinin kullanıldığı β-siklodekstrin bazlı nanosüngerlerin termal analizi incelenmiştir. Ayrıca, elde edilen nanosüngerlerin halloysit ile etkileştirilmiş versiyonlarının termal özellikleri de değerlendirilmiştir. Ayrıca, nanosüngerlerin ilaç konjuge yapıları da TGA analizi ile incelenmiş ve bu komplekslerin termal davranışı hakkında bilgi edinilmiştir.

Şekil 4.37.'ye bakıldığında analizin başlangıcında, uçucu bileşenlerin ve suyun kaybına ilişkin kayıp görülmektedir. Bu aralıktaki kütle kaybı (% 16) nanosüngerin yüzeyindeki suyun ve diğer uçucu bileşenlerin buharlaşmasıyla açıklanabilir. 200 °C civarında, nanosüngerin kütlede bir azalma başlamıştır. Bu bölge, genellikle nanosüngerin içinde bulunan mol kütlesi düşük organik bileşenlerin termal bozunmasıyla ilişkilidir. 400 °C civarında, nanosüngerin kütle kaybı daha hızlı bir şekilde artar. Bu bölge, nanosüngerin ana bileşenlerinin termal bozunmasına işaret eder. Maleik anhidrit ve epiklorohidrin gibi bağ kuran maddelerin termal bozunması bu sıcaklık aralığında

gerçekleşir. 750 °C'nin üzerinde, nanosüngerin kütlesi daha istikrarlı hale gelir. Bu bölge, genellikle nanosüngerin inorganik bileşenlerinin termal kararlılığını yansıtır. Nanosünger yapıya halloysit kil eklenmesiyle Şekil 4.37.'de de görüleceği gibi nanosünger termal kararlılığı artmıştır. Halloysit kilin yapıya eklenmesiyle yine 50-200 °C aralığında, halloysit kilin ve nanosünger yapısındaki kristal suyun çıkması sebebiyle bir kütle kaybı görülür.



Şekil 4.37. β CD-MA-EPI nanosüngerlerin, β CD-MA-EPI-HNT nanosünger yapıların ve nanosünger-ilaç konjuge yapıya ait termogramlar.

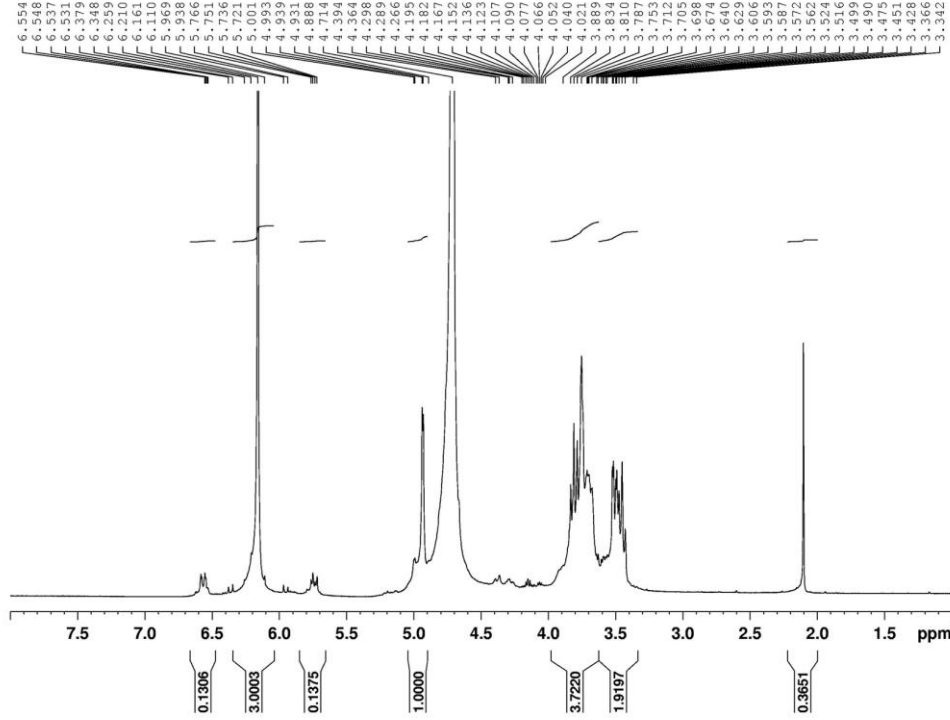
Daha sonra halloysit kil yapısındaki hidroksil grupların ve organik bileşenlerin bozulması 200-600 °C aralığında gözlenir. HNT katkısız ve HNT katkılı nanosüngerlerin hidroksiüre ile konjugasyonundan oluşan yapıların termal analizine bakıldığında HNT katkısız olan nanosüngerin termal kararlılığının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. 150-200 °C aralığındaki kütle kaybında hidroksiüreye ait kristal suyun da payı vardır. Daha yüksek sıcaklıklara gelindiğinde hidroksiüre molekülü termal olarak parçalanmaya uğramıştır. 200-300 °C aralığında özellikle, hidroksiüre molekülünde bulunan karbon, hidrojen ve oksijen atomları arasındaki bağlar zayıflar ve molekülün ayrışması başlar. Bu aşamada, hidroksiüre molekülünün karbonil grubu içeren parçalarının bozunması gerçekleşebilir.

Çizelge 4.4. β CD-MA-EPI NS, HNT katkılı NS ve bu nanosüngerlerin ilaç konjugatlarının Sıcaklık (°C) - % Kütle Kaybı değerleri

Sıcaklık (°C) - %Kütle Kaybı										
Numune	100 °C	200 °C	300 °C	400 °C	500 °C	600 °C	700 °C	800 °C	900 °C	1000 °C
β CD-MA-EPI	13.3	21.4	49.3	57.8	64.3	65.2	66.5	74.0	91.5	93.1
β CD-MA-EPI-HU	15.0	40.5	59.4	67.5	71.7	73.2	75.7	86.1	97.2	99.0
I- β CD-MA-EPI-HNT	12.4	17.0	36.7	47.1	56.3	58.0	60.2	62.2	63.4	65.5
I- β CD-MA-EPI-HNT-HU	13.8	24.9	43.2	51.7	58.5	60.0	58.5	65.0	68.7	71.2
E- β CD-MA-EPI-HNT	12.5	17.8	36.8	48.1	56.9	59.1	62.1	64.2	65.3	68.3
E- β CD-MA-HNT-EPI-HU	13.9	19.8	43.2	46.8	54.2	56.2	58.6	61.4	63.3	65.1

4.3.3 β CD-MA-EPI Nanosünger Yapıya Ait $^1\text{H-NMR}$ Analizi

Maleik anhidrit ve epiklorohidrin ile sentezlenerek oluşturulan β CD temelli nanosüngerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu, farklı bir çevreye sahip hidrojen atomlarının kimyasal etkileşimini göstermek üzere analiz edilmiştir [122]. Bu analiz sonucunda yapıda ne gibi değişikliklerin meydana geldiği açıklanmıştır.



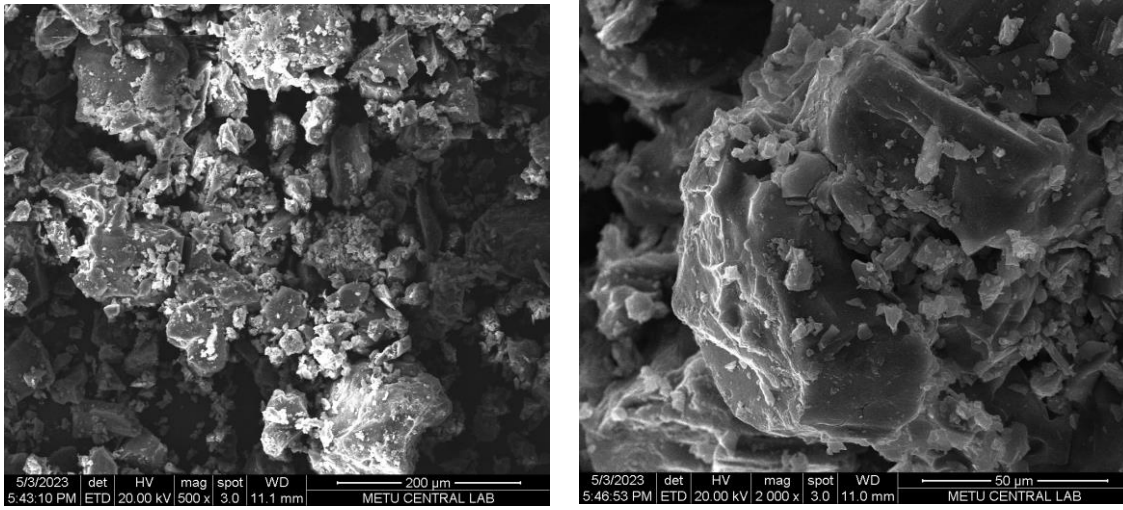
Şekil 4.38. MA-EPI ile sentezlenen β CD bazlı nanosüngerlerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

DMSO-d6 çözücüsü içinde 25 ± 0.1 °C

Şekil 4.38.'deki δ 6.20 ppm civarında gözlenen pik için MA yapısından söz edilebilir. Bu spektrumda δ 4.65 ppm ve δ 3.85- δ 3.50 ppm'deki rezonanslar için β CD yapısına ait olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, MA'nın eklenmesi nedeniyle beklenen kimyasal modifikasyonun β CD yapısında etkili şekilde meydana geldiğini kanıtlar niteliktedir. δ 3.40– δ 4.20 ppm aralığına karşılık gelen iskelet karbonhidrat protonları bölgesinde yeni sinyallerin görünmesi, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2$ köprü birimlerinin varlığını gösterir. Bu sinyallerin, epiklorohidrinin nanosünger yapısına dâhil edilmesinden kaynaklandığı ve bu köprü birimlerinin oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir.

4.3.4. β CD-MA-EPI Nanosünger Yapıya Ait Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Nanosüngerin yüzey morfolojisini değerlendirmek için genellikle SEM analizi kullanılır. Bu inceleme ile nanosüngerin yapısal nitelikleri, yüzey dokusu, gözeneklilik, parçacık büyüklüğü ve şekil gibi özellikleri analiz edilmiştir. β CD temelli nanosünger SEM görüntülerine Şekil 4.39.'a bakıldığında nanosünger partiküllerinin düzenli şekilde dağıldığı, poroz yapıya sahip olduğu fakat üzerinde olası agregasyonlar da bulunduğu gözlemlenmiştir [123].



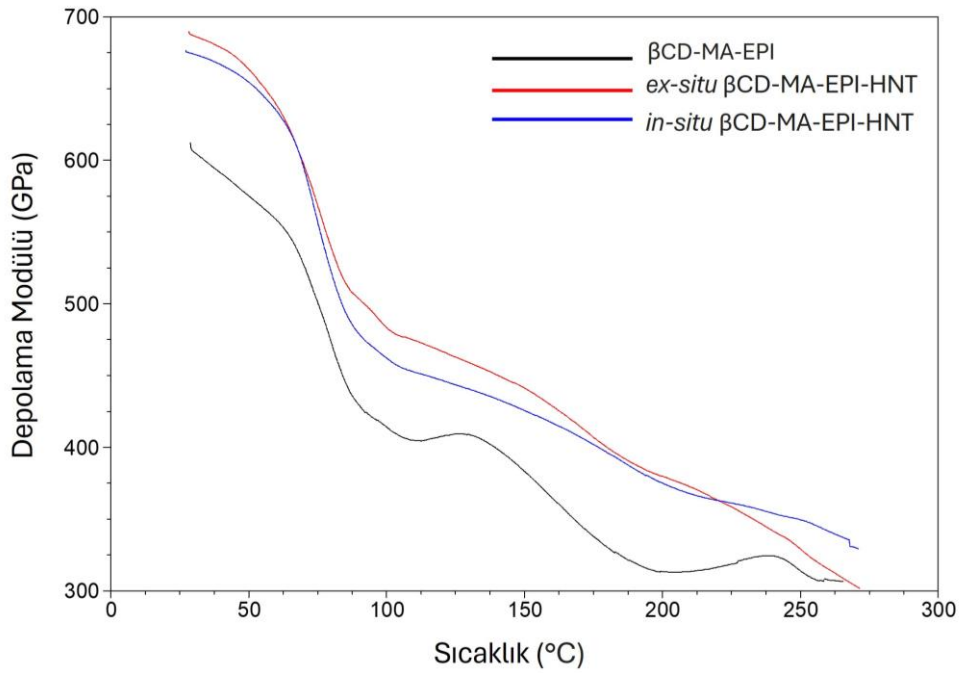
Şekil 4.39. MA-EPI ile sentezlenen β CD bazlı nanosüngerlerin SEM görüntüleri.

Şekil 4.39.'da görüldüğü üzere nanosüngerlerin çeşitli boyut açısından dağılımı açıkça görülmektedir. SEM analizi, nanosüngerin oldukça poroz yapısını görsel olarak açığa çıkarmış ve onun süngerimsi dokusunu belirginleştirmiştir.

4.3.5. β CD-MA-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait Dinamik Mekanik Analiz (DMA)

Maleik anhidrit-epiklorohidrin ile sentezlenen β CD temelli nanosüngerler yapıya ait dinamik mekanik özellikler incelenerek bu malzemelerin ısı geçişleri bulunmuştur. Buna göre Şekil 4.40.'taki Depolama Modülü (SM) eğrisine bakıldığında β CD-MA-EPI nanosünger yapısı için önemli camsı geçiş sıcaklığı SM'de (Tg1) 79.6 °C, (Tg2) 98.5 °C ve (Tg3) 136 °C olarak izlenmiştir. Halloysit katkı yapılarına baktığımızda ise *ex-situ* ve *in-situ* yöntemlerle sentezlenen HNT-nanosüngerlerin birbiriyle yine benzer özellik gösterdiği ve katkısız nanosüngere oranla ısı dayanımının daha iyi olduğunu söylemek mümkündür. Buna göre HNT katkı örnekler için önemli

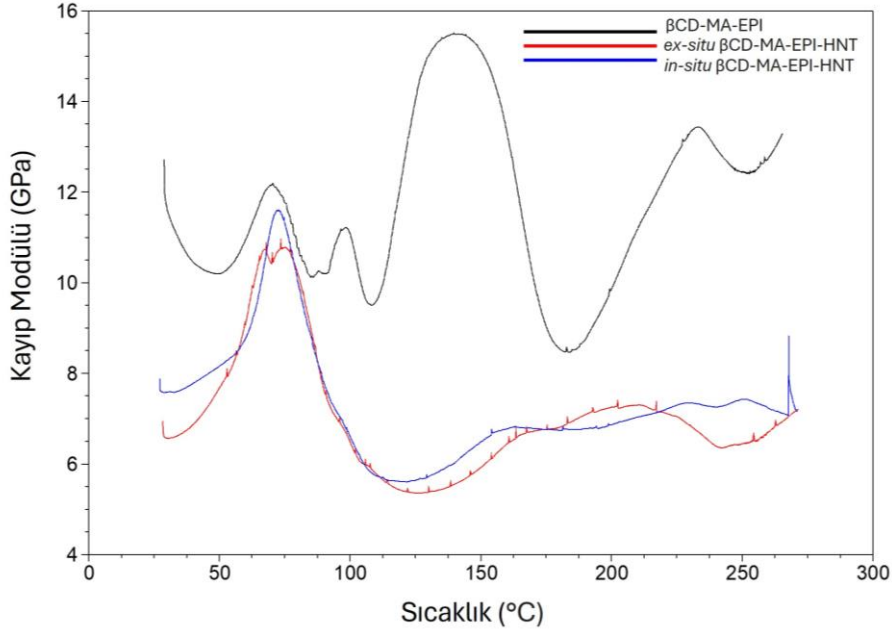
ısı geçiş *ex-situ* örnek için SM'de (Tg1) 75.7 °C olarak gözlenmiştir. *In-situ* örnek için SM'de önemli geçiş ise (Tg1) 74.2 °C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.40. βCD-MA-EPI nanosünger yapının ve HNT katkılı nanosünger yapıların Depolama Modülü (SM) (GPa)-Sıcaklık (°C) grafiği.

HNT katkısız nanosünger için ilk geçişin SM eğrisinde (Tg1) 79.6 °C'de gerçekleşmesi, malzemenin belirli bir termal geçiş yaşadığını ve bu sıcaklıkta belirgin bir yapısal değişim gösterdiğini belirtir. Yani, malzemenin katı halinden daha esnek bir hal almaya başladığı noktadır. İkinci geçiş SM'de (Tg2) 98.5 °C'de gözlenir ve bu sıcaklıkta, nanosünger yapılarındaki moleküler düzen değişmeye başlar. Bu, malzemenin elastik özelliklerinde ve moleküler hareketliliğinde değişim olduğunu gösterir. Üçüncü geçiş (Tg3) ise SM'de 136 °C'de gerçekleşir ve malzemede moleküler düzenin büyük ölçüde değiştiğini göstermektedir.

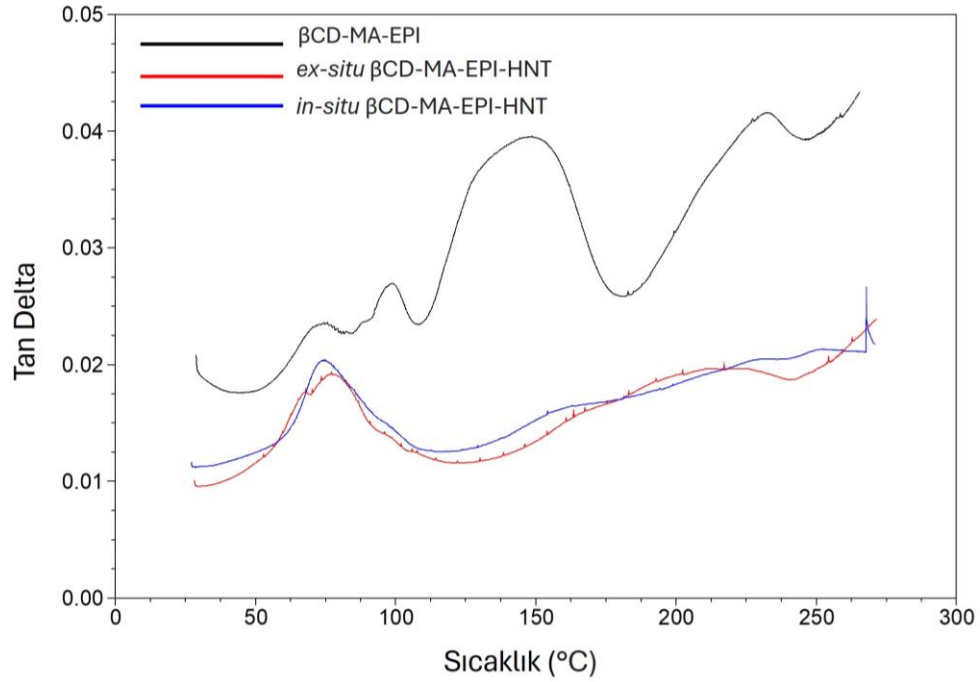
Ex-situ HNT katkılı nanosüngerlerde ise, SM'de (Tg1) 75.7 °C'de, *in-situ* HNT katkılı nanosüngerde (Tg1) 74.2 °C'de yapısal değişim gözlenmeye başlar. HNT katkısının etkisiyle, malzemenin camsı geçiş sıcaklığı etkilenir ve daha farklı sıcaklıkta yapısal değişimler başlar. HNT katkısının etkisiyle, malzemenin elastik özelliklerinde ve moleküler hareketlilikte değişim daha istikrarlı bir şekilde gerçekleşir. Sırasıyla *ex-situ* ve *in-situ* örnekler için 153 °C ve 165 °C ise malzemenin yapısının bozunduğu sıcaklık olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.41. βCD-MA-EPI nanosünger yapının ve HNT katkılı nanosünger yapıların Kayıp Modülü (LM) (GPa)-Sıcaklık (°C) grafiği.

Şekil 4.41.'deki βCD-MA-EPI nanosüngere ait Sıcaklık-Kayıp Modül (LM) eğrisine bakıldığında ısıl geçişlere bakıldığında (Tg1) 70.4 °C, ardından (Tg2) 98.5 °C ve son olarak 136 °C'de geniş ve kuvvetli pik (Tg3)'e atfedilmiştir. Bu pikler, belirli termal geçişleri temsil eder. Bu sıcaklıklarda, moleküler düzeydeki düzenin bozulmaya başladığı ve malzemenin gittikçe daha esnek hale geldiği geçişleri göstermektedir.

In-situ ve *ex-situ* yöntemle elde edilen HNT katkılı nanosüngerlerin LM eğrisinde yine benzer özellikler gösterdiği söylenebilir. Buna göre başlangıçta *ex-situ* örnek için, 73.8°C, *in-situ* örnek için 72.6 °C'de pikler gözlemlenmiştir ve bu geçişler birinci basamaktaki geçiş (Tg1) moleküler düzenlerin değişmesine işaret etmektedir. Camsı geçiş pikleri, malzemenin katı halinden daha elastik bir hal almaya başladığı noktayı temsil eder. Bu sıcaklıkta, malzeme elastik özellikler kazanır. 150 °C civarı sıcaklıktan sonra her iki malzemenin de bozunduğu söylenebilir. *In-situ* ve *ex-situ* yöntemlerle elde edilen HNT katkılı nanosüngerler arasında benzer piklerin görülmesi, her iki malzemenin de benzer termal özelliklere sahip olduğunu gösterir.



Şekil 4.42. β CD-MA-EPI nanosünger yapının ve HNT katkılı nanosünger yapıların Tan δ -Sıcaklık grafiği.

Şekil 4.42.'deki Tan δ -Sıcaklık eğrisi incelendiğinde β CD-MA-EPI nanosünger için tan δ 'da (Tg1) 72.8 °C, (Tg2) 99.0 °C ve ardından 144 °C civarındaki geniş ve kuvvetli pik camsı geçiş sıcaklığı (Tg3) olarak belirlenmiştir. Daha yüksek sıcaklıklarda malzeme ısı enerjisi nedeniyle düzenli yapısını kaybetmeye başlar ve malzemenin molekülleri daha fazla hareket etmeye başlayarak düzenli yapıları bozulmaktadır.

HNT katkılı nanosünger yapılarda ise Tg değeri *ex-situ* örnek için 77.0°C (Tg1), *in-situ* için örnek için 74.7 °C olarak bulunmuştur. *Ex-situ* ve *in-situ* HNT katkılı nanosünger yapılar yine burada benzer özellik göstermektedir ve her iki örnek için de 150 °C'den sonra bozunma pikleri gözlenmiştir.

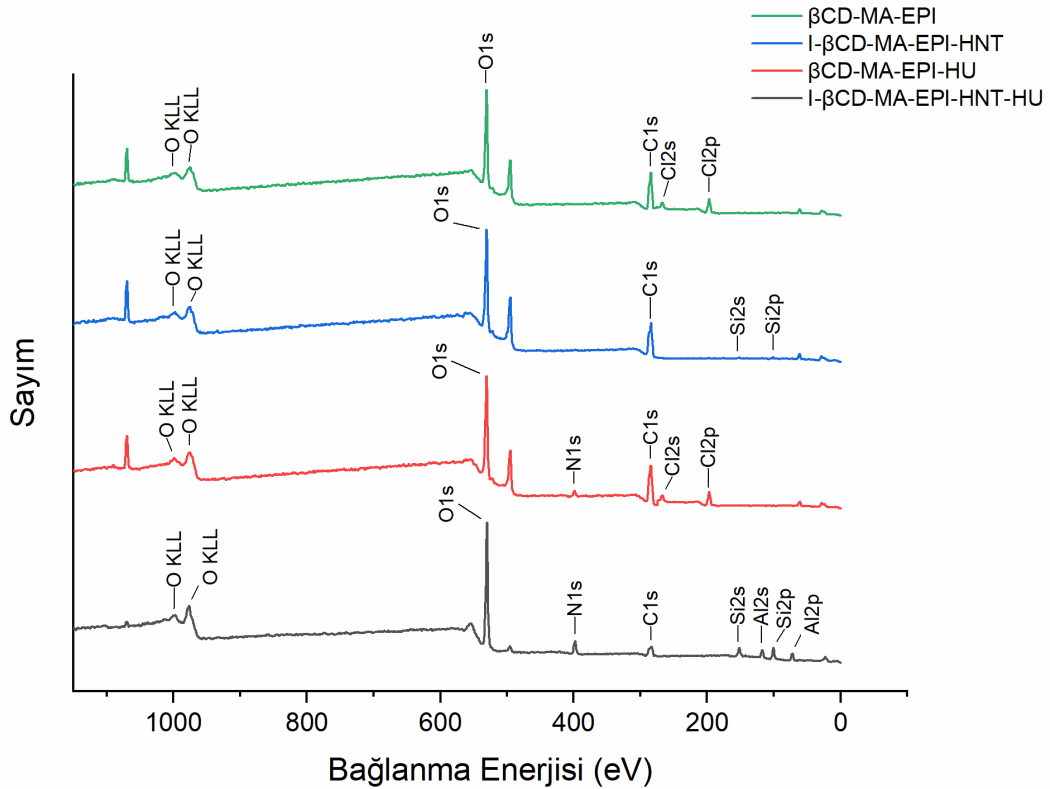
Çizelge 4.5. β CD-MA-EPI, E- β CD-MA-EPI-HNT ve I- β CD-MA-EPI-HNT yapılara ait SM, LM ve tan δ eğrilerinde gözlenen sıcaklık geçişleri

Numune	Sıcaklık (°C)						Tan δ (Tg1)	Tan δ (Tg2)	Tan δ (Tg3)
	SM (Tg1)	SM (Tg2)	SM (Tg3)	LM (Tg1)	LM (Tg2)	LM (Tg3)			
β CD-MA-EPI	79.6	98.5	136	70.4	98.5	139	72.8	99.0	144
E- β CD-MA-EPI-HNT	75.7	-	-	73.8	-	-	77.0	-	-
I- β CD-MA-EPI-HNT	74.2	-	-	72.6	-	-	74.7	-	-

4.3.6. β CD-MA-EPI Nanosüngere, HNT Katkılı Nanosüngere ve Nanosünger-İlaç Konjuge Yapılara Ait X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) Analizi

Maleik anhidrit-epiklorohidrin ile sentezlenen β CD bazlı nanosünger, bu nanosüngerin HNT katkılı yapısı ve HNT katkılı ve HNT katkısız nanosüngerlerin ilaç konjugasyonu ile oluşan yeni yapıların kimyasal bağlanma ve elementel analizi hakkında bilgi sağlamak için XPS yöntemi kullanılmıştır.

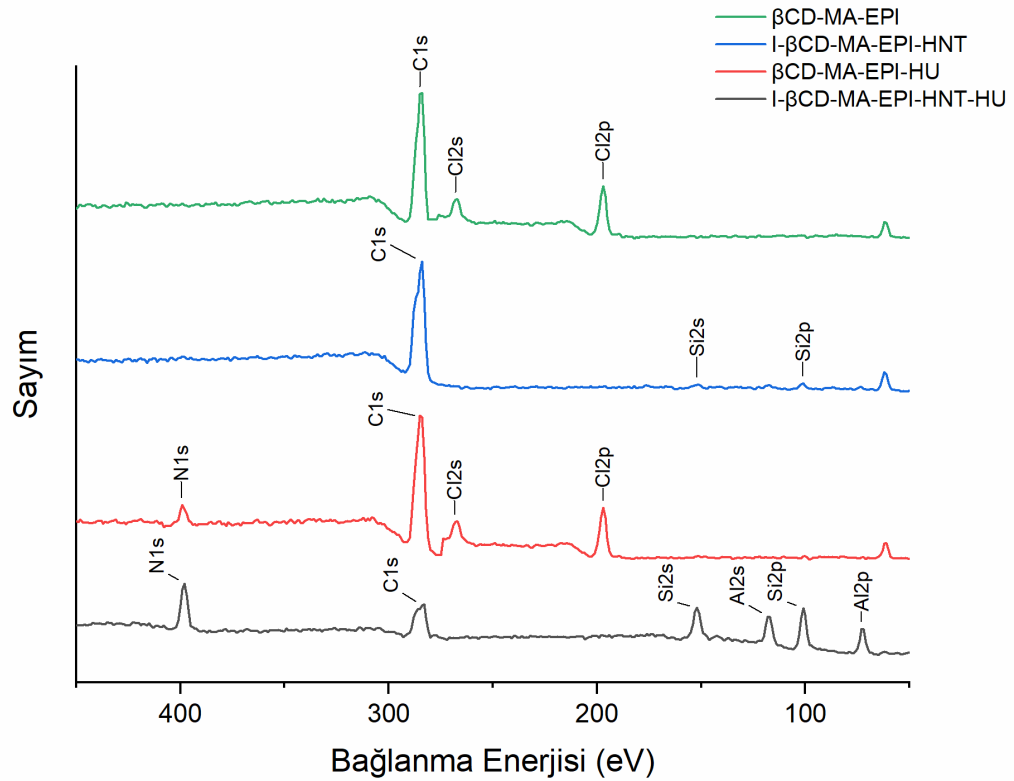
β CD-MA-EPI nanosünger yapı için Şekil 4.43.'teki XPS spektrumlarına bakıldığında % 50.6 oranında C1s piki kendini göstermektedir ki bu da β CD ve MA ve EPI yapısında bulunan karbonlara atfedilebilir. Yine üç yapıda da oksijen bulunması sebebiyle O1s piki 530 eV'ta % 41.4 değeri ile yüksek oranda XPS spektrumunda kendini göstermektedir. 270 eV'taki % 0.20 oranıyla klordan kaynaklanan Cl2p piki epiklorohidrinin yapıya katıldığını kanıtlar niteliktedir fakat yüzde olarak klorun bu denli az oranda pik vermesi epiklorohidriden ziyade maleik anhidritin yapıya daha çok katıldığını göstermektedir.



Şekil 4.43. β CD-MA-EPI nanosünger ve *in-situ* yöntemle HNT katkılı nanosünger yapıya ait ve nanosünger- ilaç konjugatlarına ait XPS genel taraması.

In-situ yöntemle HNT katkılı nanosünger yapı için karbon kendini C1s piki ile 284 eV'ta % 45.4 oranında, oksijen O1s piki ile 530 eV'ta % 43.7 oranında ve halloysitten gelen Si2p piki ile silisyum kendini 100 eV'ta % 1.1 oranında göstermektedir. Özellikle silisyumun XPS spektrumunda yer alması nanosüngere, HNT yapısının katıldığını kanıtlamaktadır.

HNT katkısız nanosünger yapıya hidroksiüre konjuge edildiğinde yeni elde edilen malzemenin spektrumunda görülen farklılıklar, hidroksiüre molekülünde bulunan elementler olan azot atomunun 410 eV'ta % 3.70 oranında kendini N1s piki ile ve epiklorohidrin yapısındaki klor atomunun 200 eV'ta % 0.20 oranında kendini Cl2p piki ile göstermesiyle açıklanabilir.



Şekil 4.44. βCD-MA-EPI nanosünger ve *in-situ* yöntemle HNT katkılı nanosünger ve nanosünger-ilaç konjugatlarına ait 0-400 eV arası XPS taramasının büyütülmüş hali

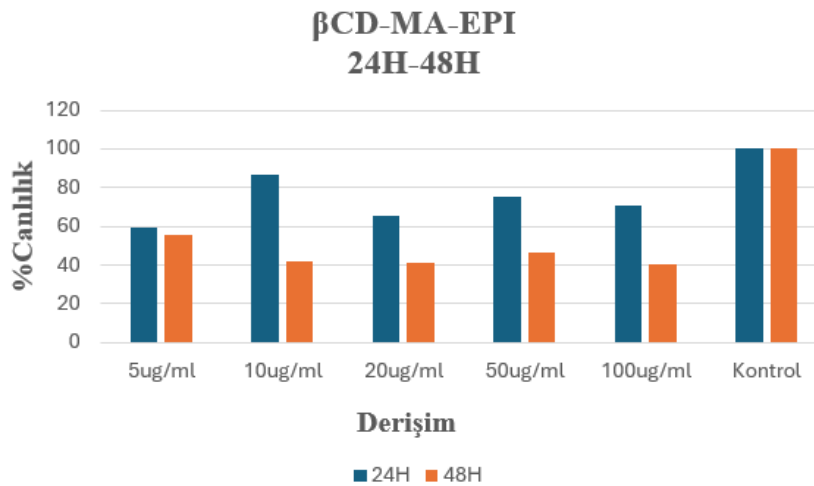
Son olarak HNT katkılı nanogünger yapıya hidroksiürenin konjuge edilmesiyle elde edilen nanosünger-ilaç konjugatının XPS spektrumlarına bakıldığında konjugasyonun başarıyla gerçekleştiği söylenebilir. βCD, MA, EPI ve HU yapılarında bulunan oksijenin O1s pikinin 530 eV'ta % 52.2 ile yüksek oranda spektrumda gözlenmesi,

yapıların içeriğini aydınlatmaktadır. Karbon için C1s piki 287 eV'ta % 15.6 oranında gözlenirken, hidroksiüre molekülünde bulunan azot için N1s piki 400 eV'ta % 10.3 oranında gözlenmiştir. Azot pikinin bu denli artışı, HNT kil yapısının nanosüngerin yüzey alanını arttırdığı ve bu nedenle de nanosünger yapının daha fazla ilaç molekülünü tutabildiğine atfedilebilir. Halloysitin, nanosünger yapıya katıldığını ise 100 eV'ta % 9.40 oranındaki silisyum Si2p ve 72 eV'ta % 8.20 oranı ile alüminyum Al2p piki ile anlaşılmaktadır. Epiklorohidrin yapısındaki klor atomunun 200 eV'ta % 0.20 oranında kendini Cl2p piki ile göstermiştir. HNT katkılı nanosüngerlerde klor pikinin gözlenmemesinin sebebi epiklorohidrinin klor ucundan reaksiyona girmemesi olarak açıklanabilir. Sentez mekanizmasının epiklorohidrin üzerinden daha çok maleik anhidrit tercihli olduğu XPS spektrumunda klor atomu izlendiğinde gözlenmektedir.

4.3.7. Sitotoksisite Deneyleri

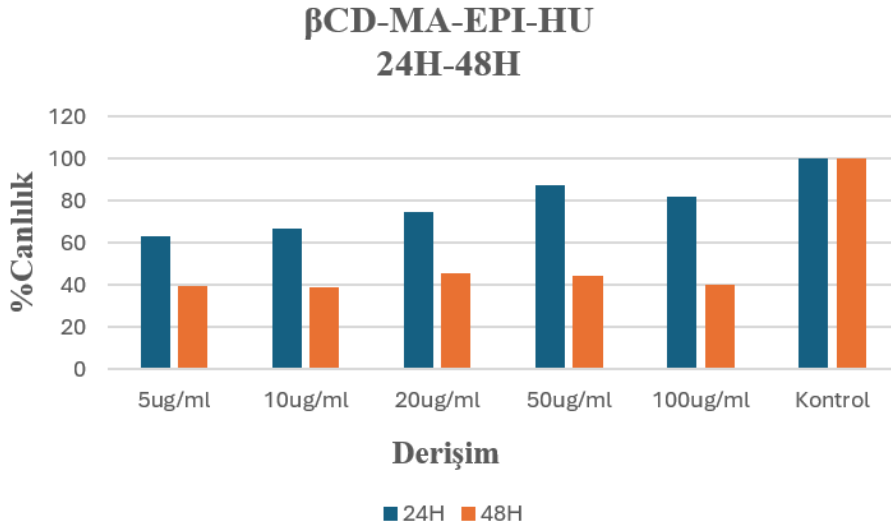
Farklı derişimlerde (5, 10, 20, 50, 100 µg/mL) ilaç konjugasyonu sağlanmış ve sağlanmamış *in-situ* yöntemle HNT katkılı ve HNT katkısız maleik anhidrit-epiklorohidrin ile sentezlenmiş nanosünger yapıların insan embriyonik böbrek (HEK293) hücrelerindeki 24 ve 48 saatlik sitotoksisite etkileri incelenmiştir [116, 124, 125].

Buna göre Şekil 4.45.'teki grafik incelenirse, sonuçlar 24 saatlik inkübasyon süresinde nanosünger malzemenin derişiminin artmasıyla HEK293 hücrelerinin % canlılık değerlerinin neredeyse aynı kaldığını göstermektedir. Kontrol grubuna oranla daha düşük değerlerde gözlenen % canlılık değerleri yapıya epiklorohidrinin eklenmesiyle açıklanabilir. Epiklorohidrin kalıntıları az da olsa hücrelere toksik etki göstermiştir. 24 saatlik inkübasyonda 10 µg/mL derişim, nanosünger yapının en az toksik etki gösterdiği değer olarak belirlenebilir. 48 saatlik inkübasyon süresinde derişimin artmasıyla birlikte % canlılık değerlerinin 24 saat inkübasyon süresine kıyasla daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum uzun süreli maruziyetin hücreler üzerinde olumsuz etkilere neden olduğunu göstermektedir. Düşük derişimlerde çalışıldığında hücrelere etki eden olumsuz etkinin en aza indirildiği görülmektedir. 48 saatlik inkübasyon süresinde 100 µg/mL konsantrasyonda hücreler % 60 oranında baskılanmıştır.



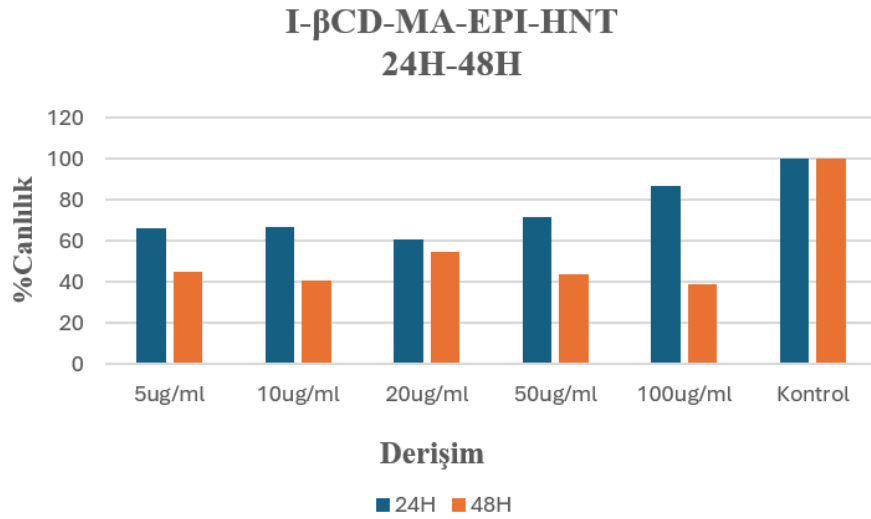
Şekil 4.45. βCD-MA-EPI NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği

Şekil 4.46. incelendiğinde hidroksiüre konjuge edilen nanosünger yapının derişime karşı HEK293 hücreleri % canlılık grafiği görölmektedir. Buna göre 48 saatlik inkübasyon süresinde % canlılık değerleri 24 saatlik inkübasyona göre daha düşüktür. Uzun inkübasyon süresinin hücrelerin nanosüngerlerle etkileşimini artırarak olumlu bir etki yarattığı düşünölmektedir. Nanosünger yapının 48 saatlik inkübasyon ile hücrelere daha fazla ilaç taşıdığı ve hücreleri daha fazla öldürdüğü grafikten anlaşılabilir. 24 saatlik inkübasyon süresinde artan ilaç derişimindeki artışın hücre canlılığını 48 saat verilerine göre daha az etkilediği gözlemlenmiştir. Bu durumda hidroksiüre konjuge edilen nanosünger yapının sitotoksik etkisinin 48 saatlik uygulamada daha net göröldüğü ve artan konsantrasyonla etkinliğin arttığı sonucuna varılmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinde 100 µg/mL konsantrasyonda hücreler % 61 oranında baskılanmıştır.



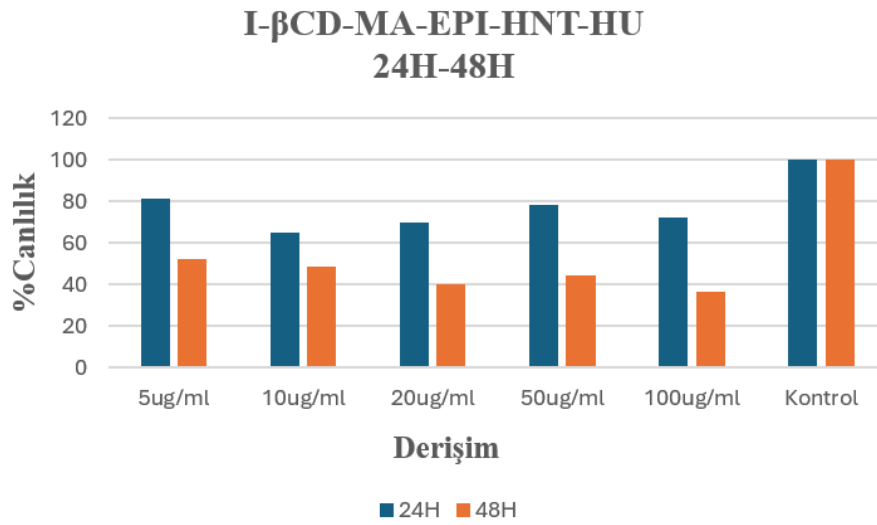
Şekil 4.46. βCD-MA-EPI-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği

Şekil 4.47.'de halloysit katkılı nanosünger yapının farklı derişimleri ile 24 saat ve 48 saatte gerçekleştirilen HEK293 hücre deneylerinin derişime karşı % canlılık grafiği verilmiştir. Buna göre 24 saatlik inkübasyonda derişim arttıkça % canlılık artmıştır ve hücreler ortamda daha çok canlı kalmıştır. 48 saatlik inkübasyonda ise derişim arttıkça % canlılık azalmıştır ve bunun nedeninin ortamda nanosünger yapıda biriken epiklorohidrin kalıntılarının hücrelere daha uzun süre etki etmesi olarak açıklanabilir. Ayrıca 48 saatte artan halloysit katkılı nanosünger dozlarındaki canlılık verilerinin benzer çıkması en düşük konsantrasyon olan 10 µg/mL'nin etkin sitotoksik etkiye sebep olduğunu göstermiştir. 48 saatlik inkübasyon süresinde 100 µg/mL konsantrasyonda hücreler % 62 oranında baskılanmıştır.



Şekil 4.47. I-βCD-MA-EPI-HNT NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği

HNT katkılı nanosünger yapının ilaç konjugatlarının farklı derişimlerdeki 24 saatlik ve 48 saatlik inkübasyon süresince HEK293 hücrelerine gösterdiği etki Şekil 4.48.'deki derişime karşı % canlılık grafiğinden görülebilir. Buna göre 24 saatlik inkübasyon süresinde nanosünger ve hücrelerin etkileşim süresi az olduğundan, artan derişimle birlikte bir miktar % canlılık değerlerinde azalma gözlenirse de 48 saatlik inkübasyon süresinde artan derişimlerle birlikte hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca ilaç konjugatı içeren nanosünger yapının artan dozlarla etkinliğinin artması ilaç etkinliğinin göstergesidir. 48 saat verilerinde 20 µg/mL'nin canlı hücrelerin % 50'sinde sitotoksik etki göstermesi hazırlanan konjugatın düşük dozlarda etkinliğini göstermektedir. 48 saatlik inkübasyon süresinde 100 µg/mL konsantrasyonda hücreler % 64 oranında baskılanmıştır.



Şekil 4.48. I-βCD-MA-EPI-HNT-HU NS'e ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiği

5. SONUÇLAR

HU, polisitemi vera, esansiyel trombositemi ve primer miyelofibroz gibi miyeloproliferatif bozuklukların birinci basamak tedavisi olarak hemotolojide kullanılmasının yanı sıra, malign melanom, baş ve boyun kanserleri ve beyin tümörlerinin tedavisinde kombinasyon terapi olarak hayati bir rol oynamaktadır [126]. Antikanser ilacı olarak kullanıldığındaki tüm bu yararlı etkilerine rağmen; mide bulantısı, kusma, karın ağrısı, ciltte soyulma veya renk değişiklikleri, grip benzeri semptomlar, saç kaybı, kızarıklık, baş ağrısı, uyuşukluk, kilo kaybı gibi genellikle görülen yan ve anemi, kemik iliği aktivitesinde azalma, lösemi gibi ciddi derecede tehlikeli yan etkileri bulunmaktadır [127]. Genellikle kanser ilaçlarında olduğu gibi hidroksiüre için de yüksek düzeyde terapötik etki alabilmek için ilacın yüksek dozlarına ihtiyaç duyulmakta ve bu da ilaç toksisitesinin ve yan etkilerinin artmasına sebep olmaktadır. Hidroksiüre gibi zararlı bir ilacı zararsız bir şekilde dokuya ulaşana kadar taşıyabilmek için bir sistem tasarlanmıştır. Bu sebeplerden dolayı tez çalışması kapsamında ilaç taşıyıcı sistem olarak halloysit katkılı nanosüngerler sentezlenmiştir. Sentezlenen bu nanosüngerlerin çeşitli karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyonu gerçekleştirilen nanosüngerler ile sitotoksite deneyleri gerçekleştirilmiştir.

İlaç taşıyıcı olarak kullanılmak üzere maleik anhidrit, epiklorohidrin ve maleik anhidrit-epiklorohidrin ile betasiklodekstrin bazlı nanosüngerler elde edilmiştir. Bu nanosüngerler, HNT yapısı ile hem *ex-situ* hem de *in-situ* yöntemlerle etkileştirilmiş ve nanokompozit malzemeler elde edilmiştir. HNT'nin nanosünger yapıya katılmasının amacı, taşıyıcı olarak kullanılacak nanosünger yapısının yüzey alanını artırmak ve "yeşil kimya" alanında adı geçen toksisitesi bulunmayan halloysit kil ile ilaç-nanosünger etkileşimini artırmaktır. Nanosüngerlerin yüzey alanını ve ilaç-nanosünger etkileşimini arttırmak için yapıya HNT katılmıştır. Yapıya HNT maddesinin eklenmesi 2 farklı şekilde gerçekleştirilmiştir: *In-situ* ve *ex-situ* yöntem. Elde edilen *in-situ* ve *ex-situ* HNT katkılı ve HNT katksız bu nanosüngerlere kanser ilacı olan hidroksiüre ile konjugasyon sağlanmış ve nanosünger-ilacın kompleksleri hazırlanmıştır.

Elde edilen bu taşıyıcı sistemlerin molekül yapılarını aydınlatmak için FTIR spektroskopisi kullanılmıştır. Nanosüngerlere ait FTIR spektroskopisi incelenirken literatürde yapılmış diğer çalışmalardaki absorban aralıklarına karşılık geçirgenlik

değerlerinin yer aldığı pik maksimumları ile karşılaştırma yapılmış ve nanosünger sentezlerinin başarıyla gerçekleştiği doğrulanmıştır. β CD-MA nanosüngerlerin FTIR spektrumunda, maleik anhidritin C=C ve C=O bağlarından kaynaklanan yeni pikler gözlemlenmiştir. Bu özellikle, sentezlenen nanosünger yapısında maleik anhidrit halkasının açılarak β CD ile esterleşme reaksiyonundan meydana gelen nanosünger yapısının varlığını kanıtlar. β CD-EPI nanosüngerlerin FTIR spektrumunda, epiklorohidrinin β CD yapısına katılımının kanıtı olarak, EPI'ye ait epoksi halkasının karakteristik pikinin β CD-EPI nanosünger için kaybolduğu gözlenmiştir. Ayrıca parmak izi bölgesinde gözlenen C-Cl bağına ait gerilme titreşimlerinin kaybolması ve C-O-C gerilme titreşim pikinin yeni malzemenin FTIR spektrumunda izlenmesi EPI yapısının varlığını göstermektedir. β CD-MA-EPI nanosünger yapısında sentez mekanizmasının daha çok maleik anhidrit üzerinden yürüdüğü FTIR spektrumlarında 1800 cm^{-1} 'de MA yapısında gözlenen iki pikin nanosünger yapısında kaybolmasından anlaşılmıştır. Halloysit kilinin nanosüngerlere katılanması sonrasında elde edilen yapıların spektrumlarında halloysit kile ait Al-OH ve Si-O-Si gruplarına ait spesifik bantların ve yine hidroksiüre konjuge edildiğinde hidroksiüreye ait -NH spesifik bantların gözlemlenmesi malzemelerin başarıyla sentezlendiğini doğrulamaktadır. Ayrıca molekül içi ve moleküller arası amid, amin ve yapılarıdaki -OH gruplarının yaptığı kuvvetli hidrojen bağlarının FTIR spektrumlarında kendini göstermesi de sentezlerin başarıyla tamamlandığını kanıtlar niteliktedir [107, 109, 128, 129].

Nanosünger ve türevlerinin kütle kaybının belirlenmesi için Termal Gravimetrik Analiz (TGA) gerçekleştirilmiştir. Bu analizde ölçülen bozunma sıcaklıkları maddenin yapısına ve mol kütlesine bağlı olarak değişmektedir. TGA eğrileri incelendiği zaman; β CD-MA nanosünger numunesinin kalan ağırlığının kütlece % 15.2 olduğu gözlenirken *in-situ* ve *ex-situ* HNT katkılı yapılarının sırasıyla kalan ağırlıklarının kütlece % 41.7 ve % 42.0 olduğu gözlemlenmiştir. β CD-MA-EPI nanosünger numunesinin kalan ağırlığı kütlece % 6.90 iken *in-situ* ve *ex-situ* HNT katkılı yapılarının sırasıyla kalan ağırlıkları kütlece % 34.5 ve % 31.7 olduğu görülmektedir. Son olarak β CD-EPI nanosünger numunesinin kalan ağırlığı % 8.60 olarak gözlenirken *in-situ* ve *ex-situ* HNT katkılı nanosünger yapıların sırasıyla kalan ağırlıkları kütlece % 52.8 ve % 37.1 olarak gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda HNT katkılı yapıların, nanosüngerlerin termal kararlılığını arttırmış olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca HNT katkısız nanosünger yapı ile HNT katkılı nanosünger yapıların ilaç konjugatlarının termogramlarına bakıldığında da yine HNT

bulunan yapıların termal kararlılıklarının daha yüksek olduğu görülmüştür. Buna göre termal olarak HNT katkısız nanosünger yapılar kendi içinde karşılaştırılırsa, en termal kararlı olanın β CD-MA nanosünger yapısının olduğu söylenebilir. β CD-MA nanosüngerin TGA analizi sonucunda en az bozulan yapıya sahip olması, maleik anhidrit ile β CD'nin çapraz bağlanmasının termal kararlılığı artırdığını göstermektedir. *In-situ* ve *ex-situ* HNT katkılı kompozitler için, I- β CD-EPI-HNT ve E- β CD-MA-HNT'nin en termal kararlı yapılar olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, halloysitin *in-situ* yöntemle epiklorohidrin yapısıyla daha uyumlu bir şekilde kompozit oluştururken, *ex-situ* yöntemle maleik anhidrit yapısıyla daha uyumlu şekilde kompozit oluşturması ve dolayısıyla halloysit içeren yapıların en az termal olarak bozulan yapılar olduğu sonucuna dayanmaktadır.

Betasiklodekstrin temelli nanosüngerler için $^1\text{H-NMR}$ spektrumları alınmış ve her üç nanosüngerin de başarıyla sentezlendiği görülmüştür. $^1\text{H-NMR}$ piklerine bakıldığında nanosünger yapılarda betasiklodekstrin, maleik anhidrit ve epiklorohidrin pikleri kendilerini göstermiş ve yapıya girdiklerini kanıtlamışlardır [121, 130].

Betasiklodekstrin temelli nanosüngerlerin yüzey morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskopu ile (SEM) incelenmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde her üç nanosünger için de poröz yapı ve gözeneklilik görülmektedir. Nanosüngerler, bu poröz yapıları sayesinde ilaçları kapsülleyebilir ve onları güvenle biyolojik sistemde taşıyabilirler.

β CD-MA ve β CD-MA-EPI nanosüngerler ve bunların *in-situ* ve *ex-situ* yöntem ile HNT katkılı türevlerinin yapısal karakteristik davranışlarının zamanla değişimini incelemek için Dinamik Mekanik Analiz (DMA) gerçekleştirilmiştir. Ekler kısmında Şekil 4 incelenirse β CD yapısının Tg değeri sırasıyla $\tan \delta$ grafiğindeki 95 °C (Tg1) ve 227 °C (Tg2) olan geçişlerdir [131]. Buna göre grafikler incelendiğinde β CD-MA nanosünger $\tan \delta$ eğrisinde (Tg1) 94.3 °C ve (Tg2) 114 °C'de ve β CD-MA-EPI nanosünger yapıları $\tan \delta$ eğrisinde (Tg1) 72.8 °C, (Tg2) 99.0 °C ve (Tg3) 114 °C sıcaklıkta Tg değerlerini göstermişlerken, *ex-situ* β CD-MA-HNT $\tan \delta$ eğrisinde (Tg1) değerini 70.1 °C'de ve *in-situ* β CD-MA-HNT (Tg1) değerini 80.6 °C'de; *ex-situ* β CD-MA-EPI-HNT $\tan \delta$ eğrisinde (Tg1) değerini 77.0 °C ve *in-situ* β CD-MA-EPI-HNT ise (Tg1) değerini 74.7 °C'de göstermişlerdir. β CD-EPI nanosünger ve HNT ile kompozit yapıları jel formda olduğu için bu örneklerin Dinamik Mekanik Analizleri gerçekleştirilememiştir.

Bu analize göre nanosüngerlerin dinamik mekanik analizlerinde *in-situ* ve *ex-situ* yöntemlerden daha iyi sonuç veren yöntemin β CD-MA nanosünger için *in-situ* yöntem ve β CD-MA-EPI nanosünger için *ex-situ* yöntem olduğu ve HNT katkılı nanosüngerlerden ise daha dayanıklı malzeme olan *in-situ* β CD-MA-HNT olduğu görülmektedir. Halloysitin β CD yapısına katılmasıyla malzemenin daha dayanıklı hale geldiği anlaşılmıştır [132, 133].

Nanosüngerlerin yüzeylerinin kimyasal bağlanma ve elementel analizi hakkında bilgi edinilmek için X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi analizi gerçekleştirilmiştir. Her bir numune içerisinde bulunan elementler XPS taramasında pik vermiş ve tez kapsamında sentezlenen numunelerin sentez aşamalarının başarıyla tamamlandığı kanıtlanmıştır. β CD-MA nanosünger yapısında siklodekstrin ve maleik anhidritten kaynaklanan karbon, hidrojen ve oksijen elementlerine ait pikler gözlenirken, β CD-MA-EPI nanosünger yapısında siklodekstrin, maleik anhidrit ve epiklorohidrine ait karbon, hidrojen, oksijen ve azot elementlerine ait pikler gözlenmiştir. β CD-EPI yapısında ise karbon, hidrojen, oksijen ve klor elementlerine ait pikler görülmüştür. β CD-EPI yapısında, β CD-MA-EPI yapısına kıyasla daha belirgin klor pikinin gözlenmesi, epiklorohidrinin tek başına reaksiyona girdiğinde daha etkin bir şekilde rol oynadığını düşündürmektedir. Yapılara HNT katkısı yapıldığında alüminyum ve silisyum atomlarının pikleri görülürken hidroksiüre ile konjuge olan yapılarda hidroksiüredeki azot atomunun piki gözlenmiştir. İstenmeyen sodyum pikleri ise sentez esnasında kullanılan sodyum hidroksit kalıntılarından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Son olarak sitotoksisite deneyler gerçekleştirilmiştir. İlaç konjugasyonu sağlanmamış ve ilaç konjugasyonu sağlanmış *in-situ* HNT katkılı ve HNT katkısız nanosünger yapıların karşılaştırılması amacıyla farklı derişimlerde (5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL) nanosüngerlerin çözeltileri hazırlanmış ve insan embriyonik böbrek (HEK293) hücrelerinde 24 ve 48 saatlik sitotoksisite etkileri araştırılmıştır.

Nanosüngerlerin genel olarak toksik bir etki göstermediği, ilaç konjuge yapıların ise beklendiği gibi hücreler üzerinde etkili bir şekilde canlılığı azalttığı gözlemlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında 48 saatlik inkübasyon süresinin nanosünger-ilaç komplekslerinin hücrelerle etkileşmesi ve hücreler üzerinde ilaç etkinliğinin gösterilmesi açısından daha etkin sonuç verdiği görülmüştür. Bu durumun nedenlerini anlamak için, öncelikle nanosüngerlerin özelliklerini ve hücrelerle etkileşim süreçleri göz önünde bulundurulmalıdır. β CD-MA nanosünger yapılarına halloysit katkısı,

nanosüngerlerin yapısal özelliklerini değiştirerek hücrelerle etkileşimini değiştirmiştir. Öte yandan, 48 saatlik inkübasyon süresinde, tüm derişimlerde benzer % canlılık değerlerinin gözlenmesi, hücrelerin zamanla adaptasyon gösterme veya hücre zarlarının nanosüngerlerle etkileşiminin zamanla azalması nedeniyle olabilir. Bu durum, hücrelerin uzun süreli maruziyet sonrasında nanosüngerlerle etkileşimlerinin kararlı hale gelmesi olarak yorumlanabilir. β CD-MA nanosünger için % canlılık-derişim grafikleri incelendiğinde halloysitin yüzeyi arttırması ve hidroksiürenin daha fazla yapıda tutunabilmesiyle % canlılığı en düşüren malzeme I- β CD-MA-HNT-HU olmuştur. β CD-MA-EPI nanosünger ve β CD-EPI nanosünger için de yine aynı durum söz konusu olup % canlılığı azaltarak en etkili malzemeler halloysitin yapıda bulunduğu sırasıyla I- β CD-MA-EPI-HNT ve I- β CD-EPI-HNT nanosünger yapılar olmuştur. HNT katkılı malzemelerin karşılaştırılmasıyla, hücreler üzerinde en etkili olanın I- β CD-EPI-HNT-HU yapısı olduğu gözlemlenmiştir. Başka bir deyişle, epiklorohidrinin tek başına bulunduğu ortamda sentezlenen nanosünger malzemesinin hücreler üzerindeki etkisi en yüksektir. Ancak, epiklorohidrinin kimyasal olarak toksik olduğu ve klor içermesi nedeniyle nanosünger sentezinde tepkimeye girmeyen maddelerin olası kirliliğinin, hücreler üzerinde etki yapmış olabileceği dikkate alınmalıdır [124, 125, 134].

Spektroskopik analizler dikkate alındığında, termal kararlılık ve dinamik mekanik özellikler açısından başarılı bir şekilde sentezlendiği görülen, ayrıca sitotoksik etkisi epiklorohidrin içeren yapılarınkinden çok daha az olan HNT katkılı I- β CD-MA-HNT-HU yapısının, biyolojik sistemlerde güvenle kullanılabilmesi tezini destekleyen sonuçlar elde edilmiştir. Üç farklı nanosünger arasında yapılan karşılaştırmada, hem dayanıklılığı hem termal kararlılığı hem de epiklorohidrin kaynaklı sitotoksik etkilerin önlenmesi açısından I- β CD-MA-HNT-HU nanosüngerin yeşil malzeme olarak kullanılabilir olması da dikkat çekmektedir.

Bu tez çalışmasında sonuç olarak halloysit ile yüzey alanı arttırılmış ve hidroksiüre ile polimer-ilaç konjugasyonu elde edilmiş farklı kimyasallarla elde edilen nanosüngerlerin kullanımları araştırılmış ve ilacın antikanser tedavisindeki etkinliğini arttıran yeni bir biyoyumlu nanomalzeme ortaya konulmuştur. Bu sayede literatüre, kanser tedavisindeki etkileri araştırılabilecek nanoteknoloji ürünü yeni bir biyo-uyumlu malzeme eklenmiştir. Tez kapsamında hazırlanan nanosüngerlerin, nanokompozit malzemelerin ve bunların ilaç konjuge yapılarının analizleri, yapı-özellik ilişkileri ve termal ve dinamik mekanik davranışlarının incelenmesi sonucunda ortaya çıkan bu

Çalışma, malzeme hazırlanması ve kapsamlı karakterizasyonları ile bilim dünyasına önemli bir katkı sağladığı düşünülmüştür.

6. KAYNAKLAR

- [1] M. Mohajeri, B. Behnam, A. Sahebkar, Biomedical applications of carbon nanomaterials: Drug and gene delivery potentials, *Journal of cellular physiology*, 234 (2019) 298-319.
- [2] S. Hassan, G. Prakash, A.B. Ozturk, S. Saghazadeh, M.F. Sohail, J. Seo, M.R. Dokmeci, Y.S. Zhang, A. Khademhosseini, Evolution and clinical translation of drug delivery nanomaterials, *Nano today*, 15 (2017) 91-106.
- [3] A.P. Sherje, B.R. Dravyakar, D. Kadam, M. Jadhav, Cyclodextrin-based nanosponges: A critical review, *Carbohydrate polymers*, 173 (2017) 37-49.
- [4] G. Jilsha, V. Viswanad, Nanosponges: A novel approach of drug delivery system, *Int J Pharm Sci Rev Res*, 19 (2013) 119-123.
- [5] N. Morin-Crini, G. Crini, Environmental applications of water-insoluble β -cyclodextrin–epichlorohydrin polymers, *Progress in Polymer Science*, 38 (2013) 344-368.
- [6] S. Jawaharlal, S. Subramanian, V. Palanivel, G. Devarajan, V. Veerasamy, Cyclodextrin-based nanosponges as promising carriers for active pharmaceutical ingredient, *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 38 (2024) e23597.
- [7] S.M. Ghurghure, M.S.A. Pathan, P.R. Surwase, Nanosponges: A novel approach for targeted drug delivery system, *International Journal of Chemistry Studies*, 2 (2018) 15-23.
- [8] H.K. Can, S. Kavlak, A. Güner, Experimental approaches to investigation of the interaction in between anhydride containing copolymer and poly (N-vinyl-Pyrrolidone) blends, *Polymers and Polymer Composites*, 24 (2016) 213-224.
- [9] H.K. Can, G. Karakus, N. Tuzcu, Synthesis, characterization and in vitro antibacterial assessments of a novel modified poly [maleic anhydride-alt-acrylic acid]/acriflavine conjugate, *Polymer bulletin*, 71 (2014) 2903-2921.
- [10] B. Trivedi, *Maleic anhydride*, Springer Science & Business Media 2013.
- [11] H.K. Can, A.L. Doğan, Z.M. Rzaev, A.H. Uner, A. Güner, Synthesis and antitumor activity of poly (3, 4-dihydro-2H-pyran-co-maleic anhydride-co-vinyl acetate), *Journal of applied polymer science*, 96 (2005) 2352-2359.

- [12] H.K. Can, A.L. Doğan, Z.M. Rzaev, A.H. Uner, A. Güner, Synthesis, characterization, and antitumor activity of poly (maleic anhydride-co-vinyl acetate-co-acrylic acid), *Journal of applied polymer science*, 100 (2006) 3425-3432.
- [13] H.K. Can, S. Parvizikhosroshahi, E.C. Uluşık, Studies of miscibility and specific interactions of antitumor-active anhydride copolymer and poly (ethylene glycol) blends, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44 (2016) 680-689.
- [14] A. Shah, S. Aftab, J. Nisar, M.N. Ashiq, F.J. Iftikhar, Nanocarriers for targeted drug delivery, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 62 (2021) 102426.
- [15] K.K. Jain, *Drug delivery systems*, Springer2008.
- [16] P. Abasian, S. Ghanavati, S. Rahebi, S. Nouri Khorasani, S. Khalili, Polymeric nanocarriers in targeted drug delivery systems: A review, *Polymers for Advanced Technologies*, 31 (2020) 2939-2954.
- [17] S. Davis, Biomedical applications of nanotechnology—implications for drug targeting and gene therapy, *Trends in biotechnology*, 15 (1997) 217-224.
- [18] K. Jain, N. Kumar Mehra, N. K Jain, Nanotechnology in drug delivery: safety and toxicity issues, *Current pharmaceutical design*, 21 (2015) 4252-4261.
- [19] A.G. Zaki, E.-S.R. El-Sayed, M. Abd Elkodous, G.S. El-Sayyad, Microbial acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's therapy: recent trends on extraction, detection, irradiation-assisted production improvement and nano-structured drug delivery, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104 (2020) 4717-4735.
- [20] P. van Hoogevest, X. Liu, A. Fahr, Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective, *Expert opinion on drug delivery*, 8 (2011) 1481-1500.
- [21] R. Awasthi, I. Pant, G. T Kulkarni, I. Satiko Kikuchi, T. de Jesus Andreoli Pinto, K. Dua, V. Ramana Malipeddi, Opportunities and challenges in nano-structure mediated drug delivery: where do we stand?, *Current Nanomedicine (Formerly: Recent Patents on Nanomedicine)*, 6 (2016) 78-104.
- [22] R. Feynman, There's plenty of room at the bottom, *Feynman and computation*, CRC Press2018, pp. 63-76.
- [23] N. Kumar, R. Kumar, *Nanotechnology and Nanomaterials in the Treatment of Life-threatening Diseases*, William Andrew2013.
- [24] K. Aydın, H. Sevim, H.K. Can, Insight into the fabrication, characterization, and in vitro cytotoxicity studies approaches of halloysite-based functional anhydride

containing polymer nanocomposites, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 73 (2024) 79-90.

[25] B.M. Sahoo, B.V. Kumar, C.N. Patra, J.R. Panda, B.C. Mohanta, N.N. Palei, Nanotechnology: a novel approach for drug development in health care system, *Current Nanomaterials*, 5 (2020) 12-25.

[26] N.B. Turan, H.S. Erkan, G.O. Engin, M.S. Bilgili, Nanoparticles in the aquatic environment: Usage, properties, transformation and toxicity—A review, *Process safety and environmental protection*, 130 (2019) 238-249.

[27] I.J. Joye, D.J. McClements, Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application, *Current opinion in colloid & interface science*, 19 (2014) 417-427.

[28] Y.K. Sung, S.W. Kim, Recent advances in polymeric drug delivery systems, *Biomaterials Research*, 24 (2020) 12.

[29] A. De, R. Bose, A. Kumar, S. Mozumdar, Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles, Springer 2014.

[30] A. Kumari, S.K. Yadav, S.C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 75 (2010) 1-18.

[31] S. Hirsjarvi, C. Passirani, J.-P. Benoit, Passive and active tumour targeting with nanocarriers, *Current drug discovery technologies*, 8 (2011) 188-196.

[32] S. Sharma, A. Singh, Nanotechnology based targeted drug delivery: current status and future prospects for drug development, *Drug Discovery and Development—Present and Future*, published by infotech open science open minds, (2011) 427-463.

[33] C. Martinelli, C. Pucci, G. Ciofani, Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy, *APL bioengineering*, 3 (2019).

[34] M.J. Lentze, The history of maltose-active disaccharidases, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 66 (2018) S4-S6.

[35] I. Krabicová, S.L. Appleton, M. Tannous, G. Hoti, F. Caldera, A. Rubin Pedrazzo, C. Ceccone, R. Cavalli, F. Trotta, History of cyclodextrin nanosponges, *Polymers*, 12 (2020) 1122.

[36] T. Loftsson, D. Duchene, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications, *International journal of pharmaceutics*, 329 (2007) 1-11.

[37] A. Avci, S. Dönmez, Cyclodextrins and their usage in the food industry, *GIDA-Journal of Food*, 35 (2010) 305-311.

- [38] Z. Li, M. Wang, F. Wang, Z. Gu, G. Du, J. Wu, J. Chen, γ -Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications, *Applied microbiology and biotechnology*, 77 (2007) 245-255.
- [39] B.G. Poulson, Q.A. Alsulami, A. Sharfalddin, E.F. El Agammy, F. Mouffouk, A.-H. Emwas, L. Jaremko, M. Jaremko, Cyclodextrins: Structural, chemical, and physical properties, and applications, *Polysaccharides*, 3 (2021) 1-31.
- [40] S. Rahali, Y. Belhocine, H. Allal, A. Bouhadiba, I.M. Assaba, M. Seydou, A DFT investigation of the host–guest interactions between boron-based aromatic systems and β -cyclodextrin, *Structural Chemistry*, (2022) 1-12.
- [41] M. Zheng, T. Endo, W. Zimmermann, Enzymatic synthesis and analysis of large-ring cyclodextrins, *Australian Journal of Chemistry*, 55 (2002) 39-48.
- [42] Z. Liu, L. Ye, J. Xi, J. Wang, Z.-g. Feng, Cyclodextrin polymers: Structure, synthesis, and use as drug carriers, *Progress in Polymer Science*, 118 (2021) 101408.
- [43] S. Fourmentin, G. Crini, E. Lichtfouse, *Cyclodextrin fundamentals, reactivity and analysis*, Springer2018.
- [44] J.A. Hamilton, L. Chen, Crystal structure of an inclusion complex of. beta.-cyclodextrin with racemic fenoprofen: direct evidence for chiral recognition, *Journal of the American Chemical Society*, 110 (1988) 5833-5841.
- [45] M.B. de Jesus, L.F. Fraceto, M.F. Martini, M. Pickholz, C.V. Ferreira, E. de Paula, Non-inclusion complexes between riboflavin and cyclodextrins, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64 (2012) 832-842.
- [46] S. Pereva, V. Nikolova, S. Angelova, T. Spassov, T. Dudev, Water inside β -cyclodextrin cavity: Amount, stability and mechanism of binding, *Beilstein journal of organic chemistry*, 15 (2019) 1592-1600.
- [47] E.M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: a review, *Process biochemistry*, 39 (2004) 1033-1046.
- [48] S. Peimanfard, A. Zarrabi, F. Trotta, A. Matencio, C. Ceccone, F. Caldera, Developing Novel Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin-Based Nanosponges as Carriers for Anticancer Hydrophobic Agents: Overcoming Limitations of Host–Guest Complexes in a Comparative Evaluation, *Pharmaceutics*, 14 (2022) 1059.
- [49] S. Darandale, P. Vavia, Cyclodextrin-based nanosponges of curcumin: formulation and physicochemical characterization, *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 75 (2013) 315-322.

- [50] M. Shringirishi, S.K. Prajapati, A. Mahor, S. Alok, P. Yadav, A. Verma, Nanosponges: a potential nanocarrier for novel drug delivery-a review, *Asian pacific journal of tropical disease*, 4 (2014) S519-S526.
- [51] R. Cavalli, F. Trotta, W. Tumiatti, Cyclodextrin-based nanosponges for drug delivery, *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 56 (2006) 209-213.
- [52] M. Tannous, F. Caldera, G. Hoti, U. Dianzani, R. Cavalli, F. Trotta, Drug-encapsulated cyclodextrin nanosponges, *Supramolecules in Drug Discovery and Drug Delivery: Methods and Protocols*, (2021) 247-283.
- [53] G. Tejashri, B. Amrita, J. Darshana, Cyclodextrin based nanosponges for pharmaceutical use: A review, *Acta pharmaceutica*, 63 (2013) 335-358.
- [54] A. Bergal, A. Elmas, G. Akyüz, M. Andac, A New Type and Effective Approach for Anti-Cancer Drug Delivery Application: Nanosponge, (2021).
- [55] D. Li, M. Ma, Nanosponges for water purification, *Clean products and processes*, 2 (2000) 112-116.
- [56] P. Patel, A. Deshpande, Patent review on cyclodextrin based nanosponges prepared by different methods: physicochemical characterization, factors influencing formation and applications, *World journal of pharmaceutical sciences*, (2014) 380-385.
- [57] P.S. Ahire, D.S. Bhambere, M.P. Patil, S.J. Kshirsagar, Recent advances in nanosponges as a drug delivery system, *Indian Journal of Drugs*, 8 (2020) 8-17.
- [58] R. Lala, A. Thorat, C. Gargote, Current trends in β -cyclodextrin based drug delivery systems, *Int J Res Ayur Pharm*, 2 (2011) 1520-1526.
- [59] R.Z. Ahmed, G. Patil, Z. Zaheer, Nanosponges—a completely new nano-horizon: pharmaceutical applications and recent advances, *Drug development and industrial pharmacy*, 39 (2013) 1263-1272.
- [60] H. Butt, M.U. Minhas, K.U. Khan, M. Sohail, I. Khalid, S. Rehmani, M. Suhail, Cross-linking polymerization of beta-cyclodextrin with acrylic monomers; characterization and study of drug carrier properties, *Polymer Bulletin*, 80 (2023) 1893-1914.
- [61] L. Kuniak, R. Marchessault, Study of the crosslinking reaction between epichlorohydrin and starch, *Starch-Stärke*, 24 (1972) 110-116.
- [62] X. Chen, Y. Zheng, Y. Shen, Natural products with maleic anhydride structure: nonadrides, tautomycin, chaetomelic anhydride, and other compounds, *Chemical reviews*, 107 (2007) 1777-1830.

- [63] M. Ferro, F. Castiglione, C. Punta, L. Melone, W. Panzeri, B. Rossi, F. Trotta, A. Mele, Anomalous diffusion of ibuprofen in cyclodextrin nanosponge hydrogels: An HRMAS NMR study, *Beilstein journal of organic chemistry*, 10 (2014) 2715-2723.
- [64] P.K. Shende, R. Gaud, R. Bakal, D. Patil, Effect of inclusion complexation of meloxicam with β -cyclodextrin-and β -cyclodextrin-based nanosponges on solubility, in vitro release and stability studies, *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 136 (2015) 105-110.
- [65] F. Trotta, F. Caldera, C. Dianzani, M. Argenziano, G. Barrera, R. Cavalli, Glutathione bioresponsive cyclodextrin nanosponges, *ChemPlusChem*, 81 (2016) 439-443.
- [66] S. Parvizikhosroshahi, H.K. Can, Synthesis and characterization of novel polymer-drug conjugate based on the anhydride containing copolymer as a potential method for drug carrier, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 55 (2018) 192-204.
- [67] H.K. Can, H. Sevim, Ö. Şahin, Ö.A. Gürpınar, Experimental routes of cytotoxicity studies of nanocomposites based on the organo-bentonite clay and anhydride containing co-and terpolymers, *Polymer Bulletin*, 79 (2022) 5549-5567.
- [68] E. Joussein, S. Petit, J. Churchman, B. Theng, D. Righi, B. Delvaux, Halloysite clay minerals—a review, *Clay minerals*, 40 (2005) 383-426.
- [69] P. Yuan, D. Tan, F. Annabi-Bergaya, Properties and applications of halloysite nanotubes: recent research advances and future prospects, *Applied Clay Science*, 112 (2015) 75-93.
- [70] B.B. Lázaro, Halloysite and kaolinite: two clay minerals with geological and technological importance, *Revista de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza*, (2015) 7-38.
- [71] R. Kamble, M. Ghag, S. Gaikawad, B.K. Panda, Halloysite nanotubes and applications: a review, *Journal of advanced scientific research*, 3 (2012) 25-29.
- [72] F. Donmez, A.C. Kandemir, H.K. Can, Biocompatible nanocomposite production via nanoclays with diverse morphology, *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, 27 (2022) 158-179.
- [73] D. Tan, P. Yuan, D. Liu, P. Du, Surface modifications of halloysite, *Developments in clay science*, Elsevier2016, pp. 167-201.
- [74] G. Uner, G. Karakus, H. Kaplan Can, Design, fabrication and characterization of silane tailored surface of halloysite based polymer nanocomposites, *Polymer Composites*, 44 (2023) 1305-1330.

- [75] A. Okal, S. Reaz, C.S. Lim, Cancer biology: some causes for a variety of different diseases, *Cancer Targeted Drug Delivery: An Elusive Dream*, Springer2013, pp. 121-159.
- [76] F. Fontana, M. Marzagalli, M. Sommariva, N. Gagliano, P. Limonta, In vitro 3D cultures to model the tumor microenvironment, *Cancers*, 13 (2021) 2970.
- [77] M.A. Dawson, T. Kouzarides, Cancer epigenetics: from mechanism to therapy, *cell*, 150 (2012) 12-27.
- [78] H.H. Heng, J.B. Stevens, S.W. Bremer, K.J. Ye, G. Liu, C.J. Ye, The evolutionary mechanism of cancer, *Journal of cellular biochemistry*, 109 (2010) 1072-1084.
- [79] A.S. Cravo, R. Mrsny, Cancer: so common and so difficult to deal with, *Biomaterials for Cancer Therapeutics*, Elsevier2020, pp. 1-22.
- [80] B.M. Cantwell, D. Veale, C. Rivett, S. Ghani, A.L. Harris, Cisplatin with high-dose infusions of hydroxyurea to inhibit DNA repair: a phase II study in non-small-cell lung cancer, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 23 (1989) 252-254.
- [81] R.A. Finch, M.-C. Liu, S.P. Grill, W.C. Rose, R. Loomis, K.M. Vasquez, Y.-C. Cheng, A.C. Sartorelli, Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): A potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity, *Biochemical pharmacology*, 59 (2000) 983-991.
- [82] D.C. Smith, W.P. Vaughan, P.R. Gwilt, D.L. Trump, A phase I trial of high-dose continuous-infusion hydroxyurea, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 33 (1993) 139-143.
- [83] J. Zhang, C.Q. Lan, M. Post, B. Simard, Y. Deslandes, T.H. Hsieh, Design of nanoparticles as drug carriers for cancer therapy, *Cancer genomics & proteomics*, 3 (2006) 147-157.
- [84] P. Sanchez-Moreno, J.L. Ortega-Vinuesa, J.M. Peula-Garcia, J.A. Marchal, H. Boulaiz, Smart drug-delivery systems for cancer nanotherapy, *Current drug targets*, 19 (2018) 339-359.
- [85] G. KARAKUS, Bazı maleik anhidrit içeren kopolimerlerin amin yapılı ilaç etken maddeleri ile türevlendirilmesi, yapısal karakterizasyonu ve biyolojik aktiviteleri, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 19 (2015) 121-125.
- [86] R. Duncan, Polymer therapeutics for tumour specific delivery, *Chemistry and industry*, (1997) 262-264.

- [87] H. Maeda, Y. Matsumura, Tumorotropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs, *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 6 (1989) 193-210.
- [88] Ö. SAYINER, T. ÇOMOĞLU, Nanotaşıyıcı sistemlerde hedeflendirme targeting with nanocarrier systems, *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 40 (2016) 62-79.
- [89] H. Maeda, M. Ueda, T. Morinaga, T. Matsumoto, Conjugation of poly (styrene-co-maleic acid) derivatives to the antitumor protein neocarzinostatin: pronounced improvements in pharmacological properties, *Journal of medicinal chemistry*, 28 (1985) 455-461.
- [90] R. Duncan, M. Vicent, F. Greco, R. Nicholson, Polymer–drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer, *Endocrine-related cancer*, 12 (2005) S189-S199.
- [91] Y. Matsumura, H. Maeda, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer research*, 46 (1986) 6387-6392.
- [92] P. Chytil, T. Etrych, Č. Koňák, M. Šírová, T. Mrkvan, J. Bouček, B. Říhová, K. Ulbrich, New HPMA copolymer-based drug carriers with covalently bound hydrophobic substituents for solid tumour targeting, *Journal of Controlled Release*, 127 (2008) 121-130.
- [93] B. Subramaniam, Z.H. Siddik, N.H. Nagoor, Optimization of nanostructured lipid carriers: Understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations, *Journal of nanoparticle research*, 22 (2020) 1-29.
- [94] V.P. Torchilin, Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example, *Drug delivery*, (2010) 3-53.
- [95] J.R. Upponi, V.P. Torchilin, Passive vs. active targeting: an update of the epr role in drug delivery to tumors, *Nano-Oncologicals: New Targeting and Delivery Approaches*, Springer2014, pp. 3-45.
- [96] J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect, *Advanced drug delivery reviews*, 63 (2011) 136-151.
- [97] J. Timson, Hydroxyurea, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 32 (1975) 115-131.

- [98] J.W. Yarbro, Mechanism of action of hydroxyurea, *Seminars in oncology*, 1992, pp. 1-10.
- [99] M. Attri, A. Raghav, K. Rao, P. Pandey, N. Minocha, A Review on Nanosponges: An Idiosyncratic Approach for Delivery of Proactive Molecules, *Current Nanomaterials*, 9 (2024) 193-208.
- [100] M. Massaro, C.G. Colletti, G. Lazzara, S. Guernelli, R. Noto, S. Riela, Synthesis and characterization of halloysite–cyclodextrin nanosponges for enhanced dyes adsorption, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5 (2017) 3346-3352.
- [101] B. Gidwani, A. Vyas, Synthesis, characterization and application of epichlorohydrin- β -cyclodextrin polymer, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114 (2014) 130-137.
- [102] S. Tang, L. Kong, J. Ou, Y. Liu, X. Li, H. Zou, Application of cross-linked β -cyclodextrin polymer for adsorption of aromatic amino acids, *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 19 (2006) 39-48.
- [103] N. Roik, L. Belyakova, IR Spectroscopy, X Ray diffraction and thermal analysis studies of solid β -cyclodextrin-para aminobenzoic acid" inclusion complex, *Фізика і хімія твердого тіла*, (2011) 168-173.
- [104] K.P. Sambasevam, S. Mohamad, N.M. Sarih, N.A. Ismail, Synthesis and characterization of the inclusion complex of β -cyclodextrin and azomethine, *International journal of molecular sciences*, 14 (2013) 3671-3682.
- [105] Z.Y. Sun, M.X. Shen, G.P. Cao, J. Deng, Y. Liu, T. Liu, L. Zhao, W.K. Yuan, Preparation of bimodal porous copolymer containing β -cyclodextrin and its inclusion adsorption behavior, *Journal of applied polymer science*, 118 (2010) 2176-2185.
- [106] X. Zhong, Q. Yuan, Q. Wang, C. Hu, K. Guo, J. Ouyang, M. Chen, Maleic anhydride- β -cyclodextrin functionalized magnetic nanoparticles for the removal of uranium (VI) from wastewater, *Crystals*, 12 (2022) 1731.
- [107] B. Szczepanik, P. Słomkiewicz, M. Garnuszek, K. Czech, D. Banaś, A. Kubala-Kukuś, I. Stabrawa, The effect of chemical modification on the physico-chemical characteristics of halloysite: FTIR, XRF, and XRD studies, *Journal of Molecular Structure*, 1084 (2015) 16-22.
- [108] F. Bessaha, N. Mahrez, K. Marouf-Khelifa, A. Çoruh, A. Khelifa, Removal of Congo red by thermally and chemically modified halloysite: equilibrium, FTIR spectroscopy, and mechanism studies, *International journal of environmental science and technology*, 16 (2019) 4253-4260.

- [109] G. Karakus, H.K. Can, A.S. Yaglioglu, Synthesis, structural characterization, thermal behavior and cytotoxic/antiproliferative activity assessments of poly (maleic anhydride-alt-acrylic acid)/hydroxyurea polymer/drug conjugate, *Journal of Molecular Structure*, 1210 (2020) 127989.
- [110] S.R. Kamat, A.H. Mane, A.D. Patil, T.R. Lohar, R.S. Salunkhe, Synthesis of xanthene and coumarin derivatives in water by using β -Cyclodextrin, *Research on Chemical Intermediates*, 47 (2021) 911-924.
- [111] C.M. Filho, P.V. Bueno, A.F. Matsushita, B.H. Vilsinski, A.F. Rubira, E.C. Muniz, D.M. Murtinho, A.J. Valente, Uncommon sorption mechanism of aromatic compounds onto poly (vinyl alcohol)/chitosan/maleic anhydride- β -cyclodextrin hydrogels, *Polymers*, 12 (2020) 877.
- [112] R. Rengarajan, V.R. Parameswaran, S. Lee, M. Vicic, P.L. Rinaldi, NMR analysis of polypropylene-maleic anhydride copolymer, *Polymer*, 31 (1990) 1703-1706.
- [113] A. Solladié-Cavallo, H. Senouci, L. Jierry, A. Klein, M. Bouquey, J. Terrisse, Linseed oil and mixture with maleic anhydride: ^1H and ^{13}C NMR, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80 (2003) 311-314.
- [114] S. Zhumakova, A. Ten, T. Zharkynbek, V. Yu, T. Seilkhanov, A. Basharimova, S. Bayazit, M. Aydemir, A. Zazybin, NMR study of the inclusion complexes of β -cyclodextrin with diphenhydramine, clonidine and tolperisone, *SN Applied Sciences*, 4 (2022) 75.
- [115] R.P. Chartoff, J.D. Menczel, S.H. Dillman, *Dynamic mechanical analysis (DMA), Thermal analysis of polymers: fundamentals and applications*, (2009) 387-495.
- [116] M. Yazdani, O. Tavakoli, M. Khoobi, Y.S. Wu, M.A. Faramarzi, E. Gholibegloo, S. Farkhondeh, Beta-carotene/cyclodextrin-based inclusion complex: Improved loading, solubility, stability, and cytotoxicity, *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 102 (2022) 55-64.
- [117] N. Morin-Crini, P. Winterton, S. Fourmentin, L.D. Wilson, E. Fenyvesi, G. Crini, Water-insoluble β -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers for removal of pollutants from aqueous solutions by sorption processes using batch studies: A review of inclusion mechanisms, *Progress in Polymer Science*, 78 (2018) 1-23.
- [118] B. Sreedhar, D. Chattopadhyay, M.S.H. Karunakar, A. Sastry, Thermal and surface characterization of plasticized starch polyvinyl alcohol blends crosslinked with epichlorohydrin, *Journal of Applied Polymer Science*, 101 (2006) 25-34.

- [119] J.A. Pellicer, M.I. Rodríguez-López, M.I. Fortea, C. Lucas-Abellán, M.T. Mercader-Ros, S. López-Miranda, V.M. Gómez-López, P. Semeraro, P. Cosma, P. Fini, Adsorption properties of β - and hydroxypropyl- β -cyclodextrins cross-linked with epichlorohydrin in aqueous solution. A sustainable recycling strategy in textile dyeing process, *Polymers*, 11 (2019) 252.
- [120] S.K. Upadhyay, G. Kumar, NMR and molecular modelling studies on the interaction of fluconazole with β -cyclodextrin, *Chemistry Central Journal*, 3 (2009) 1-9.
- [121] O. Donoso-González, L. Lodeiro, Á.E. Aliaga, M.A. Laguna-Bercero, S. Bollo, M.J. Kogan, N. Yutronic, R. Sierpe, Functionalization of gold nanostars with cationic β -cyclodextrin-based polymer for drug co-loading and SERS monitoring, *Pharmaceutics*, 13 (2021) 261.
- [122] G.S. Rule, T.K. Hitchens, *NMR spectroscopy*, Springer 2006.
- [123] P. Srinivas, A. Jahnavi Reddy, Formulation and evaluation of isoniazid loaded nanosponges for topical delivery, *Pharmaceutical Nanotechnology*, 3 (2015) 68-76.
- [124] S.E. Alavi, M.K.M. Esfahani, F. Alavi, F. Movahedi, A. Akbarzadeh, Drug delivery of hydroxyurea to breast cancer using liposomes, *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 28 (2013) 299-302.
- [125] L. Szente, A. Singhal, A. Domokos, B. Song, Cyclodextrins: Assessing the impact of cavity size, occupancy, and substitutions on cytotoxicity and cholesterol homeostasis, *Molecules*, 23 (2018) 1228.
- [126] A. Singh, Y.-J. Xu, The cell killing mechanisms of hydroxyurea, *Genes*, 7 (2016) 99.
- [127] H. Young, A. Khan, J. Kendra, I. Coulson, The cutaneous side-effects of hydroxyurea, *Clinical & Laboratory Haematology*, 22 (2000) 229-232.
- [128] M. Zemzem, L. Vinches, S. Hallé, Morphological investigation of maleic anhydride-grafted nitrile/nanoclay nanocomposites, *Materials Research Express*, 9 (2022) 085302.
- [129] M. Jafari Nasab, A.R. Kiasat, R. Zarasvandi, β -Cyclodextrin nanosponge polymer: a basic and eco-friendly heterogeneous catalyst for the one-pot four-component synthesis of pyranopyrazole derivatives under solvent-free conditions, *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 124 (2018) 767-778.
- [130] M. Yadav, M. Das, C. Savani, S. Thakore, R. Jadeja, Maleic anhydride cross-linked β -cyclodextrin-conjugated magnetic nanoadsorbent: an ecofriendly approach for

simultaneous adsorption of hydrophilic and hydrophobic dyes, *ACS omega*, 4 (2019) 11993-12003.

[131] N.G. Hădărugă, G.N. Bandur, I. David, D.I. Hădărugă, A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes, *Environmental Chemistry Letters*, 17 (2019) 349-373.

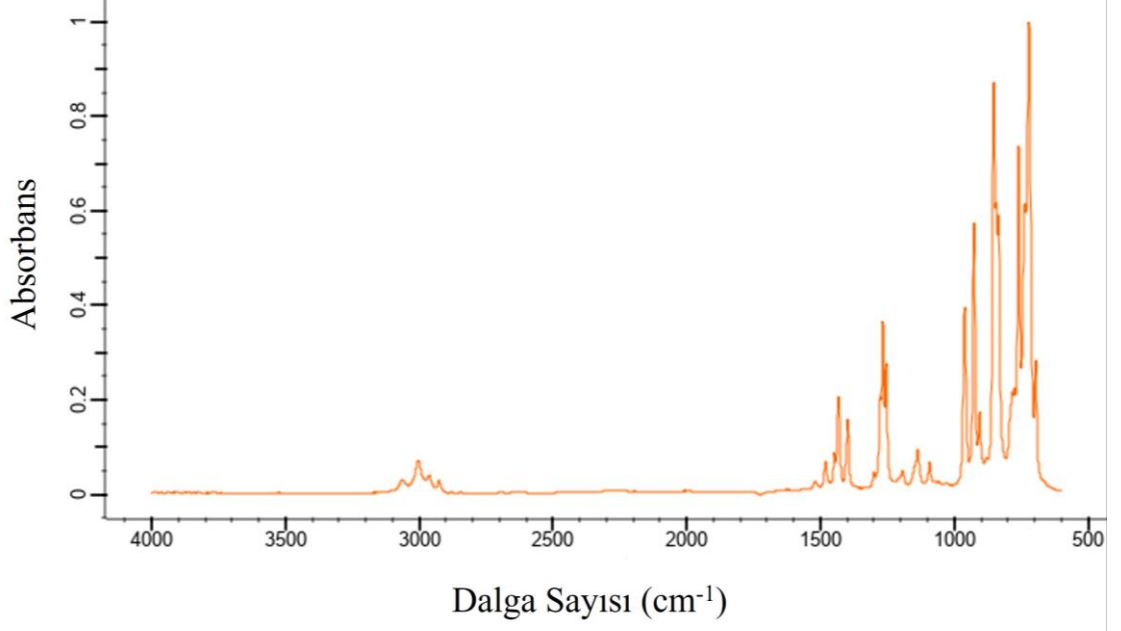
[132] R.L. Abarca, F.J. Rodríguez, A. Guarda, M.J. Galotto, J.E. Bruna, Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component, *Food chemistry*, 196 (2016) 968-975.

[133] N. Tabary, M.J. Garcia-Fernandez, F. Danede, M. Descamps, B. Martel, J.-F. Willart, Determination of the glass transition temperature of cyclodextrin polymers, *Carbohydrate polymers*, 148 (2016) 172-180.

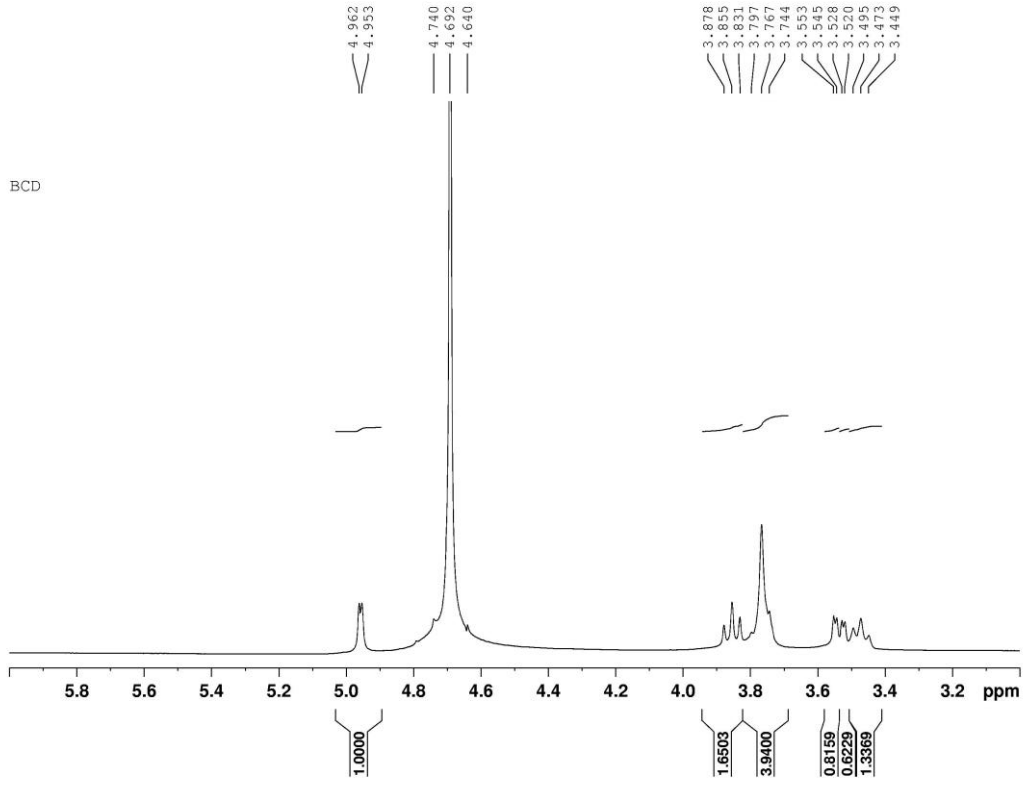
[134] A. Rezaei, J. Varshosaz, M. Fesharaki, A. Farhang, S.M. Jafari, Improving the solubility and in vitro cytotoxicity (anticancer activity) of ferulic acid by loading it into cyclodextrin nanosponges, *International journal of nanomedicine*, (2019) 4589-4599.

[135] N.I.f.O.S.a. Health, Epichlorohydrin, WILEY, 2019.

EKLER

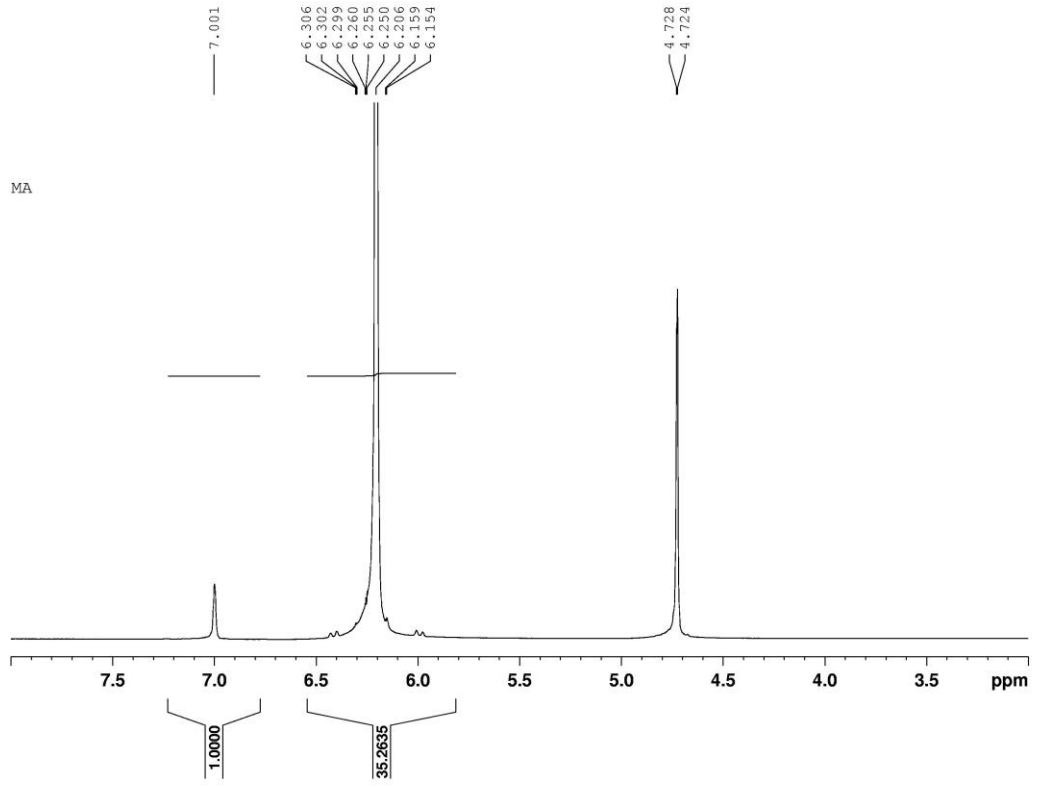


Şekil 1. EPI'ye ait FTIR spektrumu [135].



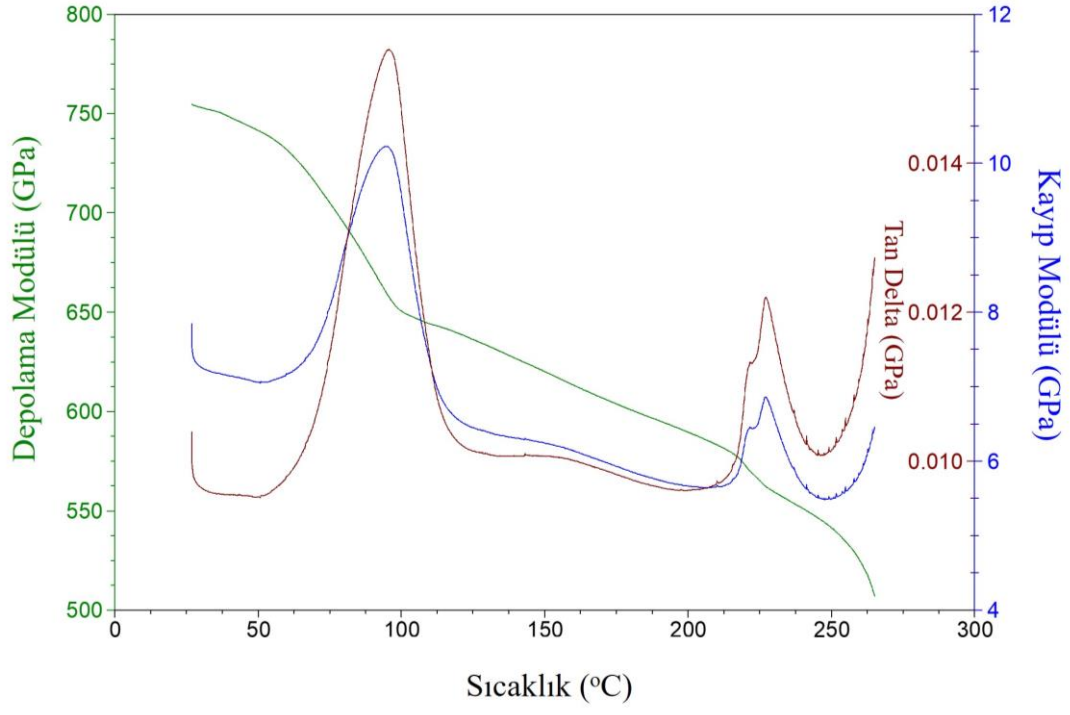
Şekil 2. Betasiklodesktrine ait ^1H -NMR spektrumu

DMSO-d6 çözücüsü içinde 25 ± 0.1 °C

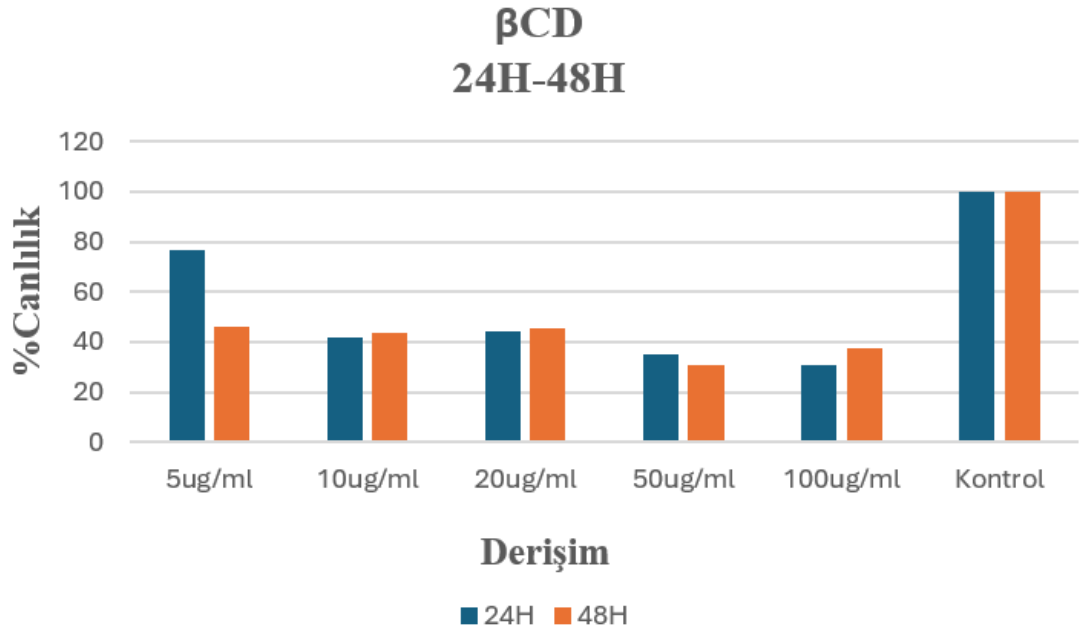


Şekil 3. Maleik Anhidrite ait ^1H -NMR spektrumu

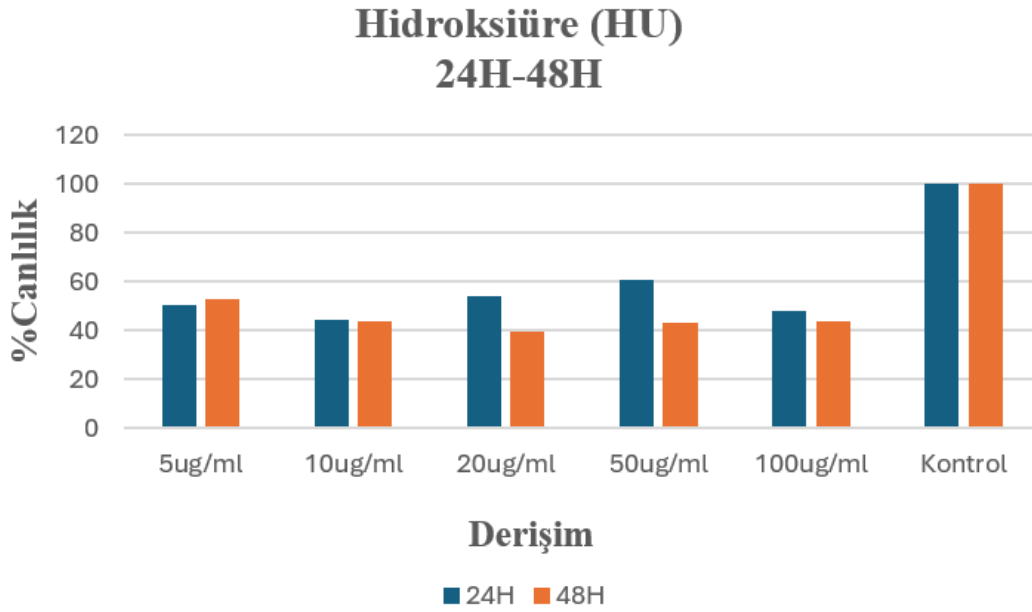
DMSO-d6 çözücüsü içinde 25 ± 0.1 °C



Şekil 4. β -Siklodekstrin'a ait Depolama Modülü, Kayıp Modülü ve Tan δ -Sıcaklık eğrileri



Şekil 5. Betasiklodesktrine ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiğı



Şekil 6. Hidroksiüreye ait 24 ve 48 saat sürelerde Derişim - % Canlılık grafiğı

Çizelge 1. β CD-MA, E- β CD-MA-HNT, I- β CD-MA-HNT, β CD-MA-EPI, E- β CD-MA-EPI-HNT ve I- β CD-MA-EPI-HNT yapılarına ait SM, LM ve tan δ eğrilerindeki geçiş sıcaklıkları

Numune	Sıcaklık (°C)								
	SM (Tg1)	SM (Tg2)	SM (Tg3)	LM (Tg1)	LM (Tg2)	LM (Tg3)	Tan δ (Tg1)	Tan δ (Tg2)	Tan δ (Tg3)
β CD-MA	78.0	114	-	74.5	114	-	94.3	114	-
E- β CD-MA-HNT	64.9	-	-	68.6	-	-	70.1	-	-
I- β CD-MA-HNT	80.5	-	-	72.5	-	-	80.6	-	-
β CD-MA-EPI	79.6	98.5	136.6	70.4	98.5	139.6	72.8	99.0	144
E- β CD-MA-EPI-HNT	75.7	-	-	73.8	-	-	77.0	-	-
I- β CD-MA-EPI-HNT	74.2	-	-	72.6	-	-	74.7	-	-

Çizelge 1. Nanosünger, HNT katkılı nanokompozit ve nanosünger ile nanokompozitlerin ilaç ile konjugasyonundan oluşan yapıların 48 saatte 100 μ M/mL derişimdeki çözeltilerinin % hücre canlılığı verileri.

Numune	% Hücre Canlılığı
β CD-MA	74
β CD-MA-HU	36
I- β CD-MA-HNT	52
I- β CD-MA-HNT-HU	42
β CD-MA-EPI	40
β CD-MA-EPI-HU	39
I- β CD-MA-EPI-HNT	38
I- β CD-MA-EPI-HNT-HU	36
β CD-EPI	84
β CD-EPI-HU	43
I- β CD-EPI-HNT	84
I- β CD-EPI-HNT-HU	24

Tezden Üretilmiş Projeler

1. Bilimsel Araştırma Projeleri, Hızlı Destek Projesi, Halloysit İçeren İlaç Taşıyıcı Nanosüngerlerin Tasarımı, Sentezi ve Karakterizasyonu, Hacettepe Üniversitesi, Proje Kodu: FHD-2024-21130 (2024- Devam ediyor).

Tezden Üretilmiş Yayınlar

1. Burcu Akar, Hatice Kaplan Can, “Developing Novel β -Cyclodextrin-Based Nanosponges As Nanocarrier Of Hydroxyurea Anticancer Agent” (In Preparation, 2024)

Tezden Üretilmiş Sunumlar

1. Akar B., Kaplan Can H., “Cyclodextrin and Halloysite based nanosponges for enhanced drug carrier”, Poster Sunumu, 5th Eurasia Biochemical Approaches & Technologies Congress (5th EBAT) November 2-5, 2023, Antalya (Poster)
2. Akar B., Kaplan Can H., “Geliştirilmiş İlaç Taşıyıcı Olarak Siklodektrin ve Halloysit Bazlı Nanosüngerler”, Poster Sunumu, Ulusal IX. Anorganik Kimya Kongresi 16-19 Mayıs 2024, Ankara (Poster).