

**İÇİ BOŞLUKLU GÖZENEKLI SİLİKA
NANOPARTİKÜLLERİN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM
OLARAK HAZIRLANMASI VE İNCELENMESİ**

**PREPARATION AND EVALUATION OF HOLLOW
MESOPOROUS SILICA NANOPARTICLES AS DRUG
DELIVERY SYSTEMS**

GÖZDE ULTAV

Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2019

Gözde Ultav'ın hazırladığı “İçi Boşluklu Gözenekli Silika Nanopartiküllerin İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Hazırlanması ve İncelenmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda Doktora TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İmran VURAL

Başkan

Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

Danışman

Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI

Üye

Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ

Üye

Doç. Dr. Müge KILIÇARSLAN

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **Doktora TEZİ** olarak / / tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

26/ 06 / 2019



Gözde ULTAV

YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

26/06 /2019



Gözde Ultav

ÖZET

İÇİ BOŞLUKLU GÖZENEKLI SİLİKA NANOPARTİKÜLLERİN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK HAZIRLANMASI VE İNCELENMESİ

Gözde ULTAV

Doktora, Nanoteknoloji ve Nano Tıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

Haziran 2019, 119 sayfa

Etkin maddelerin etkisini gösterebilmesi için kanda kalış süresinin arttırılması, bu sayede daha etkin bir Akut Miyeloid Lösemi (AML) tedavisi sağlanabilmesi amacıyla iç boşluğu sayesinde ilaç taşıma kapasitesi yüksek, proton-sünger etkisiyle (proton-sponge effect) endozomdan kaçarak etkinliğini gösterebilecek, kanda kalış süresi uzatılmış bir ilaç taşıyıcı sistem tasarımı bu tezde ele alınmıştır. Öncelikle elde edilen gözenekli silika sistemin tanımlanabilmesi için karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Dinamik ışık saçılımı (DLS) ile ortalama partikül büyüklüğünün yaklaşık 200 nm olduğu anlaşılmış, bu bilgi Transmision Elektron Mikroskopisi (TEM) ile kontrol edildiğinde partiküllerin yaklaşık 150 nm olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca partiküllerin iç boşluklarının başarıyla oluştuğu da gözlenmiştir. X-ışını kırınım desenleri ile partiküllerin dış çeperinin gözenekli kristal özellikte olduğu, azot adsorpsiyon-desorpsiyon yöntemi ile (Braun-Emmet-Teller yöntemi, BET) gözenek çapının yaklaşık 16 nm, yüzey alanının 232 m²/g olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen partiküllerin yüzey yükünün negatif olduğu, bu yükün pozitif dönüşmesiyle poli etilen glikol bağlanmış kitosan (Kitosan-PEG) kaplamanın gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Yapılan hücre kültürü çalışmalarıyla, etkin madde yüklenmemiş partiküllerin herhangi bir toksik etki göstermediği, yüklü partiküllerin ise serbest etkin madde ile yakın bir toksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Bunun üzerine gerçekleştirilen in vivo çalışmalardan elde edilen veriler, kitosan-PEG kaplamanın kanda kalış süresini arttırdığını göstermiştir. Tasarlanan sistemin AML tedavisi için umut vaat ettiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gözenekli Silika, İlaç Taşıyıcı Sistem, pH Duyarlı Sistem, Proton-Sünger Etkisi, Kitosan-PEG Kaplama

ABSTRACT

PREPARATION AND EVALUATION OF HOLLOW POROUS SILICA NANOPARTICLES AS DRUG DELIVERY SYSTEMS

Gözde ULTAV

Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

June 2019, 119 pages

In this thesis, designing a drug delivery system with high drug loading capacity due to its hollow interior, effective drug delivery by endosomal escape with proton-sponge effect and elongated blood circulation time to achieve a better Acute Myeloid Leukemia (AML) treatment is discussed. First of all, the characterization study was done to define mesoporous silica system. The average particle size was found as approximately 200nm by DLS measurements and this information checked by transmission electron microscopy (TEM) and the particles were approximately 150nm. Besides, it was observed that the hollow interior was achieved. It was observed that the outer wall of the particles were a crystal porous structure by X-Ray Diffraction, pore diameter was approximately 16nm and the surface area was 232 m²/g by nitrogen adsorption-desorption isotherms (BET). The evaluated particles were charged negatively until chitosan- poly ethylene glycol (Chitosan-PEG) modification and after that the surface charge was positive which indicates chitosan-PEG was coated onto surface. The intact NPs have no toxic effect in vitro, yet the NPs with drug substance have a toxic effect almost as good as free doxubicin. The data from in vivo studies showed that Chitosan-PEG coating was elongated blood circulation time of NPs. The designed system is promising for the treatment of AML.

Anahtar Kelimeler: Porous silica, Drug delivery system, pH Sensitive systems, Proton-Sponge Effect, Chitosan-PEG coating

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca bana her aşamada destek olup çalışmalarına yön veren başta danışman hocam Prof. Dr. Yılmaz Çapan olmak üzere çalışmalarım sırasında ihtiyaç duyduğumda her an yanımda olan Prof. Dr. Güneş Esendağlı ve Prof. Dr. İmran Vural'a

Beni Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Ailesi'ne kabul ederek tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü imkânı sağlayan tüm Hocalarıma,

Doktora Programı'na girdiğim ilk günden beri her konuda desteğini esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Adem Şahin'e

Doktora çalışmalarımız boyunca birlikte çalıştığımız değerli arkadaşlarım Ecz. Hayrettin Tonbul, Ecz. Sedenay Akbaş ve Ecz. Indrit Seko'ya

Hücre kültürü çalışmalarımı gerçekleştirmeme izin veren Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı'na ve bu çalışmalar sırasında desteğini esirgemeyen Dr. Süleyman ve Uzm. Bio. Ece Tavukçuoğlu'na,

Bu tez için kullanılan malzemelerden Kitosan-PEG'i sağlayan değerli Prof. Eduardo Fernandez-Megia'a,

Bu tezde yer alan çalışmaların bazılarında katkı sağlamış olan projeye destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri'ne (Proje No: THD-2016-12890),

Bu günlere gelmemde büyük emekleri olan ve her zaman yanımda olup beni destekleyen Sevgili Aileme ve özellikle kardeşim Dr. Cansu Özbaş ve arkadaşım Av. Özgecan Güler'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Kanser.....	5
2.1.1 Klasik kanser tedavisinin kısıtlamaları.....	6
2.1.2 Akut Miyeloid Lösemi (AML).....	7
2.2 Doksorubisin Hidroklorür.....	8
2.3 Kanser Tedavisinde Nanoilaç Taşıyıcı Sistemler.....	10
2.3.1 Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme.....	19
2.3.2 Uyarı-Yanıt İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	23
Redoks-Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	24
pH-Duyarlı (Tetikli) İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	25
Enzim-Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	26
Sıcaklık-Duyarlı Sistemler.....	26
Manyetik-Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	27
Ultrason-Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	27
Işığa-Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	27
2.4 Silika Nanopartiküller.....	28
2.4.1 Mezogözenekli Silika Nanopartikülleri (MSN).....	29
2.4.2 İçi Boş (hollow) Mezogözenekli Silika Nanopartikülleri (HMSP).....	30
HMSP Sentezleme Yöntemleri.....	30
2.5 Kitosan ve Polietilen glikol (PEG).....	39
2.6 Hücre İçine Alım.....	41
2.6.1 Endozomdan Kaçış.....	41

2.7	Deney Tasarımı	43
2.7.1	Taguchi Deney Tasarımı.....	43
2.7.2	Performans istatistiği ve sinyal gürültü oranı	44
2.7.3	TOPSIS yöntemi	45
3	Deneysel Çalışmalar	51
3.1	Kullanılan cihazlar	51
3.2	Malzemeler.....	52
3.3	Şablon Silikanın hazırlanması ve partikül büyüklüğü ve dağılımının optimizasyonu	53
3.4	İçi boş silikanın hazırlanması.....	55
3.5	Etkin madde yüklenmesi ve Kitosan-PEG Kaplanması.....	56
3.6	Etkin Madde Yükleme Etkinliği	57
3.7	Miktar Tayini	57
3.7.1	Kromatografik şartlar ve sistem.....	57
3.7.2	Doğrusallık ve Aralık:	58
3.7.3	Doğruluk ve Kesinlik.....	58
3.7.4	Saptama ve Tayin Sınırı.....	58
3.8	Nanopartiküllerin karakterizasyonu	58
3.8.1	Nanopartiküllerin Morfolojisinin İncelenmesi	59
3.8.2	Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Tayini	59
3.8.3	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	61
3.8.4	Yüzey alanının belirlenmesi	61
3.8.5	X-Işını Kırınım Desenleri (XRD).....	62
3.8.6	In Vitro Salım Çalışmaları.....	63
3.8.7	In Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları	63
3.9	İn Vivo Çalışmalar	64

3.10	Kandaki Dokсорubisin Seviyelerinin Karşılaştırılması	65
3.11	Plazmadan Dokсорubisinin Miktar Tayini için Kullanılan Analitik Yöntem 67	
3.11.1	Kromatografik şartlar ve sistem.....	67
3.11.2	Doğruluk ve Kesinlik.....	68
3.11.3	Saptama ve Tayin Sınırı.....	68
3.12	İstatistiksel Analiz	68
4	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	69
4.1	HPLC Analizleri.....	69
4.2	Nanopartikül Karakterizasyonu	71
4.2.1	Polidispersite İndeksi ve Ortalama Partikül Büyüklüğü.....	71
4.2.2	Nanopartiküllerin Morfolojisinin İncelenmesi	78
4.2.3	FTIR analizi	83
4.2.4	X-Işını kırınım desenleri (XRD).....	85
4.2.5	Yüzey Karakterizasyonu	86
4.2.6	<i>in vitro</i> salım deneyleri	87
4.2.7	<i>in vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	91
4.2.8	<i>in vivo</i> Çalışmalar	98
5	YORUM.....	103
6	Kaynaklar.....	106
7	EKLER.....	115

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Dokсорubisinin moleküler yapısı [14]	9
Şekil 2.2. Doxil yapısının şematik gösterimi [18]	10
Şekil 2.3. Nano İlaç Taşıyıcı Sistemlerin gelişimin genel durumu [23].....	12
Şekil 2.4. Normal doku ve tümörlü dokunun şematik gösterimi [35]	20
Şekil 2.5 Uyarı-Yanıt İlaç Taşıyıcı Sistemler [49]	24
Şekil 2.6 Hidroliz reaksiyonu (1) ve kondenzasyon reaksiyonu (2) [60].	29
Şekil 2.7. Yüzey korumalı aşındırma (a) ve yapısal farklılık temelli seçici aşındırma (b) mekanizmalarının şematik gösterimi [64]	32
Şekil 2.8 Son yirmi yıl içerisinde kanser alanında silika nanopartiküller kullanılarak yayınlanan çalışmaların (Web of Science®) a) toplam sayıları ve b) aldıkları toplam atıf sayıları.....	35
Şekil 2.9 A) Nanopartiküllerin yüzeyi opsoninlerle (örneğin IgG veya IgA) kaplandığında opsonizasyon adı verilen olay gerçekleşir. Opsoninler partikül yüzeyini işaretlediğinden, partiküller makrofajlar gibi fagositik hücrelerin Fc reseptörlerince tanınırlar. B) Partikül yüzeyinin PEG ile kaplanması, yüzeye opsonin adsorpsiyonunu engelleyerek partiküle sterik stabilite ve görünmezlik özelliği kazandırır.	41
Şekil 2.10 Endozomdan kaçış mekanizmasının şematik gösterimi [97]	42
Şekil 2.11. Yapılması planlanan çalışmanın özet gösterimi	49
Şekil 3.1. İçi Boş Gözenekli Silika Nanopartiküllerin Elde Edilişi.....	56
Şekil 3.2. XRD Prensibi.....	62
Şekil 4.1. Dokсорubisin için 30-110µg/mL arasında kalibrasyon grafiği.....	69
Şekil 4.2. Dokсорubisin için 0,1-10µg/mL arasında kalibrasyon grafiği.....	70
Şekil 4.3. En küçük partikül büyüklüğü için ana etki grafikleri: A ve B ortalama partikül büyüklüğüne, C ve D polidispersite indeksine göre yapılan optimizasyona aittir. E ve F ise TOPSİS tabanlı Taguchi tasarımı ile elde edilmiştir	74
Şekil 4.4 Validasyon deneyi sonuçları: A ve B sırasıyla partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli.....	75

Şekil 4.5. A ve B sırasıyla HMSPLerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli	76
Şekil 4.6. Doksorubisin Yüklü kitosan kaplı büyük HMSPLerin A partikül büyüklüğü ve B zeta potansiyeli.....	77
Şekil 4.7 Şablon silikanın SEM görüntüsü	78
Şekil 4.8. A) HMSPLerin SEM görüntüleri ve B) büyütülmüş görüntü.....	79
Şekil 4.9. Kitosan kaplı HMSP SEM görüntüsü.....	80
Şekil 4.10 TEM Görüntüleri: A) 50mg şablon kullanılarak elde edilen HMSP; B, C ve D 60 mg şablon kullanılarak elde edilen HMSPLerin farklı ölçeklerdeki görüntüleri	81
Şekil 4.11. HMSP'nin FTIR çıktısı	84
Şekil 4.12. XRD desenleri A) HMSP, B) Kitosan kaplı HMSP	85
Şekil 4.13. A) N ₂ adsorpsiyon-desorpsiyon izotermi ve B) gözenek boyut dağılımları	86
Şekil 4.14. Hazırlanan formülasyonlar için zamana karşı ilaç salımı.....	89
Şekil 4.15 MTT uygulaması sonrası bazı örnek plakalar	92
Şekil 4.16 Hazırlanan formülasyonların HL-60 hücre hattında in vitro çalışmaları sonucunda elde edilen IC50 grafikleri	93
Şekil 4.17 A) Boş partiküllerin sitotoksitesinin grafik gösterimi (*: p<0.05) ve B) etkin madde yüklenmiş partiküllerin IC50 değerleri	97
Şekil 4.18. in vivo Çalışmalar ile Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi.....	98
Şekil 4.19 Hazırlanan formülasyonlar sıçanlara verildikten sonra, toplanan kanlardaki doksorubisin konsantrasyonları	101

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Onaylanmış veya çalışması devam etmekte olan nanoteknolojik ilaçlar [14]	13
Tablo 2.2. İçi boş silika partiküller ile ilgili çalışmalardan bazıları	37
Tablo 3.1 Şablon olarak amorf silika sentezi için uygulanan deney tasarımının faktör ve seviyeleri	54
Tablo 3.2 Şablon olarak kullanılacak amorf silikanın sentezi için faktörler ve seviyeleri	54
Tablo 3.3. Etkin madde yüklemesi ve kitosan kaplaması.....	56
Tablo 4.1 Doksorubisinin su içinde PBS içinde 30-110 µg/mL aralığında miktar tayini için validasyon sonuçları	71
Tablo 4.2 Doksorubisinin su içinde PBS içinde 0.1-10 µg/mL aralığında miktar tayini için validasyon sonuçları	71
Tablo 4.3. L ₉ Taguchi tasarımıyla elde edilen yanıtlar	72
Tablo 4.4. TOPSIS metodu ve Minitab kullanılarak en küçük partikül boyutu ve en düşük polidispersite için hesaplanan S/N oranları	73
Tablo 4.5. Partiküllerin yüzey özellikleri	87
Tablo 4.6. Enkapsülasyon Etkinlikleri.....	87

1 GİRİŞ

Nanoboyuttaki partiküller/malzemeler, aynı maddeye ait daha büyük partiküllere göre çok farklı özellikler (optik, elektriksel, kimyasal ve fiziksel özellikler açısından) gösterirler. Bunun temel nedeni farklı ölçeklerde farklı kuvvetlerin etkili olmasıdır. Bunların en önemlisi yer çekimi kuvvetidir. Yerçekiminin etkisi, doğrudan kütle ve mesafe ile ilişkilidir; ancak nano-ölçekte kütleler önemsiz kabul edilebilecek kadar küçüktür ve bu nedenle yer çekimi etkisi önemsiz hale gelirken elektromanyetik kuvvetler etkili olur. Moleküler hareketler daha önemli hale gelmekte, yerini makro-ölçekte çok nadir görülen gelişigüzel hareketlere bırakmaktadırlar (Brownian motion, Brown Hareketi). Bu nedenle de nano-boyutta malzemelerin hareketleri ve enerjisinin açıklanması için klasik fizik yerine kuantum mekaniği uygulanmaktadır. Yine nano-ölçekte yüzey alanı-hacim oranının önemli ölçüde artması nedeniyle partiküllerin davranışı değişmekte, daha iyi katalizörlerin yapılmasına olanak tanıyacak şekilde etkileşim sağlayacak yüzey alanları artmaktadır.

Nanoteknolojinin tıp alanındaki uygulamaları yani nanotıp, hastalıkların iyileştirilmesi ve kas, kemik ve sinir gibi hasarlı dokuların iyileştirilebilmesi amacıyla nanoteknolojinin tıp alanına uygulanmasını hedefler. Böylece geleneksel yöntemlerle tedavi edilemeyen hastalıkların tedavisinin sağlanması ve hedeflendirilmiş Sistemler sayesinde daha az yan etkiyle daha etkin tedavi sağlanması amaçlanmaktadır. Hedeflendirilmiş ilaç taşıma, suda az çözünen ilaçların taşınması, iki veya daha fazla ilacın aynı anda taşınması ve görüntüleme teknikleri kullanılarak ilaç taşınan bölgeden görüntü alınması gibi avantajları ve geliştirilen ve piyasaya sürülen nanoteknolojik ilaçların başarısı nedeniyle bu alanda yapılan araştırmaların sayısı giderek artmaktadır. Nanoonkoloji alanında nanoteknoloji, erken teşhis ve tedavide başarı sağlanması, cerrahi ile ulaşılamayan hücrelerin ölümü, malin hücrelerin sağlıklılarla ayrılarak öldürülmesi, metastazların hedeflenebilmesi, immün yanıtın etkilenmemenin sağlanabilmesi, geciktirilmiş veya kontrollü salımla hedef bölgede ilaç konsantrasyonunda artış sağlanması, farmakolojik olarak gerekli dozda ilacın hedef bölgeye taşınması, etkin maddelerin bozunma veya inaktivasyona karşı korunması ve çoklu ilaç direncinin yenilmesi gibi avantajlar sağlamaktadır. Araştırma sayısı arttıkça,

ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir malzemelerin sayısı ve çeşitliliği de artış göstermeye başlamıştır. Başlangıçta özellikle biyo-indirgenabilir malzemelere odaklanan literatürde artık inorganik malzemeler de yerini almıştır. Bu da geliştirilen ilaç taşıyıcı Sistemlerin çeşitliliğini arttırmış, organik-inorganik melez (hibrit) Sistemlerin geliştirilmesine yol açmıştır.

Hibrit Sistemler, organik ve inorganik malzemelerin avantajlarını bir arada taşımaktadır. Kullanılan organik (genelde polimerik) kısım biyouyumluluğu artırırken, inorganik kısım ilaç yükleme kapasitesi ve/veya stabilite açısından ilaç taşıyıcı sistemin iyileştirilmesini sağlar. Bu şekilde geliştirilen partiküller, en çok görüntüleme amacıyla hazırlanmakla beraber yüksek ilaç taşıma kapasitesi gibi nedenlerle ilaç taşıyıcı sistem olarak da sıklıkla tasarlanmaktadır.

Kitosan nanopartiküller, opsonizasyonu engellediği ve hücre zarı ile etkileşimi daha iyi olduğu için üzerinde en çok çalışma yapılan partiküllerdendir. Bununla beraber, elde edilen partiküllerin stabil olmaması (agregasyon eğilimi) nedeniyle beklenen başarıya ulaşamamıştır ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesince (FDA) onaylanmamıştır; ancak araştırmalar devam etmektedir. Silika nanopartiküller ise genellikle demir veya altın gibi metalik nanopartiküller ile kombine edilerek termal terapi veya görüntüleme amaçlı kullanılması hedeflenen Sistemlerde yer almıştır. Bununla birlikte, silika nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak tek başına kullanılmasına yönelik çalışmalar da devam etmektedir. Nanopartiküllerden beklenen bir diğer önemli özellik ise kanda kalış süresinin arttırılmasıdır. Böylece nanopartiküllerin hücrelerle etkileşim süresinin uzatılması, bunun da hücre içine alımı arttırması hedeflenmektedir. Bu amaçla genellikle poli etilen glikol (PEG) kullanılmaktadır.

Nanopartiküllerin hücre ile etkileşimi arttırılarak hücre içine alınması sağlanabilir. Partikül üzerinde hedeflendirme varsa, reseptör-ligand ilişkisi ile partiküller hücre içine alınırlar. Hedeflendirmeyi sağlayan antikör, anahtar-kilit ilişkisi ile hücre üzerindeki reseptörlere bağlanarak, hücre içine alım yollarını aktive eder. Partikül üzerinde hedeflendirme yoksa, partikülün şekli, büyüklüğü, konsantrasyonu ve inkübasyon süresi

daha da önemli hale gelir. 100nm'den daha küçük nanopartiküllerin hücre içine alınımının daha yüksek olduğu bilinmektedir. Partiküller hücre zarı ile etkileştikten sonra, hücre içine endozom kesesinde alınırlar ve kese içinden çıkamadıkları takdirde lizozomda etkisiz hale gelebilirler. Bu nedenle endozomdan kaçabilen nanopartiküllerin geliştirilmesi önemlidir. Bunu sağlamak için endozomda gözenek oluşturulması, proton sünger etkisi veya endozomun fotokimyasal bozulması gibi çeşitli stratejiler literatürde önerilmektedir.

İlaç taşıyıcı Sistemler tasarlanırken bir diğer önemli konu partiküllerin yalnızca hedeflenen dokuda etkili olmasıdır. Bunun için aktif veya pasif hedeflendirme kullanılabilir gibi yalnızca hedeflenen dokuda etki gösteren partiküller veya bu iki stratejinin kombinasyonları kullanılabilir. Fototermal terapi veya çeşitli etkilere yanıt veren partiküller tasarlanarak yan etkilerin azaltılması mümkün olabilmektedir.

Bu tez kapsamında, inorganik bir nanopartikül çeşiti olan silika nanopartiküller kitosan ile birleştirilerek hibrit nanopartiküller elde edilmiştir. Hücre ile etkileşimin artması için partiküller kitosan ile kaplanırken, kanda kalış süresinin arttırılması amacıyla polietilen glikol (PEG) ile konjuge edilmiş bir kitosan kullanılmıştır. Bu inorganik-organik yapıyla her iki malzemenin de üstün özelliklerinden (silikanın yüksek ilaç yükleme kapasitesi, kitosanın hücre zarı ile daha iyi etkileşmesi ve PEG'in kanda kalış süresini arttırması) faydalanılmak istenmiştir. Akut miyeloid lösemi (AML) için endike bir ilaç olan doksorubisin etkin madde olarak seçilmiştir. Bunun yanı sıra nanopartiküller hücre içine alındıktan sonra endozom kesesinden kaçarak etkin maddenin sitozole ulaşması amacıyla sodyum bikarbonat (NaHCO_3) doksorubisinin yanı sıra nanopartiküllere yüklenmiştir. Hücre içine alım açısından partikül büyüklüğü önemli olduğu için, önce partikül büyüklüğü optimizasyonu yapılmış, daha sonra elde edilen partiküllerin karakterizasyonu yapılarak partiküllerin yüzey özellikleri ve fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla partiküllerin sitotoksiteleri belirlenerek, farmakokinetik özellikleri incelenmiştir.

Bu çalışmada gerçekleştirilen Silika-Kitosan-PEG hibrit nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanması, hazırlanması ve optimizasyonu, elde edilen sistemin yalnızca hedef dokuda etki göstermesi ve endozomdan kaçışın sağlanması ve *in vitro* – *in vivo* karakterizasyonunun yapılması, yeni nanopartiküler sistem tasarımları açısından sonraki çalışmalarda da yol gösterici olması amaçlanmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Katı tümör, küçük bir hücre ya da bir hücre grubunda meydana gelen bir mutasyon ile başlar. Sağlıklı bir dokuda hücrelerin çoğalması, hücreyel sinyallere göre ayarlanır ve bu mekanizma ile hücre bölünme sayısı kontrol altında tutulur. Eğer bu hücreyel sinyaller doğru şekilde iletilmez ise, eksik ise ya da hücre bölünmesini yöneten genlerde kendiliğinden oluşan bir mutasyon söz konusu ise, hücreler kontrolsüz olarak çoğalmaya ve biraraya gelerek tümör denilen yapıları oluşturmaya başlar. Kişide semptomlar görülmeye başlayana kadar, hasarlı hücrenin çoğalması ve tümörün görüntülenebilecek kadar büyümesi için zaman geçmesi gerekir [1].

Tümörler malign (kötü huylu) ya da benign (iyi huylu) tümör olabilirler. İyi huylu tümörler genellikle yavaş büyüme hızı gösterirler, vücudun diğer bölgelerine yayılmaya eğilimli değildir ve normal vücut hücreleri ile kaplı durumda görülürler. İyi huylu tümör hücreleri normal hücrelerden çok da farklı olmamakla birlikte; çok büyük bir alan kaplamaya başlayabilir, organlara baskı yapabilir, hastayı rahatsız edebilirler. Kötü huylu tümörler ise genellikle iyi huylu olanlara göre çok daha hızlı büyüme gösterirler, etraflarını saran dokulara yayılma ve hasar verme özellikleri vardır, primer tümör oluşumundan sonra kan damarları ya da lenfatik sistem aracılığı ile vücudun diğer bölgelerinde sekonder tümörlerin oluşumuna sebep olabilmektedirler [2].

Tümör hücreleri kontrolsüz ve düzensiz olarak çoğaldıkça, tümör merkezindeki hücreler, kendilerini besleyen kan damarlarına ulaşmakta zorluk çekerler ve bu yüzden anjiyojenik faktörler salgılamaya başlarlar. Bu faktörler tümör içerisinde ve etrafında yeni kan damarlarının oluşmasını uyaran faktörlerdir. Böylece tümör, heterojen dağılmış olan kan damarlarından kendisine gereken besinleri ve oksijeni alabilir hale gelir [3].

Günümüzde 200'ün üzerinde kanser türü olduğu söylenmektedir. Dünya Sağlık Örgüt'üne (WHO) göre dünya çapında, 2012 yılında 14 milyon yeni kanser vakası tanımlanmış ve 8.2 milyon kanserden ölüm kaydedilmiştir [4].

2.1.1 Klasik kanser tedavisinin kısıtlamaları

Kanser tedavisi, tümör dokusunun ve damarlanmasının heterojenik yapısından dolayı günümüzde hala etkin olarak sağlanamamıştır. Tedavi yaklaşımları olarak;

- Cerrahi müdahale
- Radyasyon tedavisi
- Kemoterapi
- İmmunoterapi
- Hedeflendirilmiş Terapi
- Hormon Tedavisi
- Kök hücre Transplantı
- Presizyon (Precision) Tedavi gibi yaklaşımlar bulunmaktadır.

Ameliyat seçeneği kanser için bilinen en eski tedavilerdendir. Eğer kanser metastaz yapmadıysa, tümörün hastadan cerrahi olarak alınması ile tedavi sağlanabilir. Ancak kanser hücrelerinin tamamının dokudan uzaklaştırılması neredeyse imkânsızdır. Radyasyon tedavisi ile kanser hücrelerinin yüksek enerjili ışınların odaklanması ile yok edilmesine dayanan bir tedavidir. Bu yaklaşım ile kanser hücrelerine zarar vermek ve kendilerini yok etmelerini sağlamak amaçlanmaktadır. Bu yöntemin sakıncası ise bu yüksek enerjili gama ışınlarının, tümör hücrelerinin yanında sağlıklı hücreleri de öldürmesi, dolayısı ile erken evre kanserlerin tedavisinde yarar göstermekten çok zarar vermeleridir. Kemoterapide, hücre bölünmesini engelleyici, hücre DNA'sına ya da proteinlerine zarar vererek hücrenin kendisini öldürmesine sebep olan etkin maddeler kullanılmaktadır. Bu etkin maddeleri taşıyan ilaçlar, hızla çoğalmakta olan hücrelerin, bölünmesini engelleyerek tümör dokusunu küçültmeyi, büyümesini durdurmayı

hedeflemektedir. Ancak bilindiği üzere, kemoterapi ile hastaya verilen ilaçlar, dokuya hedeflendirilmedikleri için, sadece tümör hücrelerine değil sağlıklı hücrelere de zarar vermektedirler ve hastanın sağlıklı hücrelerinin kendilerini onarabilmeleri için kemoterapi seansları arasında gerekli zamanın bırakılması gerekmektedir. Kemoterapi boyunca kan dolaşımında bulunan etkin maddeler, saç dökülmesi, bulantı, yorgunluk, nötropeni ve kusma gibi ciddi yan etkilere sebep olmakta, hastanın moral ve yaşam kalitesinde düşüşe neden olmaktadır. İmmunoterapi ile, kan dolaşımına verilen protein interferon gibi immün sistemi tümöre karşı tetikleyici maddelerin, tümörü küçültmesi amaçlanmaktadır. Bir diğer immunoterapi yöntemi ise kemik iliği transferidir. Her iki yöntem de her hastaya uygulanamayacak yöntemlerdir. Protein interferon yöntemi henüz araştırma aşamasında olan ve geliştirilmesi gereken bir yaklaşımdır. Hormon terapisi, sadece hormonlar ile bağlantılı oldukları düşünülen kanser tipleri için uygun görülmektedir. Bu yöntemde, vücudun hormon üretim düzenini değiştirmek ve tümör hücrelerinin büyümesini durdurmak amaçlanmaktadır. Bu tedavi de henüz yalnızca meme ve prostat kanseri, bir ihtimal olarak lösemi ile lenfoma üzerinde etkili olabilecek bir tedavidir. Gen terapisi, kansere neden olan hasarlı genlerin, doğru çalışan genler ile yer değiştirilmesini kapsar. Kanser tedavisi için yapılan araştırmalarda önemli bir yer bulsa da, gen terapisi ile insanda başarılı bir tedavi sağlanamamıştır [5, 6].

2.1.2 Akut Miyeloid Lösemi (AML)

Lösemi kanser türleri içinde rastlanma sıklığı açısından 11'inci, ölüm sıklığı açısından 10'uncu sırada gelmektedir [7]. Lösemiler kendi içinde lenfositik ve miyeloid olmak üzere ikiye ayrılırlar [8]. Kemik iliğindeki genç miyeloid hücrelerin, kemik iliğinden kanseröz olarak üretilip vücuda yayıldığı lösemi türüne miyeloid lösemi denir [8].

Akut Miyeloid Lösemi (AML), kemik içinde yer alıp kan hücrelerinin üretilmesine yardımcı olan yumuşak doku olarak tanımlanabilen kemik iliğinde başlayan bir kanser türüdür. Kanser, normalde beyaz kan hücrelerine dönüşmesi gereken miyeloid blastlardan oluşmaktadır [9]. Son yıllarda sağkalımı özellikle genç hastalarda artış göstermiş olsa da, AML hala pek çok hasta için öldürücü olabilmektedir [7]. AML, yetişkinler arasında en yaygın lösemi türlerinden biridir [10]. AML her yaşta görülebilir

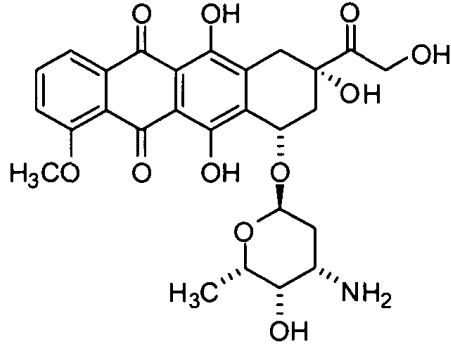
ancak genelde yaşlılıkta (70 yaş civarı) daha sık rastlanmaktadır [11]. 60 yaşın altındaki AML hastalarının %40-50'si iyileşmektedir; ancak yaşlılarda 5 yıllık sağkalım ise %15'in altındadır [11].

Akut miyeloid lösemiler (AML), kemik iliğinde ve kandaki olgunlaşmamış miyeloid hücrelerinin yüksek sayıda olması ile ortaya çıkar. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 12000 yeni vaka kaydedilmekte ve bunların üçte ikisi bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmektedir. AML'den her yıl etkilenen yeni hasta sayısının artan yaş ile arttığı bilinmektedir. Yani ileri yaşlarda, yeni vakaya rastlanma sıklığı daha fazladır. En sık yeni vaka 70li yaşlarda görülmektedir. Genç hastalarda AML daha hızlı gelişmektedir ve hastalığa hızlıca müdahale edilmesi hayati önem taşır. Daha yaşlı hastalarda hastalık daha yavaş ilerlemekle beraber tedaviye daha güç yanıt vermektedir. Hücrelerin morfolojisine veya genetik anormaliye göre AML sınıflandırılabilir.

AML tedavisinde, önce hızlıca kemoterapi başlanır ve daha sonra hastalığın uzun vadede kemoterapi veya (özellikle genç hastalar için) kemik iliği nakli ile tedavisine karar verilebilir. Kemoterapi için antrasiklinler kullanılır. Bu amaçla klinikte daunorubisin sıklıkla tercih edilmektedir. Doksorubisin bu amaçla kullanılabilen bir diğer antrasiklin olmakla birlikte (33), kardiyotoksitesi nedeniyle tercih edilmemektedir.

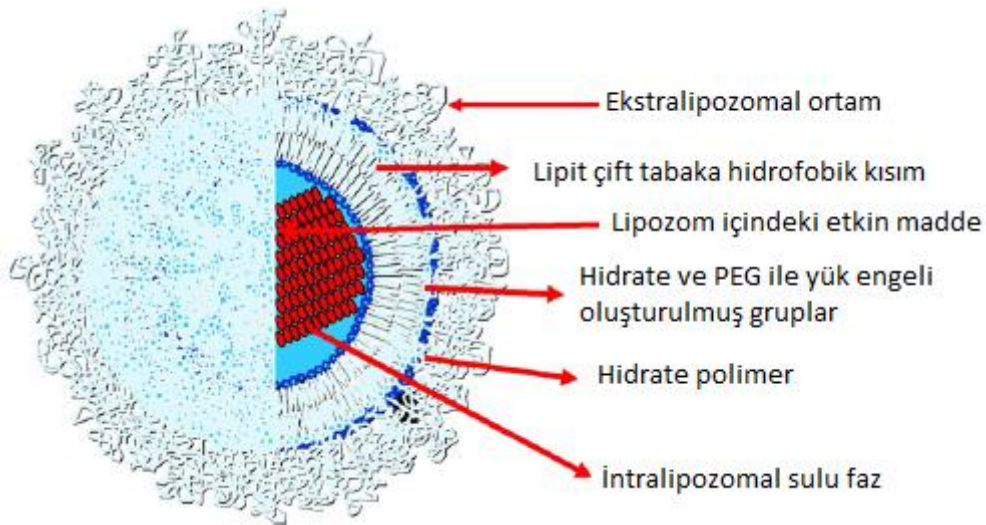
2.2 Doksorubisin Hidroklorür

Antrasiklin türevi bir antineoplastik ajan olan doksorubisin günümüzde yaygın olarak kullanılan en etkin antikanser ajanlardan biridir. Etkisini kanser hücresi içinde nükleik asit sentezini inhibe ederek göstermektedir[12]. Diğer tüm antrasiklinler gibi DNA içine interkalasyon yapar. Başta over kanseri olmak üzere, meme, akciğer, tiroid kanseri vs., bazı yumuşak doku sarkomaları ve bazı tür lösemilerin tedavisinde kullanılır. Geniş spektrumlu ve etkin bir neoplastik olmasına karşı oldukça toksiktir. Şekil 2.2'de gösterildiği gibi yapısında tetrasiklin halkası ve bu halkaya glikozidik bağı ile bağlı daunoamin şekeri içerir[13].



Şekil 2.1. Dokсорubisinin moleküler yapısı [14]

Dokсорubisinin düzensiz kalp atışları, kalp yetmezliği gibi istenmeyen birçok yan etkisi yanında renal, pulmoner, testiküler ve hematolojik birçok yetkisi olduğundan kullanımı sınırlıdır [15, 16]. İstenmeyen bu etkilerin dışında diğer bir önemli konu ise ilaç dirençliliğidir. Dokсорubisinin belirtilen bu yan etkilerinin giderilmesi amacıyla günümüzde klinik uygulamalarda da kullanılmakta olan PEG-lipozomal dokсорubisin (**Doxil**[®]) geliştirilmiştir. Doxil[®] 1995 yılında FDA tarafından onay alarak FDA tarafından onaylanmış ilk nano ilaç olmuştur. Doxil[®], EPR (“enhanced permeability and retention”) etkisinden faydalanarak pasif hedeflendirmeye tümör hücresinde dokсорubisinin birikmesini sağlamaktadır [17].



Şekil 2.2. Doxil yapısının şematik gösterimi [18]

Serbest doksorubisin kana verildiğinde kandan dakikalar içinde elimine olduğu bilinmektedir [19]. Bu nedenle tekrarlanan dozlarda verilmesi gerekmektedir ve bu durum hasta uyuncu açısından uygun olmamaktadır. Kanda kalış süresinin arttırılması için nanoteknolojik yaklaşımlar bu nedenle gerekmektedir. Doksorubisinin nanoteknolojik formu olarak Doxil uzun yıllardır piyasada bulunmakla birlikte bu alanda yapılan çalışmaların devam edilmesine hasta uyuncunun arttırılması ve yan etkilerin azaltılması açılarından hala gerek duyulmaktadır [20]. Ayrıca nanopartiküler Sistemler hücre içine alındığında dahi endozom kesesinden kaçamayabilir ve dışarı atılarak etkisizleşebilirler. Bu nedenle hücre içine alınıp hücrenin savunma mekanizmalarını kandırabilen ve etkin maddeyi hedefine taşıyan nanopartiküler ilaç taşıyıcı Sistemler için yeni tasarımlara hala ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez kapsamında AML'ye spesifik, pH duyarlı, yüksek kapasitede etkin madde taşıyabilecek bir ilaç taşıyıcı sistem tasarımı hedeflenerek, doksorubisinin kanda kalış süresinin uzatılması ve bu sayede kandaki kanserli hücrelerle daha uzun süre inkübe olması hedeflenmiştir. Bu inkübasyon sonucu endozom ile alındıktan sonra keseyi patlatarak sitoplazmaya etkin madde olan doksorubisinin salınarak doğrudan hücre çekirdeği ile etkileşmesi ve bu sayede etkisini gösterebilmesi amaçlanmıştır.

2.3 Kanser Tedavisinde Nanoilaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknolojinin kanser alanında uygulanması fikri özellikle 2000'li yılların başından beri çok yoğun bir şekilde araştırılmakta ve her geçen gün bu konu üzerinde yapılan çalışmalar artmaktadır. Bu alandaki çalışmaların kazandığı hız ise şaşırtıcı düzeydedir. Pubmed veri tabanı bilgilerine göre 2018 yılına kadar ‘nanopartikül’ alanında 170455 çalışma bulunmaktadır ve bunların yarısı son beş yılda yayınlanmıştır [21].

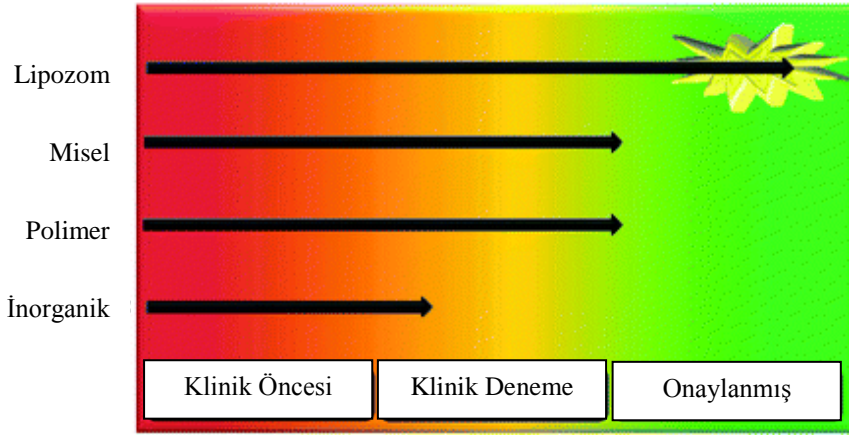
Nanopartiküller, en az bir boyutu 100nm veya daha küçük olan genellikle kolloidal Sistemlerdir [22]. İlaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküller, içlerine ilaç hapsedilerek nano özelliklerinden faydalanılan Sistemlerdir. İlaç etkin maddesi; nanopartiküllerin,

nanokürelerin ve nanokapsüllerin elde edilmiş yöntemlerine göre çözündürülebilir, hapsedilebilir, ya da nanopartikül matriksine eklenebilir.

İlaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküllerin kullanımının avantajları şunlardır[22];

- Parenteral uygulamayı takiben nanopartiküllerin aktif ya da pasif olarak hedeflendirilip partikül büyüklüğü ya da yüzey özellikleri değiştirilerek kolayca manipule edilebilir.
- Nanopartiküller ilacın hedef bölgede salımını kontrol edebilir, salımını uzatabilir, organlardaki dağılımını ve devamında klerensini değiştirebilir, böylece terapötik etkinlik artar ve yan etkiler azaltılabilir.
- Partiküllerin yüzeyine hedeflendirmeyi sağlayan ligandlar bağlanarak ya da manyetik partiküller kullanılarak dışarıdan mıknatıs yardımıyla spesifik hedeflendirme yapılabilir.
- Matriks bileşenleri değiştirilerek kontrollü salım ve partikül degradasyon karakteristikleri değiştirilebilir. İlacı degradasyondan koruma özellikleri vardır.
- Yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahiptir ve ilaçlar herhangi bir kimyasal reaksiyona girmeden sisteme yüklenebildikleri için ilaç aktivitesi korunabilir.
- Sistem pek çok yoldan (oral, nazal, parenteral, intraoküler...) kullanılabilir.
- Farmakolojik olarak aktif olan ajanların kontrollü salımının, spesifik etki bölgesinde optimum dozda salınmasını sağlar.

Çok geniş bir yelpazede gelişen nanopartiküler Sistemler sayesinde kullanılacak taşıyıcı sistemin boyutu, bileşimi ve fonksiyonelliğine karar verilebilmektedir. Nanopartiküller organik, inorganik ve hibrid olmak üzere gruplara ayrılabilirler. Şekil 2.3'te literatürde araştırılan çeşitli nanopartiküllerin gelişimi yer almaktadır.[23]



Şekil 2.3. Nano İlaç Taşıyıcı Sistemlerin gelişimin genel durumu [23]

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış bir ilaç olan Doxil, doksorubisinin lipozom içindeki PEGile formülasyonudur. Bir diğer onaylanmış ilaç Abraxane, albümin bağlı paklitakseldir. Misel ve polimerler ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. İnorganik nanopartiküllerin klinik çalışmaları da devam etmektedir. Örneğin silika ile ilgili 5 adet klinik çalışma bulunmaktadır. Onaylanmış veya klinik çalışmaları devam etmekte olan nanoteknolojik ilaçlar Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Onaylanmış veya çalışması devam etmekte olan nanoteknolojik ilaçlar [14]

Ticari İsim	Jenerik İsim	Endikasyonları	Geleneksel İlaça Göre Avantajı
Lipozomal Nanopartiküller			
Curosurf (Chiesi USA)	Poractant Alfa	Solunum güçlüğü sendromu	Daha düşük toksisite, daha az hacimde arttırılmış ilaç taşınması
Doxil (Janssen)	Doksorubisin HCl lipozom enjeksiyon	Kaposi yumurtalık multipl miyelom Sarkomu, kanseri,	Hastalıklı bölgeye ulaşan ilaç miktarının artması, serbest ilaca göre daha düşük sistemik toksisite
Abelcet (Sigma-Tau)	Lipozomal amfoterisin B lipit kompleksi	Mantar enfeksiyonları	Daha düşük toksisite
AmBlosome (Gilead Sciences)	Lipozomal amfoterisin B	Mantar/Protozoal Enfeksiyonlar	Daha düşük nefrotoksisite
DepoDur (Pacira Pharmaceuticals)	Lipozomal Morfin Sülfat	Postoperatif Analjezi	Uzatılmış Salım
DepoCyt (Sigma-Tau)	Lipozomal Sitarabin	lenfomatöz menenjit	Tümör bölgesine arttırılmış ilaç taşınması, azaltılmış sistemik toksisite
Marqibo (Spectrum Pharmaceuticals)	Lipozomal Vincristin	ALL (akut lenfositik lösemi)	Tümör bölgesine arttırılmış ilaç taşınması, azaltılmış sistemik toksisite
Onivyde (Ipsen Biopharmaceuticals)	Lipozomal İrinotekan	Pankreas kanseri	Tümör bölgesine arttırılmış ilaç taşınması, azaltılmış sistemik toksisite

Ticari İsim	Jenerik İsim	Endikasyonları	Geleneksel İlaça Göre Avantajı	
Visudyne (Bausch and Lomb)	Lipozomal Verteporfin	Yaş tip sarı nokta hastalığı, oküler histoplazma, miyop	Bozulmuş damarlara arttırılmış ilaç taşınımı, ışık-duyarlı salım	
Vyxeos (Jazz Pharmaceuticals)	Lipozomal Daunorubisin ve sitarabin	AML(akut miyeloid lösemi), miyelodisplazma ilişkili değişikliklerle seyreden AML	Beraber enkapsüle edilmiş ajanların sinerjestik etki oluşturması nedeniyle arttırılmış efikası	
Polimerik Nanopartiküller				
Adagen (Leadiant Biosciences)	Pegademaz bovin	Şiddetli İmmün (SCID)	Kombine Yetmezlik	Daha uzun kanda kalış süresi, azaltılmış immünojenite
Adynovate (Shire)	Antihemofilik faktör (rekombinant), pegile	Hemofili		Daha iyi protein stabilitesi, daha uzun yarı ömür
Cimzia (UCB)	Certolizumab pegol	Kron hastalığı, romatoid artrit, psöriatik artrit, ankilozan spondilit		Daha uzun kanda kalış süresi, in vivo'da daha yüksek stabilite
Copaxone (Teva)	Glatimer asetat	Multipl skleroz		Kontrollü klerans
Eligard (Tolmar)	Leuprolit asetat	Prostat kanseri		Daha uzun kanda kalış süresi, kontrollü ilaç taşıma

Ticari İsim	Jenerik İsim	Endikasyonları	Geleneksel İlaça Göre Avantajı
Krystexxa (Horizon)	Peglotikaz	Kronik gut	Daha iyi protein stabilitesi
Macugen (Bausch and Lomb)	Pegabtinib	Neovasküler akut maküler dejenerasyon (AMD)	Daha iyi protein stabilitesi
Mircera (Vifor)	Metoksi polietilen glikol – epoetin beta	Kronik böbrek hastalığı anemisi	Daha iyi aptamer stabilitesi
Neulasta (Amgen)	Pegfilgrastim	Kemoterapi sonrası nütropeni	Daha iyi aptamer stabilitesi
Oncaspar (Baxalta U.S.)	Pegaspargase	ALL	Daha iyi protein stabilitesi
Pegasys (Genentech)	Pegile IFN alfa-2a	Hepatit B, Hepatit C	Daha iyi protein stabilitesi
Plegridy (Biogen)	Pegile IFN beta-1a	Multipl skleroz	Daha iyi protein stabilitesi
Rebinyn (Novo Nordisk) (2018’de piyasaya girecek)	Koagülasyon faktör IX (rekombinant), glikopegile	Hemofili B	Daha uzun yarı ömür, infüzyonlar arası daha yüksek ilaç seviyesi
Renvela (Genzyme) ve Renagel (Genzyme)	Sevelamer karbonat ve sevelamer HCl	CKD	Daha uzun kanda kalış süresi ve terapötik ilaç taşınması
Somavert (Pfizer)	Pegvisomant	Akromegali	Daha iyi protein stabilitesi
Zilretta (Flexion Therapeutics)	Triamsinolon asetonit ER enjeksiyon süspansiyonu	Osteoartrit diz ağrısı	Uzatılmış salım

Ticari İsim	Jenerik İsim	Endikasyonları	Geleneksel İlaça Göre Avantajı
Misel Nanopartiküller			
Estrasorb (Novavax)	Miselar estradiol	Menapozda vazomotor semptomlar	Kontrollü salım
Nanokristal Nanopartiküller			
Avinza (Pfizer)	Morfin Sülfat	psikostimulan	Yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve biyoyarlanım
EquivaBone (Zimmer Biomet)	Hidroksiapatit	Kemik süstitiyesi	Kemik yapısını taklit etme
Emend (Merck)	Aprepitant	Antiemetik	Yüksek absorpsiyon ve biyoyarlanım
Focalin (Novartis)	Deksametifenidat HCl	psikostimulan	Yüksek ilaç yükleme ve biyoyarlanım
Invega (Janssen)	Sustenna Paliperidon palmitat	Şizofreni, şizoaffektif bozukluk	Enjekte edilebilir düşük çözünürlüklü ilacın yavaş salımı
Megace ES (Par Pharmaceuticals)	Megestrol asetat	Antianoreksik	Düşük doz
NanOss (RTI cerrahi)	Hidroksiapatit	Kemik süstitiyesi	Kemik yapısını taklit etme
Ostim (Heraeus Kulzer)	Hidroksiapatit	Kemik süstitiyesi	Kemik yapısını taklit etme

Ticari İsim	Jenerik İsim	Endikasyonları	Geleneksel İlaça Göre Avantajı
OsSatura (IsoTis Orthobiologics)	Hidroksiapatit	Kemik sübstitiyesi	Kemik yapısını taklit etme
Rapamune (Wyeth Pharmaceuticals)	Sirolimus	İmmünoşüpresan	Daha iyi biyoyararlanım
Ritalin LA (Novartis)	Metilfenidat HCl	psikostimulan	Yüksek ilaç yükleme ve biyoyararlanım
Ryanodex (Eagle Pharmaceuticals)	Dantrolen sodyum	Malin hipotermi	Daha yüksek dozlarda daha yüksek veriliş hızı
Tricor (AbbVie)	Fenofibrat	Hiperlipidemi	Daha iyi biyoyararlanımın verilişi kolaylaştırması
Vitoss (Stryker)	Kalsiyum fosfat	Kemik sübstitiyesi	Kemik yapısını taklit etme
Zanaflex (Acorda)	Tizanidin	Kas gevşetici	Yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve biyoyararlanım
İnorganik Nanopartiküller			
Dexferrum (American Regent)	Demir dekstran	CKD demir eksikliği	Arttırılmış doz
Feraheme (AMAG Pharmaceuticals)	Ferumoksitol	CKD demir eksikliği	Veriliş sıklığı daha düşük uzatılmış sürekli salım

Ticari İsim	Jenerik İsim	Endikasyonları	Geleneksel İlaça Göre Avantajı
Ferflecit (Sanofi-Aventis)	Sükroz enjeksiyonluk Sodyum demir glukonat kompleksi	CKD demir eksikliği	Arttırılmış doz
Infed (Actavis Pharma)	Demir dekstran	CKD demir eksikliği	Arttırılmış doz
Venofer (American Reagent)	Demir sükroz	CKD demir eksikliği	Arttırılmış doz
Protein Nanopartiküller			
Abraxane (Celgene)	Albümin bağlı Paklitaksel	Meme Kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, pankreas kanseri	Daha iyi çözünürlük, tümöre arttırılmış ilaç taşınması
Ontak (Elsai)	Denilökin diftitoks	Kutanöz t-hücreli lenfoma	Hedeflendirilmiş t-hücre spesifikliğı, lizozomal kaçış

2.3.1 Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme

Hedeflendirilmiş ilaç taşınması ile ilacın istenen dokuda konstarasyonu arttırılarak diğer bölgelerdeki ilaç konsantrasyonununun minimum düzeyde olması sağlanmaktadır. İlacın bu şekilde vücudun istenen bölgede birikmesi birçok avantaj sağlamaktadır[24-27];

- Toksikiteyi ve yan etkileri büyük ölçüde azaltmak
- İlacın etkinliğini ve biyoyararlanımını arttırmak
- Hedef organda ilaç konsantrasyonunu arttırmak
- İlacın uygulanan konsantrasyonunu düşürmek
- İlacın konsantrasyonunu terapötik sınırlar içinde tutmak

Literatürde beyin, prostat, akciğer, kalp ve oküler gibi birçok doku için kanser, enflamasyon, HIV ile ilgili hastalıkların tedavisi için sayısız derleme ve araştırma makalesi bulunmaktadır [28-31]. Tüm bu hastalıklar arasında, kanser bu alanda en fazla araştırma yapılan alan konumundadır. Kanserın daha etkili bir şekilde tedavi edilebilmesi için birçok farklı taşıyıcı sistem, farklı hedeflendirme çeşitleri araştırılmaktadır [30].

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı Sistemlerle ilgili birçok farklı hedeflendirme yaklaşımı olsada temelde hedeflendirme aktif ve pasif hedeflendirme olmak üzere iki başlık altında toplanabilir. Her iki hedeflendirme stratejisinde de, nanotaşıyıcı sistem etkin maddenin kanser hücresinde hücre içi konsantrasyonu arttırarak normal dokudaki toksisiteyi azaltmayı başarmaktadır. Ayrıca bu sayede antikanser ilacın etkinliğini arttırarak sistemik toksisitenin de azalmasını sağlamaktadır [32].

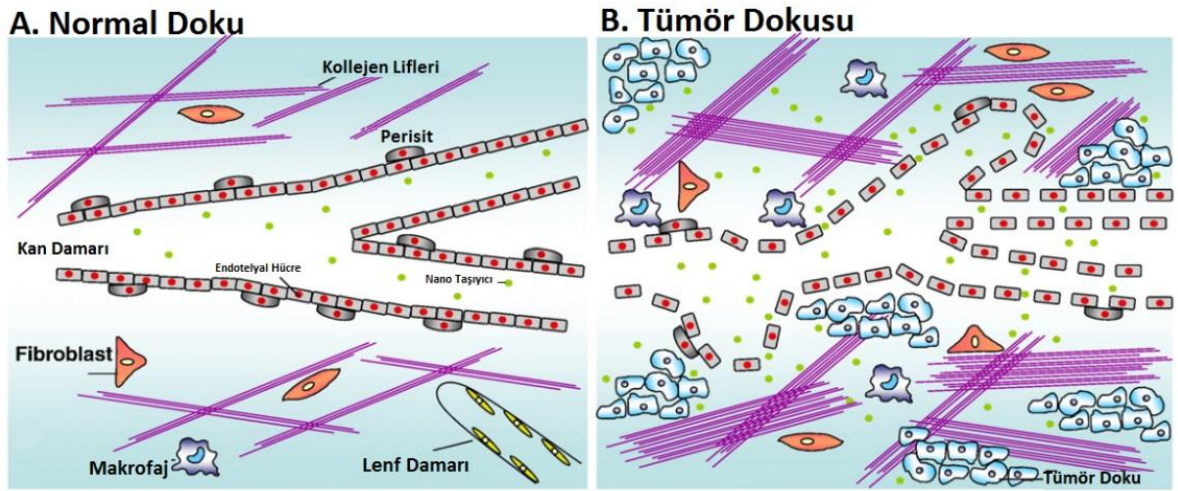
Pasif Hedeflendirme ve EPR etkisi

Pasif hedeflendirme, ilacın ya da ilaç taşıyıcı sistemin fiziko-kimyasal yada farmakolojik etkilere bağlı olarak istenilen bölgede birikmesi anlamına gelmektedir. Nanopartikülün boyutundan ve tümörün kendine özgü mikro-çevresi sayesinde pasif

hedeflendirme mümkün olabilmektedir. Pasif hedeflendirme için arttırılmış permeasyon ve retensiyon etkisi (enhanced permeation retention effect, EPR) ile tümörün damarlanma özellikleri kritik rol oynamaktadır.

Moleküllerin ve küçük partiküllerin daha kolay olarak tümör damarlarından geçebilmesi ve lenfatik drenajın azalması nedeniyle dolaşıma geri dönüşünün etkin olmaması kanser tedavisinde önemli bir basamak olup buna EPR etkisi adı verilir. Bu yaklaşım etkin bir biçimde ilacın etkinliğini ve biyoyararlanımını arttırmaktadır.

Tümörün damarlanması normal dokuya göre oldukça farklılık göstermektedir. Normal dokunun aksine, tümörlü dokuda anjiyogenik kan damarları endotel hücreler arasında 600-800nm aralığına kadar boşluğa sahiptirler. Tümöre özgü bu patofizyolojik durum zayıf lenfatik drenaj ile birleşince EPR etkisi artmaktadır. Bu durumda, nanopartiküllerin ekstravasküler boşluklardan geçerek tümör dokusunda birikmesini sağlamaktadır [33, 34]. Normal doku ile tümörlü dokunun şematik gösterimi Şekil 2.4'te gösterilmiştir [35].



Şekil 2.4. Normal doku ve tümörlü dokunun şematik gösterimi [35]

EPR etkisi nanotaşıyıcı sistemin immün sistem tarafından vücuttan uzaklaştırılmadığı ve vücuttaki dolaşım süresi uzun olduğu sürece idealdir. EPR etkisinin etkinliğinin artması şu faktörlere bağlıdır;

- Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem 10-100nm arasında olmalıdır
- Renal eliminasyona uğramaması için nötr veya anyonik yükte olmalıdır
- Retiküloendotelyal Sistem (RES) etkisinden saklanmış olmalıdır

EPR etkisini etkileyen faktörler şunlardır;

Büyüklik: Nanomalzemenin büyüklüğü tümör dokusunda birikme kinetiğini önemli ölçüde etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada 30, 50, 70 ve 100 nm büyüklüğündeki nanopartiküllerin, tümörler aşırı geçirgen (murin kolon adenokarsinom) durumdayken etkili bir şekilde dağıldığı, ama tümörler az geçirgenken 70nm'den küçük nanopartiküllerin birikebildiği görülmüştür [36].

Yük: Diğer fizikokimyasal parametreler gibi makromoleküllerin ve nanopartiküllerin yükü de sistemik dolaşım süresini ve tümör içi prosesleri etkiler ve ayrı ayrı ele alınmaları zordur. Materyalin yükü opsonizasyon profilini, fagositik hücreler tarafından tanınmalarını ve genel plazma sirkülasyon profilini değiştirmektedir. Negatif yüzey yükü nanopartiküllerin kandan temizlenmesini artırabilir, azaltabilir ya da etkilemeyebilir, ama pozitif yüzey yükünün nanopartikülün plazma ile etkileşimine negatif bir etkisi vardır. Pozitif yükün, nanopartiküllerin tümör kan damarları ile etkileşimini artıracığı ve tümöre difüzyonu ile sistemik dolaşıma geri dağıtılmasını engelleyeceği muhtemel görülmektedir. [37]

Şekil: Nanopartiküllerin şekli fagositik hücreler ile etkileşimi düzenleyerek kan maruziyetini etkilemektedir. Tek duvarlı karbon nanotüpler (100:1 oranından 500:1 oranına kadar) böbreklerden, glomerüler filtrasyon sınırınının 10-20 katı büyüklükte (100-500 nm) olmalarına rağmen etkili bir şekilde temizlenmişlerdir. Bu olay, uzun yapıların filtrasyonun etkili düşündürmektedir. [37]

Aktif Hedeflendirme

Temel olarak aktif hedeflendirme, taşıyıcı sistemin yüzeyini protein, glikolipid, peptit, polisakkarit, aptamer ve monoklonal antikorlar gibi çeşitli ligandlarla modifiye ederek hedeflenen bölgedeki spesifik reseptörlere bağlanmasını sağlamaktır[38]. Bu Sistemlerin en etkin kullanıldığı durum modifiye edilen ligandın reseptörlerinin kanserli hücrede olup sağlıklı hücrede olmadığı durumdur [39].

Aktif hedeflendirmeyi etkileyen faktörler şunlardır;

Ligant Yoğunluğu: Taşıyıcı sisteminin yüzeyinin modifiye edildiği ligandın yoğunluğu reseptör bölgesindeki substrata bağlanma afinitelerini etkileyen faktörlerden biridir. Ligand yoğunlu genelde afiniteyi arttırsada ligand yoğunluğu ve afinite arasındaki bağlantı her zaman doğru orantılı değildir. Bazı durumlarda ligantların yüzeye düzensiz dizilmesinden dolayı, komşu moleküllerin sterik engel yaratması ve reseptöre bağlanmak için yarışmacı davranış ile açıklanabilir [40, 41].

Nanopartikül Büyüklüğü ve Şekli: Küresel partiküller için daha küçük partikül büyüklüklerinde kavis arttığı için ligant fonksiyonelleşmesinde problem çıkabilmektedir. Ayrıca yüksek molekül ağırlıklı ligantların nanopartikül yüzeyine bağlanmasından sonra partikül çapının, modifikasyon yapılmamış partiküle göre hidrodinamik çapının artmasına neden olmaktadır. Çaptaki bu artışın, tümör akümüasyonu için bazı durumlarda problem yaratabildiği göz önünde bulundurulmalıdır [42, 43].

Nanopartikül büyüklüğünün yukarda bahsedilen durumlar dışında ayrıca hücre içine alımı da etkilediği bilinmektedir. Genel olarak partikül boyutu 100nm'nin altında olan partiküllerin hücre içine alımlarının daha fazla olduğu bildirilmektedir [21, 44].

Partikülün büyüklüğü dışında şeklinin de partikülün kandaki dolaşım özellikleri ve tümör birikimi dışında hücre içine alım kinetiklerini ve alım yollarında etkilemektedir [45, 46].

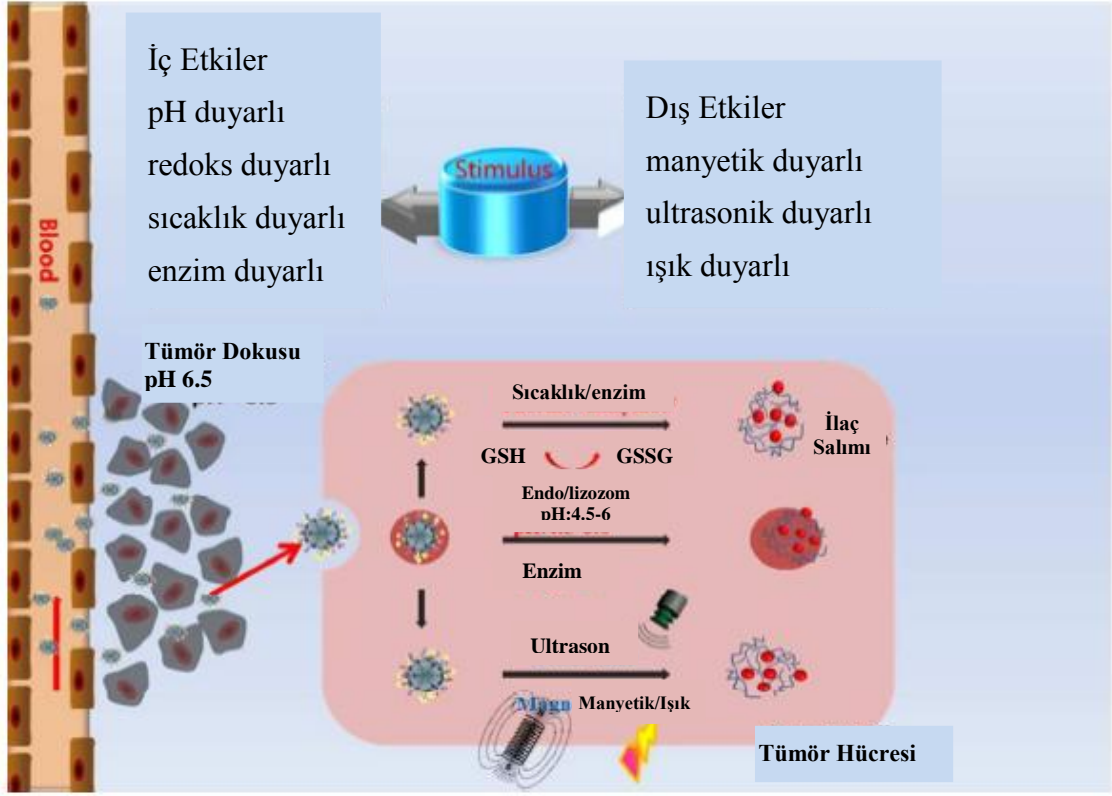
Yüzey ve Ligant Yükü: Negatif yükü hücre membranları ile pozitif yüklü nanopartiküller arasındaki etkileşime bağlı olarak, katyonik nanopartiküllerin spesifik olamayan bir şekilde hücre içine alımlarının arttığı bilinmektedir [47]. Ligantlar yüklü moleküller olduğundan, nanopartikül yüzeyindeki ligant yoğunluğundan, materyalden ve nanopartikül hazırlama yöntemi etkilerinin kombinasyonundan etkilenmektedir; fakat günümüzde halen hangi parametrenin tümöre hedeflendirme özelliğinin en iyi olduğu tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır [21].

Yüzey hidrofobikliği: Yüzey yükü dışında, partikülün hidrofobikliğide ligantın partikül üzerindeki mimarisini etkilemektedir. Özellikle çoğu polimerik nanopartikül hidrofobik çekirdeğe sahip olduğundan polimerik nanopartiküller için bu faktör daha fazla önem arz etmektedir [48].

Bu çalışmada düşük pH'ta salım yapan uyarı-cevap ilaç taşıyıcı bir sistem kullanılmıştır. Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere göre daha asidik olmasından faydalanmak amacıyla pH duyarlı bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Etkin madde olarak seçilen doksorubisin, mezogözenekli silika ile pH duyarlı bir sistem oluşturduğundan, çalışılacak sistem olarak silika nanopartiküller seçilmiştir. Bu sisteme ilişkin bilgiler bir sonraki bölümde paylaşılmıştır.

2.3.2 Uyarı-Yanıt İlaç Taşıyıcı Sistemler

Uyarı-yanıt ilaç taşıyıcı Sistemler, ilacı sadece tümör içi (pH, redoks, enzim, sıcaklık vb) veya dışarıdan (manyetik alan, ultrason, ışık vb) uyaranlar ile tetiklendiğinde salması istenen Sistemlerdir. Antikanser ilaçların etkinliğini arttırmada ve yan etkileri azaltmada verimli bir yöntem olacağı düşünülmektedir. Çeşitli uyarı-cevap yöntemlerine ilişkin gösterim Şekil 2.5'te verilmiştir.



Şekil 2.5 Uyarı-Yanıt İlaç Taşıyıcı Sistemler [49]

Uyarı-cevap Sistemleri temel olarak iki başlık altında incelenebilir: iç uyaranlara yanıt veren Sistemler ve dış uyaranlara yanıt veren Sistemler. İç uyaranlara yanıt veren Sistemler hücre içindeki ortama yanıt verirken, dış uyaranlara yanıt veren Sistemler için dışarıdan bir etki uygulanması gerekmektedir. Bu Sistemler daha detaylı olarak ilerleyen sayfalarda incelenecektir. [49]

Redoks-Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler

Glutatiyon (GSH) insan vücudunda yer alan önemli bir antioksidandır. GSH hücre içinde hücre dışı ortama göre daha fazla bulunmanın yanı sıra kanser hücrelerinde diğer hücelere göre daha yüksek miktarlardadır. Bu nedenle de uyarı-cevap Sistemleri için bir uyarı olarak kullanılabilir.

Silika nanopartiküller için, ilaç yükleme gerçekleştirildikten sonra partikül dışına gözenekleri kapatıp erken salımı önlemek amacıyla PEG, polietilen imin (PEI), siklodekstrinler veya daha küçük inorganik partiküller gibi “kapı bekçileri” (gate-keepers) tiyol grupları üzerinden kolaylıkla bağlanabilir. Oluşan disülfid bağları GSH enzimine duyarlı olduğundan, tümör hücresi içinde kırılarak ilaç salımının gerçekleşmesini sağlayacaktır. [49[50]]

pH-Duyarlı (Tetikli) İlaç Taşıyıcı Sistemler

Hedef dışı toksisiteden kaçınmak için literatürde çeşitli yöntemler önerilmektedir. Bunlar arasında çeşitli etkilere duyarlı Sistemler kullanılması son yıllarda artan bir şekilde araştırılmaktadır. Bu Sistemler genellikle, kanser hücrelerinin diğer hücelere göre farklı olan özelliklerinden faydalanmayı hedeflemektedir. Örneğin kanser hücrelerinin (ve bazı durumlarda tümör rezervinin) yüksek aktiviteye bağlı olarak daha çok karbon dioksit salımı nedeniyle daha asidik olması, pH (duyarlı) ilaç salımı sağlayabilen Sistemlerin geliştirilmesi ve tercih edilmesine neden olmuştur. Bu yaklaşım, kanser hücrelerindeki endozom/lizozomların ve sitozolün 5-5.5 civarında pH'sının olmasına bağlı olarak asidik ortamda tetiklenmiş salım sağlayan antikanser ilaçların taşınması çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır. Temelde, sistemin pH duyarlı olması, daha asidik olan kanser hücrelerine ulaşıncaya dek nötrale yakın olan normal fizyolojik koşullarda ilaç salımının engellenmesi ve böylece toksisitenin düşmesiyle yan etkilerin azalmasını sağlar. Bu yöntem nanopartikülün hedef bölgeye ve görece düşük pH'ya ulaşmasının tetik görevi görerek ilaç salımını yalnızca ilacın etkili olması istenen bölgede gerçekleştirmesi ile daha etkili bir ilaç taşıyıcı sistem elde edilmesi esasına dayanan bir yaklaşımdır. [50-52]

Bu çalışmada pH duyarlı bir sistem geliştirilmesi amacıyla, aynı zamanda Akut miyeloid lösemi için kullanılan bir ilaç olan doksorubisin seçilmiştir. Doksorubisin molekülleri gözenekli silika içine, elektrostatik etkileşim veya hidrojen bağı ile tutunarak yüklenirler. Ortam pH'sı azaldığında, silika yüzeyindeki silanoller protonlanır; böylece doksorubisin ile silika arasındaki etkileşim azalarak salım başlar. Bu sayede bir pH duyarlı sistem elde edilmiş olur.

Enzim-Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bu Sistemler, tümör dokusunda bulunan ve aşırı üretilen (ve sağlıklı hücrelerde görece az üretilen) enzimlerden faydalanılarak ilaç salımını gerçekleştirmek amacıyla geliştirilmişlerdir.

Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri partiküllerin enzime duyarlı bir bağ yardımı ile bir başka malzeme ile kaplanmasıdır. Tümör hücrelerinde aşırı üretilen proteaz, fosfolipaz ve oksidoredüktaz gibi kaplama ile nanopartikül arasındaki bağların enzimlerce kırılması sonucunda, kaplamanın yapıdan ayrılmasına böylece ilaç salımının başlamasına dayanır. İkinci bir yöntem ise partiküllerin enzim tarafından parçalanabilen biyomalzemeler ile kaplanmasıdır. Örneğin nişasta veya jelatin gibi maddelerle kaplanmış nanopartiküller hücre içine alındıklarında amilaz veya lipaz varlığında bu tip kaplama ajanları degrede olacak ve böylece ilaç salımı gerçekleşecektir. [50, 53]

Sıcaklık-Duyarlı Sistemler

Pek çok tümör çeşitinde yerel sıcaklığın normal vücut sıcaklığının üzerinde olduğu bilinmektedir. Bu sıcaklık farkından yararlanılması hedeflenerek uyarı-cevap ilaç taşıyıcı Sistemler geliştirilmiştir. Burada kritik sıcaklığı (LCST, lower critical solution temperature) 37°C civarında olan polimerler kullanılabilir. Bu sayede 37°C'de hidroflik yapıya sahip polimer zincirleriyle yüzey örtülürken, sıcaklık yükseldiğinde polimer ayrılarak salımın başlamasını sağlar. En iyi bilinen sıcaklık-duyarlı polimer poli-N-izopropil akril amit (PNIPAM), kritik sıcaklığı 32°C olduğundan bu uygulamalar için elverişli olmadığından, kritik sıcaklığı normal vücut sıcaklığına daha yakın olan N-izopropil metil metakrilamit gibi PNIPAM türevleri geliştirilmiştir. Böylelikle silika nanopartiküler gibi ilaç taşıyıcı Sistemler için gözenek kapatarak erken salımı engellemek aynı zamanda da sıcaklık-duyarlı bir sistem geliştirmek amacıyla kullanılabilirler. Artan sıcaklıkla polimer yapısı bozularak salıma olanak sağlamaktadır. [54]

Manyetik-Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler

Ultrason ya da ışığa duyarlı Sistemlere göre aynı zamanda görüntüleme ajanı olarak kullanılabilirler için daha çok tercih edilebilirler. Dışarıdan uygulanan manyetik alan yardımıyla partiküller istenen bölgeye yönlendirilerek aktif hedeflendirme sağlanabilir. Bunun yanı sıra, çekirdek-kabuk Sistemler kullanılarak partikül içine ilaç yüklenebilir ve manyetik alan değişikliğine duyarlı partiküller kullanılarak hedeflendirme sonrası manyetik alanda değişiklik yapılarak partiküllerin salım yapması sağlanabilir.[55]

Ultrason-Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler

Mekanik veya ısı uyarı oluşturmak amacıyla dışarıdan uygulanabilecek bir diğer uyarıcı da ultrasondur. Zaten klinik uygulamalarda yer alan bir cihaz olduğundan uygulamaya geçme kolaylığı sağlamaktadır. Ayrıca yalnızca ilaç salımını tetiklemek amacıyla değil, doku ve organlara penetrasyonu arttırmak amacıyla da kullanılabilir. Uygulandığında biyolojik bariyerlerde geçici olarak bir bozulmaya yol açmaktadır ki bu da özellikle kan-beyin engeli gibi nanopartiküller için aşılması zor olan engellerden partikül geçişine olanak sağlaması açısından önemlidir. Bu amaçla kullanılacak en uygun partiküller kabarcık şeklindeki partiküllerdir. Temel olarak gaz fazına geçebilecek bir çekirdek ve lipit, polimer veya protein yapıdaki bir kabuktan oluşan bu partiküller ultrason ile uyarıldığında sıvı fazdaki çekirdek gaz fazına geçerek dıştaki kabuğu bozar ve ilaç salımını başlatılır. [56]

Işığa-Duyarlı İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaç salımını tetiklemek amacıyla kullanılacak bir diğer etki de ışıktır. Bu sistemleri kullanmanın avantajları arasında intensitenin ayarlanmasının kolay oluşu, maruziyet süresinin kolayca kontrol edilebilmesi ve girişimsel bir işlem olmayışı sayılabilir. Partiküller verildikten sonra dışarıdan uygun bir ışık kaynağı uygulanarak ilaç salımı tetiklenebilir. Örneğin ultraviyole veya yakın bölge kızıl ötesi lazerler bu amaçla kullanılabilirler. UV ışığı kullanımının temel dezavantajı ise ilaç taşıyıcı sistemi tetiklerken diğer dokulara da zarar vermesidir. Bu nedenle yakın bölge kızıl ötesi bölgede çalışılması hem daha güvenli kabul edilmektedir hem de doku penetrasyonu daha iyi olduğundan daha verimlidir. Bu amaçla altın nanopartiküller, mezogözenekli

silikalar, polimerik hidrojeller, çekirdek-kabuk şeklindeki nanopartiküller kullanılabilir. [57]

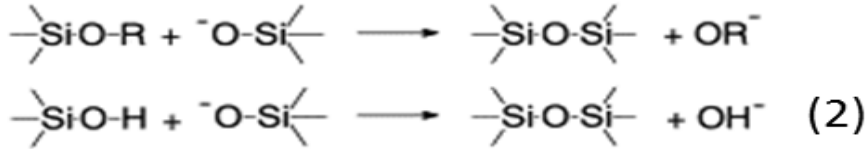
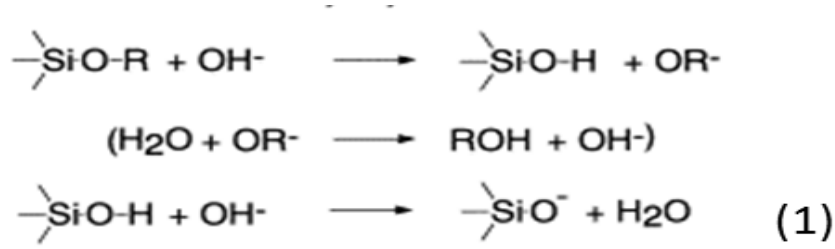
Bu çalışma kapsamında, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem olarak içi boş gözenekli silika nanopartiküller kullanılmıştır.

2.4 Silika Nanopartiküller

Silika nanopartikülleri kolay hazırlanabilmeleri ve eczacılık, elektronik, kataliz ince film substratları gibi birçok endüstriyel uygulaması olduğundan dolayı bilimsel araştırmalarda oldukça geniş bir yer tutmaktadır [58].

1968 yılında Stöber, Fink ve Bohn, daha sonra adlarının baş harfleri birleştirilerek SFB metodu diye anılacak olan, bir metot geliştirmişlerdir [59]. Bu metot, silika alkoksitlerin, $Si(OR)_4$ (burada R, genel formülü C_mH_{2m+1} olan radikal gruptur), hidrolizi reaksiyonu sonucunda, hidroliz olarak siloksan (-Si-O-Si-) grupları oluşturup yoğunlaşması ile birbirine yakın çapta küresel ve mikron (ya da mikron-altı, submikron) boyutlarında silikaların üretimini oldukça basit bir şekilde önermektedir. Reaksiyon pH 7-11 arasında gerçekleşirken, elektrostatik itme kuvveti sayesinde, yoğunlaşması gerçekleşmiş türlerin yanı sıra monomerler oluşmaktadır. Böylece topaklaşma engellenmekte ve çözünmeyen parçacıklar sol jel içerisinde elde edilmektedir. Metot genel olarak, silika alkoksit, çözücü ve katalizör kullanımını içermektedir. Silika kaynağı olarak genellikle TEOS (tetraetoksitortosilikat), çözücü olarak alkol Sistemleri veya saf alkoller (en çok etanol) ve katalizör olarak amonyak veya amonyum hidroksit literatürde sıkça kullanılmaktadır.

Gerçekleşen reaksiyonlar Şekil 2.6'da verilmiştir:



Şekil 2.6 Hidroliz reaksiyonu (1) ve kondenzasyon reaksiyonu (2) [60].

2.4.1 Mezogözenekli Silika Nanopartikülleri (MSN)

Mezogözenekli silika isminden de anlaşılacağı gibi silikanın mezogözenekli halidir ve nanoteknoloji alanındaki gelişmelerden bir tanesidir.

Mezogözenekli nanopartiküller; katı, sert bir yapıdan oluşan içinde gözenek bulunduran yüksek yüzey alanına sahip yapılardır ve yüzeyine farklı fonksiyonel grupların bağlanmasına olanak sağlayarak ilacı istenen bölgeye taşımaya olanak sağlarlar. Kimyasal olarak mezogözenekli silikalar bal peteği benzeri yapıya ve aktif yüzeye sahiptirler [61].

Mezogözenekli silikaların aşağıda özetlenen özellikleri sayesinde ilaç taşıyıcı sistem olarak günümüzde yoğun olarak araştırılmaktadır [62]:

- *Ayarlanabilir partikül boyutu:* mezogözenekli silikaların partikül büyüklüğü, yaşayan organizmalarda belirgin herhangi bir sitotoksisite göstermeksizin, 50nm ile 300nm arasında ayarlanabilmektedir.
- *Stabil ve sağlam yapı:* Polimer bazlı diğer nanotaşıyıcılar ile karşılaştırıldığında, mezogözenekli silikalar ısıya, pH'ya, mekanik strese ve hidroliz kaynaklı degradasyona karşı daha dayanıklıdır.

- *Tekdüze ve ayarlanabilir gözenek yapısı:* mezogözenekli silikaların gözenek boyutu dağılımı oldukça dar bir aralıkta değişmektedir ve gözenek çapı 2nm ile 6nm arasında ayarlanabilmektedir. Bu özellik sayesinde farklı ilaç molekülleri nanopartiküle yüklenebilmekte ve ilacın salım kinetiği çalışmalarının yüksek hassasiyette yapılmasına olanak sağlamaktadır.
- *Yüksek yüzey alanı ve geniş gözenek hacmi:* MSNlerde partikül boyutu ve gözenek boyutu ayarlanarak oldukça geniş yüzey alanı elde edilebilmekte ve yüksek oranda ilaç moleküllerinin yüklenmesi sağlanabilmektedir.

MSNlerin tüm bu özelliklerine rağmen, biyoteknoloji ve nanotıp alanındaki gelişmelerle birlikte, MSNlerin yükleme kapasitesi, biyomedikal alandaki uygulamaların genişlemesiyle birlikte, yetersiz gelmeye başlamıştır. İlaç taşıyıcı sistem olarak MSNlerin ve mikrokürelerin avantajlarının birleştirilmesiyle, İçi Boş (hollow) Mezogözenekli Silika Nanopartikülleri (HMSP) sentezlenmesi fikri ortaya atılmıştır [63].

2.4.2 İçi Boş (hollow) Mezogözenekli Silika Nanopartikülleri (HMSP)

İçi boş (hollow) yapılar, hem araştırma hem de pratik uygulamalar için oldukça ilgi çekicidir. Geçen yirmi yılda, fiziksel ve kimyasal özellikleri uygun hale getirilmiş içi boş yapıdaki nanomalzemeler, kataliz, kontrollü salım, sentez, optik ve elektronik, enerji depolama ve çevre koruma gibi geniş uygulama alanı bulmuştur. İçi boş yapıdaki malzemeler arasında silika, mekanik ve termal stabilite, kolay modifikasyon yapılabilmesi, düşük toksisite ve yüksek biyoyumluluk gibi üstün özelliklerine bağlı olarak, oldukça etkileyicidir. Kullanılabilir iç boşluk ve oldukça geçirgen mezogözenekli kabuk sayesinde, içi boş mezogözenekli silika (HMS) içerisine etkin madde yüklenmesi açısından oldukça uygundur [64].

HMSP Sentezleme Yöntemleri

Günümüzde, şablon kullanılan (templating) metotlar, HMS hazırlamada kullanılan en etkili ve yaygın yöntemlerdir. Bu yaklaşım iki temel kategoriye ayrılabilir: “hard-templating” ve “soft-templating” (katı şablon ve hafif şablon) metotlar. Geleneksel

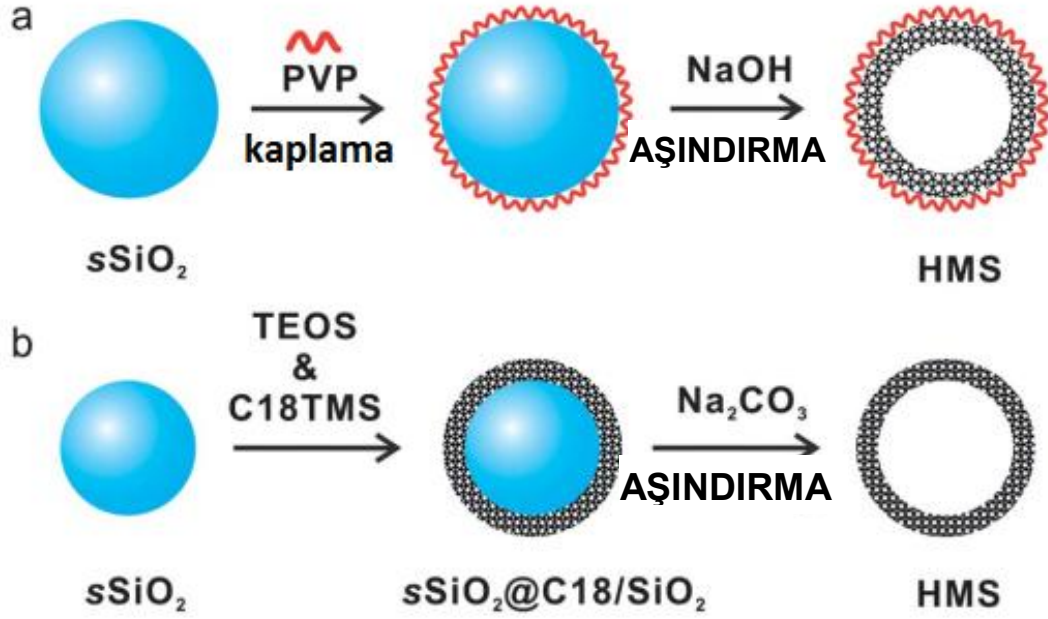
hard-templating metotlarda, bazı silika olmayan, silikaya affinitesi olan polimer bead ve oksit partiküller gibi malzemeler şablon (template) olarak kullanılırdı. Çekirdek/kabuk şablon silika ilk kez sol-jel yöntemiyle önceden üretilen şablonun kaplanmasıyla elde edilmiştir. Sol-jel silika kaplama prosesi boyunca, gözenek oluşturucu ajanlar (yüzey aktif maddeler ya da organosilanlar) mezogözenekli silika tabakası oluşturmak üzere ortama eklenirler. İstenen HMS, gözenek yapıcı ajanların ve şablonların ortamdaki seçici (selective) uzaklaştırılmasıyla elde edilir. Hafif-şablonlu (Soft-templating) metotlar, genelde yüzey etkin madde temelli misel/mikroemülsiyonu, yüzey aktif maddenin ve sol-jel ile elde edilen silikanın birlikte bir araya gelmesi yoluyla iç boşluk ve mezogözenekli silika kabuğun eş zamanlı oluşturulması için şablon olarak kullanılır. Çözeltideki şablonun uniform bir şekilde elde edilmesinin zor oluşuna bağlı olarak elde edilen HMS'in boyut dağılımının geniş olmasına neden olur. Katı-şablonlu (Hard-templating) metotların avantajı, önceden elde edilen şablonun boyutu ve şekli ile boşluk hacminin ve şeklinin kolayca kontrol edilebilmesidir [64].

HMS Sentezi için Kendi Kendini Kaplama (Self-Templating) Stratejileri

Kendi kendini kaplama metotları iki aşamada özetlenebilir:

- 1.Şablon (template) nanomalzemelerin sentezi
2. Üstü kaplanan şablonların içi boş yapılara dönüştürülmesi

Geleneksel katı şablon (hard-templating) metotlardan farklı olarak, kendi kendini kaplama metotlarında kullanılan şablonlar, sadece iç boşluğu oluşturmak amacıyla değil aynı zamanda dış mezogözenekli kabuğun bütünleyici kompozisyonunu oluşturmak için kullanılırlar. HMS sentezi için yeni geliştirilen kendi kendini kaplama metotlarında, Stöber metoduyla oluşturulmuş katı silika küreler, büyük ölçekte kolayca elde edilebildikleri için, uniform morfoloji ve kontrol edilebilen boyutlarda üretilebildikleri için yaygın bir şekilde kullanılırlar. Bu yöntemleri de yüzey-korumalı aşındırma (surface-protected etching) ve yapısal farklılık-temelli seçici aşındırma (structural difference based selective etching) olmak üzere ikiye ayırmak mümkündür [64]. Şekil 2.4'te bu iki yöntemin şematik olarak gösterimi verilmiştir [64].



Şekil 2.7. Yüzey korumalı aşındırma (a) ve yapısal farklılık temelli seçici aşındırma (b) mekanizmalarının şematik gösterimi [64]

Yüzey Korumalı aşındırma

2008 yılında ortaya atılan metoda göre; tipik bir yüzey korumalı aşındırma işlemi, sSiO₂'nin koruyucu bir poli-vinilpirolidon tabakası (PVP) ile önceden adsorpsiyonunu ve daha sonra sodyum hidroksit (NaOH) veya sodyum bor hidrür (NaBH₄) gibi uygun bir aşındırıcı ajan kullanılarak sSiO₂'nin içinden silisyumun tercihli olarak aşındırılmasını içerir. Bu metotta PVP, çok sayıda karbonil grupları sayesinde, güçlü hidrojen bağıyla sSiO₂ yüzeyindeki hidroksil gruplarıyla etkileşime girebileceğinden dolayı, yüzey koruyucu ajan olarak seçilmiştir [65].

Yapısal farklılık temelli seçici aşındırma

Gözeneksiz silika partiküllerden HMS üretmek için, iç boşluğun seçici etching ile uzaklaştırılması önemlidir. İçteki ile yüzey tabakasını oluşturan silika arasındaki yapısal farklılıktan faydalanılarak seçici aşındırma işlemi gerçekleştirilir. Template olarak hazırlanan sSiO₂ yapısı ile n-octadecyltrimethoxysilane- tetraethoxysilane (C18TMS-TEOS) yapısının, hidroliz ve kondensasyon prosesine birlikte sokulması ile, çekirdek/kabuk yapısında hazırlanan hibrit nanopartiküller elde edilmektedir. Daha sonra da aşındırma işlemi (etching) için Na₂CO₃ sulu solüsyonu veya amonyak kullanıldığında, hibrit nanopartikülün dış C18 kabuğu bozulmadan kalırken; içteki SiO₂ yapısı uzaklaştırılmaktadır. Bu sayede elde edilen içi boşluklu silika nanopartiküllerin (HMSP), partikül büyüklükleri ve por açıklıkları sentez metoduna göre ayarlanabilmektedir [66, 67].

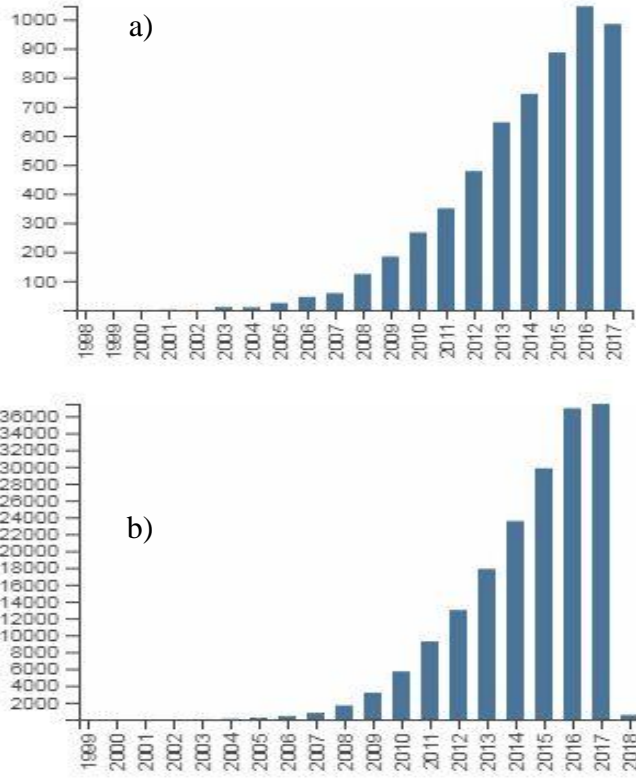
Kendi kendini kaplama için yardımcı katyonik yüzey aktif madde

Kendi kendini kaplama stratejilerin geliştirilmesiyle, sSiO₂ yapısından yola çıkılarak hazırlanan çeşitli içi boşluklu silikalar (HMSler) elde edilmektedir. Maalesef, gözenek oluşumunu kontrol altına almanın etkili bir yolunun bulunmaması nedeniyle, en çok kullanılan Self templating stratejileri ile elde edilen HMSteki gözenekler genellikle düzensizdir ve büyüklük dağılımları geniş bir aralıkta bulunmaktadır. Ancak, birçok mezogözenekli silika malzemesi için düzenli olarak dizilmiş ve büyüklükleri dar bir aralıkta dağılmış gözenekler arzu edilmektedir. Katyonik yüzey aktif maddelerin bu amaçla kullanılması ile ilgili olarak; katyonik yüzey aktif madde aracılı seçici aşındırma (etching) işleminden bahsedilebilir. Bu işlemde CTAB (Setil trimetil amonyum bromid) gibi kuaterner amonyum türevi bir katyonik yüzey aktif maddenin kullanılması ile, önceden oluşturulmuş CTAB misellerinin yapısal boşluklarına, hidroliz olmuş TEOS moleküllerinin yerleşmesi, daha sonra da CTAB maddesinin ortamdan uzaklaştırılması ile (etanol içerisinde çözme), düzenli gözeneklere sahip olan MCM-41 tipinde mezogözenekli silika nanopartiküllerin elde edilmesi sağlanmaktadır [64].

Kendi kendini kaplama stratejileri ile elde edilen HMS uygulamaları

İçi boşluklu silika (HMS) sentezinin ilk basamağı olan şablonların, istenen boyut ve yapıda elde edilebilmesi ile, hem HMS yapısının hem de çekirdek/kabuk şeklindeki yapıların hazırlanması daha kolay hale gelmiştir. Bu yapılar, özellikle çekirdek/kabuk (yolk/shell) yapılarının hazırlanmasında, yüzey geliştirilmesi yapılmış Raman saçılması ve nanotıp alanında yapılan çalışmalarda kullanılmaktadır [68, 69].

Self templating uygulamalarından biri olarak; çekirdek/kabuk (yolk/shell) yapılarının elde edilmesi, bu yapıların iç kısımlarına fonksiyonel nanopartiküllerin konulabilmesi sayesinde çeşitli hibrit yapıların önünü açmış ve özellikle de nanotıp uygulamalarına olanak sağlamıştır. MCM-41 tipindeki mezogözenekli silika nanopartiküller, ilaç taşıyıcı sistem olarak ilk defa 2001 yılında kullanılmıştır [70]. Bu nanopartiküllerin büyük yüzey alanları, yüksek ilaç yükleme kapasiteleri gibi avantajları dolayısı ile, nanotıp alanında dikkat çekmelerine neden olmuştur. Son yıllarda da “self templating metodları” (kendi kendini kaplama) ile elde edilen HMS yapıların, kontrollü ilaç salımı için kullanıldığı çalışmalar sıklıkla yayınlanmaktadır. Yine bu yapılara boyaların yüklenmesi veya aktif yüzey özellikleri sayesinde boyalar ile konjuge edilebilmeleri ile görüntüleme Sistemleri tarafından takip edilmeleri sağlanmıştır. HMS yapılardan ilaçların kontrollü salımın, uyarı yanıtı salımın, dokulara hedeflendirmenin mümkün olması ve tüm bu avantajların kolay üretim teknikleri ile birleşmesiyle, özellikle antikanser ilaç taşıyıcı Sistemlerin geliştirilmesine yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunda HMS yapılar tercih edilmektedir [71, 72]. Literatürde silika nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı yayınlar ile ilgili grafikler Şekil 2.8’de verilmiştir.



Şekil 2.8 Son yirmi yıl içerisinde kanser alanında silika nanopartiküller kullanılarak yayınlanan çalışmaların (Web of Science®) a) toplam sayıları ve b) aldıkları toplam atıf sayıları

Literatürde silika partiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanıldığı çalışmalardan örnekler Tablo 2.2’de verilmiştir.

Tablo 2.2. İçi boş silika partiküller ile ilgili çalışmalardan bazıları

Silika partikül büyüklüğü	Etkin madde veya yüklenen madde	Uygulama	Biyouyumluluğu arttırıcı ajan	Hedeflendirme	Kaynak
~150nm	Doksorubisin hidroklorit	Kanser	poli(2-(diethylamino)-etil metakrilat)	Pasif	[73]
>250nm	Fe ₃ O ₄	Görüntüleme	Yok	Pasif	[74]
>45	Doksorubisin	Kanser	Yok	Pasif	[75]
>100nm	Doksorubisin	Kanser	β-siklodekstrin/Ada-PEG	Pasif	[76]
~140nm	Bortezomib	Kanser	Yok	Pasif	[77]
~230nm	Doksorubisin	Kanser	Kitosan-PEG	Pasif	[78]
~200nm	Doksorubisin	Kanser	Kitosan	Pasif	[79]
90-140nm	Ibuprofen	Kanser	Kitosan	Pasif	[80]
~250nm	TNF-α	Kanser	Kitosan	Aktif	[81]
~150nm	Doksorubisin	Kanser	PEG	Aktif	[82]
~150nm	Doksorubisin	Kanser	Folik Asit/4,7,10-trioksa-1,13-tridekanediamin/ 4-n-dodesiloksibenzalasetal	Aktif	[83]
~350nm	Doksorubisin	Kanser	Yok	Pasif	[84]
~300nm	Doksorubisin	Kanser, Teragnostik	Yok	Pasif	[85]
~30nm	Tetrodotoksin	Sinir sistemi, Anestezik	Yok	Pasif	[86]

~100nm	Doksorubisin hidroklorit ve komptotesin/verepamil hidroklorit ve doksorubisin	Kanser	PEG-pridin disülfid (PDS)- 2-(diisopropilamino) etil metakrilat (DPA) kopolimeri	Pasif	[87]
>140nm	Klorantraniliprol	İnsektisit, Kontrollü Salım	A-siklodekstrin	Pasif	[88]
~250nm	Heparin	Kalp – Damar Hastalıkları, Nanomotor	Yok	Pasif	[89]
150-200nm	Peptit	Kanser, aşı	Lipozom	Pasif	[90]
~250nm	IgG, β -galaktozidaz	Kanser	Yüzey modifikasyonu	Pasif	[91]
~260nm	Mitoxantrone	Kanser	Yok	Pasif	[92]

Bu çalışma kapsamında AML tedavisinde endike bir ilaç olan doksorubisin aynı zamanda gözenekli silika ile pH duyarlı bir ilaç taşıyıcı sistem oluşturması amacıyla seçilmiştir. Elde edilen ilaç taşıyıcı sistemin kanda kalış süresinin uzun olması, yani retiküloendotelyal sistemden (RES) kaçabilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan en yaygın yöntem, PEGilasyondur. Yine, partiküllerin hücrelerle etkileşiminin yüksek olması bir diğer önemli husustur. Bu amaçla bu çalışmada uygulanan yüzey modifikasyonları ile ilgili teorik bilgiler bir sonraki bölümde verilmiştir.

2.5 Kitosan ve Polietilen glikol (PEG)

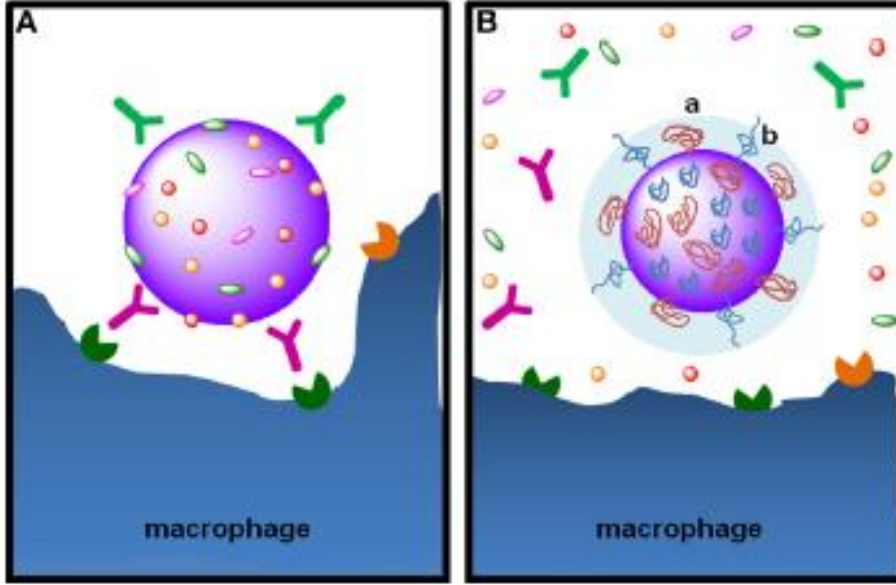
Partikül yüzeyinin biyouyumluluğu daha yüksek maddelerle modifiye edilmesi için kullanılan metotların bazılarının oldukça karmaşık olduğu literatürden anlaşılmaktadır. Bu maddeler içinden kitosan, katyonik, biyoindirgenabilir ve doğada bulunan bir polisakkarit olarak öne çıkmaktadır.

Kitin, selülozdan sonra dünyada en yaygın olarak bulunan ikinci biyopolimerdir. Yengeç, karides gibi kabuklu su ürünlerinin ana bileşeni olup, böceklerin iskeletinde ve mantarların hücre duvarlarının yapısında da bulunmaktadır. Kitinin birçok türevi bulunmakla beraber, bunlar arasında en önemlisi kitosandır. Kitosan yapı olarak selüloza benzer bir polimerdir. Her ikisi de doğrusal β -(1-4)-bağlı monosakkaritlerden meydana gelir. Bununla beraber kitosanın selüloza göre önemli farkı kitosanın glikozid bağlarıyla bağlanan 2-amino-2-deoksi- β -D-glukan yapısı taşımasıdır. Bu yapı polimerin genelinin %50'sinden fazlasını oluşturuyorsa yapı kitosan, yapının % 50'sinden fazlasını N-asetil-glukozamin oluşturuyorsa yapı kitin ismini alır. Kitosan pH'ya duyarlılık, biyouyumluluk ve toksik olmama gibi biyofarmasötik özelliklere sahiptir [93].

Kitosan, ilk kez 1811 yılında Henri Bracannot tarafından keşfedilmiştir. Bracannot, mantarlarda bulunan kitini sülfürik asitte çözmeye çalışmış ancak başarılı olamamıştır. 1894'de Hoppe-Seyler, kitini potasyum hidroksit içerisinde 180°C'de işleme sokmuş (deasetilasyon) ve asetil içeriği azaltılmış bir ürün olan "kitosan"ı elde etmiştir.

Pozitif yüklü kitosan molekülleri hücre membranına bağlanarak transsellüler epitelyal elektriksel direnci düşürür ve permeabilitenin artmasına neden olur. Kitosan hücreler arası sıkı kavşakları açarak hücrelere taşınan elemanların alınmasını sağlayıcı doğal bir yeteneğe sahiptir. Ek olarak kitosan tuzları tranmukozal absorpsiyonda permeasyon artırıcı olarak işlev görebilir ve normalde bariyeri aşamayan peptit yapılı ilaçların bariyeri aşarak hedefine ulaşmasını sağlayabilir. Olayın etki mekanizmasının temelini kitosanın pozitif yüklerinin sıkı kavşak proteinleriyle (okludin ve ZO-1) etkileşimi ve plazma membranının destabilizasyonu olduğu düşünülmektedir [88]. Bu etki sayesinde lipofilik membranlardan geçmesi zor olan hidrofilik peptit moleküllerinin bariyerleri aşmasına yardımcı olabilir. Bu nedenle engelleri aşabilmek amacıyla kitosan kullanılarak tasarlanan ilaç taşıyıcı Sistemler peptit yapılı hidrofilik ilaçların korunmasında, permeasyonunun ve penetrasyonunun artırılmasında, enkapsüle ya da adsorbe ettirilen ilacın kontrollü salımında görev alırlar [94].

Ancak pozitif yüklü doğası nedeniyle kitosanın kanda kalış süresi oldukça kısadır. Kandan hızlıca elimine olur ve retikuloendotelyal sistem (RES) organlarında birikir. Partikül yüzeyinin hidrofilik bir polimer olan poli etilen glikol ile kaplanması (PEGilasyon) ile bu problemin aşılabildiği bilinmektedir. Yüzey PEG ile kaplandığında, “hayalet” etkisi (stealth effect) denilen bir durum sonucunda nanopartiküller bağışıklık sistemince tanınmazlar. Bunun nedeni, PEGile edilmeyen partikül yüzeylerinin kan akımında opsonin adı verilen serum proteinleriyle etkileşime uğraması (opsonizasyon); PEGile edilenlerin ise uğramamasıdır. Bunun temel nedeni opsoninlerin bağışıklık sistemince tanınmaları ve opsonize olmuş partiküllerin kan akımındaki hücrelerin reseptörlerince tanınması ile fagositoz ile alınarak kandan temizlenmesidir. Partikül yüzeylerinin opsoninlenmesi genelde elektrostatik, hidrojen bağı veya hidrofobik etkileşimlere dayanır. Yüzeyin PEG zincirleri ile kaplanması ise hidrofilik doğası nedeniyle partikül etrafında bir su bulutu oluşturur ve oluşan bu bulut diğer etkileşimler için bir siterik engel oluşturur (Şekil 2.9).



Şekil 2.9 A) Nanopartiküllerin yüzeyi opsoninlerle (örneğin IgG veya IgA) kaplandığında opsonizasyon adı verilen olay gerçekleşir. Opsoninler partikül yüzeyini işaretlediğinden, partiküller makrofajlar gibi fagositik hücrelerin Fc reseptörlerince tanınırlar. B) Partikül yüzeyinin PEG ile kaplanması, yüzeye opsonin adsorpsiyonunu engelleyerek partiküle sterik stabilite ve görünmezlik özelliği kazandırır.

2.6 Hücre İçine Alım

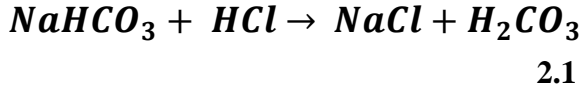
Hücre dışı ortamdaki nanopartiküllerin hücre zarı ile etkileşmesi sonucunda hücre içine girme süreci “*endositoz*” olarak adlandırılır. Nanopartiküller hücre zarı etkileştiğinde, hücre zarının bir bölümü bir kese şeklinde hücre içine doğru çöker ve nanopartikülü içine alacak şekilde kapanarak hücre içine geçer. Böylece nanopartikül endozom içine alınmış olur. [69]

2.6.1 Endozomdan Kaçış

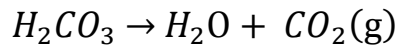
Nanopartiküller hücre içine partikül büyüklüğüne ve/veya şekline bağlı olarak çeşitli yollarla alınırlar. Ancak endositik yolak, nanopartiküller için temel hücre içine alım mekanizması olarak tanımlanabilir. Bu yolak, nanopartiküllerin hücre içine endozom adı verilen, pH'sı 5-6 civarında olan kesecikler içinde alındıktan sonra erken endozomdan geç endozoma yönelmesi ve sindirici enzimler bulduran lizozom ile birleşmesi mekanizması ile işlemektedir. Bu nedenle, hücre içine nanopartiküller,

lizozoma giderek sindirilmekte ve biyoyararlanımları düşmektedir. Bu durum, literatürde umut vadettiği düşünülen pek çok nanopartikülün hayvan deneylerinde beklenen performansı gösterememesinin en önemli nedenlerinden biri olarak düşünülebilir.

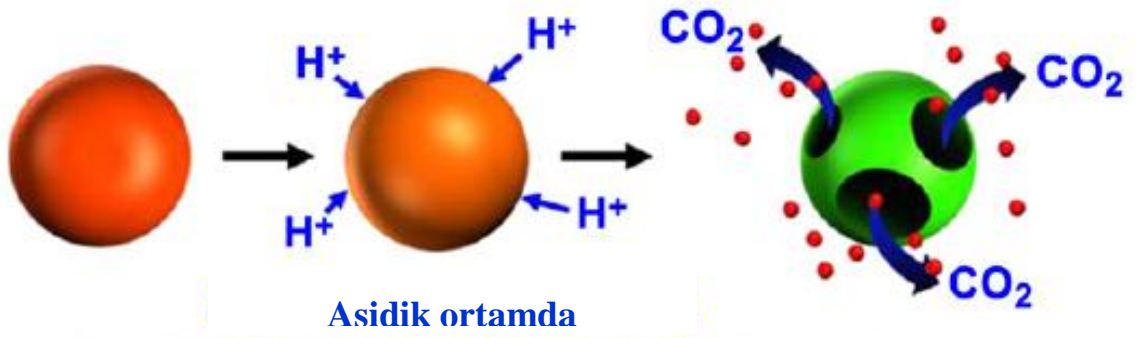
Bu noktada, endozom içinin düşük pH'sından faydalanılarak, yalnızca düşük pH'da salım yapan partiküller tasarlanarak biyoyararlanım arttırılabilir [95]. Bunun yanı sıra, lizozoma ulaşmadan endozom kesesini patlatarak düşük pH'ta salınan etkin maddenin sitozole ulaştırılmasını sağlayan Sistemler de tasarlanmıştır [96]. Endozomdan kaçış için farklı rotalar izleyen çeşitli mekanizmalar vardır: endozom kesesinde gözenek oluşumu, pH-tampon etkisi (proton sünger etkisi), endozom kesesi ile birleşme ve endozom kesesinin fotokimyasal bozulması. Bu mekanizmalar içinden en önemlisi ve literatürde en yaygın araştırılan proton sünger etkisidir. Burada, nanopartikül içine yüklenen sodyum bikarbonat, endozom kesesi içindeki asidik ortamda reaksiyon vererek CO₂ çıkışına neden olmakta ve oluşan basınç keseyi patlatarak etkin maddenin hücre içine dağılmasını sağlamaktadır [96] (Şekil 2.10). İlgili reaksiyonlar Denklem 2.1 ve Denklem 2.2'de verilmiştir.



Denklem



Denklem 2.2



Şekil 2.10 Endozomdan kaçış mekanizmasının şematik gösterimi [97]

Şekil 2.10'da görüldüğü gibi asidik ortamda, sodyum bikarbonat ile hidroklorik asit reaksiyon vererek karbon dioksit oluşturur. Bu gaz çıkışı, endozom kesesi içinde basınç oluşturur. Gaz miktarı arttıkça basınç da artar ve bu durum kesenin patlamasına neden olabilir. Kese patladığında nanopartiküller ve nanopartiküllerden salınmış etkin madde sitozole dağılır. Böylece asidik ortamda endozomdan kaçış sağlanabilir ve partiküller sitozol içinde dağılarak etkin maddenin hedefe ulaştırılmasını sağlayabilirler. Bu yöntem özellikle doksorubisin gibi etki gösterebilmesi için hücre çekirdeğine ulaşması gereken etkin maddelerin taşınmasında verimli bir strateji olabilir.

2.7 Deney Tasarımı

Deney tasarımı, süreç üzerinde etkili olabilecek değişkenlerin belirlenmesi ve belirli bir tasarım matrisine göre değiştirilmesi ile deneylerin gerçekleştirilmesi sonucunda deney üzerinde etkili olan değişkenlerin belirlenmesi için kullanılan yöntemleri içerir.

2.7.1 Taguchi Deney Tasarımı

Tasarım aşamasında yapılan düzenlemelerle kalitenin kontrol aşamasına kalmadan sağlanmasını amaçlar [98]. Yani, kontrol aşamasından sonra ürünün iyi veya uygun değil şeklinde sınıflandırılması için ayrılan ekstra kaynağın önüne geçilerek, en başından kaliteli ürün üretilmesini sağlayacak istatistiksel metotlar önerir.

Kalite en temel haliyle ürünün istenen performansı tam olarak sergilemesi olarak tanımlanabilir. Ürünün kalitesi, üründen beklenen özellikler ile yakından ilişkili olduğundan, üründen beklenen özellikler, tasarım aşamasında ortaya konmalıdır [98]. Taguchi kaliteyi geliştirmek için temeli deney tasarımına dayanan, Taguchi yöntemi olarak bilinen deney tasarım metodunu geliştirmiştir. Bu yöntem, kısmi faktöriyel deney tasarımı ile dayanıklı (robust) tasarım ve ortogonal dizinler gibi kavramların birleştirilmesiyle oluşturulmuştur [98].

Taguchi deney tasarımında, ürünün performansını etkileyen faktörler kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen faktörler olmak üzere ikiye ayrılır. Bunlardan ilki rahatlıkla

belirlenebilen faktörler olmakla birlikte kontrol edilemeyen (gürültü) faktörler varyansı oluşturan temel nedenlerdir.

2.7.2 Performans istatistiği ve sinyal gürültü oranı

Performans istatistikleri, farklı kontrol edilebilir faktör seviyelerini karşılaştıran ve en uygun faktör seviyesi kombinasyonunu seçen bir değerlendirme metodudur. Taguchi metodunda performans istatistiği olarak Sinyal/Gürültü (S/N) oranı kullanılmaktadır [98]. S/N en temel haliyle ortalamanın standart sapmaya oranı olarak ifade edilebilir [99]. Ortalama ve standart sapmanın ayrı ayrı kullanılmasına göre daha güvenilir sonuçlar bu yöntemle elde edilebilir [100].

Performans karakteristiğinin minimum, maksimum veya en iyi olmasına göre geliştirilen S/N oranları aşağıda verilmiştir [101, 102]. Bu denklemlerde “y” performans karakteristiği değerini, “s²” ise varyansı ifade etmektedir.

- Minimum durumunda y'nin sifira en yakın olması istenir ve ilgili eşitlik Denklem 2.3'te verilmiştir.

$$\eta = -10 \log_{10} \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2 \right] \dots \dots \dots \text{Denklem 2.3}$$

- Maksimum durumunda ise y'nin sonsuza gittiği varsayılır ve S/N Denklem 2.4'teki gibi olur.

$$\eta = -10 \log_{10} \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right] \dots \dots \dots \text{Denklem 2.4}$$

- Hedef Değer En iyi (ürün boyutları, elektrik voltajı vb.). Bu tür problemlerde, y için belli bir hedef değer verilmistir.

$$\eta = 10 \log_{10} \left[\frac{\bar{y}^2}{s^2} \right] \dots \dots \dots \text{Denklem 2.5}$$

2.6.6 Ortogonal dizinler

Çok sayıda faktör ve seviye gerektiren çalışmalarda tam faktöriyel çalışıldığında deney sayısı çok artmakta bu da hem zaman hem de malzeme kaybına neden olmaktadır. Taguchi yöntemi kesirli faktöriyel tasarımla bu durumun önüne geçer; yalnızca ortogonal dizinleri kullanarak deney sayısını azaltır ve minimum sayıda deneyden maksimum yararlanımı sağlamayı hedefler. Ortogonal dizinler kullanılarak bütün deneylerin tek tek denenmesinin önüne geçilir, aynı anda birden fazla değişken değiştirilerek deney sayısı azaltılır. [98]

Ortogonal dizinler aynı zamanda çok sayıda faktörün etkisinin aynı anda incelenmesi için de uygundur. Bu metotla deney tasarımının tam faktöriyele göre etkisi azalsa da, kazanılan zaman ve iş gücüne göre bunun önemsiz bir kayıp olarak değerlendirilmesi mümkündür. [98]

Taguchi tasarımı yardımıyla tek yanıt için az sayıda deneyle optimizasyon çalışması yapılması mümkün olmakla beraber çok yanıtli optimizasyon için uygun bir metot değildir. Bu nedenle bu tez kapsamında çok yanıtli optimizasyon için ideal çözüme yakınlıklarına göre deneylerin sınıflandırılması amacıyla kullanılan bir metot olan TOPSIS (Technique for Order Preference by Similarity to the Ideal Solution) metodu da kullanılarak çok yanıtli optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

2.7.3 TOPSIS yöntemi

TOPSIS (Technique for Order Preference by Similarity to the Ideal Solution) metodu, ideal çözüme yakınlık bakımından sınıflandırma yapmak için sıkça kullanılan bir metottur. Metot, negatif ideal çözümden en uzak olan ve ideale en yakın olanı seçme temeline dayanır [103].

TOPSIS yöntemi, seçenekleri ideal çözüme olan yakınlıklarına göre sınıflandırarak seçim yapılmasını kolaylaştırır. Bu amaçla kriterler önceliklerine göre

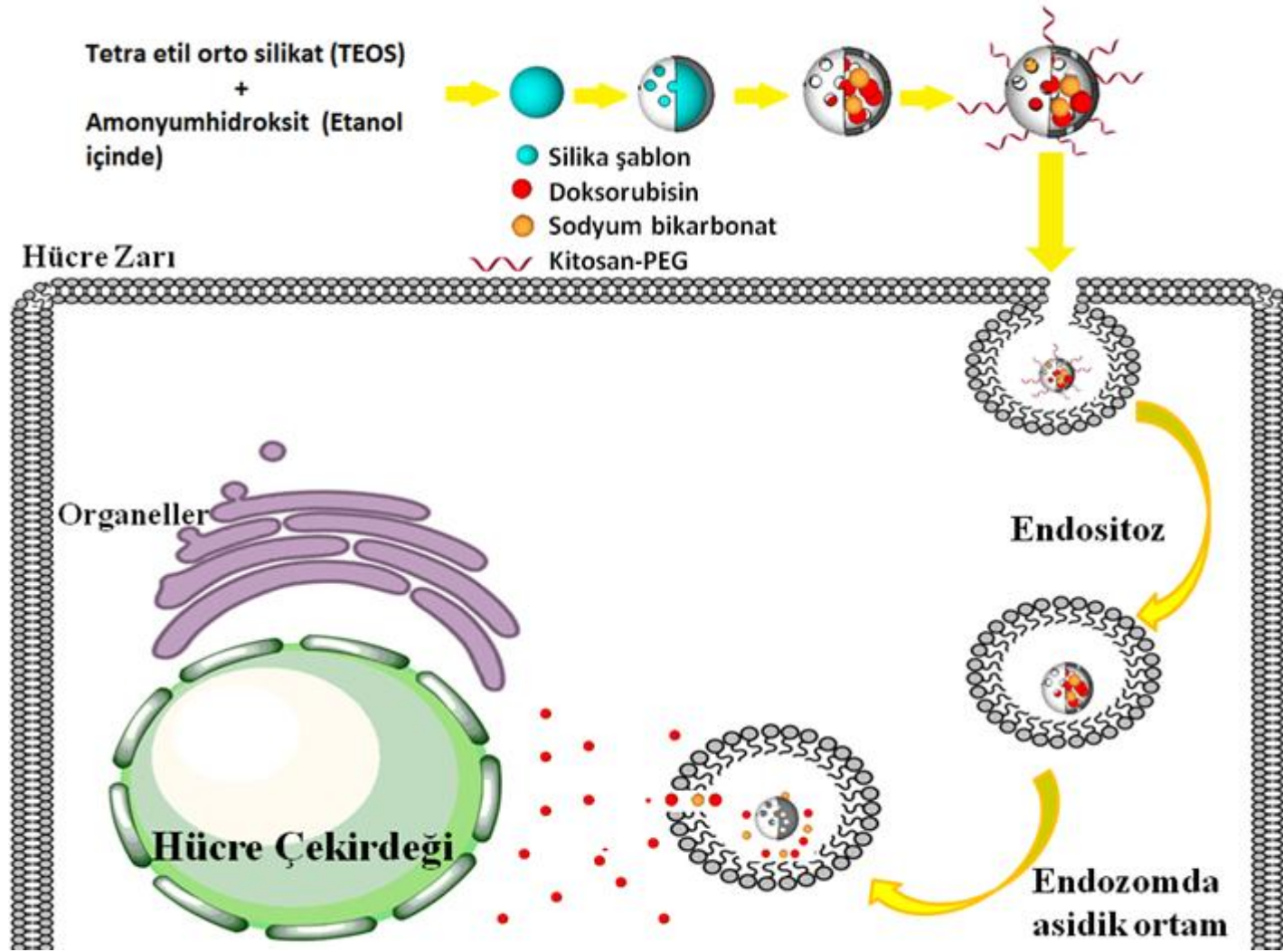
ağırlıklandırılabilirler, bu da en önemli kriterin en yüksek ağırlığa sahip olması anlamına gelmektedir [103].

Bu çalışma kapsamında ideal çözüm, partikül büyüklüğünün ve polidispersite indeksinin minimize edilmesidir. Bu noktada partikül büyüklüğünün daha önemli olması, ağırlıklandırma yapılırken göz önüne alınmıştır.

Bu çalışmada, içindeki boşluklar nedeniyle daha yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip görece yeni bir ilaç taşıyıcı sistem olan içi boş mezogözenekli silika nanopartiküllerin sentezlenerek kanser tedavisi için bir platform olarak tasarlanması hedeflenmiştir. Bu amaçla literatürde kullanılan çeşitli metotlar arasından, sentez kolaylığı ve daha üniform partiküller elde edilmesi amacıyla kendi kendini kaplama (self-templating) metodunun kullanılmasına karar verilmiştir. AML tedavisinde kullanılan bir antikanser ajan olan doksorubisin etkin madde olarak seçilmiş, böylece etkin madde ile silika arasındaki zayıf hidrojen bağlarının pH duyarlılığından faydalanılmak istenmiştir. Bu şekilde pH değişimi ile tetiklenen bir ilaç taşıyıcı sistem tasarımı öngörülmüştür. Aynı zamanda, ilaç taşıyıcı sistem içine etkin maddenin yanı sıra sodyum bikarbonat yüklenerek, partiküllerin hücre içine girdiğinde karşılaştığı asidik ortamda ilacı pH bağımlı olarak salması ve endozom kesesinden çıkması (endozomdan kaçış) amaçlanmıştır. Partiküllerin, opsonizasyona uğramadan kanser hücrelerinin içine kadar ulaşması olasılığının artırılması için kanda kalış süresini arttırmak amacıyla partikül yüzeyinin, elektrostatik etkileşim yardımıyla, kitosan-PEG ile kaplanması uygun görülmüştür. Burada kitosan, hem biyoyum

uluğu arttıran hem de erken salımı engelleyici bir kaplama olarak seçilmiştir. Elde edilen ilaç taşıyıcı sistemin fizikokimyasal karakterizasyonu tamamlandıktan sonra hücre kültüründe denenerek etkinliğinin belirlenmesi ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda in vivo çalışmalarla değerlendirilmesi ile yenilikçi bir nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem elde edilmesi planlanmıştır. Planlanan çalışmayı özetleyen bir çizim Şekil 2.11'de verilmiştir.

Bu kapsamda yapılan çalışmalar ile ilgili analitik metotlar, kullanılan malzemeler, karakterizasyon yöntemleri ve deneysel yöntemlerin detayları Malzeme ve Metot başlığı altında bir sonraki bölümde verilmiştir.



Şekil 2.11. Yapılması planlanan çalışmanın özet gösterimi

*Şeklin çizilmesi için SketchUp ve ChemOffice programlarının ücretsiz sürümleri kullanılmıştır.

3 Deneysel Çalışmalar

3.1 Kullanılan cihazlar

Cihaz/Yazılım	Marka/Program Adı
Santrifüj aleti	Hermle Z383 K, Almanya
Termostatlı yatay çalkalayıcı	Memmert, Almanya
İnkübatör	Sanyo, Japonya
Hassas terazi	Mettler Toledo, İsviçre
Laminar hava akımlı kültür kabini	Faster, İtalya
Isıtıcı manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçüm cihazı	Malvern Instruments, İngiltere
Ultra saf su sistemi	Milipore, A.B.D.
Vorteks	IKA, Almanya
Geçirimli elektron mikroskobu	FEI Company, Hollanda
Floresan mikroskop	Leica, Germany
FTIR cihazı	Bruker, A.B.D.
Mikropipetler	Ependorf, Almanya
İn vivo görüntüleme sistemi	IVIS Spectrum, A.B.D.
İstatistik yazılımı	Minitab 17
Çizim yazılımları	ChemDraw 15, SketchUP2016
Resim düzenleme yazılımları	ImageJ, Adobe Photoshop CS6

3.2 Malzemeler

Madde	Marka
Tetra etil orto silikat (TEOS)	Sigma Aldrich A.B.D.
Kitosan-PEG	Dr. Eduardo Fernandes Megia tarafından bağışlanmıştır
Metanol	Sigma Aldrich A.B.D.
Etanol	Sigma Aldrich, A.B.D.
Amonyum Hidroksit	Sigma Aldrich A.B.D.
Sodyum karbonat	Sigma Aldrich A.B.D.
SDS	Sigma Aldrich A.B.D.
Sodyum bikarbonat	Sigma Aldrich A.B.D.
Doksorubisin hidroklorür	Deva İlaç San. tarafından bağışlanmıştır.
RPMI 1640	Sigma Aldrich A.B.D.
FBS	Sigma Aldrich A.B.D.
L-glutamin	Sigma Aldrich A.B.D.
Penisilin-Streptomisin	Sigma Aldrich A.B.D.
HL60 hücre hattı	HÜ Temel Onkoloji A.B.D.'den Prof. Dr. Güneş Esendağlı tarafından sağlanmıştır.

3.3 Şablon Silikanın hazırlanması ve partikül büyüklüğü ve dağılımının optimizasyonu

Şablon silikanın hazırlanması için literatürde en yaygın sentez yöntemi olarak kullanılan Stöber metodu kullanılmıştır [59]. Temel olarak, etanol ortamında su ve amonyak varlığında TEOS'un hidrolizi ile gerçekleştirilmiştir. Burada kullanılan su, amonyak ve TEOS miktarlarının ortalama partikül boyutu ve dağılımı üzerinde ne kadar etkili olduğu deney tasarım matrisi yardımıyla incelenmiştir. Amorf silika sentezi temel olarak aşağıdaki gibidir:

1. Etanol içine su ve amonyum hidroksit eklenerek 15 dakika manyetik karıştırıcıda, oda sıcaklığında karıştırılmıştır.
2. Üzerine TEOS hızlıca ve tek seferde eklenmiştir.

Son ürünün partikül boyutu ve polidispersitesine etki eden temel değişkenin iç boşluğu oluşturacak olan amorf silikanın partikül boyutu olduğu göz önüne alınarak, amorf silikanın partikül boyutunu etkileyen parametreler incelenmiştir. Partikül boyutu ve polidispersiteye etki eden parametreler, reaksiyon ortamındaki bileşenlerin konsantrasyonları olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, reaksiyon ortamı olan etanolün miktarı 10 mL olarak sabit tutulmuştur. TEOS, NH₄OH ve su miktarları ise partikül boyutuna etkileyen faktörler olarak ele alınmıştır. Bu faktörlerin her bir için üç seviye belirlenerek, yanıtlar yani partikül boyutu ve polidispersite indeksi üzerine etkileri Taguchi tasarımı ile incelenmiştir. Bu seviyeler, daha önce yapılan deneylere göre belirlenmiştir. Taguchi tasarımı Minitab© yardımıyla yapılmıştır. Göz önünde bulundurulacak faktörler ve belirlenen seviyeleri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Şablon olarak amorf silika sentezi için uygulanan deney tasarımının faktör ve seviyeleri

Sembol	Faktör	Seviyeler		
		1	2	3
A	Su (H ₂ O) miktarı (mL)	0,4	1,5	2,60
B	Amonyum Hidroksit (NH ₄ OH) miktarı (mL)	0,45	1,10	1,75
C	Silika alkoksit (TEOS) miktarı (mL)	0,7	0,8	0,9

Bu çalışmada, Taguchi ortogonal dizisi (L9) deney sonuçlarını değerlendirmek için kullanılmıştır. Tablo 3.1’de 3, 4 ve 5. kolonlar üç kontrol faktörünü ve onların kodlanmamış seviyelerini göstermektedir. Bu model üç performans kriterinin, eş zamanlı olarak, faktör etkilerinin analizinde kullanılmasını sağlamaktadır. Deneylerin gerçekleştirilmesi için yapılan tasarım Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2 Şablon olarak kullanılacak amorf silikanın sentezi için faktörler ve seviyeleri

Deney No.	Kodlanmış Seviyeler			Kodlanmamış Seviyeler		
	A	B	C	H ₂ O miktarı (mL)	NH ₄ OH miktarı (mL)	TEOS miktarı (mL)
1	1	1	1	0,40	0,45	0,9
2	1	2	2	1,50	1,10	0,9
3	1	3	3	2,60	1,75	0,9
4	2	1	2	0,40	1,10	0,8
5	2	2	3	1,50	1,75	0,8
6	2	3	1	2,60	0,45	0,8
7	3	1	3	0,40	1,75	0,7
8	3	2	1	1,50	0,45	0,7
9	3	3	2	2,60	1,10	0,7

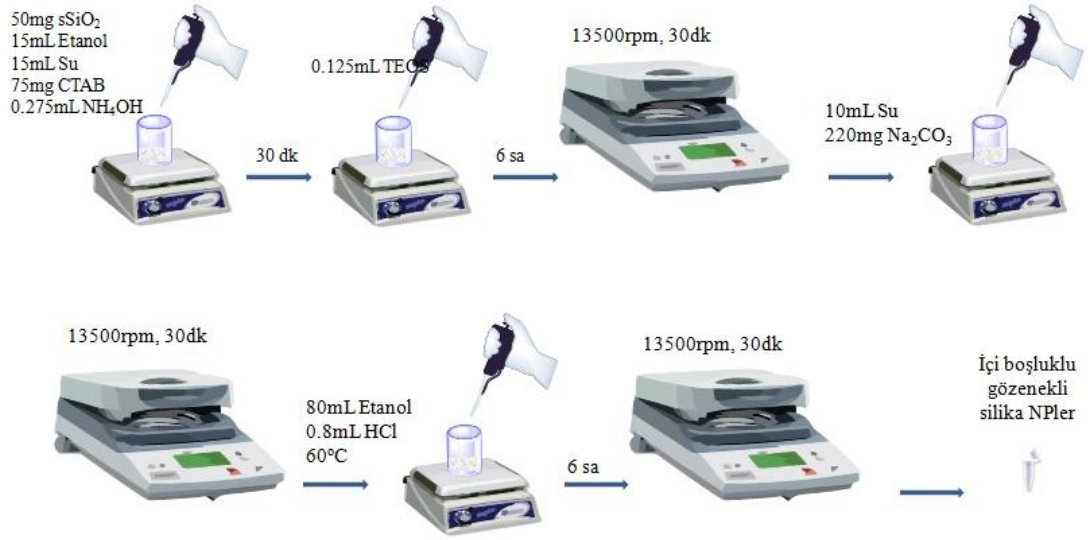
Taguchi tasarımından elde edilen sonuçlar, Minitab®’in Taguchi tasarımı bölümünden faydalanılarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen amorf silikaların partikül boyutları ve dağılımları ve yüzey yükleri zeta sizer ile ölçülmüş, ayrıca yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile incelenmiştir.

Bir sentezden elde edilen miktarın hesaplanabilmesi için elde edilen malzemeler etüvde kurutularak tartılmıştır (işlem üç kez tekrar edilerek ortalamaları alınmıştır).

3.4 İçi boş silikanın hazırlanması

Elde edilen amorf silikadan 60 mg alınıp, 10 mL deiyonize suda, ultrasonik prob yardımıyla, 5dk süreyle dağıtılmıştır. Elde edilen süspansiyon, 15mL su ve 15mL etanol karışımı içine manyetik karıştırıcı üzerinde şiddetli karıştırma ile eklenmiştir. Karışım 30dk karıştırıldıktan sonra üzerine 75mg setiltrimetil amonyum bromür (CTAB) ve 0,275mL NH₄OH eklenerek 30dk daha oda sıcaklığında karıştırılmış ve son olarak üzerine 0,125mL TEOS hızlıca eklenmiştir. Karışım 6 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra santrifüjle (13500 rpm, 30dk) ayrılmış, süpernatant atılmış ve partiküller 30mL deiyonize suda ultrasonik prob yardımıyla dağıtılmıştır. Süspansiyon manyetik karıştırıcı üzerinde 50°C'ye ısıtılmış ve şiddetli karıştırma altında üzerine 220 mg Na₂CO₃ eklenerek kimyasal aşındırma basamağı gerçekleştirilmiştir. 50°C'de 10 saat boyunca karıştıktan sonra santrifüjle ayrılmış, suyla üç kez yıkanmış ve 80 mL etanolde redisperse edilerek üzerine 0,8 mL HCl eklenmiş ve 60°C'de 6 saat karışmaya bırakılarak yüzey etkin madde uzaklaştırılmıştır. 6 saatin sonunda yeniden santrifüjlenerek partiküller ayrılmış, üç kez su ve alkolle yıkanarak fosfat tamponu (PBS) içinde redisperse edilmiştir. Elde edilen partikül miktarı, bir sentezden elde edilen partiküller etüvde kurutularak belirlenmiş, bu miktar göz önüne alınarak oluşan süspansiyonun konsantrasyonu belirlenmiş ve kurutma işlemi uygulanmamış partiküllere etkin madde yüklemesi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. İçi Boş Gözenekli Silika Nanopartiküllerin Elde Edilişi

3.5 Etkin madde yüklenmesi ve Kitosan-PEG Kaplanması

1mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan 20mL HMSP/PBS süspansiyonu içine 10mg Doksorubisin (suda çözünen tuz formu) eklenerek çözünmesi sağlanmış ve 12 saat boyunca karanlıkta karıştırıldıktan sonra dört ayrı şişeye bölünmüştür. 2,5mg NaHCO₃ şişelerden ikisine eklenmiş ve 12 saat daha karanlıkta karıştırma işlemine devam edilmiştir. Şişelerden ikisine 5'er mg Kitosan-PEG eklenerek 3 saat daha karıştırılmıştır. Yapılan eklemeler Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Etkin madde yüklemesi ve kitosan kaplaması

HMSP miktarı (mg)	Doksorubisin miktarı (mg)	NaHCO ₃ miktarı (mg)	Kitosan-PEG miktarı (mg)
2,5	1,25	1,25	2,5
2,5	1,25	-	-
2,5	1,25	1,25	-
2,5	1,25	-	2,5

NaHCO₃ ve Kitosan-PEG varlığının etkisinin anlaşılması adına bu formülasyonlar da kontrol amaçlı olarak salım ve hücre kültürü çalışmalarına dahil edilmiştir.

3.6 Etkin Madde Yükleme Etkinliği

Her bir partikül büyüklüğü için elde edilen 4 farklı formülasyona doksorubisin yükleme kapasitesi yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir. Bu amaçla analitik metot geliştirilmiştir. Yükleme etkinliğinin belirlenmesinde indirek metot kullanılmıştır; yani etkin maddenin partiküllere yüklenmesi sonrasında, partiküller santrifüjle ayrılarak süpernatanttaki etkin madde miktarı HPLC ile tayin edilmiştir. Yükleme etkinliğinin hesaplanmasında Denklem 3.1 kullanılmıştır.

Yükleme etkinliği (%) =

$$\frac{\text{Kullanılan toplam doksorubisin miktarı (mg)} - \text{süpernatantdaki doksorubisin miktarı (mg)}}{\text{Kullanılan toplam doksorubisin miktarı (mg)}} \times 100 \dots\dots\dots \text{Denklem 3.1}$$

3.7 Miktar Tayini

3.7.1 Kromatografik şartlar ve sistem

Analitik yöntem, yüksek performans sıvı kromatografisi (high pressure liquid chromatography, HPLC) için geliştirilmiştir. C 18 (250m x 4.6 mm, 5 µm) kolon, sabit faz olarak seçilmiştir. İzokratik şartlarda, mobil fazın akış hızı 1 mL/dk ve termostatlı kolon sıcaklığı 35 °C olarak ayarlanmıştır. Analizler, Floresans dedektörle, 475 nm eksitasyonda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak asetonitril:su (38:62) kullanılmıştır [104]. Mobil faz, analizden önce degaze edildikten sonra 30 dakika boyunca kolondan geçirilmiştir.

Doksorubisinin stok çözeltisi 1mg/mL olacak şekilde, ultra saf su ile hazırlanmış ve gerekli seyreltmeler yapılarak 0,1-110,00 µg/mL konsantrasyonları arasında belirlenen 6 nokta ile kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır.

3.7.2 Doğrusallık ve Aralık:

Geliştirilen analitik yöntem ile elde edilen sonuçların doksorubisin konsantrasyonu ile korelasyonunu incelemek için 0,10-110,00 µg/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık çalışmaları yapılmıştır. Basit doğrusal regresyon analizi, en küçük kareler yöntemi kullanılarak uygulanmış ve regresyon katsayısı ve interseptin anlamlılığı t testi ile belirlenmiştir (n = 3). Yükleme etkinliği ve *in vitro* ilaç salım çalışmalarından elde edilebilecek konsantrasyon değerleri göz önünde bulundurularak geliştirilen yöntem 0,10 ile 110,00 µg/mL konsantrasyon aralığında valide edilmiştir.

3.7.3 Doğruluk ve Kesinlik

Geliştirilen analitik yöntem ile elde edilen değerlerin, gerçek değerlere ne kadar yakın sonuç verdiğini ve elde edilen değerlerin tekrarlanabilirliğini test edebilmek için üç ayrı konsantrasyonda (0.10, 70 ve 110 µg/mL) doksorubisin çözeltileri üçer defa hazırlanarak analiz edilmiştir. Günler arasındaki değişkenliği belirleyebilmek amacıyla aynı prosedür üç gün tekrarlanmıştır. Validasyon sonuçları için geri kazanım (%), kesinlik için ise bağıl standart sapma (%) doğruluk parametresi olarak ifade edilmiştir.

3.7.4 Saptama ve Tayin Sınırı

Analitik yöntemin duyarlılık parametresinin değerlendirilmesi için saptama limiti (limit of detection, LOD) ve tayin limiti (limit of quantitation, LOQ) değerleri sinyal-gürültü oranı yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.8 Nanopartiküllerin karakterizasyonu

Elde edilen nanopartiküllerin amacına uygun veya istenen özelliklerde olup olmadıklarının saptanması için karakterize edilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla öncelikle nanopartiküllerin şekil ve büyüklük yönünden uygunluğunun incelenmesi için dinamik ışık saçılımı veya mikroskopik yöntemler kullanılmaktadır. Daha sonra, nanopartiküllerin yapısal karakterizasyonunun yapılması ve/veya yüzey özelliklerinin belirlenmesi amacıyla X-ışını Kırınım Desenleri, Fourier Transform Kızıl ötesi (FTIR) veya gerekli durumlarda X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi gibi yöntemler kullanılabilir. Burada ilaç taşıyıcı sistem olarak hazırlanan içi boş gözenekli

silika nanopartiküllerin karakterizasyonu için bu çalışmada kullanılan karakterizasyon tekniklerinden kısaca bahsedilecektir.

3.8.1 Nanopartiküllerin Morfolojisinin İncelenmesi

Yüzey yapısını karakterize etmek için sıkça kullanılan yöntemlerden biri taramalı elektron mikroskopisidir (SEM). Malzemenin fotoğrafını çekerek şeklinin normal olup olmadığını kontrol için uygulanır. Örneğe çok hassas bir elektron ışını gönderilir. Örnekten çıkan ya da geri dağılan elektronların tanımlanmasıyla monitörde fotoğraf oluşturulmasına dayanır. Görüntüyü 100000 kat büyütebilir. Nitel ve nicel analizler için EDS ile beraber kullanılır. İletken malzemeler için kullanılabilirken iletken olmayan malzemeler Altın/Paladyum gibi iletkenliği arttırıcı bir malzeme ile kaplanarak görüntülerinin alınması mümkündür.

Benzer şekilde bir diğer uygulama olan Transmisyon Elektron Mikroskopisi (TEM) ile yapı hakkında bilgi renk farklılıklarından faydalanılarak elde edilebilir. Gerekli incelikte, çok seyreltik süspansiyon halindeki örnek elektron ışınlarıyla taranır. Görüntü TEM sonuçlarının modellenerek resmedilmesiyle elde edilir. Numunenin görüntüsü 300000 kat büyütülür. Gözenek büyüklük dağılımı hakkında bilgi verir. [6]

Bu çalışmada partiküllerin yüzey morfolojisi SEM ve TEM ile incelenmiştir. Bunun için elde edilen partiküller etanol (%99, absolute) içinde ultrasonik prob yardımıyla dağıtıldıktan sonra ODTÜ merkezi laboratuvarlarına götürülerek, vitroz karbon parçalar üzerine damlatılıp kurutularak, iletkenliği sağlamak için, yüzey altın-paladyumla kaplanmıştır.

3.8.2 Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Tayini

Dinamik ışık saçılımı (DLS), küçük partiküllerin partikül büyüklüğünün ve partikül büyüklük dağılımının belirlenmesinde kullanılan, nano boyuta inildikçe “Brownian hareketi” adı verilen partiküllerin gelişigüzel hareketiyle partikül büyüklüğü arasındaki ilişkiden faydalanılan bir yöntemdir. Partiküller üzerine monokromatik bir ışık düşürülerek, partiküllerin hızının ölçülmesine dayanır. Partiküller küçüldükçe, Brownian hareketi hızlanır. Cihaz partikül büyüklüğü dağılımına karşılık intensite

grafığı verir. Elde edilen grafiğin çan eğrisi şeklinde ve simetrik olması beklenir. Eğrinin x ekseninde geniş yer tutması, çeşitli büyüklüklerdeki partiküllerin bir arada bulunduğunu, dar bir aralıkta olması ise tek tip partikül (monotip) bulunduğunu gösterir. Partikül büyüklüğü dağılımı için kriter, polidispersite indeksidir (PDI). Bu indeksin 0.5'ten büyük olması (PDI>0.5) heterojen bir dağılıma işaret eder. Burada göz önüne alınması gereken bir diğer önemli nokta cihazın hidrodinamik çap ölçmesidir. Hidrodinamik çap, partiküllerin yüküne bağlı olarak, etrafında su moleküllerinden oluşturduğu film ile beraber toplam çaptır. DLS ile partikül büyüklüğü ölçüldüğünde, ölçülen çapa partikül etrafındaki bu sıvı filminin de dahil olduğu ve gerçek çaptan biraz daha büyük olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Yine DLS ile sıvı içinde ölçüm alındığından, şişebilen partiküllerin (çapraz bağlı partiküller vs) partikül büyüklüğünün, gerçek partikül büyüklüğünden daha büyük ölçülmesi söz konusudur.

Kolloidal partiküller, dispersiyon ortamında iyon absorbe ederler ve pozitif veya negatif yüklenirler. Her partikül taşıdığı yükün tersi yükteki iyonlarla çevrilebilir ve bu şekilde partikül etrafında tek tabakalı bir yapı oluşur. Bu yapının etrafında ise, doğrudan partiküle bağlı olmamakla beraber hareketli ikinci bir iyon tabakası yer alır. Bu çift tabakanın dışında pozitif ve negatif iyonların eşit olduğu nötral bir alan bulunur. Partikülün yüzeyi ile bu nötral alan arasındaki potansiyel farkı zeta potansiyeli olarak adlandırılır. Zeta potansiyeli partikül üzerindeki net yükü gösterir. Zetasizer ile ölçülür ve birimi milivolttur (mV). Kolloidal dağılımların stabilitesini göstermesi açısından önemlidir.

Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçüm cihazı (Zetasizer Nanoseries-ZS (Malvern Ins., İngiltere)) ile partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri yapılmıştır. Partiküller su içinde dağıtıldıktan sonra her formülasyon için peş peşe üç ölçüm yapılmış, ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C, ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.8.3 Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Organik maddelerin ve bazı durumlarda inorganik maddelerin tanımlanmasında kullanılır. Dalga boyuna örnek madde grafiği verir. Malzemenin içerdiği fonksiyonel grupları belirlemede kullanılır. Her bir fonksiyonel grup belirli bir dalga boyundaki enerjiyi absorplar ve spektrum üzerinde pik verir. Yani fonksiyonel grupların spektrumda kendilerine özel pikleri vardır [7].

Elde edilen partiküllerde yüzey etkin madde kalıntısının kalıp kalmadığının anlaşılması amacıyla FTIR analizi yapılmıştır. Bunun için IRPrestige-21 spektrometresi (Shimadzu, Japonya) ile 4000-500 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında, 4 cm⁻¹ çözünürlükte yapılmıştır.

3.8.4 Yüzey alanının belirlenmesi

Adsorpsiyon Desorpsiyon izotermeleri, gözenekli malzemelerin yüzey alanlarının hesaplanmasında, gözenek büyüklük dağılımını belirlemede ve gözenek hacminin bulunmasında kullanılır. Bu amaçla kullanılan cihazda katı malzeme üzerine yoğunlaşma sıcaklığındaki bir gaz (genelde Azot gazı, 77K'de) çeşitli basınçlarda gönderilir. Azot molekülleri katı gözeneklerinde sıvılaşarak gözenekleri doldurur. Cihaz P/P₀'a karşılık V grafiği verir. Burada P₀ buhar basıncı, P/P₀ kısmi basınçtır. V ise adsorplanan hacimdir

BET (Brauner, Emmett and Teller) denklemi:

$$\frac{P}{v(P_0 - P)} = \frac{1}{cv_m} + \frac{(c-1)P}{cv_m P_0} \dots\dots\dots \text{Denklem 3.2}$$

Burada c BET denklemi sabitidir. Belirli gaz-katı Sistemleri ve sıcaklıklar için bilinen bir sabittir. BET denklemi yalnızca P/P₀'ın 0.05 ile 0.35 arasında olduğu durumlarda geçerlidir. BET denklemi tek noktada da kullanılabilir. Bu durumda kısmi basınç P/P₀=0.3 olarak alınır ve hesaplamalar yapılırken intersept ihmal edilir.

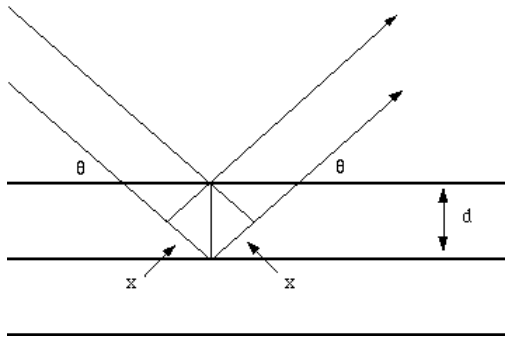
Elde edilen malzemenin iç hacminin büyüklüğü, ilaç yükleme kapasitesi açısından önemlidir. Ayrıca yüzey alanının belirlenmesi de malzemenin tanımlanması açısından önem arz etmektedir.

Elde edilen partiküllerin gözenekliliğinin anlaşılması ve toplam iç hacimlerinin bulunması amacıyla azot adsorpsiyon desorpsiyon yöntemi kullanılmıştır. Deneyler ODTÜ merkez laboratuvarı bünyesinde bulunan Yüzey Karakterizasyon cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Örnekler önce 120°C’de 3 saat boyunca degaze edilmiş, daha sonra AUTOSORB-6B cihazına verilmiştir.

3.8.5 X-Işını Kırınım Desenleri (XRD)

Örneğe gönderilen x-ışınlarının bir kısmının geri dağılması ile oluşan x-ışını deseninden madde hakkında bilgi elde edilebilir. Cihaz, 2θ vs. pik şiddeti grafiği verir.

XRD tabakalar arası uzaklığın belirlenmesinde, malzemenin içerdiği fazların belirlenmesinde, tanecik boyutu ve kimyasal kompozisyon belirlemede kullanılır. Her maddenin kendine özel 2θ açılarında pik şiddeti vardır. Bunlar ASTM kartlarından okunarak hangi pikin hangi maddeye ait olduğu anlaşılabilir. Şekil 3.2’de Bragg yasasına göre XRD prensibi verilmiştir.



Şekil 3.2. XRD Prensibi

XRD, Bragg yasasına dayanır:

$$d = \frac{n \cdot \lambda}{2 \sin \theta} \dots \dots \dots \text{Denklem 3.3}$$

Burada d tabakalar arası uzaklık, λ analiz için kullanılan cihazın dalga boyu, θ ise ölçülen kırılma açısıdır. Böylece XRD çıktısı kullanılarak tabakalar arası uzaklık hesaplanabilir [3].

Mezogözenekli yapıların hekzagonal düzlemde gözeneklerinin olup olmadığının anlaşılması, gözenek yerleşiminin düzenli olup olmadığının saptanması ve malzemenin kristal özelliklerinin belirlenmesi açısından XRD sonuçlarının incelenmesi önemlidir.

Örneklerin analizinde ODTÜ merkez laboratuvarı bünyesindeki X-ışını difraksiyon laboratuvarında bulunan Rigaku Ultima-IV X-ışını Kırınım Cihazı kullanılmıştır. cihazın dalga boyu 0.154056 nm ve ışın kaynağı CuK_α 'dır. Cihaz, 0.02 adım aralığıyla çalıştırılmıştır. Hekzagonal gözenekli yapıların pikleri 2θ açısı 0-10 arasında gözlemlendiğinden, cihaz bu aralıkta çalıştırılmıştır (küçük açılı XRD, SAXRD).

3.8.6 In Vitro Salım Çalışmaları

In vitro salım çalışmaları, fosfat tamponu içerisinde (PBS) 37°C'de 100 rpm'deki yatay çalkalayıcı su banyosunda 24 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. 0,5mg etkin madde içeren formülasyonlar 10mL PBS içeren falkonlara koyularak sink koşul sağlanmış ve pipet ile dağıtılmıştır. Daha sonra yatay çalkalayıcı su banyosuna yerleştirilerek belirli zaman aralıklarında 600 μL hacminde örnekler alınarak, santrifüj ile nanopartiküller ayrılmıştır (13500 rpm, 30dk). Dipte kalan nanopartiküller 600 μL PBS içinde dağıtılarak salım ortamına eklenmiştir. Süpernatanttaki etkin madde miktarları floresans dedektörlü HPLC ile tayin edilmiştir.

3.8.7 In Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

AML'de kullanılmak üzere doksorubisinin sitotoksitesinin anlaşılması amacıyla H1-60 (fare lösemi hücre hattı) üzerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü ortamı olarak fetal sıgır serumu (FBS, %10) ve penisilin G (50 U/mL) eklenerek hazırlanan RPMI 1640 kullanılmıştır. Hücrelerin 25cm²'lik flasklar içinde % 5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörün içine alınarak çoğalmaları sağlanmıştır.

Doksorubisinin IC50 değerinin belirlenmesi için, hücre kültürü kabini altında 96 kuyucuklu plaklara HI-60 hücreleri 50000 hücre/50µL olacak şekilde ekilmiş ve ortamdaki değişime uyum sağlamaları için 6 saat inkübatörde bekletilmiştir. 6 saatin sonunda, farklı konsantrasyonlardaki etkin madde çözeltilerinden (besiyeri içindeki) 50µL alınarak, kuyucuklara eklenmiş ve 48 saat inkübatörde bekletilmiştir.

Sitotoksosite çalışmaları thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) ile yapılmıştır. 24 saat inkübasyon süresinin sonunda, daha önceden 5 mg/mL konsantrasyonda olacak şekilde hücre kültürü kabini PBS ile hazırlanan MTT çözeltisinden, her bir kuyucuğa 25 µL eklenerek 4 saat boyunca 37°C’de hücreler ile inkübe edilmiştir. 4 saatin sonunda, her bir kuyucuğa önceden hazırlanmış olan (45:55 DMF:Su içinde çözülmüş 200g SDS) SDS/DMF çözeltisinden 100 µL eklenmiştir. 16-18 saat beklendikten sonra mikroparka okuyucuda 570nm’de absorbanları okunarak analiz edilmişlerdir. Plakalarda kontrol grubu olarak üzerinde etkin madde veya formülasyon uygulanmamış grupların canlılığı %100 olarak kabul edilerek, besiyeri ve partiküllerden gelebilecek otofloresan çıkarıldıktan sonra çeşitli konsantrasyonlarda formülasyon uygulanmış grupla karşılaştırılarak % canlılıklar hesaplanmış ve hücrelerin yarısını öldüren doz (IC50) oluşturulan eğri yardımıyla belirlenmiştir.

3.9 İn Vivo Çalışmalar

Bu çalışma kapsamında, inorganik bir nanopartikül çeşiti olan silika nanopartiküller kitosan ile birleştirilerek nanopartiküllerin elde edilmesi hedeflenmiştir. Hücre ile etkileşimin artması için partiküller kitosan ile kaplanırken, kanda kalış süresinin arttırılması amacıyla poli etilen glikol (PEG) ile konjuge edilmiş bir kitosan kullanılmıştır. Bu inorganik-organik yapıyla her iki malzemenin de üstün özelliklerinden (silikanın yüksek ilaç taşıma kapasitesi ve **PEG’in kanda kalış süresini arttırması**) faydalanılmak istenmiştir. Serbest doksorubisin kandan hızlıca elimine olduğu için *in vitro* çalışmalarda yüksek sitotoksik etki göstermekle beraber *in vivo*’da benzer performansı sergileyememektedir (insanda kandan yaklaşık 5dk içinde elimine olmaktadır [105]). Tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemin performansının daha iyi

değerlendirilebilmesi açısından *in vivo* çalışmalarla partiküllerin kanda kalış süresinin belirlenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

3R Kuralı:

R1: Kanda kalış süresinin *in vitro* ortamda belirlenmesi mümkün olmadığından *in vivo* çalışma yapılması gerekmiştir. Bu amaçla seçilen Sprague–Dawley sıçanlar, biyolojik sınıflandırma ve nöro-fizyolojik gelişmişlik bakımından bu deneyin gerçekleştirilebileceği insana en yakın canlı türlerindedir (toplam alınması gereken kan miktarı nedeniyle).

R2: İstatistiksel ön çalışma gerçekleştirilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde minimum sayıda hayvan kullanılması kararlaştırılmıştır. Literatür bilgileri bu gözlemi doğrular niteliktedir.

R3: Daha önce kullanılmış ve test edilmiş ekipmanlar kullanılacaktır. Kan alınmadan önce hayvanların acı çekmesinin önüne geçilmesi amacıyla ketamin ve ksilazin gibi anestezi ve analjezikler kullanılmıştır. Ötanazi işlemi yüksek dozda anestezi uygulanarak hayvanların acı çekmesinin önüne geçilmeye çalışılmıştır.

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen *in vivo* çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 2018/63-04 sayılı izniyle gerçekleştirilmiştir.

3.10 Kandaki Doksorubisin Seviyelerinin Karşılaştırılması

Doksorubisinin kan konsantrasyonuna bakılmak üzere, toplam 18 adet sıçan rastgele 3 gruba (n=6) ayrılacak ve kalan 3 sıçan da kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 200µL steril salin içinde doksorubisin çözeltisi veya nanopartikül çözeltisi 6mg doksorubisin/kg vücut ağırlığı olmak üzere kuyruk veninden verilmiştir. Çeşitli zaman noktalarında (5dk, 30dk, 2 saat, 8 saat ve 24 saat) sıçanlardan 0.5mL kan alınmış (anestezi altında). Toplam 5 kez kan alınmış ve alınan örnekler heparinli tüplere alındıktan sonra 6000rpm'de 10dk santrifüjlenerek plazması ayrılmış ve saklanmıştır.

Gruplar aşağıdaki gibidir:

Deney Grubu 1 (tek başına doksorubisinin kanda kalış sũresinin incelenebilmesi amacıyla kullanılacak deney grubudur, 6mg Doksorubisin/kg)

Deney Grubu 2 (doksorubisin ve sodyumbikarbonat yũklũ partikũlũn kanda kalış sũresinin incelenebilmesi amacıyla kullanılacak deney grubudur, 6mg doksorubisin ve 6 mg sodyum bikarbonat iãeren partikũlũ)

Deney Grubu 3 (dışı Cs-PEG ile kaplı, doksorubisin ve sodyum bikarbonat yũklũ partikũlũn kanda kalış sũresinin incelenebilmesi amacıyla kullanılacak deney grubudur, 6mg doksorubisin ve 6 mg sodyum bikarbonat iãeren partikũlũ)

Bũtũn enjeksiyonlar intravenũz (i.v.) olarak gerãekleřtirilmiř ve kuyruk veninden tek doz olarak verilmiştir. Her gruba verilen hacim 0,2 mL (PBS iãinde) olarak belirlenmiştir. Bu hacim iãinde 6 mg doksorubisin olacak şekilde formũlasyon uygulanmıştır [106].

Her zaman noktasında her bir hayvandan yaklaşık 0,5 mL kan, anestezi altında alınarak (toplam 2,5mL, son nokta terminal olmak üzere) toplanan kan EDTA kaplı tũplere alınmış ve 6000 rpm'de 10 dk santrifũj edilerek plazma ayrılmıştır. 24 saatin sonunda ۆtanazi uygulanmıştır (yũksek dozda ketamin/ksilazin).

Elde edilen plazmalar ¼zerine 2mL kloroform:metanol karışımı (4:1 v/v) eklenmiş ve 6000 rpm'de 10 dk santrifũj edilmiştir. Organik faz ayrılarak azot altında uãurulmuř, dipte kalan tortu kullanılacak olan mobil faz (Asetonitril: su, 32:68 v/v, pH 6.2) ile ozũlmũ ve doksorubisin konsantrasyonunun belirlenebilmesi iãin sıvı kromatografisi (high performans liquid chromatogragphy, HPLC) ile analiz edilmiştir. [104, 107-109]

3.11 Plazmadan Doksorubisinin Miktar Tayini için Kullanılan Analitik Yöntem

3.11.1 Kromatografik şartlar ve sistem

Analitik yöntem, yüksek performans sıvı kromatografisi (high pressure liquid chromatography, HPLC) için geliştirilmiştir. C 18 (250m x 4.6 mm, 5 µm) kolon, sabit faz olarak seçilmiştir. İzokratik şartlarda, mobil fazın akış hızı 0.75 mL/dk ve termostatlı kolon sıcaklığı 40 °C olarak ayarlanmıştır. Analizler, Floresans dedektörle, 480 nm eksitasyon ve 560 emisyonunda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak amonyum asetat tamponu (pH=3, 10mM) ve asetonitril (70:30 v/v) kullanılmıştır [110]. Mobil faz, analizden önce degaze edildikten sonra 30 dakika boyunca kolondan geçirilerek kolon yıkanmıştır.

Analitik yöntem geliştirilmesi için sıçan kanı santirfüjlenerek (4500 rpm, 10 dk) üstte kalan plazma kısmı alınmış ve daha sonra sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 100 µL plazma üzerine 2 mL kloroform: metanol (4:1, v/v) ve iç standart olarak kullanılan 20 µL metanol içindeki 2.5 µg/mL Daunorubisin (Daunorubisin) eklenmiştir. Örnekler vorteks ile 2 dk boyunca karıştırılmış ve daha sonra 6000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Altta kalan organik kısım 15mL'lik falkon içine alınarak azot altında kurutulmuştur. Dipte kalan çökelek 100 µL metanol içinde çözülüp 5000 rpm'de 5 dk daha santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak HPLC analizi yapılmak üzere cihaza yüklenmiştir. Örneklerden 50µL kolona enjekte edilmiştir. [107]

Doğrusallık ve Aralık:

Geliştirilen analitik yöntem ile elde edilen sonuçların doksorubisin konsantrasyonu ile korelasyonunu incelemek için 5-320 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusallık çalışmaları yapılmıştır.

3.11.2 Doğruluk ve Kesinlik

Geliştirilen analitik yöntem ile elde edilen değerlerin, gerçek değerlere ne kadar yakın sonuç verdiğini ve elde edilen değerlerin tekrarlanabilirliğini test edebilmek için üç ayrı konsantrasyonda doksorubisin çözeltileri iç standardın yanı sıra kana eklenerek (n=3) analiz edilmiştir. Günler arasındaki değişkenliği belirleyebilmek amacıyla aynı prosedür üç gün tekrarlanmıştır. Validasyon sonuçları için geri kazanım (%), kesinlik için ise bağıl standart sapma (%) doğruluk parametresi olarak ifade edilmiştir.

3.11.3 Saptama ve Tayin Sınırı

Analitik yöntemin duyarlılık parametresinin değerlendirilmesi için saptama limiti (limit of detection, LOD) ve tayin limiti (limit of quantitation, LOQ) değerleri sinyal-gürültü oranı yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. 4.5 ng/mL alt tayin limiti olarak belirlenmiş ve bundan daha düşük konsantrasyonlarda pik gözlenememiştir.

3.12 İstatistiksel Analiz

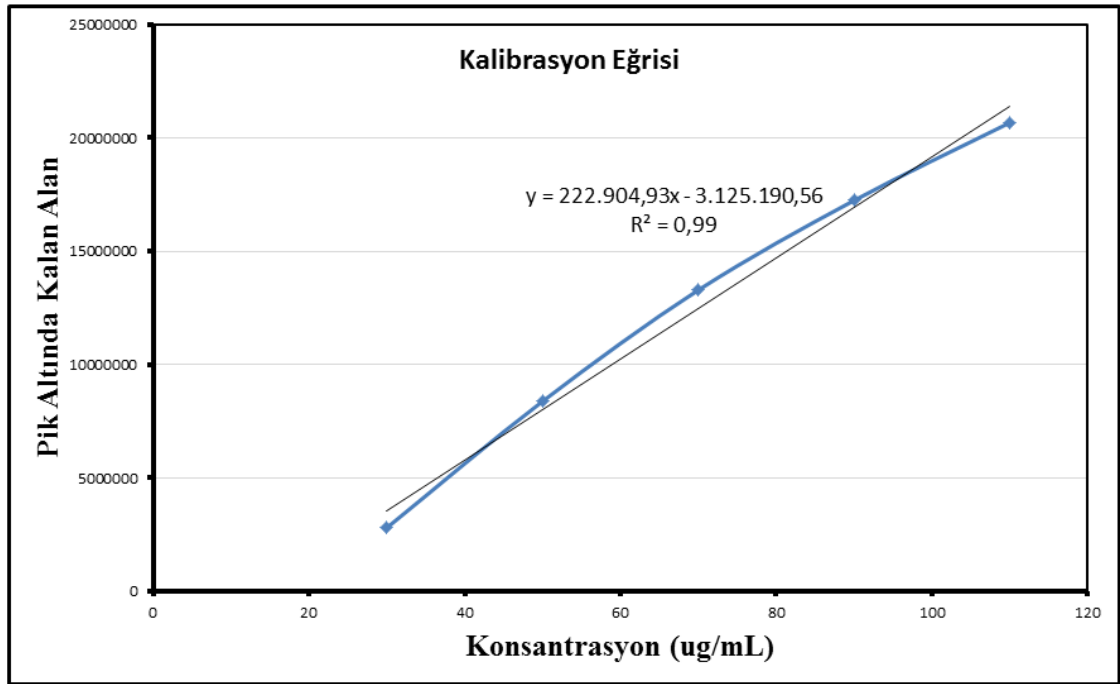
Tüm deneyler en az üçer kez tekrarlanmıştır. \pm ifadesi standart sapmayı yansıtmaktadır. İki grubun karşılaştırılmasında t testi, ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında ANOVA'yı takiben Tukey's post hoc testi Minitab® 16 programı ile gerçekleştirilmiştir. P değerinin 0.05 den düşük olduğu sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiş * işareti ile gösterilmiştir.

4 SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 HPLC Analizleri

Doksorubisin miktar tayini için analitik yöntem başarı ile geliştirilmiştir.

Öncelikle nanopartiküllere yüklenen doksorubisin miktarının belirlenebilmesi için (enkapsülasyon etkinliği belirlemede kullanılmak üzere) bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Süpernatanttan belirlenen konsantrasyonu kapsayacak şekilde 30, 50, 70, 90 ve 110 µg/mL olmak üzere beş nokta belirlenmiş ve bu noktalardan bir kalibrasyon eğrisi Şekil 4.1'deki gibi elde edilmiştir. Tanımlayıcılık katsayısı $R^2=0,9902$ olarak hesaplanmıştır. Varyasyon katsayıları %2'nin altında bulunmuştur.

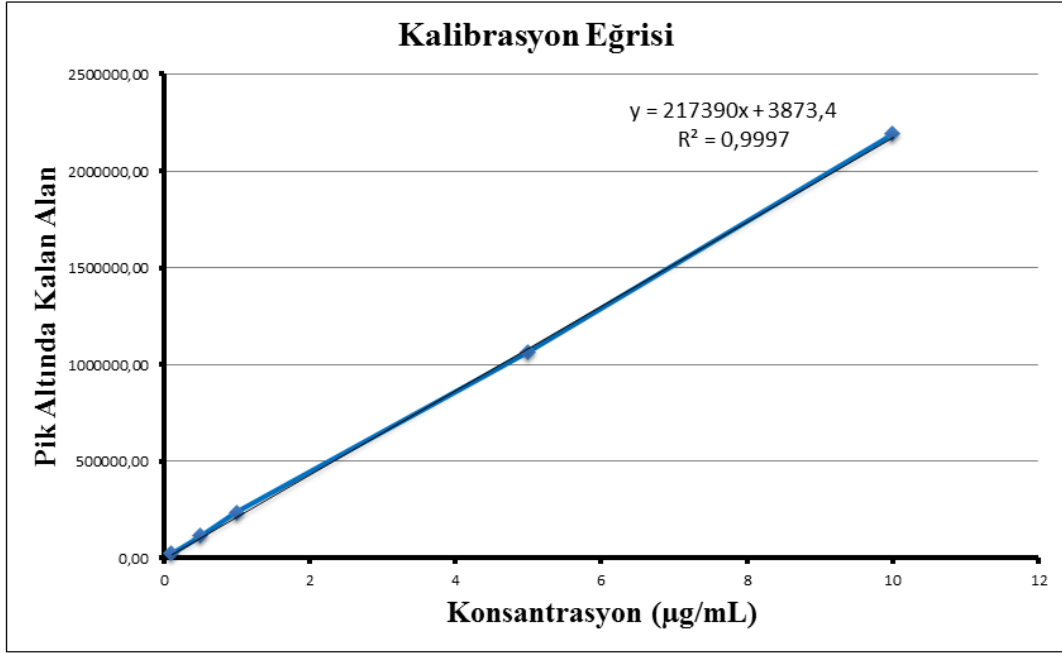


Şekil 4.1. Doksorubisin için 30-110µg/mL arasında kalibrasyon grafiği

Daha sonra nanopartiküllerden doksorubisin salımı belirlenirken, Şekil 4.2'deki kalibrasyon eğrisinin çalışma aralığını kapsamadığı ortaya çıkmıştır. Bu nedenle daha düşük konsantrasyonlarda yeni bir doğrusal aralık belirlenerek, salım hesaplanabilmesi için ikinci bir kalibrasyon eğrisi yapılmıştır. Konsantrasyonlar 0,1, 0,5, 1, 5 ve 10

$\mu\text{g/mL}$ olmak üzere kalibrasyon eğrisi Şekil 4.2'deki gibi elde edilmiştir. Tanımlayıcılık katsayısı $R^2=0.9997$ olarak hesaplanmış ve varyasyon katsayıları %2'nin altında bulunmuştur.

Burada analitik yöntem validasyonu için yapılan her bir analiz, her iki kalibrasyon eğrisi için ayrı ayrı yapılmıştır.



Şekil 4.2. Doksorubisin için 0,1-10 $\mu\text{g/mL}$ arasında kalibrasyon grafiği

Daha sonra her iki analitik metodun geri elde ve gün içi ve günler arası doğruluk sonuçları Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de verilmiştir.

Tablo 4.1 Dokсорubisinin su içinde PBS içinde 30-110 µg/mL aralığında miktar tayini için validasyon sonuçları

	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)	Varyasyon Katsayısı (%)	Geri Elde (%)
Gün İçi	30	30,0737	1,3810	100,25
	70	70,8828	0,7930	101,2612
	110	109,4385	1,8341	99,4896
Günler Arası	30	30,1750	0,2475	100,5835
	70	70,3544	0,5440	100,5063
	110	109,7574	0,4148	99,7795

Tablo 4.2 Dokсорubisinin su içinde PBS içinde 0.1-10 µg/mL aralığında miktar tayini için validasyon sonuçları

	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)	Varyasyon Katsayısı (%)	Geri Elde (%)
Gün İçi	0.1	0.0937	1.9536	100.3048
	1	1.0949	1.8515	100.3605
	10	10.2632	1.5125	101.5280
Günler Arası	0.1	0.0998	0.4162	99.8096
	1	1.0031	1.1743	100.3093
	10	10.1868	1.1634	101.8684

Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'deki verilerden de görüldüğü gibi gün içi ve günler arası varyasyon katsayıları %2'nin altındadır. %Geri Kazanımlar ise beklendiği gibi %98-102 aralığında hesaplanmıştır.

4.2 Nanopartikül Karakterizasyonu

4.2.1 Polidispersite İndeksi ve Ortalama Partikül Büyüklüğü

Ortogonal diziler kullanılarak elde edilen Taguchi deney tasarımına göre yapılan dokuz deney sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. L₉ Taguchi tasarımıyla elde edilen yanıtlar

Deney No	Kodlanmamış Seviyeler			Partikül Büyükülüğü (nm)	Polidispersite İndeksi
	A	B	C		
1	1	1	1	97,54	0,211
2	1	2	2	260,2	0,161
3	1	3	3	404,3	0,187
4	2	1	2	276,6	0,289
5	2	2	3	356,4	0,130
6	2	3	1	255	0,112
7	3	1	3	373,2	0,179
8	3	2	1	253,2	0,154
9	3	3	2	356,8	0,210

Tablo 4.3'te görüldüğü gibi farklı deney koşulları sonucunda, partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi yanıtları farklılık göstermiştir. Bu yanıtların içinden, en küçük ve en büyük partikül boyutunu sağlaması amacıyla Minitab© yazılımında Taguchi tasarımı analiz edilirken, en küçük partikül boyutunu belirlemek amacıyla “en küçük en iyi” (smaller is better) seçeneği işaretlenmiştir. Böylece, en küçük ve en büyük partiküllerin elde edilebilmesi için formülasyonlar belirlenebilmiştir. Ancak Taguchi tasarımı aynı anda birden fazla yanıtın optimizasyonunu sağlayan bir metot olmadığından yanıtlar tek tek optimize edilmiştir ve elde edilen sonuçlar birçok yanıtı yöntemi olan TOPSIS tabanlı Taguchi tasarımı ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

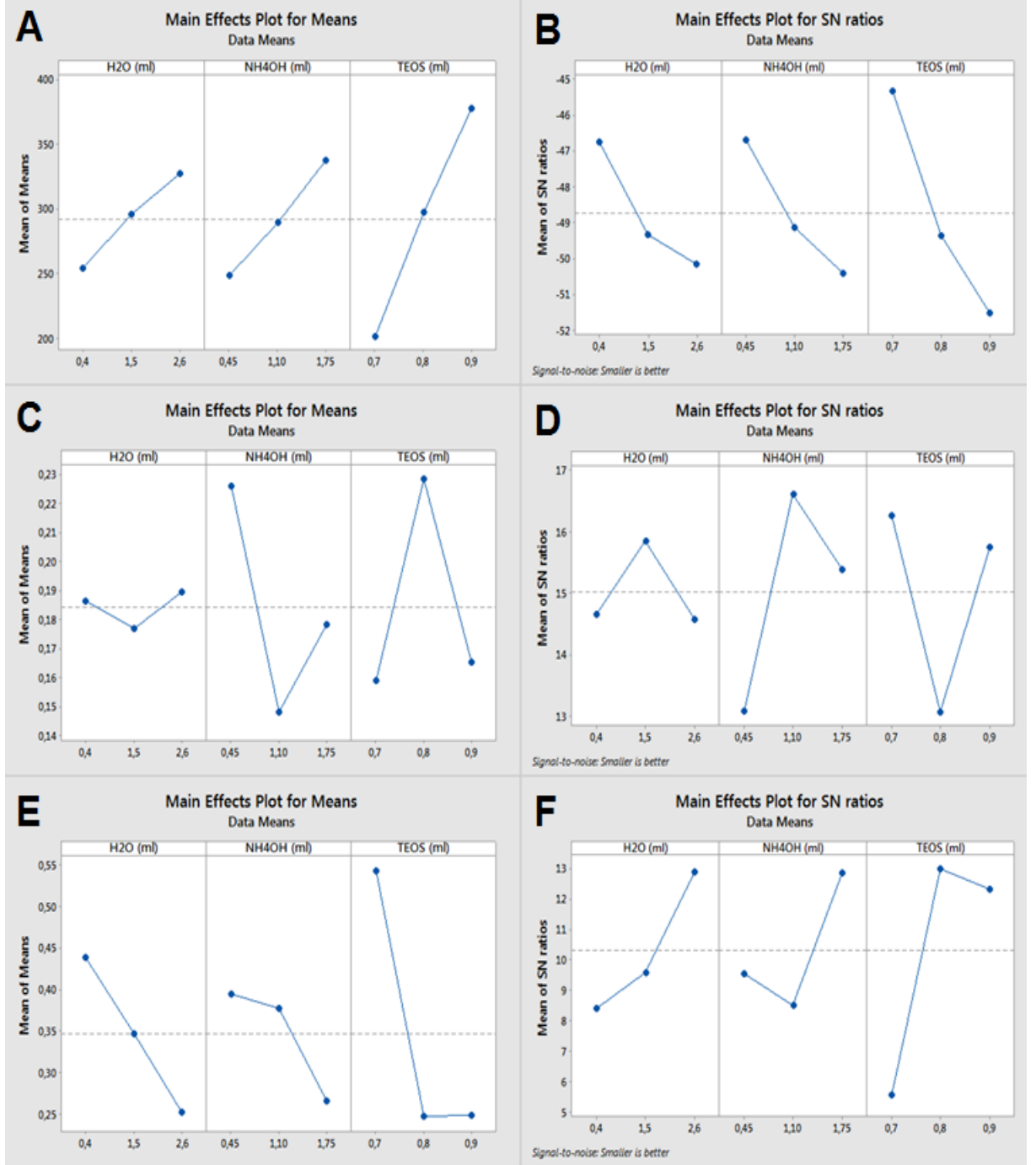
TOPSIS tabanlı Taguchi tasarımı için yapılan hesaplamalar Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4. TOPSIS metodu ve Minitab kullanılarak en küçük partikül boyutu ve en düşük polidispersite için hesaplanan S/N oranları

Yanıt ağırlığı	Karar Matrisi (S/N)		Ağırlıklı normalize karar matrisi				
	R(PB)	R(PDI)	v(PB)	v(PDI)	Si+	Si-	Ci
	0,8	0,2					
1	-39,7837	13,5144	-0,2171	0,0592	0,0241	0,0684	0,7395
2	-48,3061	15,8635	-0,2636	0,0695	0,0485	0,0305	0,3863
3	-52,1341	14,5632	-0,2845	0,0638	0,0702	0,0166	0,1911
4	-48,8370	10,7820	-0,2665	0,0472	0,0612	0,0180	0,2272
5	-51,0388	17,7211	-0,2785	0,0777	0,0617	0,0310	0,3344
6	-48,1308	19,0156	-0,2626	0,0833	0,0455	0,0422	0,4808
7	-51,4388	14,9429	-0,2807	0,0655	0,0660	0,0186	0,2200
8	-48,0693	16,2496	-0,2623	0,0712	0,0468	0,0326	0,4109
9	-50,9972	12,5418	-0,2783	0,0550	0,0674	0,0099	0,1280
	146,6223 ^a	45,63875 ^a	A ⁺ = -0,21707	0,083331			
			A ⁻ = -0,28445	0,04725			

^a Kolondaki her bir değerin kareleri toplamının karekökü

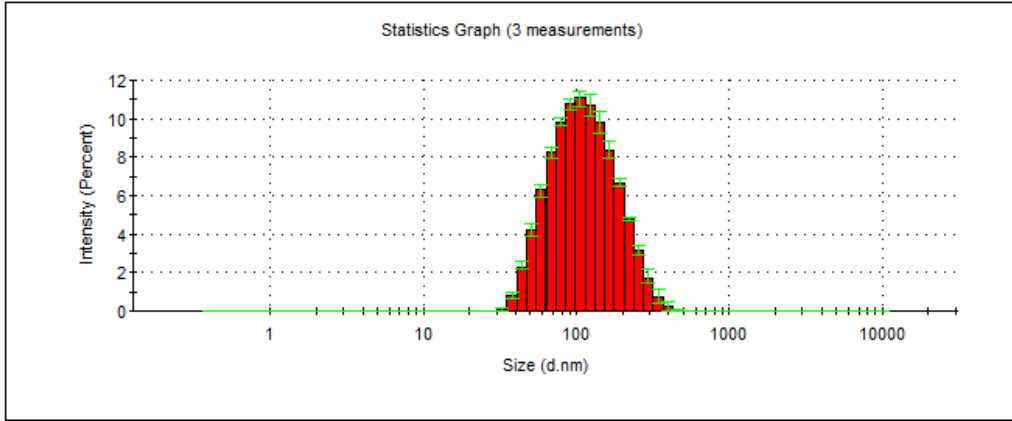
Tablo 4.4'te Ci ile gösterilen değerler, artık bu deney tasarımından elde edilen verileri ifade etmektedir. Bu veri Minitab ® programına yanıt olarak girilerek en küçük partikül büyüklüğü ve en düşük polidispersitede partikül elde etmek için 1 nolu deney koşulunun kullanılması gerektiği anlaşılmıştır. İlgili grafikler Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.3. En küçük partikül büyüklüğü için ana etki grafikleri: A ve B ortalama partikül büyüklüğüne, C ve D polidispersite indeksine göre yapılan optimizasyona aittir. E ve F ise TOPSİS tabanlı Taguchi tasarımı ile elde edilmiştir

Elde edilen bu partiküllere ait validasyon deneyi sonucu elde edilen partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri Şekil 4.4'te verildiği gibidir.

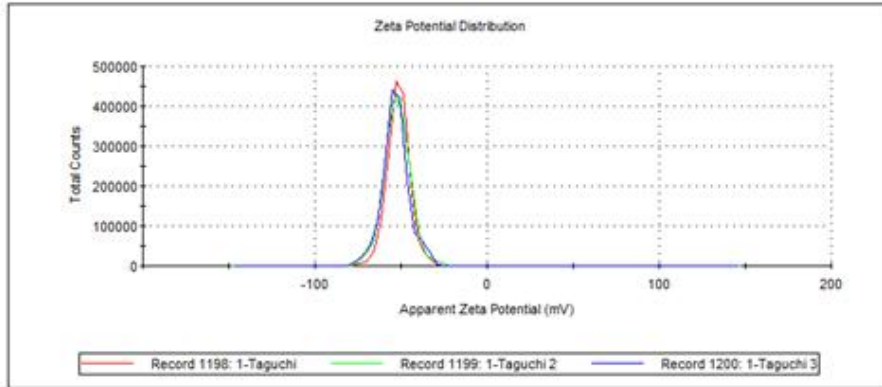
Z-Average (d.nm): 98,33
Pdl: 0,169
Intercept: 0,949
Result quality : Good



B

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -52.9	Peak 1: -52.9	100,0	7,82
Zeta Deviation (mV): 7,82	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,223	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



Şekil 4.4 Validasyon deneyi sonuçları: A ve B sırasıyla partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli

Validasyon deneyi sonucu elde edilen nanopartiküller, yazılımın önerdiği partikül büyüklüklerine yakın sonuçlar vermiştir. Partiküllerin zeta potansiyelleri de ölçülmüştür. Silika, yüzeyindeki -OH grupları nedeniyle negatif yüklüdür ve elde edilen sonuçlar bu bilgiyle örtüşmektedir. Bunun yanı sıra, zeta potansiyelinin -30'dan daha düşük çıkması, partiküllerin sudaki stabilitesinin oldukça iyi olduğunu önermektedir.

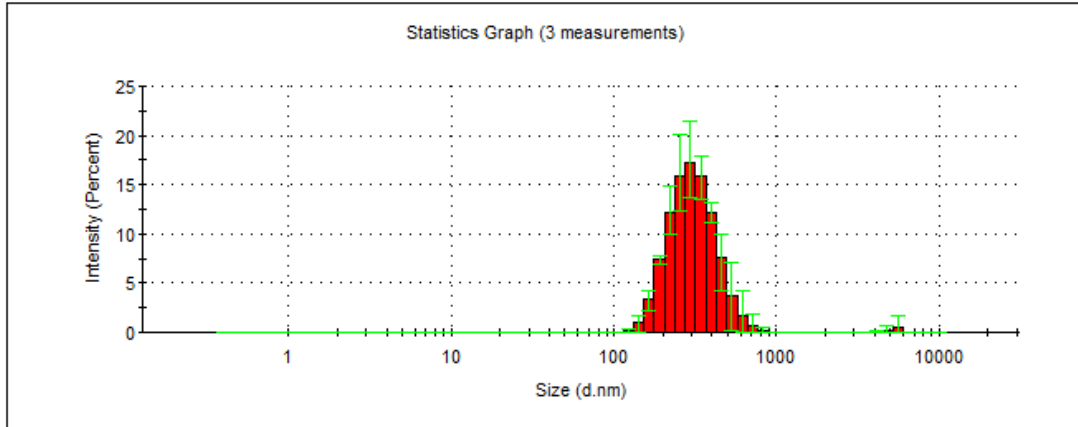
Elde edilen şablonların üzerine mezogözenekli yapı oluşturulduktan sonra, partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri DLS ve zetasizer ile belirlenmiştir (Şekil 4.5)

Z-Average (d.nm): 336,8

Pdl: 0,263

Intercept: 0,979

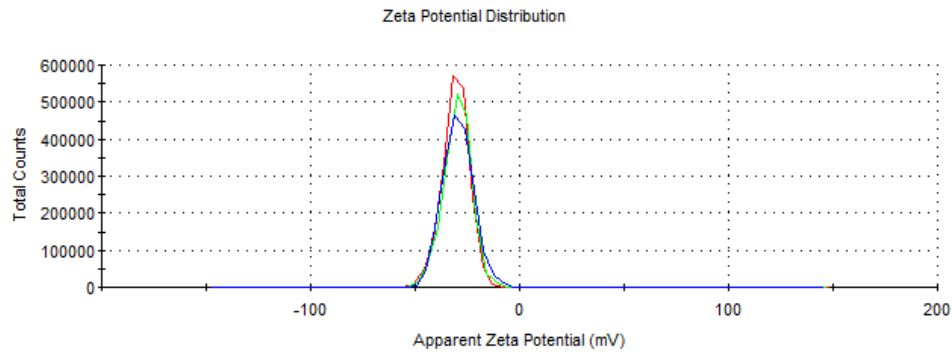
Result quality : Good



Temperature (°C): 25,0	Zeta Runs: 12
Count Rate (kcps): 197,1	Measurement Position (mm): 4,50
Cell Description: Zeta dip cell	Attenuator: 7

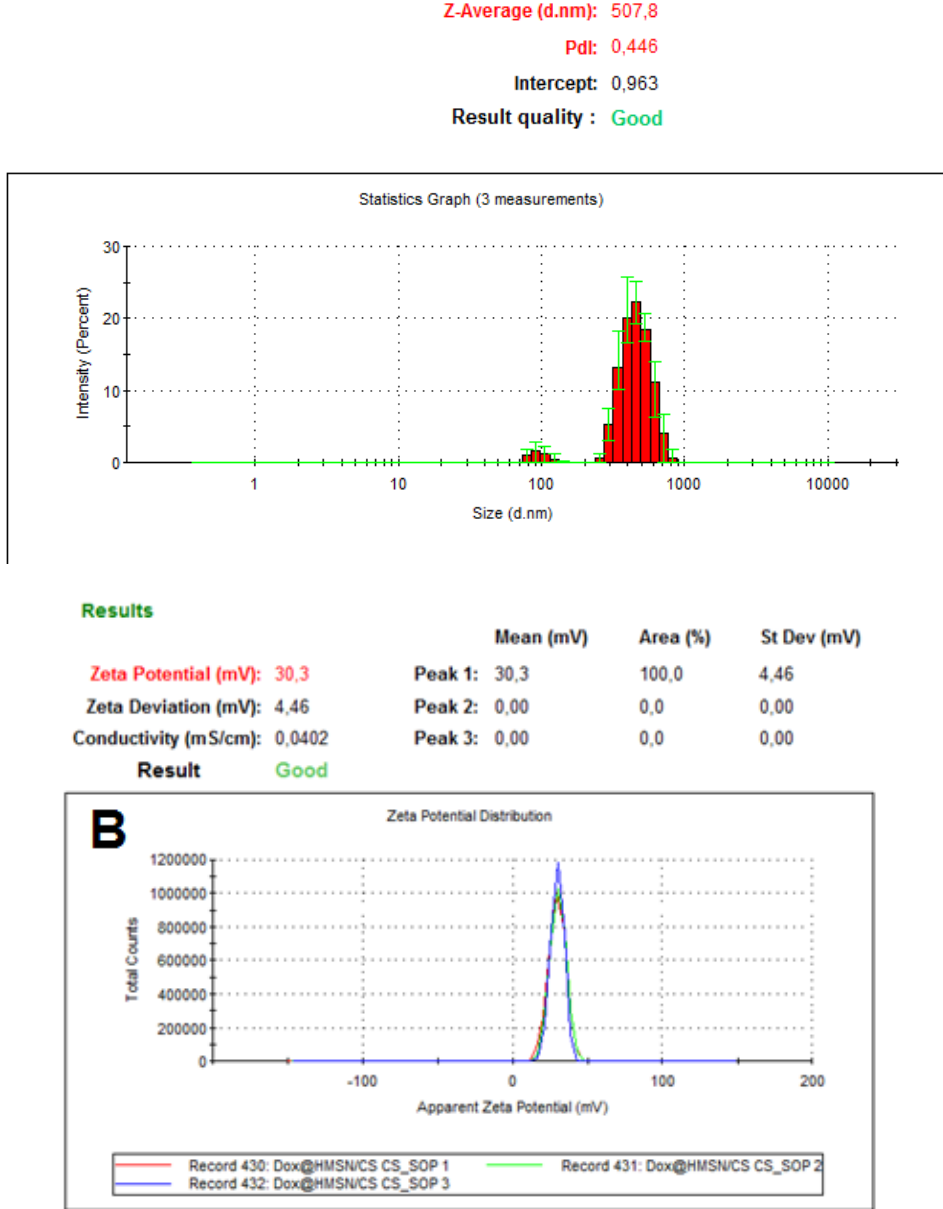
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -30,7	Peak 1: -30,7	100,0	6,32
Zeta Deviation (mV): 6,32	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,113	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



Şekil 4.5. A ve B sırasıyla HMSPIlerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli Burada partikül büyüklüğünün kullanılan şablona göre artmış olması, mezogözenekli kabuk yapının oluştuğunu düşündürmektedir. Ayrıca zeta potansiyelinin -30 olması,

kitosanın yüzeye elektrostatik etkileşimlerle tutunabilmesi açısından önemlidir. Kitosanın yüzeye tutunup tutunmadığının belirlenmesi için, kitosan kaplı büyük HMSP örneğinin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçülerek Şekil 4.6'da verilmiştir.

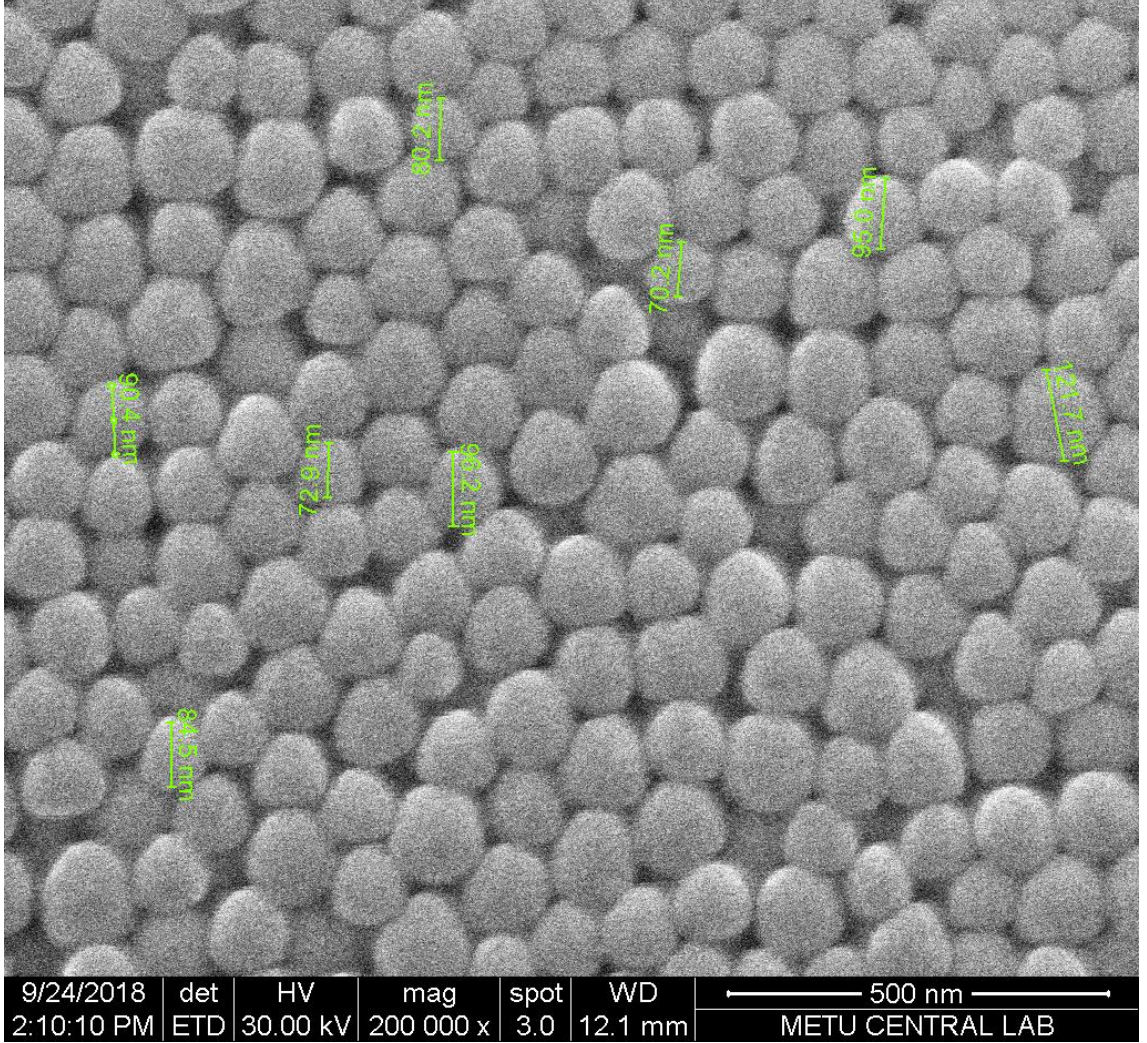


Şekil 4.6. Doksorubisin Yüklü kitosan kaplı büyük HMSPlerin A partikül büyüklüğü ve B zeta potansiyeli

HMSP örneği kitosanla kaplandıktan sonra partikül büyüklüğü artmış, zeta potansiyeli -30'dan +30'a değişmiştir. Kitosan pozitif yüklü bir malzeme olduğundan bu sonuç beklendiği gibidir ve kitosanın yüzeye tutunduğunu göstermektedir.

4.2.2 Nanopartiküllerin Morfolojisinin İncelenmesi

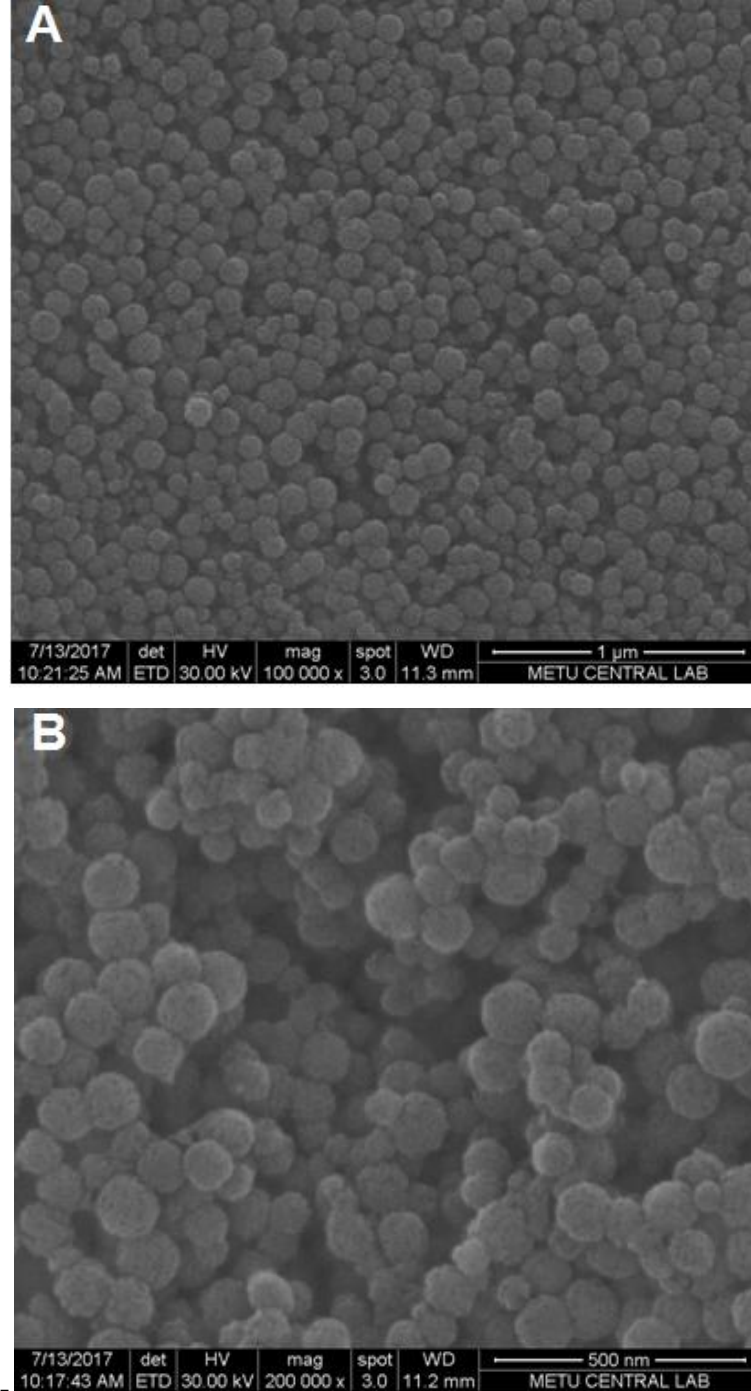
Elde edilen silika şablonların sem görüntüsü Şekil 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.7 Şablon silikanın SEM görüntüsü

Şekil 4.7’de verilen SEM görüntüsünden elde edilen partikül büyüklükleri ile DLS sonuçları karşılaştırılmıştır. SEM görüntülerinden elde edilen sonuca göre ortalama partikül büyüklüğü 80 nm civarındadır ve bu sonuç DLS sonucuna göre daha küçük olmakla birlikte DLS ile hidrodinamik çap ölçüldüğü ve silika yüzeyinde OH grupları bulunduğu için beklenen bir durumdur. Çünkü silika yüzeyindeki OH grupları yüzeyin hidrofilik olmasına neden olur ve bu da partikülün etrafına bir su filmi sarılması anlamına gelmektedir. DLS ile ölçüm alınırken bu su filmi, ölçümü yanıltıp cihaz tarafından partikülün olduğundan biraz daha büyük ölçülmesine neden olmaktadır.

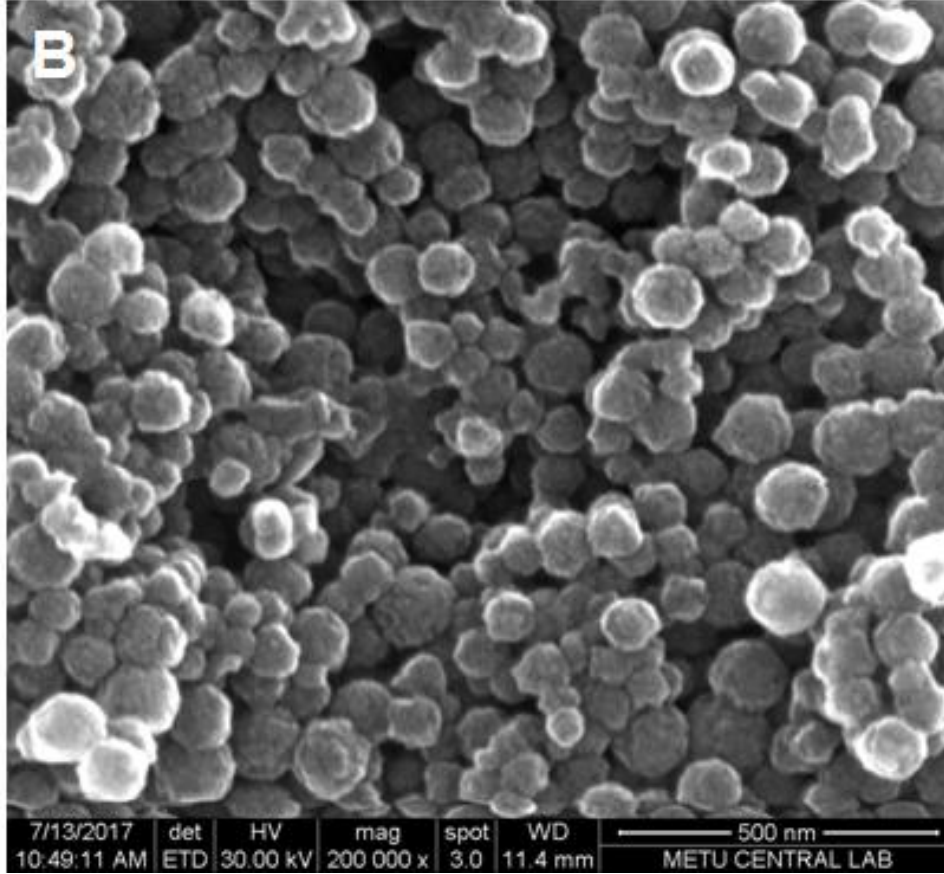
Elde edilen içi boş silika nanopartiküllerin yüzey morfolojileri SEM ve TEM ile incelenmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.8. A) HMSPLerin SEM görüntüleri ve B) büyütülmüş görüntü

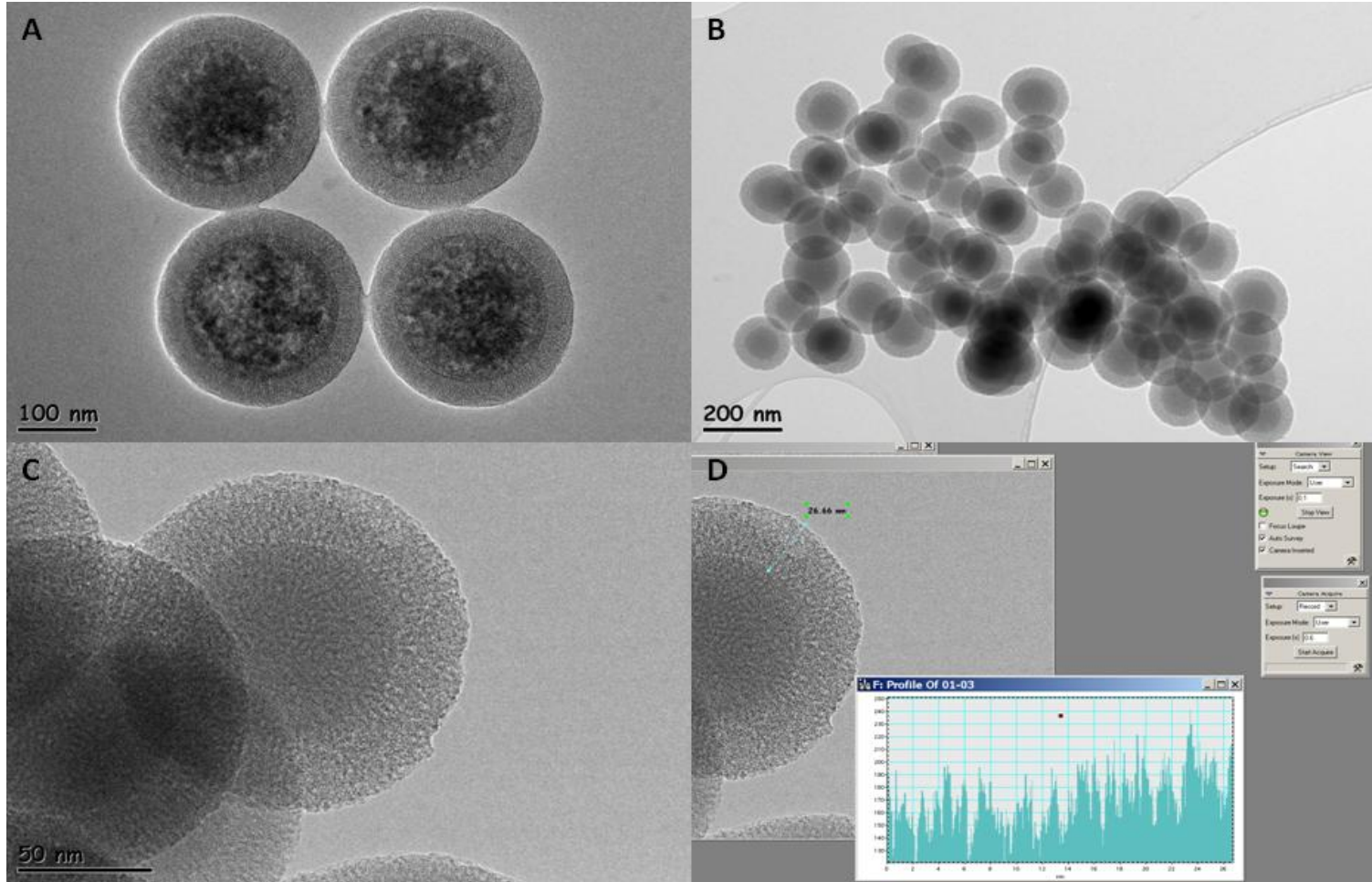
Şekil 4.8’deki SEM görüntülerinden partiküllerin monodisperse bir şekilde dağıldığı, şekillerinin küresel olduğu görülmektedir.

Partiküllerin hücrelerle etkileşimini iyileştirmek amacıyla, yüklü partiküller kitosan ile kaplanmıştır. Kitosan kaplamasının, partikül morfolojisini değiştirip değiştirmediğinin anlaşılması için SEM görüntüsü alınmıştır. Kitosan kaplı nanopartiküllerin SEM görüntüleri Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9. Kitosan kaplı HMSP SEM görüntüsü

Bu görüntüler sonucunda partiküllerin başarılı bir şekilde elde edildiği anlaşılmıştır; ancak içi boş partiküllerin elde edilip edilmediğinin anlaşılması için TEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 4.10).

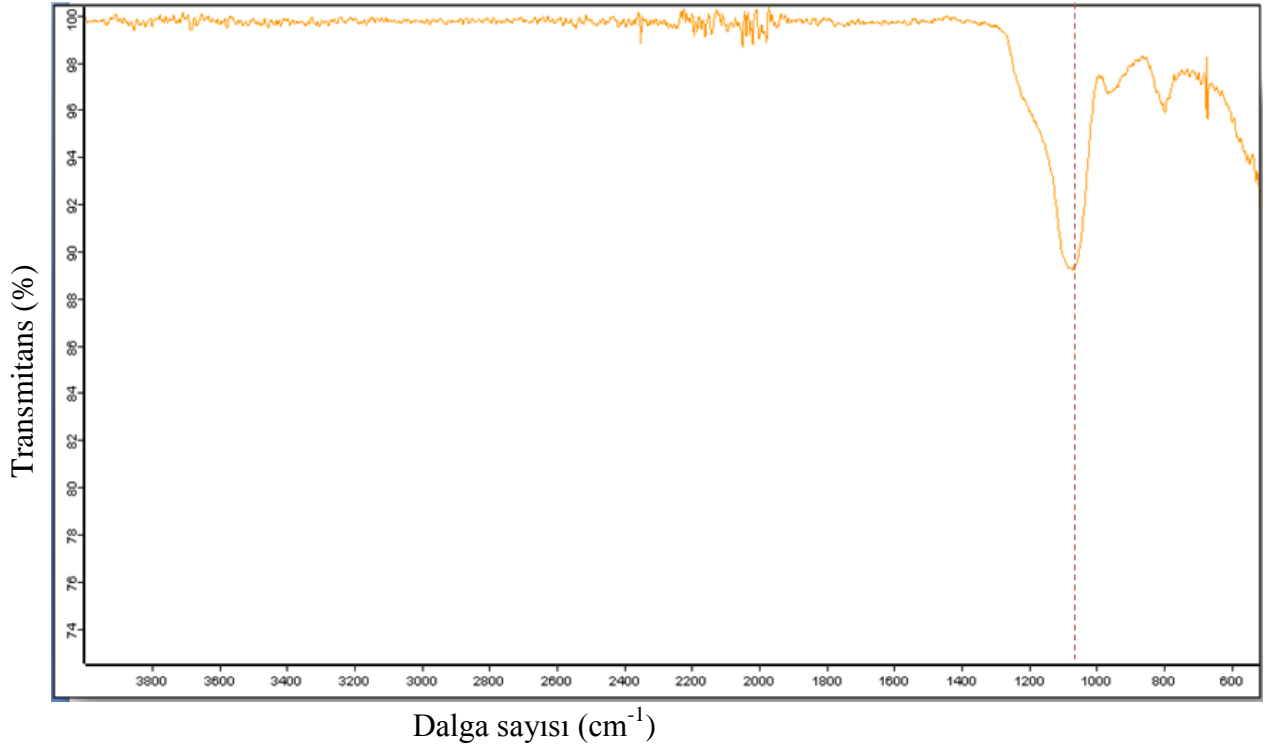


Şekil 4.10 TEM Görüntüleri: A) 50mg şablon kullanılarak elde edilen HMSN; B, C ve D 60 mg şablon kullanılarak elde edilen HMSNlerin farklı ölçeklerdeki görüntüleri

HMSPLer elde edilirken öncelikle literatür bilgisi olan 50 mg şablon kullanılarak deneme yapılmıştır. Bu deneme sonucunda Şekil 4.10'da A ile gösterilen içleri biraz boşaltılabilmiş HMSPLer elde edildiği gözlenmiştir. Bunun üzerine yeni denemeler yapılmış ve 60 mg şablon kullanılarak ve kimyasal aşındırma işleminde kullanılan ajanın miktarı literatüre göre çok az arttırılarak içi tamamen boşaltılmış HMSPLerin elde edilebildiği Şekil 4.10 B, C ve D'de görülebilmektedir. Buradan, elde edilen partiküllerin yaklaşık 150 nm olduğu, kabuk kalınlığının ise yaklaşık 25 nm olduğu gözlenmektedir. Şekil 4.10'da B şeklinden de anlaşıldığı gibi numune genelinin tek tip ve benzer partikül büyüklüğüne sahip olduğu görülmektedir. Şekil 4.10'da C şeklinde partiküllerin daha yakından gösterimi yer almaktadır, D şeklinde ise hem kabuk kalınlığı verilmiştir hem de grafikten ortalama partikül büyüklüğü anlaşılmaktadır. Grafikten en büyük nanopartikülün 240 nm'den küçük olduğu, ortalama partikül büyüklüğünün 150nm civarında olduğu anlaşılmaktadır. Burada da DLS ölçümleri sonucunda elde edilen partikül büyüklüklerinin daha büyük olmasının nedeni DLS ile ölçülen çapın hidrodinamik çap olmasıdır. Bu nedenle DLS sonuçlarına göre SEM ve/veya TEM ile elde edilen partikül büyüklüklerinin daha küçük olması beklenen bir durumdur. [111]

4.2.3 FTIR analizi

İçi boş silika nanopartiküllerin mezogözenekli kabuğunun sentezlenmesi için kullanılan bir yüzey aktif madde olan CTAB, gözenek içinde kaldığında yüzey alanını azaltır ve sitotoksiktir. Bu nedenlerle, CTAB asidik etanol ekstraksiyonuyla ortamdan uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. CTAB'in ortamdan uzaklaşıp uzaklaşmadığının anlaşılması amacıyla, elde edilen malzemenin FTIR çıktısı alınmıştır. Elde edilen en küçük partikül boyutundaki içi boş mezogözenekli silikaya ait FTIR çıktısı Şekil 4.11'de verilmiştir.



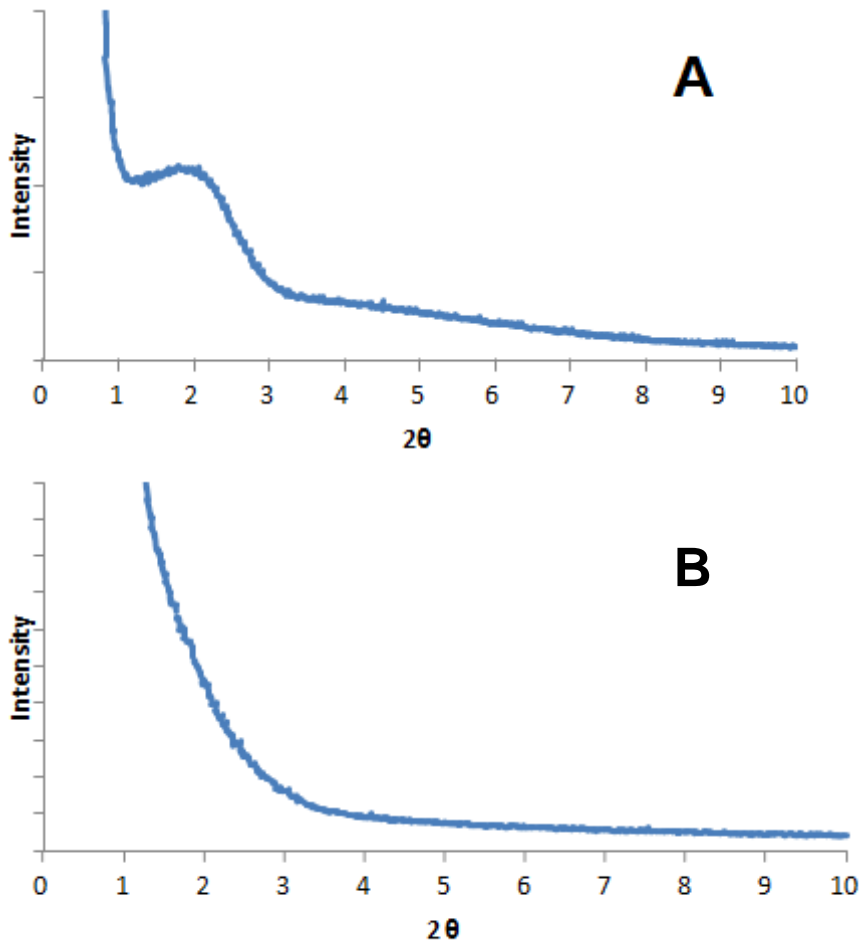
Şekil 4.11. HMSP'nin FTIR çıktısı

Ortamdaki CTAB, asidik etanol içinde uzaklaştırıldıktan sonra, elde edilen partiküllerin yüzey fonksiyonelliğinin anlaşılması, malzeme içinde CTAB kalıp kalmadığının saptanması amacıyla FTIR analizi yapılmıştır. Şekil 4.11'de görülen içi boş mezogözenekli silikaya ait FTIR çıktısında, beklendiği gibi 1080 cm^{-1} dolayında, Si-O-Si gerilme titreşiminden kaynaklanan absorpsiyon piki görülmektedir. Mezogözenekli silikada, $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenen iki pikin CTAB'den gelen $-\text{CH}_2$ grubuna ait C-H titreşimi olduğu literatürden bilinmektedir. Bu bölgede pik gözlenememesi, partiküller üzerinde CTAB kalmadığını göstermektedir. Bu da asidik etanol içinde CTAB'in uzaklaştırıldığını doğrulamaktadır. Bu sonuçlar literatür ile uyumludur [112-114].

Yüzeyde CTAB kalmadığı belirlendikten sonra, elde edilen ürünün kristal yapısının belirlenmesi, gözeneklerin düzenli yapıda olup olmadığının anlaşılması amacıyla XRD çekilmiştir.

4.2.4 X-Işını kırınım desenleri (XRD)

İçi boş mezogözenekli silika nanopartiküllerinin kristal özelliğinin anlaşılması, mezoyapının gözlenmesi ve kitosan kaplamasının başarılıp başarılmadığının kontrolü amacıyla elde edilen malzemelerin küçük açılı x-ışını difraksiyonu (SAXRD) alınmıştır. SAXRD çıktıları Şekil 4.12’de gösterilmiştir.

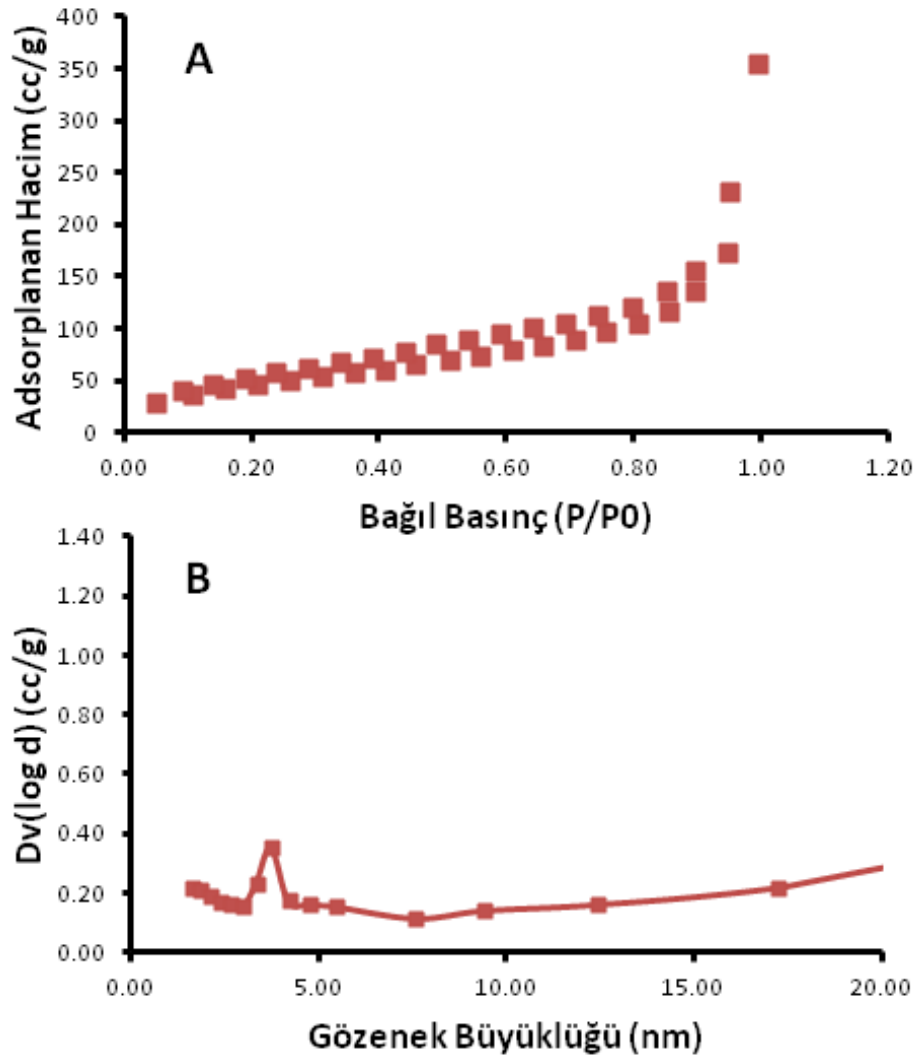


Şekil 4.12. XRD desenleri A) HMSP, B) Kitosan kaplı HMSP

Şekil 4.12’de A’da görülen zayıf ve geniş pikler, gözenekli mezoyapılar için tipik olarak kabul görmektedir [66, 74, 115]. Şekil 4.12 B’de bu pikin hiç görülmemesi ise kitosan kaplamasının yüzeyi kaplamasının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu da kitosanın yüzeye tutunduğunun bir kanıtı olarak görülebilir.

4.2.5 YüzeY Karakterizasyonu

Ortalama gözenek büyüklüğü ve yüzeY alanının hesaplanması amacıyla yüzeY karakterizasyonu yapılmıştır. Bu yöntemle hem yüzeY alanı hem gözenek hacmi hesaplanabilmektedir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.13 ve Tablo 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.13. A) N₂ adsorpsiyon-desorpsiyon izotermi ve B) gözenek boyut dağılımları

Partiküllerin dar bir gözenek boyut dağılımına ve küçük gözeneklere sahip olduğu anlaşılmaktadır. Elde edilen yüzeY alanları beklenildiği gibidir ve literatürle uyumludur [75, 116].

Tablo 4.5. Partiküllerin yüzey özellikleri

Örnek	Yüzey Alanı (m ²)	Gözenek Hacmi (cc/g)	Gözenek Büyüklüğü (nm)
HMSP	231,9	0.16	15,8

Tablo 4.5'te görüldüğü gibi elde edilen partiküllerin toplam yüzey alanı 232 m²/g'dir. Gözenek boyutu ise 15,8 nm'dir. Mezogözenekli yapıların ortalama gözenek açıklıkları 2 nm'den büyük 50 nm'den ise küçük olarak tanımlanmaktadır [117]. Bu durumda elde edilen örneklerin mezogözenekli yapılar olduğu söylenebilir. Bu veriler, analiz sonrasında ODTÜ Merkez Laboratuvarı'na sağlanmıştır.

4.2.6 *in vitro* salım deneyleri

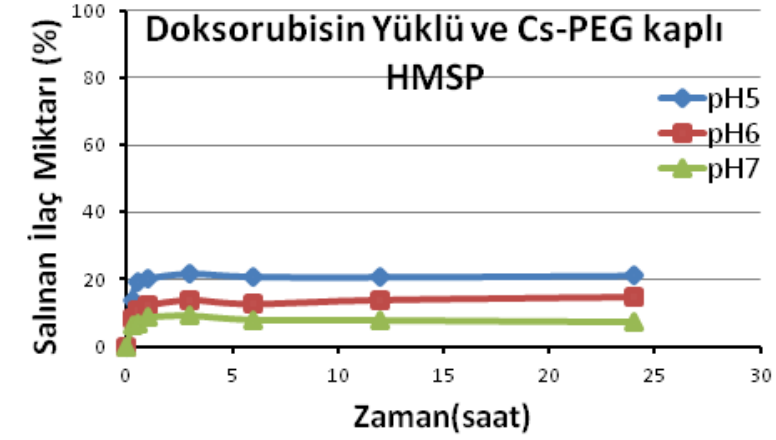
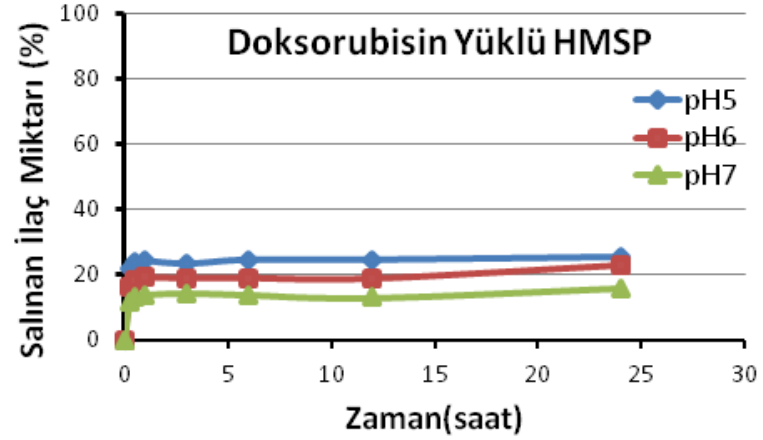
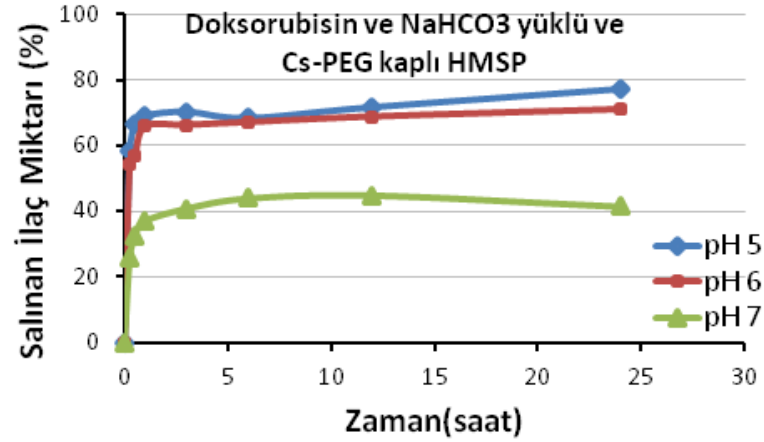
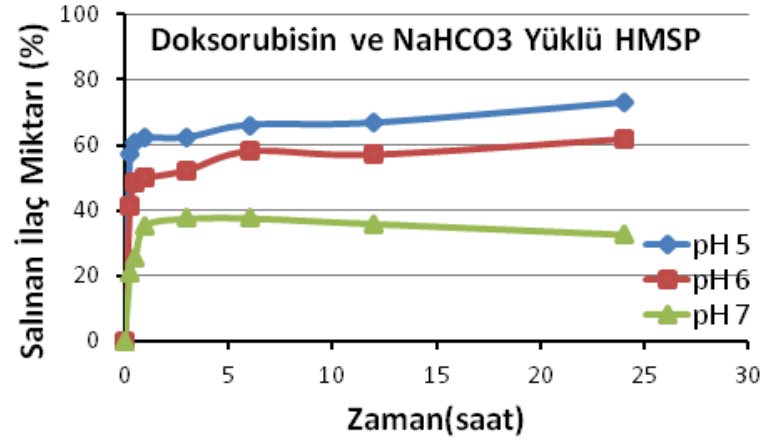
Elde edilen partiküllere Doksorubisin yüklenerek daha önce belirtilen dört formülasyon her bir partikül büyüklüğü için elde edilerek, salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Salım deneylerine başlanmadan önce her formülasyon için enkapsülasyon etkinliği hesaplanarak, aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 4.6. Enkapsülasyon Etkinlikleri

Formülasyon	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
Dokсорubisin yüklü HMSP	93,7
Dokсорubisin ve NaHCO ₃ yüklü HMSP	93,4
Dokсорubisin yüklü Kitosan kaplı HMSP	93,2
Dokсорubisin ve NaHCO ₃ yüklü Kitosan kaplı HMSP	96,6

Tablo 4.6'dan enkapsülasyon etkinliklerinin %90'ın üzerinde olduğu görülmektedir. Bu da oldukça yüksek oranda ilaç yüklenebildiğini göstermektedir. Bu enkapsülasyon etkinlikleri göz önüne alınarak her bir formülasyona yüklenen dokсорubisin miktarları hesaplanmış ve salım sonuçları bu bilgi üzerinden değerlendirilmiştir.

Salım alışması, ilaç salımının azalan pH ile artıp artmadığının anlaşılması, yani pH duyarlı bir sistem elde edilip edilmediğinin kontrolünün sağlanması için u farklı pH'da gerçekleştirilmiştir. Miktar tayini sonrasında elde edilen verilen şekil 4.14'te gösterildiği gibidir.



Şekil 4.14. Hazırlanan formülasyonlar için zamana karşı ilaç salımı

İlaç salım çalışması sonucunda partiküllerin içindeki etkin maddenin tamamının 24 saat sonunda salınmadığı gözlenmiştir. Salım sonuçları daha düşük pH'larda ilaç salımının arttığını, bunun yanı sıra ortamdaki NaHCO₃ varlığının salımı arttırdığını göstermektedir.

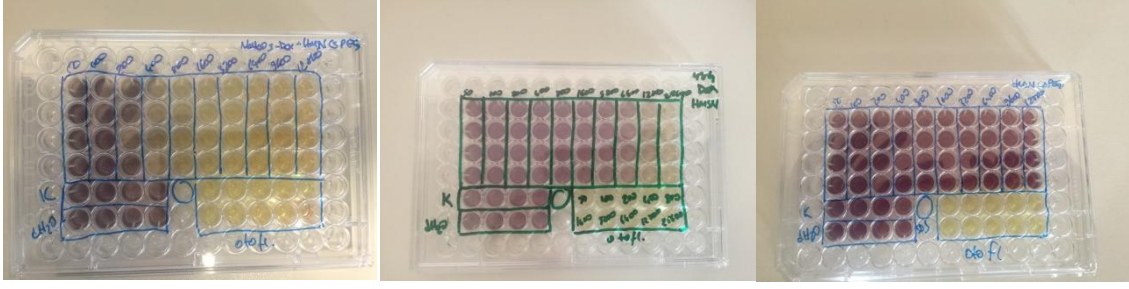
Bu durum, silika yüzeyi ile etkin madde arasındaki ilişki daha yakından incelenerek açıklanabilir. Silika yüzeyinde bulunan SiOH⁻ grupları ile doksorubisin suda çözüldüğünde oluşan H⁺ grubu arasında zayıf hidrojen bağı oluşarak, doksorubisinin yüzeye tutunmasının pH duyarlı bir sistem oluşturması şeklindeki başlangıç hipotezinden yola çıkılarak, ortam pH'sı azaldığında yani ortamdaki H⁺ iyonları arttığında, yüzey ile doksorubisin arasındaki hidrojen bağının kırılması ile düşük pHlardaki daha yüksek salım sonuçları açıklanabilir.

Benzer şekilde, ortamdaki NaHCO₃ varlığının salımı arttırması da açıklanabilir. Silika yüzeyindeki OH⁻ grupları, ortamdaki Na⁺ iyonlarını doksorubisinden gelen H⁺ iyonlarına sterik engel nedeniyle tercih edecektir. Bu durum, doksorubisinin salımını arttıracaktır. [118]

4.2.7 *in vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

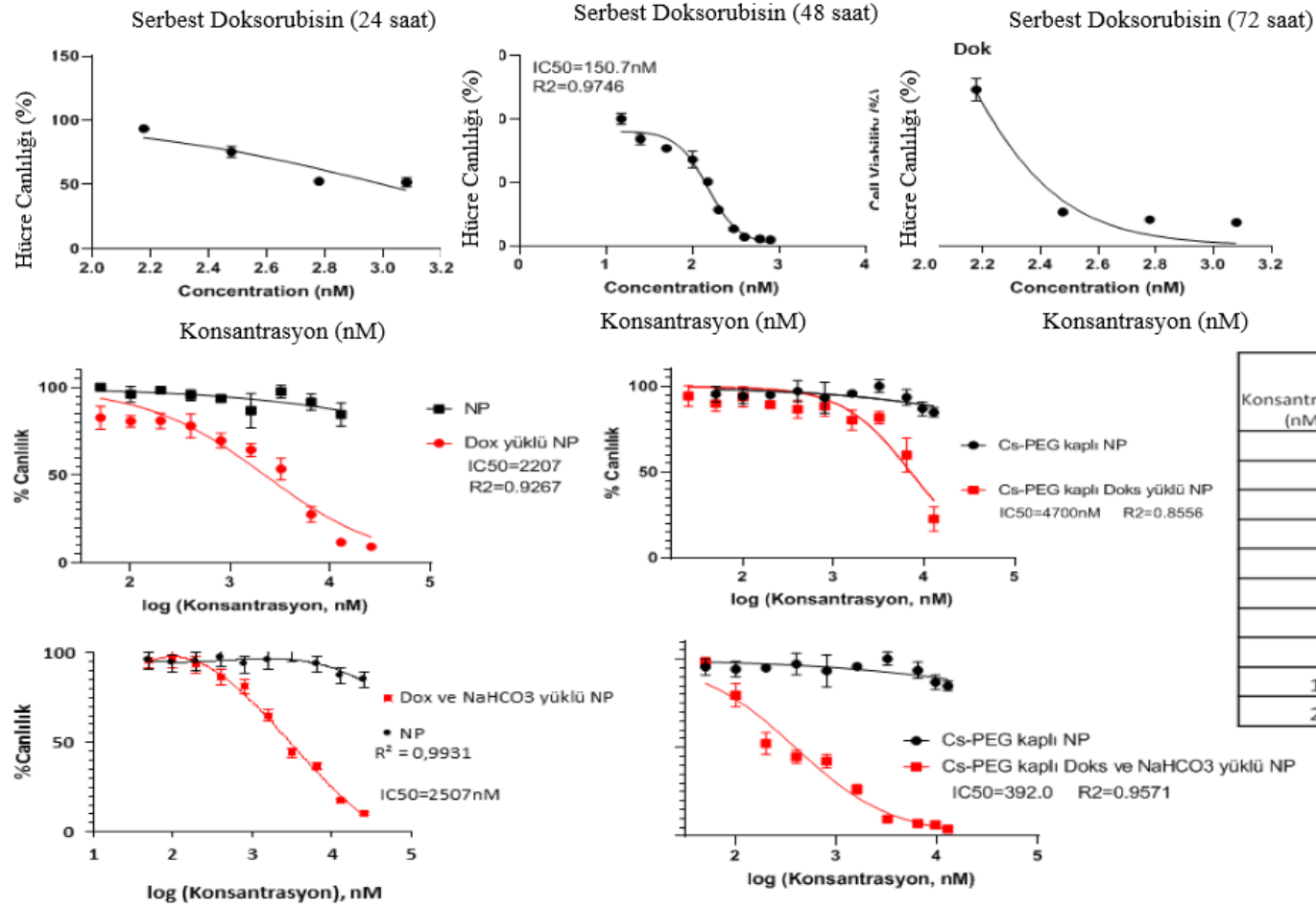
Elde edilen formülasyonların *in vitro* sitotoksitesinin belirlenmesi ve daha sonra yapılması düşünülen *in vivo* çalışmalar için bir temel oluşturabilmesi amacıyla, bir lösemi hücre hattı olan HI-60 hücre hattı üzerinde *in vitro* çalışmalar gerçekleştirilerek IC50 konsantrasyonları belirlenmiştir.

MTT sonucunda elde edilen bazı örnek plaka görüntüleri Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15 MTT uygulaması sonrası bazı örnek plakalar

Plakalar cihazda okutularak absorbansları belirlenmiş daha sonra yapılan hesaplar sonucunda IC50 konsantrasyonları belirlenmiştir. Belirlenen IC50 değerleri Tablo 4.7’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda çizilen grafikler Şekil 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.16 Hazırlanan formülasyonların HL-60 hücre hattında in vitro çalışmaları sonucunda elde edilen IC₅₀ grafikleri

Şekil 4.16’da gösterilen serbest doksorubisin sonuçları sırasıyla 24., 48. Ve 72. Saatler sonunda elde edilmiştir. Bu grafiklerden yalnızca 48. Saat sonunda elde edilende, S şeklinde bir eğri gözlenmektedir ve bu durum 48. Saatin çalışma için uygun olduğunu göstermektedir. Diğer dört grafik ise, etkin madde ve/veya NaHCO_3 yüklü formülasyonlara ve bu formülasyonların etkin madde yüklenmemiş versiyonlarının konsantrasyona % canlılığını göstermektedir. Şekil 4.16’da görüldüğü gibi hazırlanan formülasyonlar içinde en etkili olanı kitosan-PEG kaplanmış, doksorubisin ve NaHCO_3 yüklenmiş olanıdır. Yine Şekil 4.16’da içine etkin madde yüklenmemiş partiküllerin canlılık üzerinde belirgin bir etkisi bulunmadığı görülmektedir. Denenen en yüksek konsantrasyonda dahi canlılığın %90’ın altına düşmediği belirlenmiştir. Bu nedenle, tek başına partiküllerin herhangi bir sitotoksitesinin bulunmadığı sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.7 MTT deneyi sonucunda elde edilen IC50 konsantrasyonları

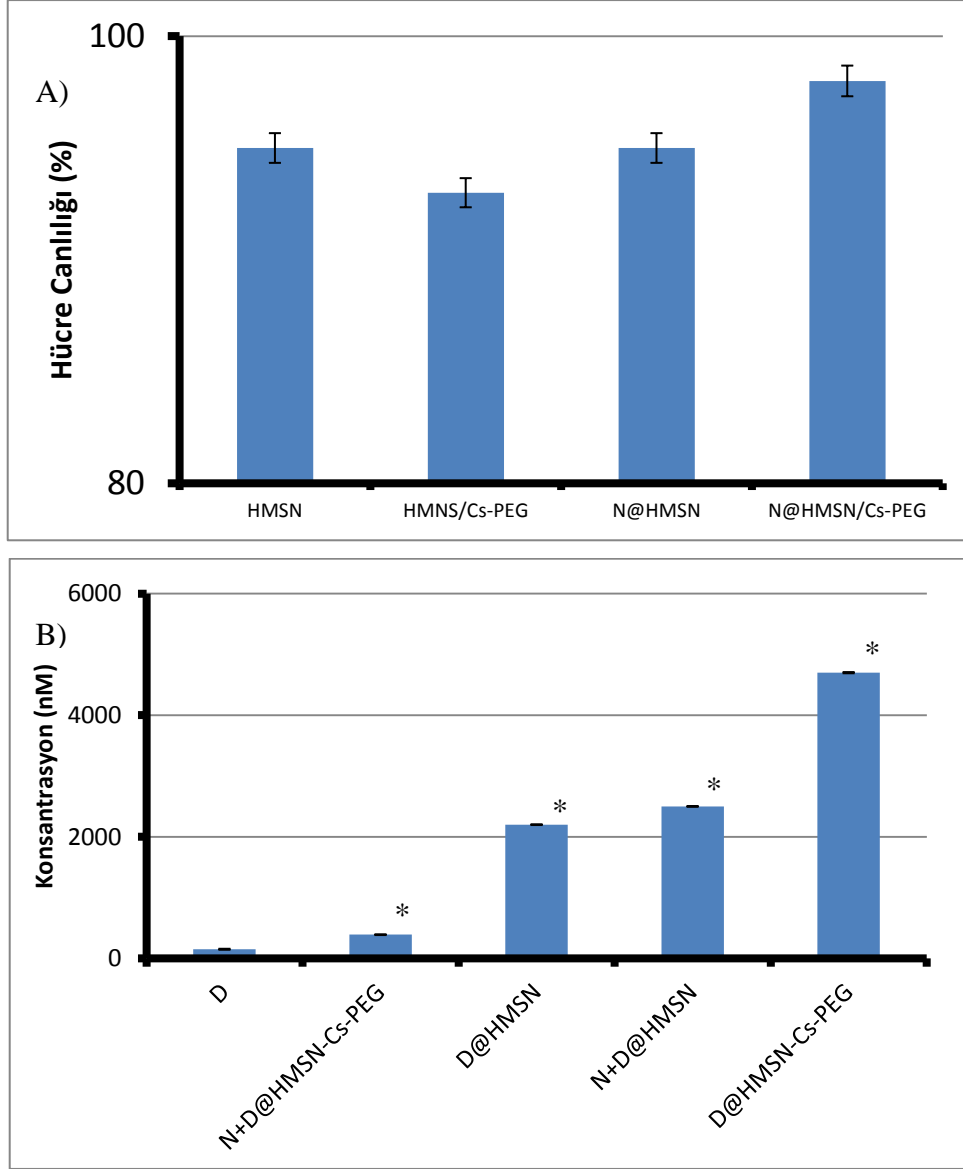
Formülasyon	IC50 Konsantrasyonu (nM)
Doksorubisin Çözeltisi (D)	150
Doksorubisin yüklü silika nanopartikül (D@HMSP)	2200
NaHCO_3 ve Doksorubisin yüklü silika nanopartikül (N+D@HMSP)	2500
Doksorubisin yüklü Kitosan-PEG kaplı silika nanopartikül (D@HMSP-Cs-PEG)	4700
NaHCO_3 ve Doksorubisin yüklü Kitosan-PEG kaplı silika nanopartikül (N+D@HMSP-Cs-PEG)	390

Etkin madde yüklü partiküllerin IC50’si belirlendikten sonra, boş partiküllerin sitotoksitesileri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.7’de verilmiştir. Burada amaç, boş partiküllerin IC50 değerinde canlılık üzerinde bir etkisinin olmadığını gösterilmesidir. Doksorubisin çözeltisi en fazla sitotoksite gösteren grup olarak belirlenmiştir. Bu beklenen durum toksik doksorubisinin doğrudan hücre içerisine girerek etkinlik göstermesi ile ilişkilidir. Fakat doksorubisinin kandan hızla elimine olması sebebiyle in vivo deneylerde anlamlılığını yitirmesine sebep olmaktadır. Literatür bilgileri de bu sonucu desteklemektedir [119]. Bundan sonraki en etkili formülasyonun NaHCO_3 ve doksorubisin yüklü, Kitosan-PEG ile kaplanmış asıl formülasyon olduğu anlaşılmaktadır. Bu formülasyon aynı zamanda en yüksek salım yapan formülasyon olduğundan, daha yüksek sitotoksite göstermesi beklenen bir durum olarak açıklanabilir.

Doksorubisin yüklü Kitosan-PEG ile kaplanmış silika partiküllerin görece daha az etkili olduğu Tablo 4.7’de görülmektedir. Bu durum, yine daha düşük miktarda salım yapan bir formülasyon olmasıyla ilişkilendirilebileceği gibi, ortamdaki NaHCO_3 olmaması nedeniyle NPlerin endozomdan kaçamaması sonucu da gelişmiş olabilir. Tablo 4.7’den anlaşıldığı üzere NaHCO_3 içermeyen formülasyonların etkinlikleri daha düşüktür. Bu durumun olası sebebi endozomdan kaçışın gerçekleşmemesi veya in vitro ortamda daha az salım yapan formülasyonlar olmaları olabilir. Cs-PEG kaplamasının NaHCO_3 ile geliştirilen formülasyonun etkinliğini arttırmış olduğu görülmektedir. Bunun sebebi, kitosanın pozitif yüzey yükü nedeniyle hücre zarıyla daha iyi etkileşerek hücre içine alımı arttırması olabilir. Ancak, Cs-PEG kaplı ve sadece doksorubisin yüklenmiş HMSPde, Cs-PEG kaplamasının benzer etkiyi göstermediği gözlenmektedir. Bu durum, kitosanın endozomdan kaçışının çok yavaş olması [120] nedeniyle etkin maddenin hücre çekirdeğine ulaşamaması nedeniyle oluşmuş olabilir.

Sonuç olarak NaHCO_3 ve Doksorubisin yüklü Kitosan-PEG kaplı silika nanopartikül (N+D@HMSP-Cs-PEG) formülasyonunun in vitro ortamda daha etkili olması, in vitro ortamdaki ani ve fazla salımdan kaynaklanma olasılığını işaret etmektedir. Bu nedenle bu formülasyonun in vivo ortamda salım/ kanda kalış profilinin değerlendirilmesine karar verilmiştir. Elde edilen bulgular, tasarlanan sistemin kontrollü salım sağladığı yönündedir.

Elde edilen sonuçların grafik özeti Şekil 4.17’de sunulmuştur. Şekildeki hata çubukları standart sapmaları ifade etmektedir.

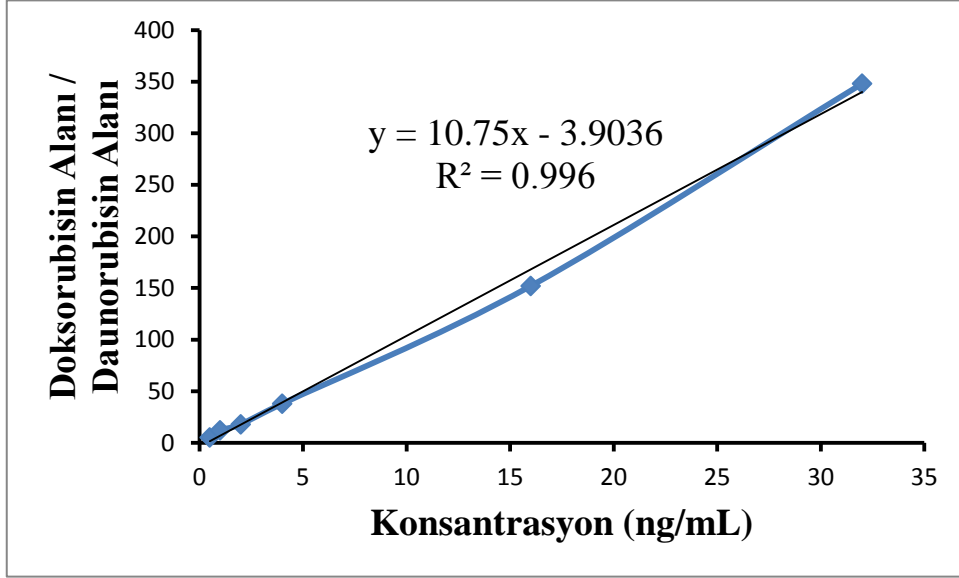


Şekil 4.17 A) Boş partiküllerin sitotoksitesinin grafik gösterimi (*: $p < 0.05$) ve B) etkin madde yüklenmiş partiküllerin IC50 değerleri

Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen yukarıdaki verilere göre, boş nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı, kitosan-PEG ile kaplanmış formülasyona etkin maddenin yanı sıra sodyum bikarbonat da eklendiği takdirde, nanopartiküllerin canlılık üzerine anlamlı bir etkisinin olduğu anlaşılmaktadır.

4.2.8 *in vivo* Çalışmalar

Elde edilen partiküllerin kanda kalış süresinin belirlenmesi için *in vivo* çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen verilerin değerlendirilebilmesi için öncelikle kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve elde edilen eğri Şekil 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. *in vivo* Çalışmalar ile Elde Edilen Kalibrasyon Eğrisi

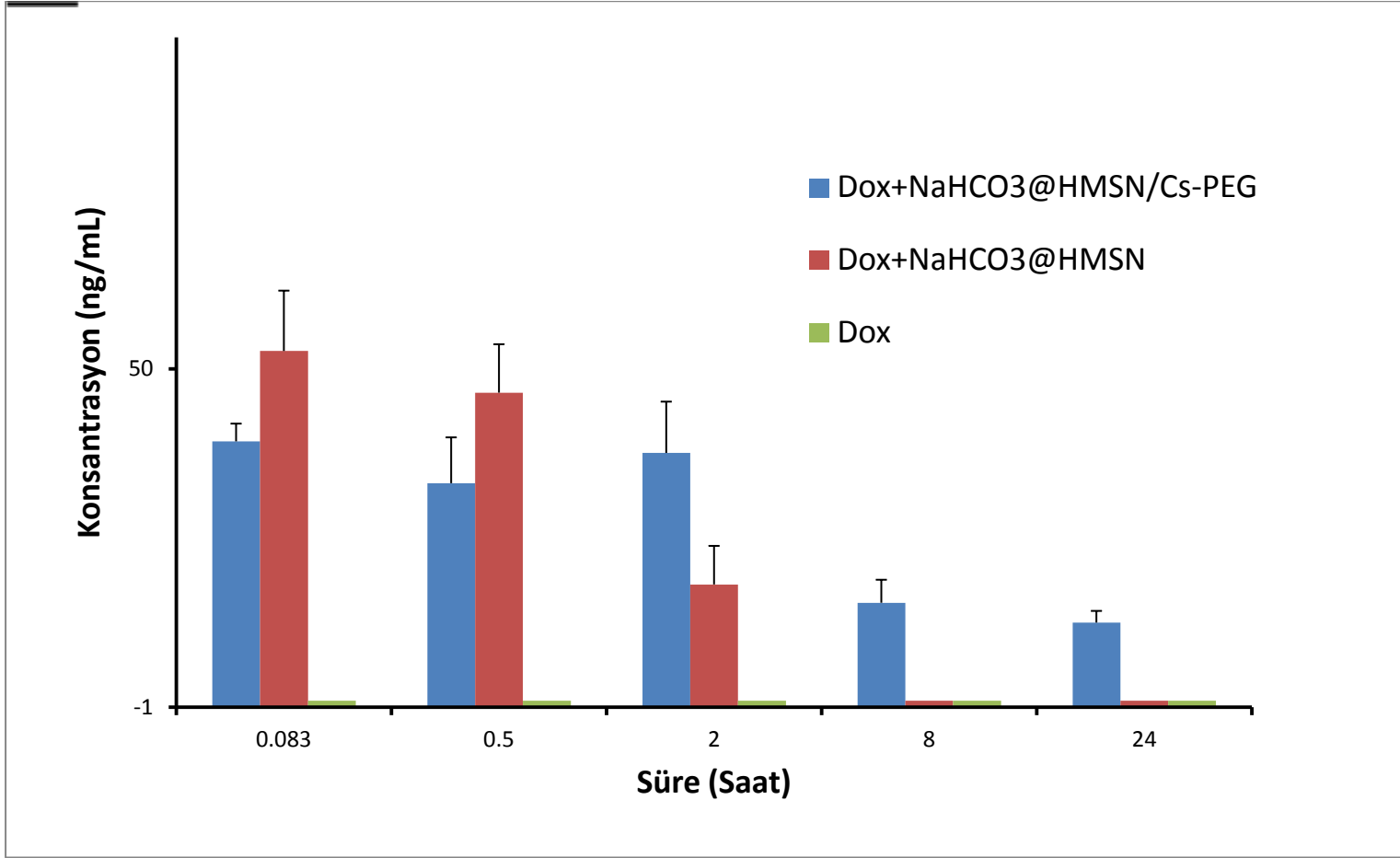
Şekil 4.18’de görüldüğü gibi R^2 değeri 0.996 olarak hesaplanmış ve 5-320 ng/mL aralığında bilinmeyen kan konsantrasyonlarının hesaplanmasında bu eğri kullanılmıştır. Daha önce analitik yöntem validasyonu için gerçekleştirilen gün içi ve günler arası çalışmalar burada da gerçekleştirilmiş ve sonuç olarak varyasyon katsayısı ve standart sapmaların 1.5’tan küçük olduğu, geri kazanımın ise %98-102 aralığı içinde kaldığı hesaplanmıştır.

Sıçanlara enjeksiyonlar yapıldıktan sonra alınan kanlar plazması ayrıldıktan sonra Bölüm 4.3 Plazmadan Doksorubisinin Miktar Tayini için Kullanılan Analitik Yöntem’de verilen basamaklar uygulanarak, örnekler HPLC’ye verilmiştir. Bunun sonucunda, kitosan-PEG kaplı formülasyonun kanda kalış süresinin diğer formülasyondan daha uzun olduğu anlaşılmıştır. Serbest doksorubisinin ise beklendiği

üzere kandan elimine olduğu gözlenmiştir. Ancak hazırlanan formülasyonların kanda daha uzun süre kaldıkları belirlenmiştir. Kitosan kaplaması yapılmayan formülasyon 8. saatten sonra kandan tespit edilemezken, kitosan kaplı formülasyonda bu süre daha da uzamış ve 24. saatte de kandan miktar tayini yapılabilmektedir.

Her üç formülasyon için (serbest dokсорubisin, NaHCO₃ ve dokсорubisin yüklü NPler ve NaHCO₃ ve dokсорubisin yüklendikten sonra kitosan-PEG ile kaplanmış NPler) elde edilen grafikler Şekil 4.19'da verilmiştir. Grafikte belirtilen hata çubukları, 6 sıçandan elde edilen verilerin standart sapmasını ifade etmektedir, * istatistiksel olarak anlamlı birk fark görülmediğini, ** ise aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade etmektedir.

Grafikten anlaşıldığı üzere, kitosan-PEG ile kaplı formülasyonun kanda kalış süresi diğerlerine göre daha uzundur. Bu durum, kitosan-PEG kaplamasının opsonizasyonu engellemesi sonucunda kanda kalış süresinin arttırması sonucunda gelişmiş olabilir. Serbest dokсорubisinin kandan hızlıca elimine olduğu literatürden bilinmektedir



Şekil 4.19 Hazırlanan formülasyonlar sıçanlara verildikten sonra, toplanan kanlardaki doksorubisin konsantrasyonları

5 YORUM

Bu tez kapsamında kanser tedavisinde yer alması amacıyla yan etkileri azaltılmış bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda EPR etkisinden faydalanılmak için nanopartiküler taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Bu sistemin pH duyarlı olması sağlanarak kanser hücrelerinin daha asidik olması özelliğinden faydalanılmak istenmiştir. Aynı zamanda hücre içine alınan nanopartiküllerin etki göstermeden hücreden atılmasının da önüne geçmek amacıyla endozomdan kaçış sağlamak için NaHCO_3 yüklemesi yapılarak, asidik ortamda karbondioksit çıkışıyla endozom kesesinden kaçıp etkin maddeyi sitoplazmaya taşıyabilen bir sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu hedeflere ulaşmak için nano-taşıyıcı sistem olarak içi boşaltılmış (hollow) mezogözenekli silika seçilmiştir. Bu çalışma kapsamında öncelikle boşaltılmış (hollow) mezogözenekli silika sentezi ve partikül büyüklüğü ve polidispersite optimizasyonu yapılmıştır.

Elde edilen sonuçlar, nanopartikülleri oluşturmak için kullanılan şablonun (template) büyüklüğü kontrol edilerek, elde edilen son nanopartiküllerin büyüklüğünün de kontrol edilebileceğini göstermiştir. DLS, SEM ve TEM ile yapılan analizler sonucunda ortalama partikül büyüklüğünün 150nm civarında olduğu, içi boş yapının oluşturulduğu ve dış kabuğun gözenekli olduğu anlaşılmıştır. FTIR ile sentez sırasında kullanılan yüzey aktif maddenin uzaklaştırıldığı, XRD ile malzemenin beklenen kristal özelliği gösterdiği, BET ile yüksek yüzey alanlı bir malzeme olduğu gösterilmiştir.

Bu aşamadan sonra elde edilen partiküller, elektrostatik etkileşimden faydalanılarak Kitosan-PEG ile kaplanmıştır. Zeta potansiyeli sonucu, silika yüzeyinin negatif yüklü olduğunu göstermektedir. Silika yüzeyinde bulunan OH^- grupları nedeniyle bu beklenen bir durumdur [121]. Kitosan-PEG kaplamasından sonra ise yüzey yükünün pozitif dönüşüğü gözlenmiştir. Kitosan-PEG pozitif yüklü olduğu için beklenen bu durum, kitosanın silika yüzeyine kaplandığını işaret etmektedir [122, 123].

Tasarlanan sisteme etkin madde ve/veya NaHCO_3 yüklendiği ve miktar tayinleri HPLC ile gösterilmiştir. Etkin madde yüklemesinin NaHCO_3 varlığında veya yokluğunda,

kitosan-PEG varlığında ve yokluğunda %90 civarında olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra gerçekleştirilen salım çalışması ile pH duyarlı salım sağlayan bir sistem elde edilip edilmediğinin anlaşılması için üç farklı pH'taki ortamda salım çalışması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, her formülasyonun en çok salımı pH 5,'te yaptığı ve pH7' de hep daha az salım yaptığını göstermektedir. Yani ortam pH'sı azaldıkça, Nanopartiküllerden yapılan salım artmaktadır. Ortam pH'sının azalması, aynı zamanda ortamda bulunan serbest H⁺ iyonlarının artması anlamına gelmektedir; artan H⁺ iyonları, yüzeydeki silanol gruplarıyla etkileşerek doksorubisinin yüzeyden ayrılmasına neden olmuş ve bu nedenle salımı arttırmış olabilir [124]. Bu da pH duyarlı bir sistemin elde edilebildiğini düşündürmektedir. Ayrıca, formülasyonların NaHCO₃ varlığında daha çok salım yaptığı belirlenmiştir. Yüzeydeki OH⁻ grupları ile doksorubisinin H⁺ ucu arasında bir etkileşim olmakla birlikte doksorubisinin sterik engel oluşturacağı, bu nedenle yüzeyin doksorubisini bırakıp serbest Na⁺ iyonlarını bağlaması ile bu durumun açıklanabileceği düşünülmektedir.

Lösemi hücre hattı olan HL-60 hücreleri ile yapılan in vitro çalışmalar sonucunda nanopartiküler taşıyıcı sistemin tek başına herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. Böylece ilaç taşıyıcı sistemden kaynaklanan bir etkinlik olmadığı, sitotoksik etkinin etkin maddeden kaynaklandığı gösterilmek istenmiştir. Etkin madde yüklü formülasyonlar içinde en yüksek sitotoksik etkiyi Kitosan-PEG kaplı, doksorubisin ve NaHCO₃ yüklenmiş NPLerin sağladığı anlaşılmıştır. NPLerin hızla salım yapması sonucunda daha çok etkin maddenin salınması bu duruma neden olabileceği gibi endozomdan kaçışın sağlanmasının da benzer bir sonucun ortaya çıkmasını sağlayabileceği düşünülmektedir [97]. Durumun daha iyi değerlendirilmesi açısından in vivo ortamda yapılacak değerlendirmelerle salım/kanda kalış profilinin incelenmesi yoluna gidilmiştir.

In vivo çalışmalar sonrasında yapılan miktar tayini sonucunda, kitosan-PEG kaplaması yapılan formülasyon verilen sıçanların kanından 24. saatin sonunda doksorubisin tayin edilebilirken, Kitosan-PEG kaplaması yapılmayan NPLer verilen sıçanların kanından 8. saatten sonra doksorubisin izole edilememiştir. Bu sonuçlar, kitosan-PEG kaplaması

yapılmayan NPLerin kandan daha erken elimine olduğunu ve kitosan-PEG kaplamasının kanda kalış süresini arttırdığını göstermektedir.

Bu tez kapsamındaki çalışmalar, AML için ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi amacıyla yürütülmüştür. AML temel olarak akyuvar hücrelerinin, kemik iliğinde başlayarak, kontrolsüz üretilmesi sonucu gelişmektedir [8]. Kansere hızlıca karaciğer, dalak ve lenf düğümlerine yayılabilir. Miyeloid hücreler, çok sayıda lizozom içeren granüler hücrelerdir. Bu durum göz önüne alındığında, hazırlanan ilaç taşıyıcı sistem, endozomdan kaçarak bu hücreler üzerinde daha büyük etki göstererek, kandan temizlenmelerine yardımcı olabilir. Ancak diğer kanser türleri için değerlendirildiğinde, kandaki normal nötrofilleri de etkileyeceği düşünülerek, nötropeniye neden olma ihtimali göz önüne alınmalıdır.

Elde edilen sonuçlara göre, hazırlanan sistemin hedeflendiği gibi kanser tedavisinde etkili olma potansiyeline sahip yenilikçi ve etkili bir sistem olduğu anlaşılmıştır.

6 Kaynaklar

1. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *Cancer genes and the pathways they control*. Nat Med. 10 8 (2004) p. 789-99.
2. Paez-Ribes, M., et al., *Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis*. Cancer Cell. 15 3 (2009) p. 220-31.
3. Ferrara, N., *VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors*. Nat Rev Cancer. 2 10 (2002) p. 795-803.
4. DeSantis, C.E., et al., *Cancer treatment and survivorship statistics, 2014*. CA Cancer J Clin. 64 4 (2014) p. 252-71.
5. Chidambaram, M., R. Manavalan, and K. Kathiresan, *Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations*. J Pharm Pharm Sci. 14 1 (2011) p. 67-77.
6. Talmadge, J.E., et al., *Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer*. Am J Pathol. 170 3 (2007) p. 793-804.
7. Stewart, B.W. and C. Wild, *World cancer report 2014*. Lyon, France, Geneva, Switzerland: International Agency for Research on Cancer. 2014, WHO Press.
8. Hall, J.E., *Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji. 12. bs.(Çev. Ed. Berrak Çağlayan Yeğen)*. 2013, Elsevier/Nobel Tıp Kitabevleri.
9. Robbins, S.L. and V. Kumar, *Robbins temel patoloji: (basic pathology)*. 2008: Nobel Tıp Kitabevi.
10. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood. 127 20 (2016) p. 2391-2405.
11. Cornelissen, J.J., et al., *The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach*. Nature Reviews Clinical Oncology. 9 10 (2012) p. 579-590.
12. Yoo, H.S., et al., *In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates*. J Control Release. 68 3 (2000) p. 419-31.
13. Waterhouse, D.N., et al., *A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles*. Drug Saf. 24 12 (2001) p. 903-20.
14. Gnapareddy, B., et al., *Chemical and Physical Characteristics of Doxorubicin Hydrochloride Drug-Doped Salmon DNA Thin Films*. Scientific Reports. 5 (2015) p. 12722.
15. Ibrahim, M.A., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT(1)-receptor antagonism equally improve doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity*. Pharmacol Res. 60 5 (2009) p. 373-81.
16. Jung, K. and R. Reszka, *Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines*. Adv Drug Deliv Rev. 49 1-2 (2001) p. 87-105.

17. Barenholz, Y., *Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned*. J Control Release. 160 2 (2012) p. 117-34.
18. Barenholz, Y., *Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned*. Journal of Controlled Release. 160 2 (2012) p. 117-134.
19. Krischke, M., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of doxorubicin in children with cancer: results of a "European Pediatric Oncology Off-patents Medicines Consortium" trial*. Cancer chemotherapy and pharmacology. 78 6 (2016) p. 1175-1184.
20. Kanwal, U., et al., *Advances in nano-delivery systems for doxorubicin: an updated insight*. Journal of Drug Targeting. 26 4 (2018) p. 296-310.
21. Bertrand, N., et al., *Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology*. Adv Drug Deliv Rev. 66 (2014) p. 2-25.
22. Soppimath, K.S., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. J Control Release. 70 1-2 (2001) p. 1-20.
23. Mai, W.X. and H. Meng, *Mesoporous silica nanoparticles: A multifunctional nano therapeutic system*. Integrative Biology. 5 1 (2012) p. 19-28.
24. Muro, S., *Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems*. J Control Release. 164 2 (2012) p. 125-37.
25. Petrak, K., *Essential properties of drug-targeting delivery systems*. Drug Discov Today. 10 23-24 (2005) p. 1667-73.
26. Jaracz, S., et al., *Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates*. Bioorg Med Chem. 13 17 (2005) p. 5043-54.
27. Torchilin, V.P., *Drug targeting*. Eur J Pharm Sci. 11 Suppl 2 (2000) p. S81-91.
28. Poelstra, K., J. Prakash, and L. Beljaars, *Drug targeting to the diseased liver*. J Control Release. 161 2 (2012) p. 188-97.
29. Beduneau, A., P. Saulnier, and J.P. Benoit, *Active targeting of brain tumors using nanocarriers*. Biomaterials. 28 33 (2007) p. 4947-67.
30. Byrne, J.D., T. Betancourt, and L. Brannon-Peppas, *Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev. 60 15 (2008) p. 1615-26.
31. Gupta, U. and N.K. Jain, *Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting*. Adv Drug Deliv Rev. 62 4-5 (2010) p. 478-90.
32. Acharya, S., F. Dilnawaz, and S.K. Sahoo, *Targeted epidermal growth factor receptor nanoparticle bioconjugates for breast cancer therapy*. Biomaterials. 30 29 (2009) p. 5737-50.
33. Maeda, H., *Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 88 3 (2012) p. 53-71.

34. Misra, R., S. Acharya, and S.K. Sahoo, *Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy*. Drug Discov Today. 15 19-20 (2010) p. 842-50.
35. Danhier, F., O. Feron, and V. Preat, *To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery*. J Control Release. 148 2 (2010) p. 135-46.
36. Cabral, H., et al., *Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size*. Nat Nanotechnol. 6 12 (2011) p. 815-23.
37. Albanese, A., P.S. Tang, and W.C.W. Chan, *The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems*. Annual Review of Biomedical Engineering. 14 1 (2012) p. 1-16.
38. Lammers, T., et al., *Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress*. J Control Release. 161 2 (2012) p. 175-87.
39. Brannon-Peppas, L. and J.O. Blanchette, *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. Adv Drug Deliv Rev. 56 11 (2004) p. 1649-59.
40. Stefanick, J.F., et al., *A systematic analysis of peptide linker length and liposomal polyethylene glycol coating on cellular uptake of peptide-targeted liposomes*. ACS Nano. 7 4 (2013) p. 2935-47.
41. Gu, F., et al., *Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers*. Proc Natl Acad Sci U S A. 105 7 (2008) p. 2586-91.
42. Ghitescu, L. and M. Bendayan, *Immunolabeling efficiency of protein A-gold complexes*. J Histochem Cytochem. 38 11 (1990) p. 1523-30.
43. Jiang, W., et al., *Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent*. Nat Nanotechnol. 3 3 (2008) p. 145-50.
44. Sahin, A., et al., *A small variation in average particle size of PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation leads to considerable change in nanoparticles' characteristics and efficacy of intracellular delivery*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, (2017) p. 1-11.
45. Gratton, S.E., et al., *The effect of particle design on cellular internalization pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A. 105 33 (2008) p. 11613-8.
46. Petros, R.A. and J.M. DeSimone, *Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications*. Nat Rev Drug Discov. 9 8 (2010) p. 615-27.
47. Zhao, F., et al., *Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials*. Small. 7 10 (2011) p. 1322-37.
48. Wu, J. and C.C. Chu, *Block copolymer of poly(ester amide) and polyesters: synthesis, characterization, and in vitro cellular response*. Acta Biomater. 8 12 (2012) p. 4314-23.
49. Chen, Y., et al., *Multifunctional mesoporous silica nanocarriers for stimuli-responsive target delivery of anticancer drugs*. RSC Advances. 6 94 (2016) p. 92073-92091.

50. Torchilin, V.P., *CHAPTER 1 Fundamentals of Stimuli-responsive Drug and Gene Delivery Systems*, in *Stimuli-responsive Drug Delivery Systems*. **2018**, The Royal Society of Chemistry. p. 1-32.
51. Rawal, M., *CHAPTER 2 Materials and Chemistry of Stimuli-responsive Drug Delivery Systems*, in *Stimuli-responsive Drug Delivery Systems*. **2018**, The Royal Society of Chemistry. p. 33-50.
52. Wang, Z., et al., *CHAPTER 3 pH-responsive Drug Delivery Systems*, in *Stimuli-responsive Drug Delivery Systems*. **2018**, The Royal Society of Chemistry. p. 51-82.
53. Secret, E. and J.S. Andrew, *CHAPTER 9 Enzyme-responsive Drug Delivery Systems*, in *Stimuli-responsive Drug Delivery Systems*. **2018**, The Royal Society of Chemistry. p. 209-231.
54. Almeida, A., et al., *CHAPTER 4 Thermo-responsive Nanomedicines for Drug Delivery in the Gastrointestinal Tract*, in *Stimuli-responsive Drug Delivery Systems*. **2018**, The Royal Society of Chemistry. p. 83-108.
55. Guisasola, E., A. Baeza, and M. Vallet, *CHAPTER 6 Magnetically-responsive DDS*, in *Stimuli-responsive Drug Delivery Systems*. **2018**, The Royal Society of Chemistry. p. 145-162.
56. Zhou, Q.-L., et al., *Ultrasound-Mediated Local Drug and Gene Delivery Using Nanocarriers*. BioMed Research International. 2014 (**2014**) p. 13.
57. Tan, X., E.L. Burchfield, and K. Zhang, *CHAPTER 7 Light-responsive Drug Delivery Systems*, in *Stimuli-responsive Drug Delivery Systems*. **2018**, The Royal Society of Chemistry. p. 163-191.
58. Rao, K.S., et al., *A novel method for synthesis of silica nanoparticles*. J Colloid Interface Sci. 289 1 (**2005**) p. 125-31.
59. Stöber, W., A. Fink, and E. Bohn, *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range*. Journal of Colloid and Interface Science. 26 1 (**1968**) p. 62-69.
60. *Chapter 1 Silica: preparation and properties*. Studies in Surface Science and Catalysis. 93 (**1995**) p. 3-30.
61. Klichko, Y., et al., *Mesostructured Silica for Optical Functionality, Nanomachines, and Drug Delivery*. J Am Ceram Soc. 92 s1 (**2009**) p. s2-s10.
62. Slowing, II, et al., *Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers*. Adv Drug Deliv Rev. 60 11 (**2008**) p. 1278-88.
63. Li, Y., et al., *Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles with Tunable Structures for Controlled Drug Delivery*. ACS Appl Mater Interfaces. 9 3 (**2017**) p. 2123-2129.
64. Fang, X., et al., *Self-templating synthesis of hollow mesoporous silica and their applications in catalysis and drug delivery*. Nanoscale. 5 6 (**2013**) p. 2205-18.
65. Zhang, Q., et al., *Permeable silica shell through surface-protected etching*. Nano Letters. 8 9 (**2008**) p. 2867-2871.

66. Chen, Y., et al., *Hollow/Rattle-Type Mesoporous Nanostructures by a Structural Difference-Based Selective Etching Strategy*. *ACS Nano*. 4 1 (2010) p. 529-539.
67. Zhang, K., et al., *A facile in situ hydrophobic layer protected selective etching strategy for the synchronous synthesis/modification of hollow or rattle-type silica nanoconstructs*. *Journal of Materials Chemistry*. 22 25 (2012) p. 12553-12561.
68. Liu, J., et al., *Yolk/shell nanoparticles: new platforms for nanoreactors, drug delivery and lithium-ion batteries*. *Chem Commun (Camb)*. 47 47 (2011) p. 12578-91.
69. Roca, M. and A.J. Haes, *Silica-Void-Gold Nanoparticles: Temporally Stable Surface-Enhanced Raman Scattering Substrates*. *Journal of the American Chemical Society*. 130 43 (2008) p. 14273-14279.
70. Vallet-Regi, M., et al., *A new property of MCM-41: Drug delivery system*. *Chemistry of Materials*. 13 2 (2001) p. 308-311.
71. He, Q.J. and J.L. Shi, *Mesoporous silica nanoparticle based nano drug delivery systems: synthesis, controlled drug release and delivery, pharmacokinetics and biocompatibility*. *Journal of Materials Chemistry*. 21 16 (2011) p. 5845-5855.
72. Jiao, Y., et al., *Redox- and temperature-controlled drug release from hollow mesoporous silica nanoparticles*. *Chemistry*. 19 45 (2013) p. 15410-20.
73. Zhang, Y., et al., *Polymer-Coated Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles for Triple-Responsive Drug Delivery*. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 7 32 (2015) p. 18179-18187.
74. Zhaogang Teng, X.S., Yuanyi Zheng, Jing Sun, Guotao Chen, Congcong Tian, Jiandong Wang, Hao Li, Yane Zhao and Guangming Lu, *Mesoporous Silica Hollow Spheres with Ordered Radial Mesochannels by a Spontaneous Self-Transformation Approach*. *Chemistry of Materials*, 25 (2013) p. 98–105.
75. Chen, Y., et al., *Hollow/rattle-type mesoporous nanostructures by a structural difference-based selective etching strategy*. *ACS Nano*. 4 1 (2010) p. 529-39.
76. Liu, J., et al., *Hollow mesoporous silica nanoparticles facilitated drug delivery via cascade pH stimuli in tumor microenvironment for tumor therapy*. *Biomaterials*. 83 (2016) p. 51-65.
77. Shen, J., et al., *The use of hollow mesoporous silica nanospheres to encapsulate bortezomib and improve efficacy for non-small cell lung cancer therapy*. *Biomaterials*. 35 1 (2014) p. 316-326.
78. Jiao, J., et al., *Redox and pH dual-responsive PEG and chitosan-conjugated hollow mesoporous silica for controlled drug release*. *Materials Science and Engineering: C*. 67 (2016) p. 26-33.
79. Gulfam, M. and B.G. Chung, *Development of pH-Responsive Chitosan-Coated Mesoporous Silica Nanoparticles*. *Macromolecular Research*. 22 4 (2014) p. 412-417.
80. Chen, F. and Y. Zhu, *Chitosan enclosed mesoporous silica nanoparticles as drug nano-carriers: Sensitive response to the narrow pH range*. *Microporous and Mesoporous Materials*. 150 (2012) p. 83-89.

81. Deng, Z., et al., *Hollow chitosan–silica nanospheres as pH-sensitive targeted delivery carriers in breast cancer therapy*. *Biomaterials*. 32 21 (2011) p. 4976-4986.
82. Chen, F., et al., *Engineering of Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles for Remarkably Enhanced Tumor Active Targeting Efficacy*. *Scientific Reports*. 4 (2014) p. 5080.
83. Shun, Y., et al., *Hollow Mesoporous Silica Nanocarriers with Multifunctional Capping Agents for In Vivo Cancer Imaging and Therapy*. *Small*. 12 3 (2016) p. 360-370.
84. Xu, H., et al., *A facile route for rapid synthesis of hollow mesoporous silica nanoparticles as pH-responsive delivery carrier*. *Journal of colloid and interface science*. 451 (2015) p. 101-107.
85. Hai, L., et al., *DNA-Functionalized Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles with Dual Cargo Loading for Near-Infrared-Responsive Synergistic Chemo-Photothermal Treatment of Cancer Cells*. *ACS Applied Nano Materials*. 1 7 (2018) p. 3486-3497.
86. Liu, Q., et al., *Hollow Silica Nanoparticles Penetrate the Peripheral Nerve and Enhance the Nerve Blockade from Tetrodotoxin*. *Nano Letters*. 18 1 (2018) p. 32-37.
87. Palanikumar, L., et al., *Spatiotemporally and Sequentially-Controlled Drug Release from Polymer Gatekeeper–Hollow Silica Nanoparticles*. *Scientific Reports*. 7 (2017) p. 46540.
88. Kaziem, A.E., et al., *Synthesis and Insecticidal Activity of Enzyme-Triggered Functionalized Hollow Mesoporous Silica for Controlled Release*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65 36 (2017) p. 7854-7864.
89. Hu, S., et al., *Preparation and Properties of Janus Heparin-Loaded Ammoniated-Hollow Mesoporous Silica Nanomotors*. *The Journal of Physical Chemistry C*. 122 17 (2018) p. 9680-9687.
90. Xie, J., et al., *Encapsulation of Hydrophilic and Hydrophobic Peptides into Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhancement of Antitumor Immune Response*. *Small*. 13 40 (2017) p. 1701741.
91. Meka Anand, K., et al., *A Vesicle Supra-Assembly Approach to Synthesize Amine-Functionalized Hollow Dendritic Mesoporous Silica Nanospheres for Protein Delivery*. *Small*. 12 37 (2016) p. 5169-5177.
92. Tan, L., et al., *Uniform double-shelled silica hollow spheres: acid/base selective-etching synthesis and their drug delivery application*. *RSC Advances*. 3 16 (2013) p. 5649-5655.
93. Prabakaran, M., *Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery*. *Journal of Biomaterials Applications*. 23 1 (2008) p. 5-36.
94. Bowman, K. and K.W. Leong, *Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery*. *International Journal of Nanomedicine*. 1 2 (2006) p. 117-128.
95. Ke, C.-J., et al., *Smart Multifunctional Hollow Microspheres for the Quick Release of Drugs in Intracellular Lysosomal Compartments*. *Angewandte Chemie International Edition*. 50 35 (2011) p. 8086-8089.

96. Varkouhi, A.K., et al., *Endosomal escape pathways for delivery of biologicals*. Journal of Controlled Release. 151 3 (2011) p. 220-228.
97. Ke, C.-J., et al., *Real-time visualization of pH-responsive PLGA hollow particles containing a gas-generating agent targeted for acidic organelles for overcoming multi-drug resistance*. Biomaterials. 34 1 (2013) p. 1-10.
98. Şanyılmaz, M., *Deney tasarımı ve kalite geliştirme faaliyetlerinde taguchi yöntemi ile bir uygulama, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, (2006)*.
99. Taguchi, G., S. Chowdhury, and Y. Wu, *Taguchi's quality engineering handbook*. 2005: Wiley.
100. Taguchi, G. and Y. Wu, *Taguchi methods: case studies from the US and Europe*. Vol. 6. 1989: Amer Supplier Inst.
101. Phadke, M.S., *Quality Engineering Using Robust Design*, PTR Prentice-Hall. Inc., Englewood Cliffs, NJ, (1989).
102. Ross, P.J. and P.J. Ross, *Taguchi techniques for quality engineering: loss function, orthogonal experiments, parameter and tolerance design*. 1988: McGraw-Hill New York.
103. Ching, L.H. and P. Yoon, *Multiple Attribute Decision Making In: Lecture Notes in Economics and Mathematical Systems*. 1981, Springer-Verlag, Berlin.
104. Daeihamed, M., A. Haeri, and S. Dadashzadeh, *A Simple and Sensitive HPLC Method for Fluorescence Quantitation of Doxorubicin in Micro-volume Plasma: Applications to Pharmacokinetic Studies in Rats*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 14 (2015) p. 33-42.
105. Rahman, A., et al., *Comparative Pharmacokinetics of Free Doxorubicin and Doxorubicin Entrapped in Cardiolipin Liposomes*. Cancer Research. 46 5 (1986) p. 2295-2299.
106. Yu, T., et al., *In vivo biodistribution and pharmacokinetics of silica nanoparticles as a function of geometry, porosity and surface characteristics*. J Control Release. 163 1 (2012) p. 46-54.
107. Feng, W., et al., *Effect of pH-Responsive Alginate/Chitosan Multilayers Coating on Delivery Efficiency, Cellular Uptake and Biodistribution of Mesoporous Silica Nanoparticles Based Nanocarriers*. ACS Applied Materials & Interfaces. 6 11 (2014) p. 8447-8460.
108. Al-Abd, A.M., et al., *A simple HPLC method for doxorubicin in plasma and tissues of nude mice*. Archives of Pharmacal Research. 32 4 (2009) p. 605-611.
109. Alvarez-Cedron, L., M.L. Sayalero, and J.M. Lanao, *High-performance liquid chromatographic validated assay of doxorubicin in rat plasma and tissues*. Journal of Chromatography B. 721 2 (1999) p. 271-278.
110. Chen, Y., et al., *In vivo distribution and antitumor activity of doxorubicin-loaded N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid coated mesoporous silica nanoparticles and safety evaluation*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 85 3, Part A (2013) p. 406-412.

111. Kaasalainen, M., et al., *Size, Stability, and Porosity of Mesoporous Nanoparticles Characterized with Light Scattering*. *Nanoscale Research Letters*. 12 1 (2017) p. 74.
112. Li, H., et al., *Bone cement based on vancomycin loaded mesoporous silica nanoparticle and calcium sulfate composites*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 49 (2015) p. 210-6.
113. Hongyan Tang, J.G., Yang Sun, Baisong Chang, Qingguang Ren, Wuli Yang, *Facile synthesis of pH sensitive polymer-coated mesoporous silica nanoparticles and their application in drug delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 421 (2011) p. 388– 396.
114. Zhang, L., et al., *Fabrication and biosensing with CNT/aligned mesostructured silica core-shell nanowires*. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2 10 (2010) p. 2767-72.
115. Fang, X., et al., *A cationic surfactant assisted selective etching strategy to hollow mesoporous silica spheres*. *Nanoscale*. 3 4 (2011) p. 1632-9.
116. Xiong, L., et al., *Cancer-Cell-Specific Nuclear-Targeted Drug Delivery by Dual-Ligand-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles*. *Small*. 11 44 (2015) p. 5919-26.
117. Holban, A.M., A.M. Grumezescu, and E. Andronescu, *Chapter 10 - Inorganic nanoarchitectonics designed for drug delivery and anti-infective surfaces*, in *Surface Chemistry of Nanobiomaterials*, A.M. Grumezescu, Editor. 2016, William Andrew Publishing. p. 301-327.
118. Ringwald, S.C. and J.E. Pemberton, *Adsorption Interactions of Aromatics and Heteroaromatics with Hydrated and Dehydrated Silica Surfaces by Raman and FTIR Spectroscopies*. *Environmental Science & Technology*. 34 2 (2000) p. 259-265.
119. Gustafson, D.L., et al., *Doxorubicin pharmacokinetics: Macromolecule binding, metabolism, and excretion in the context of a physiologic model*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 91 6 (2002) p. 1488-1501.
120. Chang, K.-L., et al., *Efficient Gene Transfection by Histidine-Modified Chitosan through Enhancement of Endosomal Escape*. *Bioconjugate Chemistry*. 21 6 (2010) p. 1087-1095.
121. Kim, K.-M., et al., *Surface treatment of silica nanoparticles for stable and charge-controlled colloidal silica*. *International journal of nanomedicine*. 9 Suppl 2 Suppl 2 (2014) p. 29-40.
122. Luangtana-Anan, M., et al., *Polyethylene glycol on stability of chitosan microparticulate carrier for protein*. *AAPS PharmSciTech*. 11 3 (2010) p. 1376-1382.
123. Chen, Y., et al., *Evaluation of the PEG density in the PEGylated chitosan nanoparticles as a drug carrier for curcumin and mitoxantrone*. *Nanomaterials*. 8 7 (2018) p. 486.
124. Zou, Z., et al., *Natural Gelatin Capped Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Acid-Triggered Drug Delivery*. Vol. 29. 2013.

7 EKLER

EK-1 ETİK KURUL İZİNİ



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu

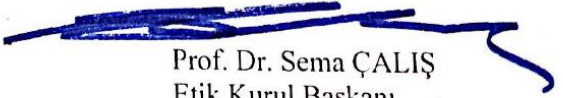
Sayı : 52338575 -143

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 04.12.2018 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2018/12
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2018/63
KARAR NUMARASI	: 2018/63 - 04
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN
HAYVAN DENEYLERİNDE	Kim. Yük. Müh. Gözde ULTAV, Prof. Dr. Güneş
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: ESENDAĞLI, Ecz. Sedenay AKBAŞ, Dr. Ecz. Adem ŞAHİN
DİĞER YARDIMCI	: -
ARAŞTIRMACILAR	
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 21 Adet Sprague-Dawley Sıçan (3 Aylık)

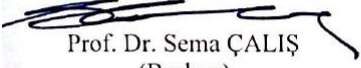


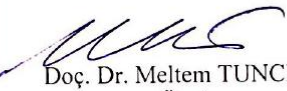

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2018/63 kayıt numaralı "*Akut Miyeloit Lösemi Tedavisinde Kullanılmak Üzere İçi Boş Mezogözenekli Silika Nanopartiküllerinin Geliştirilmesi, Optimizasyonu ve Etkinliklerinin in vitro ve in vivo Testlerle Değerlendirilmesi*" isimli çalışma Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Araştırma yürütücüsü Kurulumuza araştırma projesinin bitiş tarihini bildirmek ve proje sonuç raporunu sunmak ile yükümlüdür.


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU İMZA SİRKÜLERİ

TOPLANTI TARİHİ : 04.12.2018 (SALI)
TOPLANTI SAYISI : 2018/12
TOPLANTI SAATİ : 14.00
PROJE NUMARASI : 2018/63

 Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	 Prof. Dr. Nüket Örnek BÜKEN (Üye)	 Prof. Dr. Yıldırım SARA (Üye)
(İZİNLİ) Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR (Üye)	(İZİNLİ) Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	 Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)
 Doç. Dr. Abdullah C. AKMAN (Üye)	 Doç. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)	 Doç. Dr. Ersoy KONNAŞ (Üye)
 Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR (Üye)	 Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA (Üye)	 Dr. Öğr. Üyesi Banu Cahide TEL (Üye)
 Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)	 Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	 Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)

EK-2 TEZ İLE İLGİLİ YAYIN

2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), Ankara: Gozde Ultav, Sedenay Akbas, Hayrettin Tonbul, Adem Sahin, Yilmaz Capan, “Development and *in vitro* Evaluation of pH Triggered Hollow Silica Nanoparticles As A Drug Delivery System”, poster presentation

EK-3 ORJİNALLİK RAPORU



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
~~YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU~~

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 14/05/2019

Tez Başlığı / Konusu: İçi Boşluklu Gözenekli Silika Nanopartiküllerin İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Hazırlanması ve İncelenmesi Kanser tedavisi için ilaç taşıyıcı sistem geliştirilerek in vitro ve in vivo çalışmalarla değerlendirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 105 sayfalık kısmına ilişkin, 14/05/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 1 tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Adı Soyadı: Gözde Ultav
Öğrenci No: N14240302
Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotip
Programı:
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

Tarih ve İmza

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

Prof. Dr. Yılmaz Ceylan

EK-4 ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gözde Ultav
Doğum yeri : Terme
Doğum tarihi : 23.01.1986
Medeni hali : Bekar
Yazışma adresi :
Telefon :
Elektronik posta adresi : gozdeultav@gmail.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Gazi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya
Mühendisliği Bölümü – Örgün Öğretim
Yüksek Lisans : Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya
Mühendisliği A.B.D. – Örgün Öğretim
Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanoteknoloji ve Nanotıp A.B.D.

İş Tecrübesi

2011-2016: Araştırma Görevlisi - Çankırı Karatekin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Kimya Mühendisliği A.B.D.
2018-2019: Ar-Ge Uzmanı/Analitik – İlko İlaç Biyoteknoloji Merkezi
2019 - : Ar-Ge/Kimya - Duygu Havacılık ve Savunma