



**MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE KONTROLLÜ İLAÇ  
TAŞINIM SİSTEMİ OLARAK LİPİT NANOTÜPLERİN  
KULLANIM POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE POTENTIAL USE OF LIPID  
NANOTUBES AS CONTROLLED DRUG DELIVERY  
VEHICLES FOR THE TREATMENT OF BREAST CANCER**

**AYŞE NAZLI KARAKUŞCU**

**PROF. DR. NİHAL AYDOĞAN**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2019

AYŞE NAZLI KARAKUŞCU'nun hazırladığı "Meme Kanseri Tedavisinde Kontrollü İlaç Taşınım Sistemi Olarak Lipit Nanotüplerin Kullanım Potansiyelinin İncelenmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kevser Özden

Başkan



Prof. Dr. Nihal Aydoğın

Danışman



Prof. Dr. Tülay Durusoy

Üye



Prof. Dr. Deniz Tanyolaç

Üye



Dr. Öğretim Üyesi Emre Büküşoğlu

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS 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.

20/06/2019

Ayşe Nazlı KARAKUŞCU

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI 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.

20.../06.../2019

  
AYŞE NAZLI KARAKUŞCU

## ÖZET

# MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE KONTROLLÜ İLAÇ TAŞINIM SİSTEMİ OLARAK LİPİT NANOTÜPLERİN KULLANIM POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

**AYŞE NAZLI KARAKUŞCU**

**Yüksek Lisans, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN**

**Eş Danışman: Dr. Hande ÜNSAL HUNTER**

**Haziran 2019, 106 Sayfa**

Meme kanseri, ölümler açısından önde gelen kanser türleri arasındadır. Radyasyon ve cerrahi yöntemlerle birlikte kemoterapi en çok tercih edilen tedavi biçimlerinden olsa da kemoterapötikler organlarda ciddi hasara sebep olabilmektedirler. Bu nedenle, anti-kanser ajanları ile çalışmak çeşitli riskler bulundurmaktadır. Kanser tedavisindeki ana problemleri çözebilmek ve terapötik etkinliklerini arttırabilmek için, nanoteknoloji temeline dayanan ilaç taşıyıcı sistemler (İTS) geleneksel yöntemlere kıyasla umut vaat edici birer alternatif haline gelmişlerdir. Lipit nanotüpler (LNT) amfifilik monomerlerden oluşan ve bu monomerleri sayesinde sulu çözeltilerde kendiliğinden kümeleşme yöntemi ile oluşturulabilen açık uçlu, içi boş silindirik yapıları nanotaşıyıcılardır. LNT'ler biyoyumlu yüzeyleri ve ayarlanabilir boyutlara sahip tübüler geometrileri gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Tüm bu karakteristik özellikleri LNT'leri tercih edilir

adaylar haline getirmektedir. Model anti-kanser ajanı olarak seçilen mitoksantron (MTX) genellikle meme kanseri, prostat kanseri ve lösemi tedavilerinde kullanılan ve iyi bilinen sentetik bir antrasenediyon antibiyotiktir.

Bu çalışmanın amacı meme kanseri tedavisi için tümör bölgesini aktif olarak hedefleyebilen bir İTS geliştirmektir. Ayrıca geliştirilen İTS'nin çoklu ilaç direncinin üstesinden gelmek ve ilaçların sinerjik sitotoksik aktivitesinden yararlanmak için kombine terapide kullanılması da amaçlanmaktadır. Bu amaçları sağlayabilmek adına, özel tasarlanmış yapılarının sağladığı ve anti-kanser ajanlarının taşınımında en sık tercih edilen uyarıcılardan olan pH'a duyarlı karakteristiği nedeniyle Aqua LNT'lerin nanotaşıyıcı olarak kullanılmasına karar verilmiştir. İkinci kısımda, Aqua LNT'lerin çoklu kemoterapötik taşınımında kullanım potansiyelini araştırmak için sisteme doksorubisin (DOX) eklenmiştir. MTX ve DOX, Aqua LNT'lere elektrostatik etkileşim ve  $\pi$ - $\pi$  yığılma etkileşimleri ile yüklenmiştir. İlaç enkapsülasyonu ve salımı deneylerinde analizler UV-Vis spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir.

Aqua LNT'lerin fonksiyonelleştirilmesinde basit ve düşük maliyetli bir strateji olarak zıt yüklü fonksiyonel gruplar arasında elektrostatik etkileşim kurulmasına dayanan tabaka-tabaka-kaplama (TTK) yöntemi tercih edilmiştir. TTK yöntemi yalnızca ilk ve ani salımı azaltmakla kalmayıp tabakalar çeşitli liganlar ile zenginleştirilirse moleküler hedefleme stratejilerine de katkı sunmaktadır. Bu çalışmalarda, aljinat (ALG) ilk kaplama tabakası olarak kullanılmıştır. Ayrıca, folik asit (FA) meme kanseri hücre zarındaki reseptörlerin varlığı dolayısıyla hedefleyici ligand olarak seçilmiş ve kitosan (CHI) ile kimyasal olarak konjuge edildikten sonra Aqua LNT'lere uygulanmıştır. ALG veya FACHI tabakalarıyla kaplanan Aqua LNT'lerin karakterizasyonunda Atomik Kuvvet Mikroskobu ve zeta potansiyel ölçümlerinden yararlanılmıştır. Sonuç olarak, Aqua LNT'lere % 90 verimle MTX yüklenmesi başarılmış ve TTK sonrasında salım süresininin 168 saate ulaşması sağlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** İlaç taşınımı, kontrollü salım, lipit nanotüp, tabaka-tabaka kaplama yöntemi, ilaç hedeflemesi

## **ABSTRACT**

# **INVESTIGATION OF THE POTENTIAL USE OF LIPID NANOTUBES AS CONTROLLED DRUG DELIVERY VEHICLES FOR THE TREATMENT OF BREAST CANCER**

**AYŞE NAZLI KARAKUŞCU**

**Master of Science, Chemical Engineering Division**

**Supervisor: Prof. Dr. Nihal AYDOĞAN**

**Co-supervisor: Dr. Hande UNSAL HUNTER**

**June 2019, 106 Pages**

Breast cancer is one of the leading cancer types which gives rise to death. Chemotherapy is still the most preferred way of the treatment with the radiation and surgery yet the chemotherapeutics can cause serious organ damage. Therefore, working with anticancer agents has various risks. For addressing main obstacles in the cancer therapies and to improve their therapeutic efficacy, drug delivery systems (DDS) based on nanotechnology have become a promising alternative over the conventional therapies. Lipid nanotubes (LNTs) are open-ended, hollow cylindrical nanocarriers that consists of amphiphilic monomeric units and owing to these monomers LNTs could be formed by self-assembly method in aqueous media. LNTs have different advantages such as biocompatible membrane surface and tubular geometry with tunable dimensions. All these characteristic features make the LNTs favourable candidates for drug delivery.



The selected model anticancer agent mitoxantrone (MTX) is a well-known synthetic anthracenedione antibiotic which is commonly used for treatment of breast cancer, prostate cancers and leukaemia.

The aim of this study is to develop a DDS for the treatment of breast cancer which is able to target the tumor side actively. It is also aimed to use the developed DDS in combination therapy in order to overcome the multi-drug resistance (MDR) and to take advantage of drugs synergistic cytotoxic activity. In order to achieve these aims, Aqua LNTs are decided to be used as nanocarriers because of their specially designed structure gives them a pH sensitive character which is the most preferred stimuli for the delivery of anticancer agents. In the second part, doxorubicin (DOX) is also added to system to investigate the potential use of Aqua LNTs as multiple chemotherapeutics carrier. MTX and DOX have been loaded to the Aqua LNTs via both electrostatic and  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions. In the drug encapsulation and release experiments, the analysis has been performed by using UV-vis spectrophotometry.

Layer-by-Layer (LbL) technique which is develop via electrostatic interactions between the oppositely charged functional groups is preferred as a simpler and cost-effective strategy for the functionalization of Aqua LNTs. LbL technique not only reduce the initial burst release but also makes a contribution to molecular targeting strategies if the layers are composed of different ligands. In these studies, alginate (ALG) has been used as first coating layer. Also, folic acid (FA) has been selected as targeting ligand due to its presence on the breast cancer cell membrane and it has been introduced to Aqua LNTs after conjugation with chitosan (CHI) chemically. In order to characterize the Aqua LNTs which are coated by ALG or FACHI layers, Atomic Force Microscopy and zeta potential measurements were performed. As a conclusion, MTX loading was achieved to Aqua LNTs with 90% encapsulation efficiency and the release period was reached to 168 hours after LbL coating.

**Keywords:** Drug delivery, controlled release, lipit nanotubes, layer-by-layer method, drug targeting

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, her zaman en iyiyi arayarak ufkumu genişleten ve bana tecrübeleriyle yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nihal Aydoğan'a,

Aklıma takılan her soruda başvurabildiğim, kağıt üzerinde yazmayan her detayı kendisinden öğrenebildiğim ve karşıma çıkabilecek sorunları sayesinde önceden tahmin edebildiğim sevgili hocam ve eş danışmanım Dr. Hande Ünsal Hunter'a

Bilgisiyle ve güleryüzüyle zoru kolaylaştıran, desteğiyle her daim yanımda olduğu için büyük mutluluk duyduğum sevgili hocam Dr. Gökçe Alp'e,

Geçirdiğimiz uzun ve yorucu saatler boyunca bilgilerini, yardımlarını ve neşelerini eksik etmeyen, tanışma fırsatı bulduğum için kendimi çok şanslı gördüğüm, yeni bir unvanla birlikte yeni dostluklar kazandığımı da düşündüren, sevgili Dr. Dicle Kalaycıoğlu ve adını teker teker sayamadığım diğer tüm Araştırma Lab. 14 üyelerine,

En yoğun ve en zor zamanlarımda yanımda olarak hayatın kaşımıza çıkardığı her yeni evrede fikirlerimizi paylaşabildiğimiz Esra, Setanay ve diğer tüm dostlarıma,

Hakkını ödeyemeyeceğim, göğsünü kabartabildiğim için kendimle gurur duyduğum canım anneanneme,

Benimle birlikte yirmi yıllık bu eğitim hayatını devirirken her gün yanımda olan, her daim her şeyin çok güzel olması için koşulsuz özverileri ile çabalayan ve beni bugünlere yalnızca doğruluğu aşılayarak böylesine güçlü taşıyan canım aileme,

Teşekkür ederim...

Nazlı KARAKUŞCU

Haziran 2019, Ankara

# İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Nanoteknoloji ve İlaç Taşınımı .....	4
2.1.1. Kontrollü İlaç Salımı .....	5
2.1.1.1. Uyarı-Cevap Mekanizmaları .....	6
2.1.1.2. Kanser Tedavisinde Kontrollü İlaç Taşınımı.....	8
2.1.2. Moleküler İlaç Hedeflemesi .....	11
2.1.3. Kombine Terapi.....	15
2.2. İlaç Taşıyıcı Yapılar .....	17
2.2.1. Lipit Nanotüpler .....	19
2.2.1.1. Aqua Lipit Nanotüpler .....	21
2.3. Tabaka-Tabaka Kaplama .....	24
2.4. İlaç Salım Kinetiği.....	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	27
3.1. Kimyasal Maddeler .....	27
3.2. Aqua Molekülünün Sentez ve Karakterizasyonu .....	27

3.3.	Aqua Nanotüplerin Sentez ve Karakterizasyonu .....	28
3.4.	Aqua Nanotüplerinin İlaç Alım ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi ...	30
3.4.1.	Aqua Nanotüplerin Mitoksantron Tutma Özelliklerinin İncelenmesi.....	32
3.4.2.	Aqua Nanotüplerin Mitoksantron Salım Özelliklerinin İncelenmesi... ..	33
3.5.	Aqua Nanotüplerinin İkili İlaç Alım ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi... ..	34
3.5.1.	Aqua Nanotüplerin Mitoksantron ve Doksorubisin Tutma Özelliklerinin İncelenmesi.....	34
3.5.2.	Aqua Nanotüplerin Mitoksantron ve Doksorubisin Salım Özelliklerinin İncelenmesi.....	34
3.6.	İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerinin Yüzey Kaplama İşlemleri .....	35
3.6.1.	İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerinin Aljinat ile Kaplanması .....	35
3.6.2.	İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerin Folik Asit-Kitosan ile Kaplanması .	35
3.6.3.	Yüzey Kaplama İşlemi Sonrasında Aqua Nanotüplerin Karakterizasyonu .....	38
3.6.4.	Yüzey Kaplaması Gerçekleştirilen Aqua Nanotüplerden İlaç Salım Özelliklerinin İncelenmesi.....	39
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA .....	40
4.1.	Aqua Molekülünün Sentez ve Karakterizasyonu .....	40
4.2.	Aqua Nanotüplerin Sentez ve Karakterizasyonu .....	41
4.3.	Aqua Nanotüplerinin İlaç Alım ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi ...	42
4.3.1.	Aqua Nanotüplerin Mitoksantron Tutma Özelliklerinin İncelenmesi... ..	42
4.3.2.	Aqua Nanotüplerin Mitoksantron Salım Özelliklerinin İncelenmesi... ..	46
4.4.	İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerinin Yüzey Kaplamaları .....	50

4.4.1.	İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerinin Aljinat ile Kaplanması .....	50
4.4.1.1.	Aljinat Kaplı Aqua Nanotüplerin Karakterizasyonu.....	50
4.4.1.2.	Aljinat Kaplı Aqua Nanotüplerden İlaç Salım Özelliklerinin İncelenmesi.....	55
4.4.2.	İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerinin Folik Asit-Kitosan ile Kaplanması.....	58
4.4.2.1.	Folik Asit-Kitosan Konjuge Yapısının Sentez ve Karakterizasyonu .....	58
4.4.2.2.	Folik Asit-Kitosan Kaplı Aqua Nanotüplerin Karakterizasyonu	61
4.4.2.3.	Folik Asit-Kitosan Kaplı Aqua Nanotüplerden İlaç Salım Özelliklerinin İncelenmesi .....	64
4.4.3.	Aqua Nanotüplerden Mitoksantron Salımının Modellenmesi.....	68
4.5.	Aqua Nanotüplerinin İkili İlaç Alım ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi.....	71
4.5.1.	Aqua Nanotüplerin Mitoksantron ve Doksorubisin Tutma Özelliklerinin İncelenmesi.....	72
4.5.2.	Mitoksantron ve Doksorubisin Yüklü Aqua Nanotüplerin Yüzey Kaplamaları.....	74
4.5.3.	Aqua Nanotüplerden Mitoksantron ve Doksorubisin Salım Özelliklerinin İncelenmesi.....	78
4.5.4.	Aqua Nanotüplerden Mitoksantron ve Doksorubisin Salımının Modellenmesi.....	84
5.	SONUÇLAR.....	87
6.	KAYNAKLAR .....	92
EKLER		
ÖZGEÇMİŞ		

## ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Çeşitli iç ve dış uyarıcıların farklı nanotaşıyıcı yapılar üzerinde oluşturduğu cevap mekanizmaları.....	7
Çizelge 2.2.	Meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ajanları ve sınıfları .....	10
Çizelge 3.1.	MTX ve DOX'a ait fiziksel ve kimyasal özellikler.....	31
Çizelge 3.2.	Tez çalışması kapsamında araştırılan deneysel parametreler .....	39
Çizelge 4.1.	MTX taşınımı ve kontrollü salımı için geliştirilen bazı sistemlerin MTX tutma kapasiteleri ve yükleme verimlilikleri .....	45
Çizelge 4.2.	Aqua nanotüplerden MTX salımı tamamlandığı andaki ilaç derişimleri.....	49
Çizelge 4.3.	FACHI sentezi gerçekleştirilen bazı çalışmalarda ulaşılan bağlanma dereceleri .....	60
Çizelge 4.4.	Yüzey kaplaması gerçekleştirilen Aqua nanotüplerden MTX salımı için hesaplanan kinetik parametreler .....	69
Çizelge 4.5.	Tekli ve ikili ilaç yüklendiği durumlarda Aqua nanotüplerin çeşitli formlarında gözlenen ortalama çap değerleri (nm).....	75
Çizelge 4.6.	Yüzey kaplaması gerçekleştirilen Aqua nanotüplerden eş zamanlı MTX ve DOX salımı için hesaplanan kinetik parametreler .....	85

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Kontrollü ve kontrolsüz ilaç salımı durumunda kandaki ilaç derişiminde meydana gelen farklılık .....	6
Şekil 2.2.	Kanser tedavisinde kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerin pasif doku hedeflemesi ve aktif hücre hedeflemesinin şematik gösterimi i) hücre yakınında taşıdığı kemoterapi ajanını bırakması ii) hücre zarına bağlanması ve ilaç salımı iii) hücre içine alımı .....	12
Şekil 2.3.	Nanotaşıyıcı sistemlerin kullanılan malzemelere göre sınıflandırması	18
Şekil 2.4.	Lipit nanotüplerin farklı oluşum mekanizmaları .....	21
Şekil 2.5.	Aqua molekül yapısı .....	22
Şekil 2.6.	Eşmolar miktarda etanolamin varlığında kendiliğinden kümeleşme yoluyla elde edilen Aqua nanotüp yapısının a) AFM b) STEM c) cryo-TEM görüntüleri.....	22
Şekil 3.1.	Aqua maddesinin sentez reaksiyonu .....	27
Şekil 3.2.	Aqua molekülünün ve Aqua nanotüplerin sentez basamaklarının şematik gösterimi .....	30
Şekil 3.3.	AFM mekanizmasının şematik gösterimi .....	29
Şekil 3.4.	a) Mitoksantron ve b) doksorubisin ilaçlarının molekül yapıları.....	30
Şekil 3.5.	Aqua nanotüplerce ilaç tutma ve ilaç salımı çalışmalarının şematik gösterimi.....	34
Şekil 3.6.	Folik asit-kitosan (FACHI) eldesinde kullanılan kimyasal reaksiyonunun şematik gösterimi .....	36
Şekil 3.7.	İlaç yüklü Aqua nanotüplerin yüzeylerinin ALG veya FACHI ile kaplanması ve ardından gerçekleştirilen karakterizasyon basamaklarının şematik gösterimi .....	38
Şekil 4.1.	Aqua nanotüperin AFM'den elde edilen a) error b) üç boyutlu topografya görüntüsü .....	41

Şekil 4.2.	Aqua nanotüplerin farklı MTX:Aqua oranlarında (1:1 ve 2:1) ve çözelti pH'larında MTX tutma kapasitesi (TK, mg/mg) ve yükleme verimliliği (YV, %).....	44
Şekil 4.3.	Farklı MTX:Aqua başlangıç oranlarında yüklemesi gerçekleştirmiş Aqua nanotüplerden iki ayrı pH'ta MTX salım profili a) 1:1 b) 2:1 .....	47
Şekil 4.4.	Yalın, ilaç yüklü ve farklı sürelerce ALG kaplaması gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM üzerinden elde edilen topografya görüntüleri .....	52
Şekil 4.5.	Yalın, ilaç yüklü ve ALG kaplaması gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM görüntüleri üzerinden ölçülen ortalama çap değerleri .....	53
Şekil 4.6.	Yalın, ilaç yüklü ve ALG kaplaması gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin zeta potansiyel değerleri .....	54
Şekil 4.7.	Yalın haldeki ve ALG kaplaması gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerden iki ayrı pH ortamlarındaki MTX salım profilleri a) pH 5,5 b) pH 7,4 ....	56
Şekil 4.8.	Yalın FA ve CHI ile FACHI konjuge yapısına ait FTIR spektrumu .....	58
Şekil 4.9.	ALG ve FACHI tabakaları ile yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM üzerinden elde edilen topografya görüntüleri .....	61
Şekil 4.10.	Yalın, ilaç yüklü ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM görüntüleri üzerinden ölçülen ortalama çap değerleri .....	62
Şekil 4.11.	Yalın, ilaç yüklü ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin zeta potansiyel değerleri .....	63
Şekil 4.12.	Yalın haldeki ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplere ait iki ayrı pH ortamında kısa süreli ve denge anına kadar olan MTX salım profilleri a) pH 5,5 b) pH 7,4 .....	65
Şekil 4.13.	Belirli şekillerde yüzey kaplaması gerçekleştirilen Aqua nanotüplerden MTX salım davranışının farklı modellere göre hesaplanan profilleri ..	68
Şekil 4.14.	Aqua nanotüplerin ikili ilaç yüklemesinde MTX ve DOX tutma kapasitesi (TK, mg/mg) .....	72



Şekil 4.15. İkili ilaç yüklü ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM üzerinden elde edilen topografya görüntüleri .....	74
Şekil 4.16. Yalın, ikili ilaç yüklü ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM görüntüleri üzerinden ölçülen ortalama çap değerleri .....	75
Şekil 4.17. Yalın, ikili ilaç yüklü ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin zeta potansiyel değerleri .....	77
Şekil 4.18. Yalın haldeki ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplere ait iki ayrı pH ortamındaki eş zamanlı ilaç salım profilleri .....	78
Şekil 4.19. İkili ilaç salımında Aqua nanotüplerden pH 5,5 ve pH 7,4 ortamlarına belirli zamanlarda salınan toplam ilaç derişimleri .....	80
Şekil 4.20. Yalın haldeki ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerden iki ayrı pH ortamında MTX ve DOX salım profilleri a) pH 5,5 b) pH 7,4 .....	82
Şekil 4.21. Belirli şekillerde yüzey kaplaması gerçekleştirilen Aqua nanotüplerden eş zamanlı MTX ve DOX salım davranışının farklı modellere göre hesaplanan profilleri .....	84

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

$\epsilon$  Molar Absorptivite

### Kısaltmalar

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ALG	Aljinat
Aqua-M	Mitoksantron yüklü Aqua nanotüp
Aqua-MD-ALG	Aljinat kaplanmış mitoksantron yüklü Aqua nanotüp
Aqua-MD-ALG-FACHI	Aljinat ve folik asit-kitosan kaplanmış mitoksantron yüklü Aqua nanotüp
CHI	Kitosan
DOX	Doksorubisin
EPR	Arttırılmış Geçirgenlik ve Alıkonma Etkisi
FACHI	Folik asit-kitosan konjuge yapısı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
KNT	Karbon nanotüp
MDR	Çoklu İlaç Direnci (Multi-Drug Resistance)
MTD	Maksimum tolare edilebilir dozaj
MTX	Mitoksantron
NP	Nanopartikül
LNT	Lipit Nanotüp
HCl	Hidroklorik Asit
PBS	Fosfat Tamponlama Tuzu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TTK	Tabaka tabaka kaplama
TK	Tutma Kapasitesi
YV	Yükleme verimliliği

# 1. GİRİŞ

Nanobilim ve nanoteknoloji 1-100 nm boyutlarındaki malzemelerin özelliklerini iyileştirmek ve geliştirmek üzere yürütülen tüm bilimsel ve teknolojik araştırmaları kapsayan çalışmalar bütünüdür ve son yıllarda giderek daha fazla önem kazanan bir noktaya ulaşmıştır. Elektronik, optik, kozmetik, biyoteknoloji gibi pek çok farklı sektör ve uygulama arasında nanoteknolojinin ilgi alanında yer alan en önemli konulardan bir tanesi ise kontrollü ilaç taşınım sistemleridir. Üstün özellikler kazandırılmış ve işlevselliği artırılmış bu sistemler sayesinde geleneksel ilaç uygulamalarında karşılaşılan belli kısıtlamaların giderilebilmesi hedeflenmektedir. Bunlar arasında en yaygın görülen dezavantajlar ilacın plazmadaki derişiminin aniden yükselmesi ancak bu duruma rağmen terapötik etki gösterdiği derişimlerde beklenen seviyenin uzun süre korunamaması veya ciddi yan etkilerle karşılaşılmasıdır. İlaç taşıyıcı sistemlerin varlığıyla birlikte etkin maddelerin terapötik özelliklerinin artırılması, suda çözünürlüğü düşük ilaçlardan daha fazla yararlanım sağlanması, uygulanan ilaç dozajının azaltılması ve kan dolaşımında kalış süresinin uzatılması temel kazanımlar olarak öne çıkmıştır.

İlaç taşıyıcı sistemler boyut özelliklerinin kazandırdığı avantaj ile artırılmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi şeklinde ifade edilen pasif ilaç hedeflemesini sağlarken, tasarım aşamasında kazandırılan uyarı-cevap özellikleri sayesinde de ilacın tedavinin planlandığı bölgeye aktif olarak hedeflemesini yapmaktadır. Bu uyarılar ışık, sıcaklık, ses ötesi dalgalar, manyetik alan, redoks vb. çeşitli fiziksel ve kimyasal etkiler olabilirken kanser tedavisine yönelik geliştirilen yapılarda pH duyarlı sistemler hastalığın doğal şartları sebebiyle ayrıca dikkat çeker hale gelmiştir. Vücudun sağlıklı bölgelerinde ve kanda pH değeri 7,4 iken, tümörlü dokularda pH'ın 5-5,5 seviyesine düştüğü bilinmektedir. Dolayısıyla kemoterapi ajanlarının taşınımı için tasarlanan bir sistemde taşıyıcıdan ilaç salımının tetiklenmesi amacıyla dışarıdan ekstra bir uyarı verilmesine gerek duyulmaksızın pH farkı aracılığıyla ilaç salımında kontrol sağlanabilmektedir.

Gelişen teknoloji ile birlikte pH duyarlı taşınım sistemlerinde kullanılan malzemeler ve bunların geometrileri geniş bir yelpazeye yayılır hale gelmiştir. Polimerik,

inorganik ve karbon malzemelerden üretilen nanopartiküller, nanokapsüller veya miseller kontrollü ilaç salım çalışmalarında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Küresel yapılara kıyasla tübüler formdaki nanotaşıyıcıların madde tutma kapasitesinin daha fazla olması ve hücre içine alımlarında sorun yaşanmadığının ortaya konulmasıyla bu tür yapılara olan ilgi de artmıştır [1]. Tübüler formda yaygın olarak tercih edilen taşıyıcılar üstün mekanik dayanımları, gelişmiş fiziksel ve elektriksel özellikleriyle karbon nanotüpler (KNT) olmuştur. Fakat birçok açıdan avantajlı olan yanlarına rağmen KNT'lerin üretim aşamalarında yüksek enerji gerektiren prosesler kullanıldığı, dolayısıyla üretim zorluğu ve yüksek maliyet gerektirdiği bilinmektedir. KNT'lerin bir diğer dezavantajı ise özellikle biyomedikal uygulamalar söz konusu olduğunda dikkat edilmesi gereken en önemli hususlardan biri olan toksisite değerleridir. Hücre içi birikim ile hücre ölümlerine yol açabildiği tespit edilen KNT'lere alternatif geliştirilmesi aşamasında bu gemetrinin getirdiği en önemli avantajlardan olan yüksek madde taşıma kapasitesini kaybetmeden fakat biyoyumluluğu çok daha iyi olan ve kolay üretim yöntemleri ve düşük maliyetleri ile ön plana çıkan organik yapıları nanotüpler dikkat çekmiştir. Organik nanotüpler kontrollü ilaç salımında umut vaad eden çalışmalar ortaya konulmasını sağlamakla birlikte literatürde henüz doyunluğa ulaşmamış bir alanı teşkil etmektedirler.

Tez çalışması kapsamında bu tür organik nanotüp sınıfına giren lipit bazlı ve kendiliğinden kümeleşme yöntemi ile oluşturulan Aqua nanotüpler kullanılmıştır. Aqua nanotüplerin oluşumunda monomer olarak yer alan ve Aqua kısaltmasıyla bahsedilen AQ-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>COOH molekül yapısı da daha önce araştırma grubumuzda tasarlanan ve sentezi gerçekleştirilen özel bir moleküldür. Amfifilik özellikteki bu molekül 10 karbonlu bir hidrokarbon zincirinin iki ucunda yer alan amino antraknon ve karboksilik asit gruplarından oluşmaktadır ve bu fonksiyonel gruplar sayesinde hem redoks aktif hem de pH duyarlı karakteristiğe sahiptir. Aynı gruplar hidrojen bağı oluşturma ve π-π etkileşimleri gösterme eğilimlerinin kuvvetli olması dolayısıyla nanotüp formunun ortaya çıkmasında da rol oynamaktadır [2].

Bu tez çalışmasında, pH ve redoks gibi uyaranlara tepkili olması sebebiyle akıllı yapıda olduğu ortaya konulan lipit bazlı Aqua nanotüplerle meme kanseri tedavisinde kullanıma yönelik bir ilaç taşınım sistemi geliştirilmesi üzerine incelemelerde bulunulmuştur. Hedeflenen amaç doğrultusunda model kemoterapi

ajanı olarak seçilen mitoksatron etkin maddesinin daha uzun süreye yayılmış ve iyileştirilmiş bir salım profili sergileyebilmesi adına lipit nanotüplerin tabaka-tabaka kaplama (TTK) yöntemiyle modifiye edilmesi yoluna gidilmiştir. Ayrıca yine bu yöntemden faydalanılarak meme kanseri hücrelerinde yoğun biçimde yer aldığı bilinen folik asit resaptörlerine bağlanabilmesi doğrultusunda nanotüpler üzerine aktif moleküler hedeflemeye katkı sunacak ligandlar yerleştirilmiştir. Tez çalışmasının ikinci aşamasında ise kemoterapi sırasında en yaygın karşılaşılan problemlerden biri olan çoklu ilaç direncinin kırılması adına önemli etkilere sahip olduğu çeşitli bulgularla desteklenen kombine terapiye yönelik olarak araştırmalar yapılmış ve Aqua nanotüplere mitoksantron ile birlikte doksorubisin etkin maddesi de eş zamanlı olarak yüklenerek salım davranışları incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nanoteknoloji ve İlaç Taşınımı

Nanobilim ve nanoteknolojinin kesin bir tanımı olmamakla birlikte, yaygın kabule göre 1-100 nanometre boyutlarda maddelerin anlaşılması, kontrol edilmesi ve atomsal seviyede değiştirilerek işlevsel hale getirilmesi çalışmalarıdır. Nanoteknolojinin bilim ve teknolojinin değişik alanlarında ön plana çıkan uygulamaları arasında ilaç, gen veya protein aktarımlarını sağlayan taşıyım sistemleri, sahip olduğu yüksek avantajlar sayesinde geçtiğimiz yıllarda büyük ilgi odağı haline gelmişlerdir. Ancak ilaç taşıyım sistemlerinin tarihçesine bakıldığında bu kapsamda yapılan araştırmaların çok daha eskiye dayandığı görülmektedir. 1959 yılında Richard Feynman tarafından öne sürülen nano boyutlu partikül fikrinin tüm bu çalışmaların temelini oluşturduğu söylenebilir [3]. 1964 yılında ise lipozom yapıları oluşturulmuş, 1980'de ilaç hedeflemesine uygun şekilde modifiye edilmiş ve 1995 senesinde doksorubisin yüklü lipozomlar Doxil markası adı altında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (ing: U.S. Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylı hale gelmiştir [4].

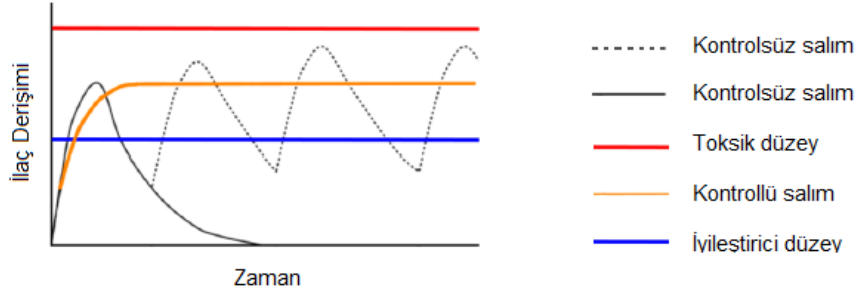
İlaç taşıyım sistemlerinin, terapötik ajanların farmasötik ve biofarmasötik özelliklerini arttırmak ve hedef bölgeye ulaşan ilaç miktarını çoğaltmak için kullanılan çeşitli formülasyon stratejileri olduğu söylenebilir [5]. Bu sistemler incelendiğinde geleneksel yöntemlere kıyasla getirdikleri pek çok farklı avantajla karşılaşılacaktır. Örneğin, sistematik şekilde ilaç salımını kontrol edebilmeleri, hastanın ilacın neden olduğu yan etkilerden büyük ölçüde korunmasına yardımcı olmaları, çoklu ilaç hedeflemesine olanak sağlamaları, ilaçların farmasötik özelliklerini (stabilite, tümörlü dokuda birikim vs.) zenginleştirmeleri, suda çözünürlüğü düşük ilaçların kullanımı sırasında oluşan dezavantajları elimine edebilmeleri, ilacın kan sirkülasyonunda kalış sürelerinin uzatılmasına yardımcı olmaları, ve *in vivo* görüntülemeye katkı sunmaları son derece kritik öneme sahip avantajları olarak ön plana çıkmaktadır [6]. Ayrıca, kombine terapilerde çoklu ilaç taşıyımını yapabilmeleri, terapötik ajanlara kişiye özel fonksiyon kazandırılabilmesi ve uygulanan ilaç dozajının/aralığının düşürülmesine yardımcı olmaları da diğer önemli faydalarındandır [5].

Taşınım sistemleri biomedikal uygulamalarının çeşitli alanlarında yoğun biçimde kullanılmaktadır. Bunlar arasında en çok ön plana çıkanların kontrollü ilaç salımı, ilaç hedeflemesi, kombine terapi ve *in vivo* görüntüleme olduğunu söylemek mümkündür.

### **2.1.1. Kontrollü İlaç Salımı**

Kontrollü salım sistemlerinin geçmişine bakıldığında 1938 yılında etken maddenin salımını geciktirmek üzere kaplanan peletlere dair Lipowski'ye ait patent göze çarpmaktadır. 1952 yılında ise değişik seviyeli kaplanmış partiküllerin bir araya getirildiği ve görece daha yavaş salımın sağlandığı bir karışım olan 'Spansule' adındaki ilk piyasa preparatı ile karşılaşılmaktadır [7]. Bu nc çalışmaların ardından kontrollü ilaç salımına yönelik araştırmalar daha da çeşitlenerek günümüzde akıllı ve biyouyumlu özelliklere sahip birçok farklı malzeme ve tasarımı temel alan hallerine kavuşmuştur [8].

İlaç tedavilerinde kontrollü salım sistemlere duyulan ihtiyaçların ortaya çıkmasına geleneksel uygulamalarda rastlanan kandaki ilaç konsantrasyonunun aniden yükselmesi ancak bu seviyede kalamayıp tekrar düşmesi gibi problemler neden olmuştur. Çünkü ilacın kanda maksimum toksik konsantrasyon (MTC) düzeyinin üzerinde yer alması toksik etkilere yol açmakta, minimum etkin konsantrasyon (MEC) değerinin altında kalması ise gösterdiği aktivitenin faydasını düşürmektedir [9]. Bu noktada kontrollü ilaç taşınım sistemleri öngörülebilir ilaç seviyelerine ulaşılarak, etken maddenin istenilen süre boyunca terapötik aralıkta ve hedeflenen değerde sabit tutulmasına yardımcı oldukları için son derece caziptirler. Kontrollü ilaç salım sistemi kullanılarak bir tedavi gerçekleştirildiğinde kan plazmasındaki ilaç derişiminde meydana gelecek olan farklılık Şekil 2.1.'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2.1. Kontrollü ve kontrolsüz ilaç salımı durumunda kandaki ilaç derişiminde meydana gelen farklılık [9]

İlaç taşınımı ve kontrollü salımı için farklı şekil ve boyutlarda çok çeşitli nanoyapı kullanıldığı gibi bunlar polimer, lipit, metal ya da seramik malzemelerden elde edilebilmektedir [10]. Vücuda ilaç alımı oral, intravenöz enjeksiyon, nazal ve pulmoner, transdermal, vajinal ve rektal gibi değişik yollarla yapılabildiğinden her sistemin kendine has gerekliliklerini karşılayabilmek üzere farklı ilaç taşıyıcı yapılar geliştirilmeye yönelik çalışmalar da yapılmaktadır [7]. İlaç taşınımına yönelik geliştirilen bu nanoyapılara Bölüm 2.2’de yer verilmiştir.

#### 2.1.1.1. Uyarı-Cevap Mekanizmaları

Bahsedildiği gibi kontrollü ilaç taşınım sistemlerindeki en önemli amaç ilacın vücudun sağlıklı bölgelerinde mümkün olduğunca taşıyıcı içinde kalması sağlanırken, hedeflenen bölgeye ulaşıldığında ise kontrollü şekilde salımının gerçekleştirilebilmesidir. Bu amaç doğrultusunda, uyarı-cevap mekanizması olarak adlandırılan çeşitli fiziksel, kimyasal veya biyolojik iç ve dış uyarıcılardan yararlanılarak ilaç salımın tetiklenmesinin planlandığı ilaç taşıyıcı yapılar tasarlanmaktadır [11]. Uyarı cevap mekanizmaları ile etki gösteren bu nanomalzemeler genellikle ‘akıllı’ veya ‘çevresel duyarlı’ ilaç taşıyıcı yapılar olarak ifade edilmektedirler.

Yaygın olarak tercih edilen uyarıcılar arasında pH, redoks etkisi (kimyasal), sıcaklık, ışık, manyetik alan, ses ötesi dalgalar (fiziksel), enzimler ve inflamasyon (biyolojik) başta gelmektedir [6]. Sıcaklık hem iç hem de dış uyarıcı olarak kullanılabilirken; pH, redoks ve enzimler iç uyarıcı; ışık ve manyetik alan ise dış uyarıcı şeklinde sınıflandırılabilir [12].



Bu uyarılara karşılık, nanomalzemelerin verdiği cevap ise herbir durum için sabit değildir ve taşıyıcı malzemenin özelliğine göre spesifik olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin, sıcaklıkla birlikte Liu ve Jiang'ın çalışmasında yer alan polimerik bazlı miseller genişirken, Kono ve araştırma grubunun geliştirdiği kolajen yapılı dendrimerlerin sıcaklık karşısında degradasyona uğrayarak taşıdıkları ilacı bıraktığı görülmektedir [13, 14] (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Çeşitli iç ve dış uyarıcıların farklı nanotaşıyıcı yapılar üzerinde oluşturduğu cevap mekanizmaları [15]

	<i>Nanotaşıyıcı</i>	<i>Uyarı</i>	<i>Cevap</i>
<i>İç Uyarı</i>	Pt Nanokristal	pH	Protonasyon
	Kuantum noktaları	Enzim	Seçimli yığılma
	Polimerik NP	Redoks	Bozunma
<i>Dış Uyarı</i>	Altın NP	Sıcaklık	Hidrojen bağ değişimi
	Silica NP	Elektrik Alan	Elektrokovalent bağ kırılması
	Titanyumoksit NP	Sesüstü dalga	Kapsül dağılması
<i>Çoklu Uyarı</i>	Altın NP	pH, Işık	Hidrofilik/hidrofobik etkileşim
	Demiroksit NP	pH, Redoks	Bağ kırılması
	Altın NP	pH, Isı	Formasyon değişimi

Böyle bir uyarı ve cevap çeşitliliği arasında doğru bir tercih yapabilmek adına göz önüne alınması gereken en önemli nokta, seçilen uyarıcı ile teşhis veya tedavisi planlanan hastalığın klinik uygulamasının eşleşebiliyor olmasıdır. Bu nedenle kanser tedavisine yönelik taşıyıcı sistemleri incelendiği zaman en çok karşılaşılan uyarı olarak pH'a rastlanması kanser fizyolojisi dikkate alındığında son derece doğaldır. İlerleyen bölümde kanser tedavisi özelinde kontrollü taşıyıcı sistemleri detaylarıyla birlikte ele alınmaktadır.

### **2.1.1.2. Kanser Tedavisinde Kontrollü İlaç Taşınımı**

Kanser dünya genelinde kalp hastalıklarından sonra en çok ölüme sebep olan hastalıklar arasında ikinci sırada gelmektedir [16]. Yalnızca 2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde altı yüz bin ölüm vakasına sebep olan kanser hastalıkları günümüzde yeni teknoloji ilaçlara ihtiyacı hayli yüksek olan bir alanı oluşturmaktadır [17]. Tez çalışması kapsamında üzerinde araştırmalar yapılacak kanser türü olarak seçilen meme kanseri ise dünya genelinde 183 ülkede kadınlarda en yaygın biçimde gözlenen, 115 ülkede ise yine kadınlar arasında ölümlerle sonuçlanma oranı en yüksek olan kanser türü olarak dikkat çekmektedir [18].

Kanser tedavisinde kullanılan başlıca yöntemler ameliyat ve radyoterapi olmakla birlikte bunlar yalnızca bölgesel çözümler sunmaktadır. Üçüncü bir alternatif olarak kemoterapi yani sitotoksik (hücre öldürücü) ajanların doğrudan enjeksiyon yoluyla kana verilmesi yöntemi ön plana çıkmaktadır. Ancak kemoterapinin kan hücresi üretiminin baskılanması ve uygulama esnasında sağlıklı hücre ölümüne de sebebiyet vermesi gibi birtakım önemli kısıtlamaları bulunmaktadır. Özellikle kana verilen kemoterapi ilaçlarının yalnızca belli bir bölümünün tümörlü bölgeye ulaşırken kalan kısmının vücudun sağlıklı doku ve organlarına yayıldığı, bu nedenle de tedavinin etkinliğinin çok ciddi şekilde azaldığı ve hastanın hayat kalitesini düşüren yan etkiler olduğu bilinmektedir. Örneğin pek çok farklı tipte kansere karşı yaygın olarak kullanılan ilaçlardan doksorubusunin kemik iliği ve bağırsak epitel hücreleri gibi hızla bölünen hücrelerde akut toksisiteye, kalp ve karaciğer dokularında ise kronik toksisiteye neden olduğu araştırmalarla ortaya konulmuştur. [19].

Kemoterapi ilaçlarının uygulamadaki bu kısıtlamalarının önüne geçebilmek için kontrollü ilaç taşıma sistemlerinden faydalanmak kaçılmaz bir sonuç olarak ortaya çıkmıştır. Teorik araştırmaları tamamlandıktan sonra ilk kez 1980'li yılların ortalarında klinik aşamaya geçilen ve 1990'lı yılların ortalarında FDA onayı alarak ticarileşen ilaç taşıyıcı sistemler mevcuttur [3]. 1995 yılından bu yana kemoterapi ajanlarını taşımaya yönelik birbirinden değişik nano yapılar üzerinde klinik uygulamalara geçilmiştir. FDA onayına sahip ilk nanoilaçlar olarak bilinen ticari

markalar Doxil ya da diğerk adıyla Caelex (doksorubisin), DaunoXome (daunorubisin) ve Abraxane (paklitaksel) ilaçlarıdır [20].

Kanser tedavisine yönelik geliştirilen bu taşıyıcı yapıların formları veya boyutları farklı olmakla beraber sahip oldukları belli ortak özellikler de mevcuttur. Örneğin, çeşitli uyarı mekanizmaları arasında, kanser tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanan bir nanotaşıyıcı sistem söz konusu olduğunda en çok tercih edilen uyarıcıların başında pH etkisinin başta geldiği görülmektedir. İnsan vücudunun farklı doku ve organları arasında pH değerlerinin değişiklik gösterdiği oldukça net şekilde bilinmektedir. Kötü huylu tümörler için de bu ayırım son derece bariz biçimde gözlemlenmektedir. Kan ve sağlıklı dokularda 7,4 gibi nötr seviyelerdeki pH değerinin, kanser hücrelerinin yüksek metabolizmaları ve bunun sonucunda biriken asidik yan ürünler nedeniyle tümör mikroçevresinde daha düşük seviyeye inerek 5,5-6 pH değer aralığında gözlenmesine sebep olmaktadır. Bu sayede dışarıdan herhangi bir müdahaleye gerek duyulmaksızın ilaç salımını tetikleyici uyarının varlığını oluşturmaktadır [21, 22].

Meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ajanlarının taşınımına yönelik geliştirilen çeşitli yapıların fonksiyonel özellikleri incelendiğinde ise bahsedildiği gibi pH duyarlı özelliğe sahip çeşitli polimerik veya biyopolimerik nanopartiküllerin, misellerin veya lipit bazlı taşıyıcıların ön plana çıktığı fark edilmektedir [22].

Tez kapsamı özelinde ele alınacak meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ajanları gösterdikleri etki mekanizmalarına göre dört ana sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar Çizelge 2.2.'de sunulmaktadır.

Çizelge 2.2. Meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ajanları ve sınıfları [23]

	<i>Etkin Madde</i>	<i>Etki Mekanizması</i>
<i>Antrasiklinler</i>	Doksorubisin Mitoksantron Epirubisin	DNA eşlemede görev alan enzimlerin aktivitesini engelleme
<i>Alkile edici ajanlar</i>	Siklofosfamid Sisplatin	DNA eşlemesi sırasında nükleotitlere bağlanarak aktivitesini engelleme
<i>Toksoidler</i>	Paklitaksel Doksetaksel	Hücrel mikrotübüllerin fonksiyonunu değiştirme
<i>Antimetabolitler</i>	5-florourasil (5-FU) Kapasitabin	DNA eşlemede görev alacak yapı taşlarının yerine geçme

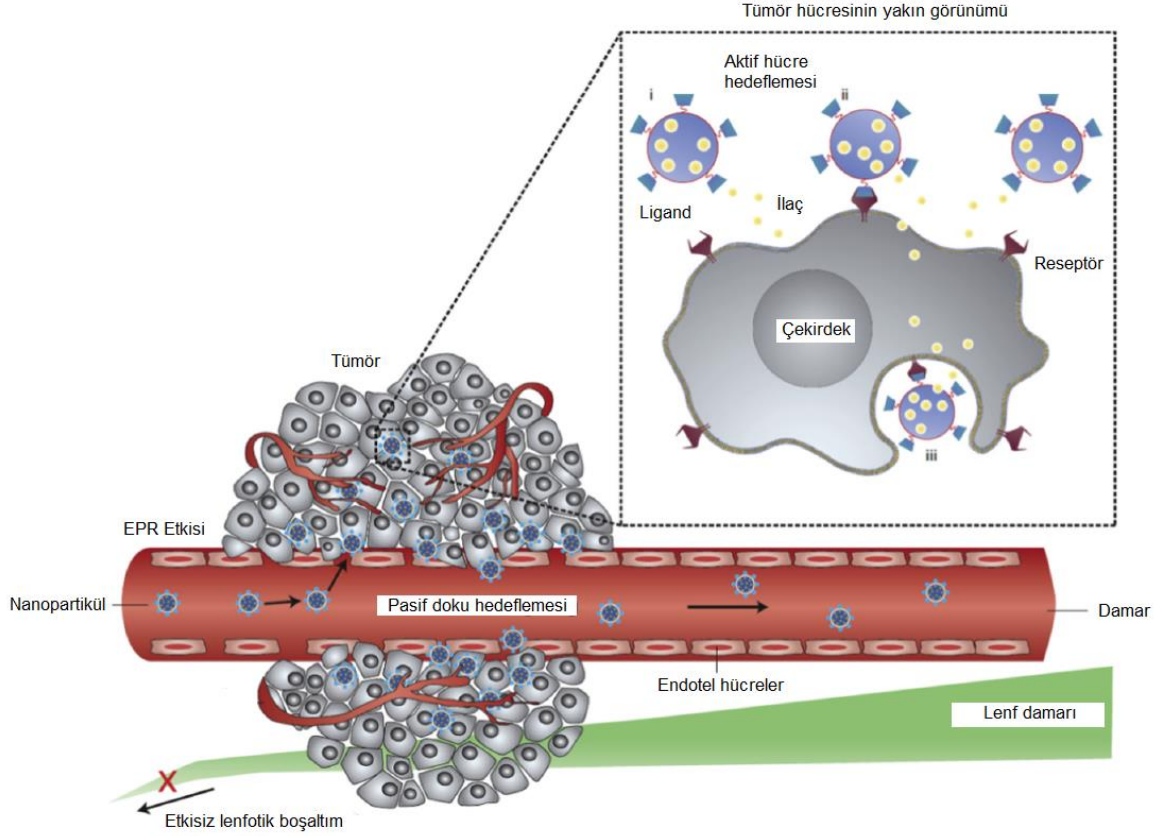
Çizelge 2.2’de sunulan etkin maddelerin tedavi için gösterdikleri etki mekanizmaları kadar gözlenen yan etkiler ve uygulama sırasında dikkat edilmesi gereken hususlar da çeşitlilik göstermektedir. Örneğin, antrasiklin grubuna giren kemoterapi ajanları sahip olduğu yüksek kardiyo toksisiteleri nedeniyle bir hastanın hayatı boyunca alabileceği toplam kümülatif dozaj belirli bir kısıtlamaya sahiptir. Antimetabolitlerde öne çıkan en önemli kısıtlama ise yalnızca hücre bölünmesinin bazı aşamalarında etkinlik gösterdikleri için belirli bir zaman çizelgesi içinde uygulanabiliyor olmalarıdır. Sonuç olarak farklı sınıflara ait etkin maddelerin sahip olduğu avantaj ve dezavantajlar birlikte değerlendirildiğinde daha efektif bir tedavi sağlanabilmesi amacıyla kombine terapilere duyulan ihtiyaçlar gündeme gelmiştir. Çoklu ilaç taşınımını ifade eden kombine terapilere ait detaylı bilgiler Bölüm 2.1.3 altında ele alınmıştır.

### **2.1.2. Moleküler İlaç Hedeflemesi**

Özellikle geçtiğimiz son on yılda kanser hastalıklarının hücresel ve moleküler seviyedeki mekanizmalarının araştırılması kadar tedavi için yeni ilaçların tasarımı konularında da yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu ihtiyaçlar doğrultusunda üzerinde en çok uğraş verilen noktalardan biri de moleküler ilaç hedeflemesidir. Kanser tedavilerinde moleküler ilaç hedeflemesi kemoterapi ilaçlarının yüksek toksisiteleri sebebiyle ciddi seviyede sebep oldukları sağlıklı hücre tahribatının engellenmesi ve tümör içi birikimin artırılması amacıyla tasarlanmaktadır.

İlaç taşıyıcı sistemlerin daha gelişmiş hale gelmesiyle fizikokimyasal özellikleri de kontrol edilebilir olmuş ve bu sayede kullanım amaçlarına yenileri eklenmiştir. Hücresel ve moleküler biyolojideki ilerlemelerle de desteklenen bu yeni teknoloji ilaç taşıyıcı sistemlerle son derece özel tasarlanmış ve karmaşık ilaç hedeflemelerini sağlama imkanı doğmuştur [17].

İlaç hedeflemesi Şekil 2.2'de şematize edildiği gibi pasif tümör hedeflemesi veya aktif hücre hedeflemesi olarak iki farklı mekanizma yardımıyla gerçekleştirilebilir.



Şekil 2.2. Kanser tedavisinde kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerin pasif doku hedeflemesi ve aktif hücre hedeflemesinin şematik gösterimi i) hücre yakınında taşıdığı kemoterapi ajanını bırakması ii) hücre zarına bağlanması ve ilaç salımı iii) hücre içine alımı [16]

Pasif hedefleme olarak bilinen artırılmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi (ing: enhanced permeability and retention effect, EPR) ilk kez 1986 yılında Matsumura ve Maeda tarafından tanımlanmıştır. EPR etkisi kısaca tümörlü bölgelerde damarların iç kısmında yer alan endotel hücrelerinin diziliminde meydana gelen açılımlara ilaç taşıyıcı yapıların birikmesi olarak özetlenebilir. Bu açılımların sebebi kontrolsüz şekilde bölünen kanser hücrelerinin artan besin ve oksijen ihtiyacının karşılanmasıdır. Sağlıklı damar yapılarında 2 nm'den büyük moleküller sıkı dizilim nedeniyle endotel hücreler arasından geçemezken tümör bölgesinde bu sıkı dizilim bozulduğundan dolayı, 10-500 nm boyut aralığındaki makromoleküller dokuya geçebilir ve burada birikir. Buna ek olarak, tümörlü bölgelerdeki etkisiz lenfotik boşaltım nedeniyle de biriken moleküller sistem dışına çıkamaz hale gelir. Böylelikle tümör bölgesindeki damarsal yapının

bozunmasından faydalanılarak pasif hedefleme gerçekleştirilir. Bu çok dikkat çekici özellik, tümör-hedefli kemoterapide bir dönüm noktası olarak kabul edilmiştir ve antikanser ilaç geliştirilmesinde oldukça ümit vericidir [24].

Pasif hedefleme klinikte uygulama bulmuş olmasına karşın, bazı tümörlerde damar geçirgenlikleri farklı olduğundan EPR etkisi ile taşınım gerçekleşemeyebilir. Bu nedenle nanotaşıyıcı sistemlerle aktif hedefleme yapılabileceği yaklaşımı ortaya çıkmıştır. Ancak aktif hedefleme ile tümürlü bölgeye pasif hedeflemeden daha yüksek miktarda ilaç birikiminin sağlanabileceği gibi bir yanılgıya düşülmemesi gerekmektedir. Aktif hedefleme yalnızca ilacın bu bölgeye seçimli olarak ulaşmasını sağlayarak terapötik etkinliğini arttırmaktadır [25].

Aktif hedefleme, kanser hücrelerinin yüzeylerinde yoğun biçimde yer alan reseptör (alıcı) veya antijenlere seçimli olarak bağlanacak özel ligandlara modifiye edilmiş ilaç taşıyıcı sistemler ile sağlanır [10]. Bu sayede kemoterapi ajanlarının sitotoksiteleri artırılarak sağlıklı hücrelerin göreceği zarar düzeyi de minimuma indirilmiş olur. Aktif hedefleme ile yalnızca yan etkilerin önüne geçmekle kalmayıp ilaçların terapötik etkilerinin arttırıldığı ve çoklu ilaç direncinin (ing: multi drug resistance, MDR) üstesinden gelindiği de bilinmektedir [16].

Farklı kanser türleri için hastalığın spesifik özellikleri ve hangi aşamada olduğu göz önüne alınarak değişik liganlardan yararlanmak mümkündür. Kullanılan ligandlar genellikle peptit, hormon, vitamin veya büyüme faktörleridir [26, 27]. Bu liganların birden fazlasının aynı anda taşıyıcı yüzeyine bağlanması ile çoklu hedefleme gerçekleştirme imkanı da bulunmaktadır. Bazı ligand türleri ve kullanım alanları şu şekilde örneklendirilebilir:

*Folik asit hedeflemesi:* Folik asit (FA) hem epitel kanser türlerinde hem de hematolojik kanserlerde hücre yüzeylerinde oldukça yoğun miktarda yer almasına karşılık, sağlıklı dokularda oldukça az bulunan folik asit reseptörleri (FR) nedeniyle aktif hedefleme aracı olarak kullanılması çok sıklıkla tercih edilen bir ligand türüdür [16, 26]. Folik asit ile konjuge edilmiş nanotaşıyıcılar bu reseptöre bağlanarak hücre içine alındıktan sonra taşıdığı kemoterapi ilacını kanserli hücrenin sitoplazmasına bırakır [10]. FR'nin bilinen üç farklı türde çeşiti mevcuttur, bunlar

FR- $\alpha$ , FR- $\beta$  ve FR- $\gamma$ 'dır. FR- $\alpha$  özellikle yumurtalık kanseri ve bunun yanı sıra beyin, meme, akciğer, böbrek gibi diğer epitel kanser dokularında yer alırken, FR- $\beta$  ise kronik veya akut miyeloid lösemi gibi tümörlerde gözlenir [26].

FR hedefleme çalışmalarında şimdiye dek iki farklı strateji üzerinde durulmuştur. Folik asitin kendisine ek olarak FR'ye bağlanabilen bir diğer molekül, mAb Mov18 adındaki monoklonal antikordur. Ancak folik asitin stabilitesinin yüksek oluşu, daha düşük maliyete sahip olması ve bilinen yan etkilerinin bulunmaması onu daha tercih edilir kılmıştır [26].

*Transferin hedeflemesi:* Transferin, hızlı büyüyen hücre zarlarından demir geçişini destekleyen bir glikoproteindir. Tümörlü bölgedeki hücrelerin yoğun demir ihtiyacı dolayısıyla yüzeylerinde transferin reseptörleri fazla miktarda varlık göstermektedir. Folik asitte olduğu gibi transferin ile konjuge edilmiş nanotaşıyıcılar bu reseptörlere bağlanarak taşıdıkları kanser ilacının salımını gerçekleştirir. Transferin reseptörlerinin temel alan ilaç hedeflemesi özellikle kan-beyin bariyerinin endotel hücrelerindeki yoğun dağılım nedeniyle beyine verilecek olan kanser ajanlarının uygulamasında tercih edilebilir. Gan ve Feng bu stratejiyi kullanarak biyobozunur yapıdaki poli(laktit)-D-alfa-tokoferil polietilen glikol süksinat diblok kopolimer nanopartikülleri ile kan-beyin bariyerinden dosetaksel taşınımını sağlamıştır [16].

*Hiyalüronik asit hedeflemesi:* Hiyalüronik asit (HA) biyobozunur ve biyoyumlu yapısının yanı sıra, bazı kanser hücrelerinin yüzeylerinde bulunan CD44 reseptörüne seçimli olarak bağlanma özelliğine de sahiptir ve bu sayede ilaç hedeflemesine oldukça uygundur. Choi ve arkadaşlarına ait çalışmada, hiyalüronik asitin kendiliğinden kümeleşmesi ile sentezlenen nanopartiküllerin ile baş-boyun kanserinde yoğun biçimde yer alan CD44 reseptörlerini aktif olarak hedeflenebildiği ve flüorasan boyaması ile nanopartiküllerin hücre içine alınımının ve birikiminin gerçekleştiği de gösterilmiştir [28].



### 2.1.3. Kombine Terapi

Tıpta gelişen teknolojilere ve elde edilen pek çok ilerlemelere karşın, kanser dünya üzerinde en çok ölümlü sonuçlanan hastalıklar arasında yer almaya devam etmektedir. Bu durumun arkasında yatan en önemli sebep olarak kanserin son derece kompleks ve heterojen bir hastalık olması dikkat çekmektedir. Genel anlamıyla ifade edilmesi gerekirse kanser, hücrelerin kontrol dışında bölünmesi veya farklılaşması ile ortaya çıkmaktadır ve tedavisinde de toksik değerlerinin yüksekliği açısından son derece riskli ilaç grupları ile çalışılmaktadır [19]. Bu zorluklar arasında özgül olmayan yan etkiler, ilacın kandan hızlı şekilde sirküle olması nedeniyle yüksek doz miktarlarıyla tedavinin sürdürülmesi en yaygın şekilde bilinenler olarak sayılabilir ancak, tek bir kanser ilacının sürekli şekilde uygulanmasıyla ortaya çıkan ve kemoterapi etkinliğini önemli ölçüde azaltan çoklu ilaç direnci (ing: multi drug resistance, MDR) de hayli önem taşımaktadır [29].

Kanser tedavisi sırasında karşılaşılan tüm bu zorlukların üstesinden gelebilmek için önceleri daha çok araştırma safhasında olan kombine (birleşik) terapi yöntemleri artık klinik uygulamada da daha fazla kullanılır hale gelmiştir. Kombine terapi en yalın tanımıyla, iki ya da daha fazla terapötik ajanın birlikte uygulanması veya farklı tedavi yöntemlerinden (kemoterapi, radyoterapi, hormon terapisi vs.) aynı anda yararlanılmasıdır. Tüm bu farklı yaklaşımlar arasında farklı kemoterapi ajanlarının tek seferde uygulanması en çok tercih edilen uygulamadır [30]. İkili ilaç taşıyım sistemleri de bu ihtiyaca cevap verecek şekilde tasarlanmaktadır.

İkili ilaç taşıyım sistemlerinin sağladığı en önemli avantajlardan biri MDR oluşumuna engel olmasıdır. Bu noktada MDR'yi daha detaylı şekilde tanımlamak gerekmektedir. MDR, hastanın üzerinde tedavi süresi boyunca daha önce hiç uygulanmayan ilaçlara karşı bile bir direnç mekanizması oluşumunun gözlemlenebildiği durumlardır. Bu yan etkinin ortaya çıkmasına aynı kanser ilacının tekrarlı biçimde hastaya verilmesi neden olabilmektedir. MDR gelişen vakalarda karşılaşılan en büyük problemler; ilacın hücre içine girişinde azalma veya hücre dışına atma işlevinde artışla ortaya çıkan hücre içi ilaç birikiminde azalma, ilaç-hedef ilişkisinde azalma veya ilaç dağılımında değişiklik şeklinde sıralanabilmektedir [31]. MDR oluşumundan sonra ilacın aktivite göstermeye

devam edebilmesi için uygulanan dozun arttırılması gerekir ki bu da tüm vücuda yayılan (sistemik) bir toksisiteyi doğurabilir. Dolayısıyla böyle bir durumda başvurulabilecek en iyi alternatif ikili ilaç uygulamasına geçmek olacaktır [29].

Kombine (birleşik) terapinin MDR'yi yenmenin yanı sıra getirdiği farklı avantajlar da bulunmaktadır. Bunlar arasında ilk olarak sağladığı sinerjetik etki göze çarpmaktadır. Klasik yöntemlerle uygulanan kemoterapide vücuda tek bir ilaç verilirken, bu ilaç ile kanserli hücrelerin belli bir metabolik döngüsü hedef alınmış olur ancak kombine tedavi sırasında çoklu ilaç kullanıldığı için birden fazla metabolik döngüye, bölünme safhasına veya gene etki ederek kanserli dokuyu elimine etme şansı yükseltilebilmektedir [30].

Tekli ilaç uygulamasının aksine kombine terapide farklı kemoterapi ilaçlarının bir arada veriliyor olması sayesinde ilaçlar daha düşük dozajlarda uygulanabildiği için getirdiği toksik yan etkiler de etkinliklerinden ödün verilmeden azaltılmaktadır [24, 30].

Kombine terapilerin daha olumlu sonuçlar verdiği ve tekli ilaç uygulamalarına karşın hayatta kalma oranlarını yükselttiği bilinmekle birlikte kendi içinde birtakım limitasyonları da mevcuttur. Kullanılacak ilaçların optimum oranlarda verilmesi ve hedeflenen bölgeye kadar bu oranın sabit tutulması, biodağılımlarının doğru ayarlanması ve benzer olmayan farmakokinetik özelliklerinden bir bütün halinde faydalanılmasının sağlanması gerekmektedir. Bu zorlukların üstesinden gelebilmek için, kemoterapik ajanları tek bir nanoformülasyon altında vücuda vermek hayli avantajlı bir çözüm sunmaktadır [24].

## 2.2. İlaç Taşıyıcı Yapılar

Taşıyıcı sistemlerinin yarattığı avantajların daha görünür hale gelmesiyle birlikte, bu amaçlar doğrultusunda kullanılan nano veya mikro boyuttaki taşıyıcılar üzerinde de araştırmalar yoğunlaşmış ve çeşitlilik artmıştır. Bu gelişen yeni nesil taşıyıcılarla birlikte yalnızca ilaç alanında değil, doku mühendisliği, biyomalzemeler ve medikal ürünler gibi diğer biyoteknoloji uygulamalarında gelişmeler kaydedilmiştir.

Önceleri makro boyutta çalışılan taşıyıcı sistemler yüksek yükleme kapasiteleri, uzatılmış ilaç salım profilleri ile tekrarlanan dozaj miktarlarını azaltmaları gibi olumlu özelliklerine rağmen doku hasarına sebebiyet vermeleri, bazı durumlarda cerrahi müdahale gerektirmeleri ve sistemik sirkülasyonda gözlenen kısıtlamalar gibi dezavantajları dolayısıyla zaman içinde mikro boyuta devamında ise nano seviyelerine kadar küçültülmüştür. Nanotaşıyıcı sistemlerin getirdiği en önemli avantajlar sistemik sirkülasyonda daha uzun süre kalabilmeleri, dokuya daha iyi nüfuz edebilmeleri (EPR etkisi), hücresel hedeflemeye uygunlukları ve boyutlarının küçüklüğü ile hücre içi alım mekanizmalarına uyumluluklarıdır [9].

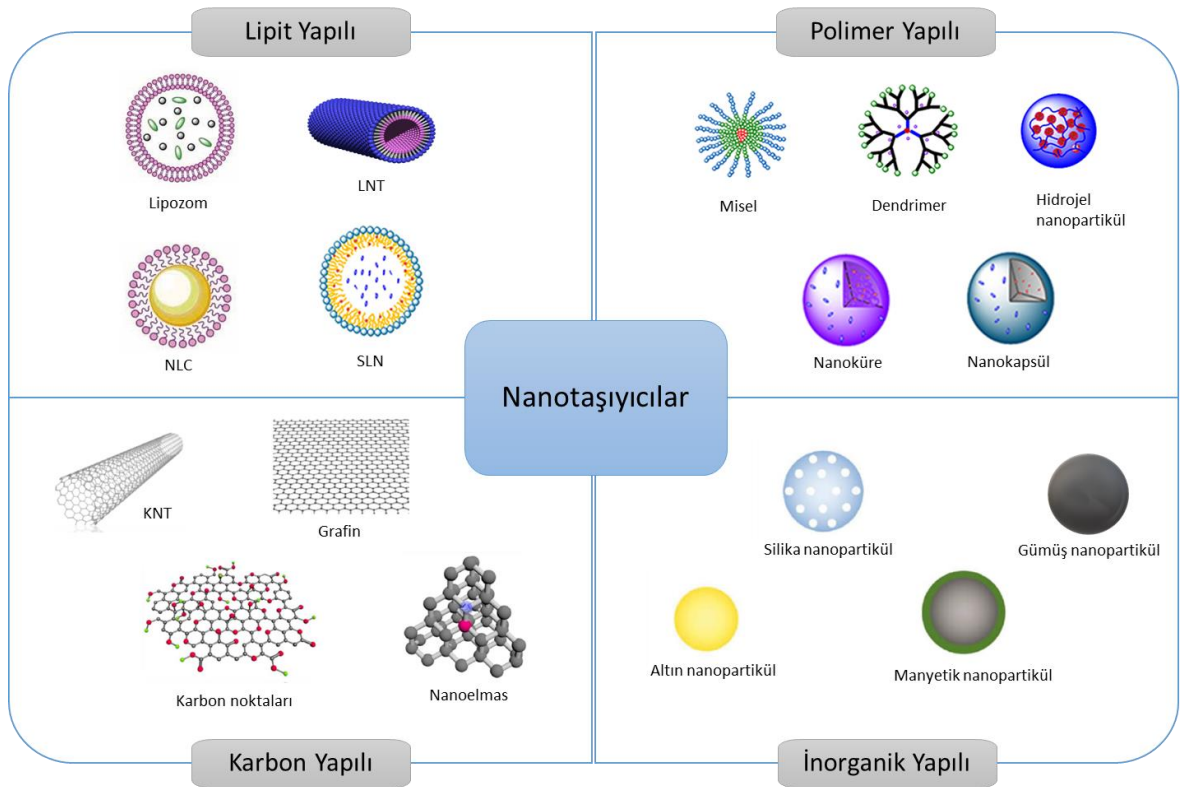
Gittikçe daralan spesifikasyonlarına rağmen ideal bir ilaç taşıyıcı yapının sahip olması gereken ortak özellikler varlığını korumaktadır. Bunlar aşağıda görüldüğü gibi beş ana başlıkta özetlenebilir [19]:

- Biyouyumlu ve/veya biyobozunur yapı
- Yüksek ilaç taşıma kapasitesi
- Sıfır veya ihmal edilebilir düzeyde prematüre ilaç salımı
- Sağlıklı hücre ve dokuları korumak adına hedeflenen bölgeye özgü salım mekanizması
- Hedeflenen bölgede etkin ilaç dozajına ulaşılmasını sağlayan kontrollü bir ilaç salım mekanizması

Bu özellikler arasında biyouyumlu/biyobozunur olmaları, canlı metabolizmasında birikim nedeniyle gözlenebilecek toksik etkileri elimine edebilmek ve hücresel işlevlerde meydana gelebilecek tahribatları engellemek adına son derece

önemlidir. Terapötik ilaçlar ise bu nanotaşıyıcılara enkapsülasyon, yüzeye tutturma veya kimyasal bağlar aracılığıyla yüklenebilir [10, 32].

Belirtilen hedefler gözetilerek, polimer, lipit, albümin veya seramik bazlı pek çok farklı malzeme ve geometride nanotaşıyıcı yapı veya nanojel tasarlanmış ve çeşitli hastalıkların tedavisinde ve görüntülenmesinde ya da gen ve protein aktarımında kullanılmıştır [33]. Genel hatlarıyla bu nanotaşıyıcı yapılar belli bir sınıflandırmaya tabi tutulacak olursa Şekil 2.3'te gösterildiği gibi bir sonuç elde edilebilir.



Şekil 2.3. Nanotaşıyıcı sistemlerin kullanılan malzemelere göre sınıflandırması [34-36]

Literatürde bulunan tüm nanotaşıyıcı yapıları sistematik bir biçimde detaylandırmak konunun uygulama alanlarının çeşitliliği düşünüldüğünde elbette oldukça zor olacaktır. Bu nedenle, yalnızca kanser tedavisine yönelik nanotaşıyıcı malzemeleri ele almak daha akıllıca bir yaklaşım haline gelebilir.

Kanser tedavisinde kullanımı araştırılan taşıyıcı yapılar ise yapıldıkları malzemeler, sentez metotları veya geometrileri düşünülerek farklı sınıflara ayrılabilir. Kemoterapi uygulamalarında en yaygın şekilde karşımıza çıkan küresel formdaki nanotaşıyıcılar lipit yapılı lipozomlar, katı lipit nanopartiküller (SLN) ve nano yapılı lipit taşıyıcılardır (NLC). Bunlara karşılık polimerik bazlı olanlar ise miseller, dendrimerler, nanokapsüller, metalik ve hibrid nanopartiküllerdir. Ayrıca silindirik formdaki karbon nanotüpler (KNT) de sıklıkla tercih edilmektedir [19].

HeLa hücreleri tarafından küresel olmayan partiküllerin de hücre içine alınımının gerçekleştiğinin görülmesiyle, farklı geometrilerdeki taşıyıcılar daha sıklıkla araştırılır hale gelmiştir [1]. Buna ek olarak son dönemde hem lipit yapısıyla biyouyumluluğu daha iyi sağlayan hem de geometrisinin getirdiği yüksek ilaç taşıma kapasitesi ve kan sürkülasyonuna karşın dayanıklı olması gibi avantajları da lipit nanotüpleri hayli ilgi çekici hale getirmiştir [37].

Tez araştırması kapsamında taşıyıcı sistem olarak kullanılan yapılar da özel olarak tasarlanmış ve sentezi gerçekleştirilmiş bir lipit nanotüp örneğidir ve ilerleyen bölümlerde detaylarından bahsedilmektedir.

### **2.2.1. Lipit Nanotüpler**

Nanotüp yapıları; yüksek yüzey alanı hacim oranları, stabilite ve ayarlanabilir boyut değerleri (çap, uzunluk, duvar kalınlığı) gibi üstün özelliklere sahip malzemeler olması sebebiyle nanoteknolojinin elektronik, medikal, sensör vs. uygulamalarında sıklıkla incelenen ve üzerinde iyileştirmeler yapılan bir konumdadır. Bu alandaki çalışmalar üstün mekanik ve elektriksel özellikleri ile KNT'ler üzerine yoğunlaşsa da yüksek enerji gerektiren üretim aşamaları, maliyetleri ve sorgulanmaya başlanan toksik etkileri dolayısıyla nanotüp yapılarında alternatif araşığına yönelmesine neden olmuştur [38].

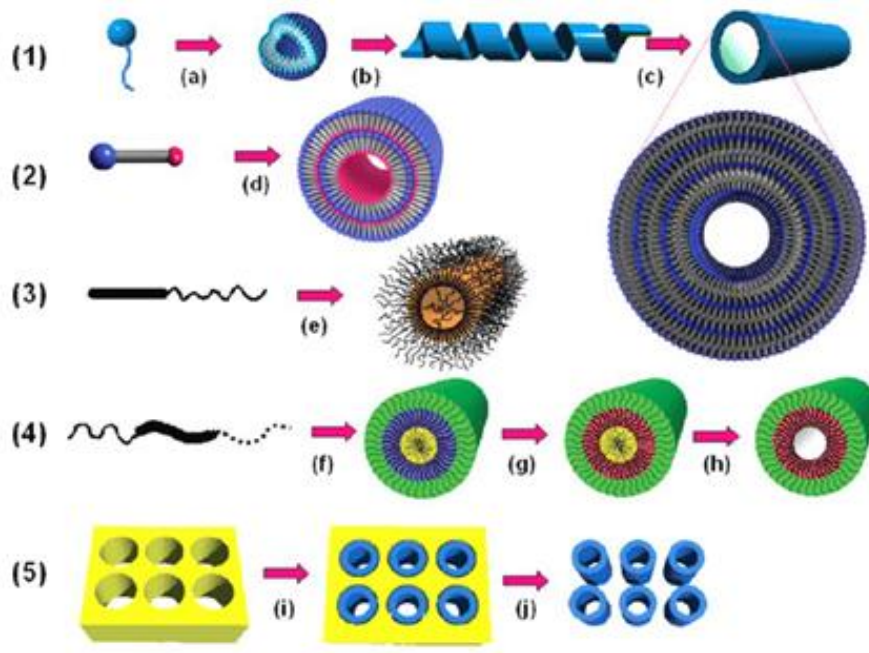
Bu ihtiyaçlar doğrultusunda kazandığı önem giderek artan organik yapıdaki nanotüplerin tarihçesine bakıldığında, 1977 yılında yayınlanan Kunitake ve Okahata'nın çalışmasında tamamen sentetik yapıdaki bir çift tabakalı membrandan su içerisinde kendiliğinden kümeleşme yöntemiyle ilk kez küresel

kesecikler elde edildiği görülmektedir [37]. Bu bulgu doğrultusunda membranlardan basit ve fonksiyonel yapılar üretilebileceği fikri ortaya atılmıştır. 1984 yılında ise ABD ve Japonya'dan üç farklı araştırma grubunun, su içerisinde kendiliğinden kümeleşerek tek boyutlu tübüler nano yapıları oluşturan fosfolipit veya glutamik asit bazlı amfifilik moleküllerden bahsettiği görülmektedir [36].

İlaç ve protein taşıma ya da gen aktarımı gibi yaygın biyomühendisik uygulamalarının yanı sıra LNT'ler, nanotel ya da nanoçubuk eldesinde kullanılan bir mikroreaktör, nanotelleri kendi yüzeylerinde metalize ederek oluşturmak için yararlanılan bir şablon, çiftli lipit tabakaları arasına gömülü nanopartikülleri barındıran bir taşıyıcı gibi farklı şekillerde de karşımıza çıkmaktadırlar [39].

Lipit nanotüpler temel olarak, hidrofilik ve hidrofobik fonksiyonel grupları içeren amfifilik moleküllerin kendiliğinden kümeleşme ile oluşturduğu, açık-uçlu, içi boş silindirik nanotaşıyıcılardır. Bu amfifilik moleküllerin kıvrılarak nanotüp yapısı oluşturmadaki etkenler genellikle, kovalent olmayan etkileşimlerden sayılan Van der Waals çekimleri, hidrojen bağı oluşumu veya  $\pi$ - $\pi$  yığılma etkileşimidir [36].

Farklı oluşum mekanizmaları ile LNT'leri elde edebilmek mümkündür. Bu yöntemler arasında yer alan kiral moleküllerin, bolaamfillerin ya da blok kopolimerlerin kendiliğinden kümeleşmesi, moleküler yontma ve gözenekli yapıların şablon olarak kullanılması teknikleri Şekil 2.4'te şematize edilerek gösterilmiştir [40].

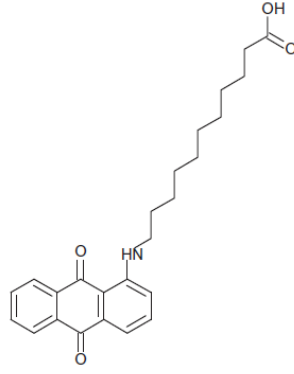


Şekil 2.4. Lipit nanotüplerin farklı oluşum mekanizmaları [40]

Bu yöntemler arasında kendiğinden kümeleşme prosesi, herhangi bir kovalent bağ oluşumuna gerek duyulmaksızın moleküller arası itme ve çekme kuvvetlerinde hassas bir denge kurulması esasına dayandığı için oldukça avantajlıdır ve üretim kolaylığına sahiptir [41].

### 2.2.1.1. Aqua Lipit Nanotüpler

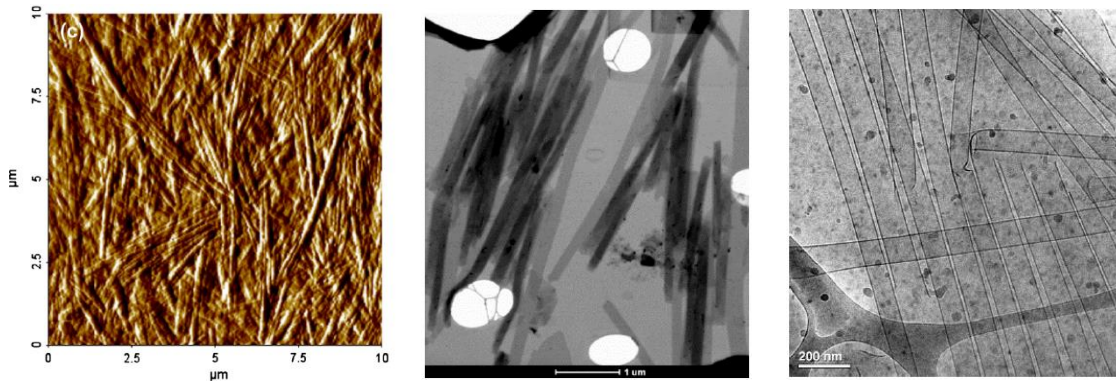
Tez çalışması kapsamında kullanılan lipit nanotüp formundaki taşıyıcılar, araştırma grubumuzda özel olarak tasarlanmış ve karakterizasyonu tamamlanmış, Aqua kısa adıyla isimlendirilmiş lipit nanotüplerdir. Aqua LNT'lere özgünlüğünü kazandıran, monomer olarak kullanılan amfifilik özellikteki,  $C_{25}H_{29}NO_4$  kapalı formülüne sahip ve zincir uzunluğu 10 olan bir hidrokarbon zinciriyle birbirine bağlanmış karboksilik asit ve amino antrakınon fonksiyonel gruplarından oluşan AQ-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>COOH veya kısaca Aqua şeklinde adlandırılan moleküldür [38]. Yapısındaki karboksilik asit ve antrakınon grupları sırasıyla hidrojen bağları oluşturma ve  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri gösterme eğilimleri yüksek gruplar olduğu için nanotüp oluşumuna katkı sunmaktadırlar (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Aqua molekül yapısı

Aqua molekül sentezinin ardından önceden belirlenen ve nanotüp oluşumunun optimum düzeyde sağlandığı bilinen koşullar ve prosedür kullanılarak Aqua LNT'lerin lipid nanotüp oluşumunda en basit ve en avantajlı yöntem olarak ön plana çıkan kendiliğinden kümeleşme yöntemi ile eldesi gerçekleştirilmiştir. Aqua LNT'lerin karakterizasyon basamakları ise şekil, boyut, yük ve stabilite analizleri ile yapılmıştır.

AFM, STEM ve cryo-TEM ölçümleri birlikte değerlendirildiğinde Aqua LNTlerin düzgün silindirik yapılara sahip olduğu açık bir şekilde ortaya konulmuştur. AFM analizinde kullanılan tip ve tarama yöntemine bağlı olarak kümeleşme boyutları olduğundan daha yüksek değerlerde ölçülebilmektedir. Bu nedenle STEM analizlerinden elde edilen boyut değerleri doğru değerler olarak tespit edilmiş ve Aqua LNT'lerin çapları 80-160 nm, uzunlukları 4-8 µm olarak belirlenmiştir [2].



Şekil 2.6. Eşmolar miktarda etanolamin varlığında kendiliğinden kümeleşme yoluyla elde edilen Aqua nanotüp yapısının a) AFM b) STEM c) cryo-TEM görüntüleri [2]



Aqua LNT'lerin stabilitesi test edilirken seyretme ve kurutma durumlarında nasıl bir davranış sergilediklerine bakılmıştır. Aqua LNT'lerle tasarlanan bir ilaç taşıma sisteminin vücuda verilmesi halinde kana karışarak yüksek oranda seyrelme faktörüne maruz kalacağı bilinmektedir. Böyle bir durumda Aqua LNT'lerin morfolojisinde bir değişiklik oluşmaması önem taşıdığı için seyrelmeye karşı dayanımları incelenmiştir. Yapısındaki karboksilik asit grubunun varlığı sayesinde pH duyarlı bir molekül olan Aqua'nın çözelti pH'ı sabit tutulduğu sürece çok yüksek oranda seyreltmeye karşı kararlı olduğu ancak pH kontrolü sağlanmadığında nanotüplerde açılma meydana geldiği belirlenmiştir [38].

Aqua LNT'lerin dayanımları belirlenirken bakılan bir başka parametre ise kurumaya karşı yapısal bir değişiklik olup olmadığıdır. Bu amaçla gerçekleştirilen AFM analizlerinde kuru numunelerde silindirik şeklin korunması ve yapılarda herhangi bir çökme veya kırılma ortaya çıkmaması, bu yapıların morfolojilerinin kurumaya karşı dayanıklı olduklarını ve kuruma esnasında büyük değişikliklere maruz kalmadıklarını açıkça göstermektedir [38].

Bir başka stabilite göstergesi olarak ele alınan zamana karşı dayanım parametresinde de 6 aylık süre boyunca yapısal özelliklerinde farklılaşma göstermeyen Aqua LNT'lerin son derece kararlı oldukları belirlenmiştir [2].

Aqua LNT'lerin işlevselliğini ve ilaç taşınımı alanındaki uygulanma potansiyelini araştırmak adına daha önce grubumuzda yapılan çalışmalarda yaygın olarak kötü huylu tümörlerin tedavisinde kullanıldığı bilinen doksorubisin (DOX) etkin maddesinin alım-salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Buna göre yüksek madde tutma kapasitesiyle öne çıkan Aqua LNT'lerin, salım performansında da iyileştirmelere gidildiği takdirde son derece umut vaat edecek bir taşıma sistemi olabileceği görülmüştür [42].

### 2.3. Tabaka-Tabaka Kaplama

İlaç taşıyıcı sistemlerin fonksiyonelleştirilmesi, üstün özelliklerle donatılması ve moleküler hedefleme sağlanması gibi amaçlarla tasarım aşamasından sonra farklı teknikler kullanılarak geliştirilmeleri söz konusu hale gelmiştir. Bu yaklaşımlar arasında tabaka-tabaka-kaplama (TTK) yöntemi uygulama kolaylığı, düşük maliyeti ve kısa süreli prosedürleri gibi avantajları dolayısıyla ön plana çıkmaktadır. TTK yönteminin bir diğer önemli avantajı ise uygulamada kullanılacak malzeme çeşitliliğidir. Bunlar arasında polietilenimin (PEI), polyakrilik asit (PAA), poliallilamin hidroklorür (PAH) gibi geleneksel polielektrotlar; kitosan, alginat vb. biyomalzemeler veya inorganik materyaller yer almaktadır [43].

TTK yöntemi iki farklı yüzey arasında hidrojen bağı, kovalent bağ veya biyolojik çekim gibi çeşitli etkileşimlerle sağlanabildiği gibi en yaygın olarak tercih edilen etkileşim türü ise zıt yüklü malzemeler arasında kurulan elektrostatik etkileşimlerdir. Bu şekilde yüzeyler üzerinde ince film tabakaları oluşturmanın mümkün olduğunu öne süren ilk çalışmalar 1965-66 yıllarında Iler ve Kirkland tarafından ortaya konulmuştur. Decher and Hong ise 1991 yılında bu çalışmalarını ilk kez tamamiyle karakterize edebilen bilim insanları olmuşlardır [44].

Zaman içerisinde elektronik, mekanik, optik gibi farklı alanlarda araştırılan her türlü nanofabrikasyon çalışmalarında dikkat çeken hale gelen TTK tekniğinin biyomedikal uygulamalara adapte edilmesiyle ilaç taşınımında da yüksek bir uygulama potansiyeli barındırdığı gözlenmiştir. Özellikle terapötik ajanların taşınımında giderek daha sıklıkla tercih edilen bir konuma ulaşan TTK tekniği sayesinde terapötik ajanların taşınımında ortaya çıkan en ciddi problemlerden olan yüksek ani ve hızlı salım değerlerinin azaltılması ve uzatılmış salım profillerinin elde edilmesi konusunda son derece umut vaad eden çalışmalar yapılmıştır. Bu iki temel iyileştirme etkin maddelerin sistemik toksisitesinin azaltılabilmesi ve tümörlü bölgede hedeflenen terapötik değerinin sürdürülebilirliğinin daha uzun süre sağlanabilmesi açısından da ayrıca kritik öneme sahiptir [45].

TTK yöntemi kullanılarak fonksiyonelliği arttırılan nanotaşıyıcılarda, uygulama performansı her bir yüzey kaplaması sonrasında çeşitli enstürmanlar ile takip

edilerek karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmektedir. Bu analiz teknikleri ile değişimi izlenen parametreler genel olarak taşıyıcı boyutları ve yüzey yüküdür. Taşıyıcı boyutları SLS-DLS (Statik ve Dinamik Işık Saçılımı) analiziyle doğrudan ölçümler ile sağlanabildiği gibi AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu), SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) veya TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu) gibi çeşitli görüntüleme teknikleri üzerinden elde edilen görüntülerden de ölçülebilmektedir. Bir diğer önemli kaplama parametresi olan yüzey yükündeki değişimler ise zeta potansiyel ölçümleri ile takip edilerek bu değerlerin pozitif ve negatif büyükler arasındaki geçişi gözlemlenmektedir.

#### 2.4. İlaç Salım Kinetiği

Literatürde rastlanan salım mekanizmaları genellikle; çözünme kontrollü, enkapsülasyon-çözünme kontrollü, difüzyon kontrollü, difüzyon-çözünme kontrollü, veya ozmotik kontrollü salımlardır [46]. Kontrollü ilaç salımında, taşıyıcı bir sistemden ilaç salımın arkasında bu mekanizmalardan hangisinin bulunduğunu daha iyi anlayabilmek adına salım profillerinin modellenmesi ve kinetiğinin incelenmesi yoluna gidilmektedir. Bu modeller arasında lipit veya polimer bazlı pek çok sisteme uygunlukları bilinen ve sıklıkla tercih edilenler ise birinci-derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modelleridir [47, 48].

*Birinci-Derece Modeli* 1967'de Gibaldi ve Feldman tarafından önerilen birinci-derece modeline göre, salınmadan kalan ilaç miktarının logaritmasının, salım için geçen süreyle orantılı olduğu söylenmektedir. Eşitlik 2.1'de gösterilen formül üzerinden açıklanabilen birinci-derece modelinin, difüzyon kontrollü salım ve çözünme kontrollü salım çalışmalarındaki sistemlere uygunluk gösterebildiği gibi suda oldukça yüksek çözünürlüğe sahip olan ilaçların suda çözünür olmayan ve şişme özelliği göstermeyen taşıyıcılardan salımıyla uyuşabildiği de literatürde yapılan çalışmalarda yer almaktadır [49].

$$\ln(1 - F) = -k_1t \quad (2.1)$$

$k_1$ : birinci-derece salım hız sabiti

Higuchi Modeli: 1960'lı yıllarda öne sürülen Higuchi modelinde, suda çözünebilen ve çözünürlüğü nispeten düşük olan ilaçların yarı-katı ve/veya katı taşıyıcılardan salımı açıklanmaktadır. Higuchi modeline uygun salım davranışında Eşitlik 2.2'de gösterildiği gibi salınan ilaç kesri zamanın karekökü ile orantılı olmaktadır [50].

$$F = k_H \sqrt{t} \quad (2.2)$$

$k_H$ : Higuchi salım hız sabiti

Korsmeyer-Peppas Modeli: 1983 yılında Korsmeyer tarafından geliştirilen bu modelde ilaç salımının zamanın üssü ile ilişkilendirildiği yarı empirik bir eşitlik olan Eşitlik 2.3 türetilmiştir. Korsmeyer-Peppas modeline göre ilacın salım kesri, zamanın üssü ile ilişkilendirilmiştir. Eşitlikte verilen  $k_{KP}$  Korsmeyer-Peppas salım hız sabiti ve n ise salımın derecesini göstermektedir.

$$F = k_{KP} t^n \quad (2.3)$$

$k_{KP}$ : Korsmeyer-Peppas salım hız sabiti

Eşitlik 2.3'te yer alan n değerinden salım mekanizmasının karakterize edilmesinde yararlanılmaktadır. n değerine göre salım üç farklı sınıflandırmaya sahiptir. Bunlar, n değeri 0,45'ten küçük veya 0,45 olduğu durumda Fick yasasına uyan (Fickian) difüzyon mekanizması, 0,45 ile 1 arasında olduğu durumda ise Fick yasasına uymayan (non-Fickian) difüzyon mekanizmasıdır.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, Fick yasasına uyan durumlarda, salımın yüklenen ilaç miktarıyla orantılı ve yüklenen malzeme ile taşıyıcının kimyasal yapılarının uyumluluğuna bağlı olarak hızlanıp yavaşlayabildiği görülmektedir. Fick yasasına uymayan durumlarda ise salımın yine difüzyonla gerçekleşmekte olduğu fakat bu koşulda erozyon ya da taşıyıcı malzemenin şişmesi gibi başka kuvvetlerin de salımı etkilediği vurgulanmaktadır. Salım derecesini gösteren n değerinin 1'in üstüne çıktığı koşulda ise yine difüzyon ve erozyon mekanizmalarının etkili olduğu ancak difüzyondansa erozyonun daha baskın hale gelmeye başladığı söylenebilmektedir [46, 51].

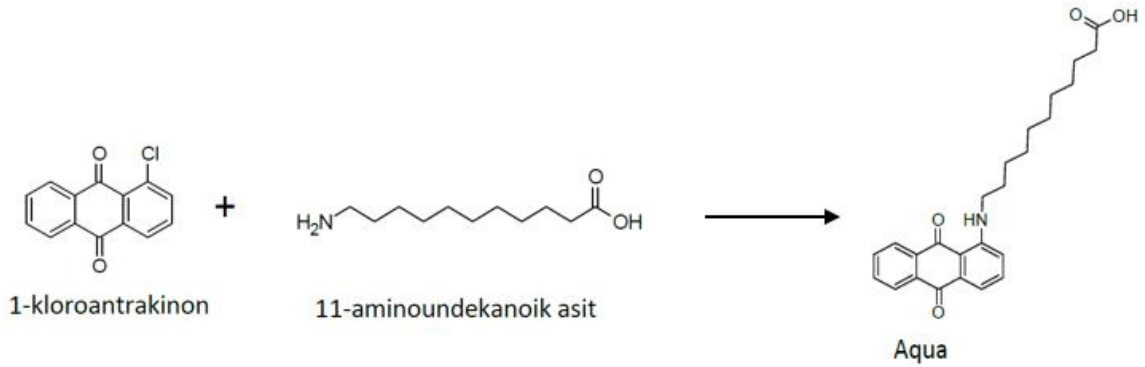
### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Kimyasal Maddeler

Yüksek lisans tez kapsamındaki deneysel çalışmalarda kullanılan 1-kloroantrakinon (%98), 11-aminoundekanoik asit (%97), etanolamin (%99), aljinat, folik asit (%97), kitosan (düşük molekül ağırlıklı), mitoksantron dihidroklorür (%97), doksorubisin hidroklorür (%98) maddeleri Sigma-Aldrich'den, 1-(3-dimetillaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC - %98) Acros Organic'ten ve DMSO (susuz - % 99) Fisher Bioreagents'tan temin edilmiş ve sonrasında herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmadan kullanılmıştır.

#### 3.2. Aqua Molekülünün Sentez ve Karakterizasyonu

Taşıyıcı sistem olarak kullanılacak lipit nanotüpleri oluşturmak üzere, öncelikle Aqua kısaltması ile ifade edilen ve  $C_{25}H_{29}NO_4$  kapalı formülüne sahip, araştırma grubumuzda özel olarak tasarlanmış [38] molekül sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Aqua maddesinin sentezi için 1-kloroantrakinon (CIAQ) ve 11-aminoundekanoik asit ( $NH_2C_{11}COOH$ ) hammaddeleri kullanılmış ve aşağıda gösterilen tek basamaklı reaksiyon ile ürün elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Aqua maddesinin sentez reaksiyonu

Reaksiyon ortamı olarak sodyum hidroksit içeren sulu çözücü karışımı kullanılmış ve 11-aminoundekanoik asit bileşiğinin çözülmesi ile işleme başlanmıştır. Ardından üzerine 1-kloroantrakinon eklenerek heterojen durumdaki reaksiyon karışımı  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  sıcaklığında ve geri soğutucuya sahip sistemde, 1000 rpm karıştırma eşliğinde 48 saat boyunca tepkimeye sokulmuştur. Bu sürenin sonunda,

reaksiyon tamamlanmış ve oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Hacmine göre aşırı miktarda saf su eklenmesi ve daha sonra 6N'lik HCl çözeltisi ile ortam pH'ının 1'e düşürülmesiyle ürünü de bulunduran karışımın çöktürülmesi sağlanmıştır. Bu noktadan sonra tepkimeye girmeyen reaktiflerin ortamdaki uzaklaştırılmasına geçilmiştir. Çöktürülen katı minimum hacimdeki kloroformda çözüldükten sonra birkaç defa hekzanda çöktürülmüştür. Bu yöntem ile reaksiyona girmeyen 1-kloroantrakinonun ortamdaki ayrılması sağlanmıştır. Elde edilen katı haldeki Aqua maddesi yine kloroformda çözüldükten sonra ilk olarak 6N HCl ile daha sonrasında ise saf suyla birkaç defa ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ekstraksiyonun tamamlanmasıyla kloroform döner buharlaştırıcı aracılığı ile uzaklaştırıldıktan sonra saf haldeki Aqua maddesi elde edilmiştir. Ürünün saflığını analiz etmek için H-NMR C-NMR ve LC-MS testleri uygulanmıştır (Ek 1).

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> 8,2 (2H, d, antrakinon halkasının 5 ve 8 konumları), 7,6 (2H, m, antrakinon halkasının 6 ve 7 konumları), 7,4 (2H, m, antrakinon halkasının 3 ve 4 konumları), 6,9 (1H, d, NHCCH), 3,3 (2H, d, NHCH<sub>2</sub>), 2,3 (2H, t, COOHCH<sub>2</sub>), 1,7 (2H, m, COOHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,5 (2H, m, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1,2 (12H, s, CH<sub>2</sub>)

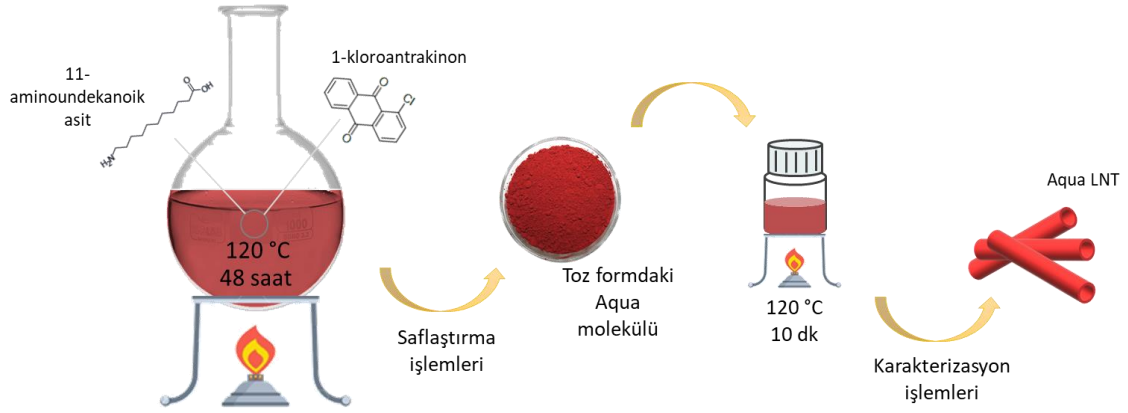
**<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ (ppm) 24,6 (COOHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 27-29 (NH CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 29,7 (COOHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 30-32 (CH<sub>2</sub>), 34 (COOHCH<sub>2</sub>), 43 (NHCH<sub>2</sub>), 116-138 (antrakinon halkası), 179 (COOH)

**LC-MS: ESI (+) m/z:** 408,9 (M+H, 100%)

### 3.3. Aqua Nanotüplerin Sentez ve Karakterizasyonu

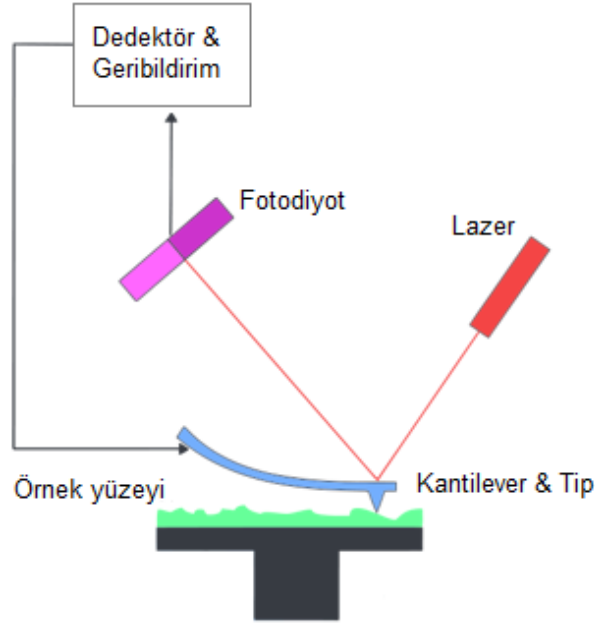
Lipit nanotüplerin sentezlenmesi için, belirli miktarda tartılan Aqua üzerine molce eşit miktarda etanolamin içerilmesi sağlanacak şekilde sulu etanolamin çözeltisi (1 M) eklenmiş ve toplam karışımındaki Aqua miktarı ağırlıkça % 1'e denk gelecek şekilde saf su ile gerekli hacme tamamlanmıştır. Karışım, homojen bir görünüme kavuşuncaya dek önceden 120 °C'ye ısıtılmış yağ banyosu içerisinde 10 dakika boyunca çalkalanarak kaynatılmış ve ardından da oda sıcaklığına gelmesi

beklenmiştir. Bu aşamadan sonra kullanılacak Aqua nanotüpler terimiyle, yukarıda bahsedilen yöntem ile elde edilmiş (Şekil 3.2) lipid nanotüpler kastedilmektedir.



Şekil 3.2. Aqua molekülünün ve Aqua nanotüplerin sentez basamaklarının şematik gösterimi

Atomik Kuvvet Mikroskopu (AFM), nanometre ölçeğindeki yapıların boyut ve yüzey topografyasını incelemekte kullanılan bir görüntüleme tekniğidir. AFM'nin getirdiği en önemli avantajlar; optik tekniklere göre 1000 kattan daha iyi çözünürlük sunması ve üç boyutlu görüntülemeye de olanak sağlamasıdır. Yüzey tarama işlemi, 'kantilever' olarak adlandırılan ve ucunda tip (iğne ucu) bulunan prob sayesinde gerçekleştirilir. Ölçüm sırasında kantilever ucundaki tip örneğe olabildiğince yaklaştırılır ve ardından tipin yüzeyi taraması beklenir. Tarama devam ettiği sürece tip ve örnek yüzeyi arasında bir etkileşim oluşur ve kantilever da bu etkileşime bir tepki verir. Bu tepki, yüzey ve tip arasındaki hatlar ve özelliklere bağlı olarak kantileverda bükülme meydana gelmesi şeklinde görülebilir. AFM ölçümleri farklı modlar kullanılarak yapılabilir. Örneğin; iğnenin yüzeye temas ettirilerek uygulandığı "contact mode" (temas yöntemi), iğnenin yüzeye temas etmediği "non-contact mode" (temassız yöntem) ve iğnenin yüzeye vurularak uygulandığı vurma yöntemidir. Temas yöntemi daha çok kristal malzemeler ve sert örnekler için iyi sonuçlar verirken, temassız yöntem yumuşak örneklerin analizlenmesi için daha uygun bir tercihtir [52].

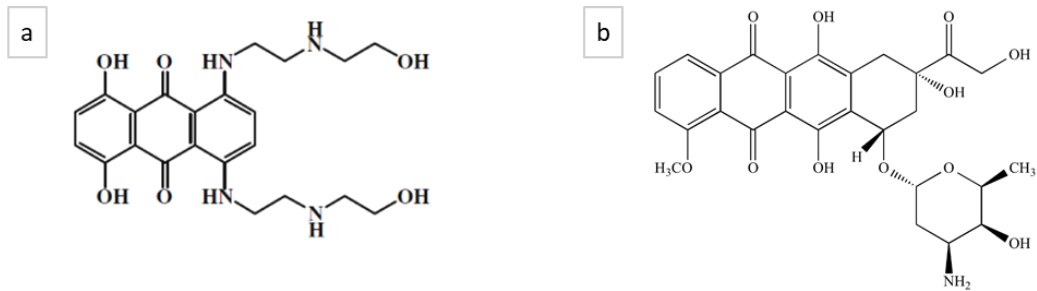


Şekil 3.3. AFM çalışma mekanizmasının şematik gösterimi

Bu tez çalışması kapsamında yapılan AFM ölçümleri PSIA Corporation markalı, XE-100E cihazının non-contact (temassız) modunda ve ACTA 10M tipi Cr-Au kantilever'ler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Katı bir substrat üzerinde hazırlanan örneklerin yüzey tarama hızı 0.37 Hz olarak belirlenmiş ve tarama alanı ise incelenen örneğe bağlı olarak 5-10  $\mu\text{m}^2$  arasında değiştirilmiştir.

### 3.4. Aqua Nanotüplerinin İlaç Alım ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi

Aqua nanotüpler tarafından enkapsüle edilen ve salım özellikleri incelenen model etkin maddeleri, molekül yapıları Şekil 3.4'te verilen mitoksantron (MTX) ve doksorubisin (DOX) adındaki kemoterapi ajanlarıdır.



Şekil 3.4. a) Mitoksantron ve b) doksorubisin ilaçlarının molekül yapıları



MTX ve DOX etkin maddelerine ait öne çıkan birtakım fiziksel ve kimyasal özellikler Çizelge 3.1’de özet olarak sunulmaktadır.

Çizelge 3.1. MTX ve DOX’a ait fiziksel ve kimyasal özellikler

	<i>MTX</i>	<i>DOX</i>
Molekül Ağırlığı (g/mol)	517,4	578,9
pKa	8,5	8,2
Sudaki Çözünürlük (mg/ml)	5,17	10
Maksimum Absorbans (nm)	611 - 664	485
Molekül Yüzey Alanı (A <sup>2</sup> )	163	206,07

İlaç alım ve alım özelliklerine dair nicel analizler UV-vis spektroskopisi ile yapılmıştır.

UV-visible spektrofotometresi ışığın ultraviyole ve infrared bölgedeki absorbasından yararlanılarak yapılan bir miktar tayin yöntemidir. Ana bileşenleri; istenilen dalga boyu aralığını kapsayan bir ışık kaynağı, daha dar dalgaboyu aralıklarını seçmekte kullanılan bir monokromator, içinde bulunduğu çözücüyü ve analizi yapılacak örneği barındıran kuvvetlerin yerleştirildiği hücreler, örnekten geçen ışığın şiddetini ölçmekte kullanılan dedektör ve yapılan ölçümü göstermekte kullanılan ekrandan oluşan bir cihazdır [53]. UV-visible ölçümlerinde analizi yapılacak olan çözeltinin çözücüsü referans kabul edilir. Yöntem, örnek olarak kullanılan çözelti ve çözücüsü tarafından geçirilen ışık şiddetlerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Transmittans terimiyle ifade edilen ve örnek tarafından geçirilen ışığın şiddetinin (I) referans tarafından geçirilen ışığın şiddetine (I<sub>0</sub>) oranına karşılık gelen değer sayesinde absorbans değerleri de belirlenebilmektedir. Transmittans ve absorbans arasındaki ilişki Eşitlik 3.1’de verilen şekildedir.

$$A = -\log(T) \quad (3.1)$$

Absorbansa etki eden faktörler ışığın geçtiği uzunluk ve maddenin derişimidir. Bu etki Beer-Lambert yasası ile tanımlanmaktadır.

$$A = \epsilon b c \quad (3.2)$$

Eşitlik 3.2'de yer alan  $\epsilon$  molar absorptivite değerini,  $b$  analiz örneğinin yer aldığı küvetin uzunluğunu,  $c$  ise derişimi göstermektedir. Beer-Lambert yasasından yararlanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrileri ile miktar analizi yapılabilmektedir. Tez boyunca gerçekleştirilen UV-vis spektrofotometre ölçümleri için 190-1100 nm dalga boyu aralığında çalışan Thermo Scientific Genesys 10S UV-vis spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Bu ölçümlerde örneklerin yerleştirildiği kuartz küvetlerin kenar uzunlukları ise 1 cm'dir.

#### **3.4.1. Aqua Nanotüplerin Mitoksantron Tutma Özelliklerinin İncelenmesi**

Aqua nanotüplerin ilaç tutma çalışmalarına ilk olarak MTX ile başlanmış ve farklı parametrelerin etkisi incelenmiştir. Bunlar; değişik çözelti pH'ları, Aqua:MTX (w/w) oranlarıdır. Tez kapsamındaki tüm çalışmalarda, ağırlıkça % 1'lik Aqua nanotüp ve 1 mg/ml derişimindeki MTX çözeltilerinden yararlanılmıştır. Toplam çözelti miktarı 1 ml olacak şekilde planlanan ve pH'ı istenilen değerdeki (pH 5,5 ve pH 7,4) PBS tampon çözeltisi ile ayarlanan ilaç tutma ortamına, önceden belirlenen MTX:Aqua (w/w) oranına (1:1 ve 2:1) denk gelecek şekilde gerekli MTX çözeltisi ilave edilmiştir. Bu karışım bir gece boyunca inkübe edilerek MTX'un Aqua nanotüplerce enkapsüle edilmesi sağlanmıştır. MTX yüklü Aqua nanotüplerin (Aqua-M), serbest haldeki MTX'dan ayrılması için 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen süpernatant UV-vis spektroskopisi ile analiz edilerek nanotüpler tarafından tutulmayan MTX miktarı saptanmıştır. Bu aşamada MTX'un 664 nm dalga boyundaki absorbas değerinden oluşturulan kalibrasyon eğrisinden yararlanılmıştır (Ek 2). Başlangıçta çözeltiliye eklenen MTX miktarı ile süpernatantta yer alan MTX miktarı arasındaki fark sayesinde tüplerin MTX tutma kapasitesi belirlenmiştir. Bu aşamada iki farklı parametre üzerinden yapılacak değerlendirmeler için aşağıda verilen eşitlikler kullanılmıştır.

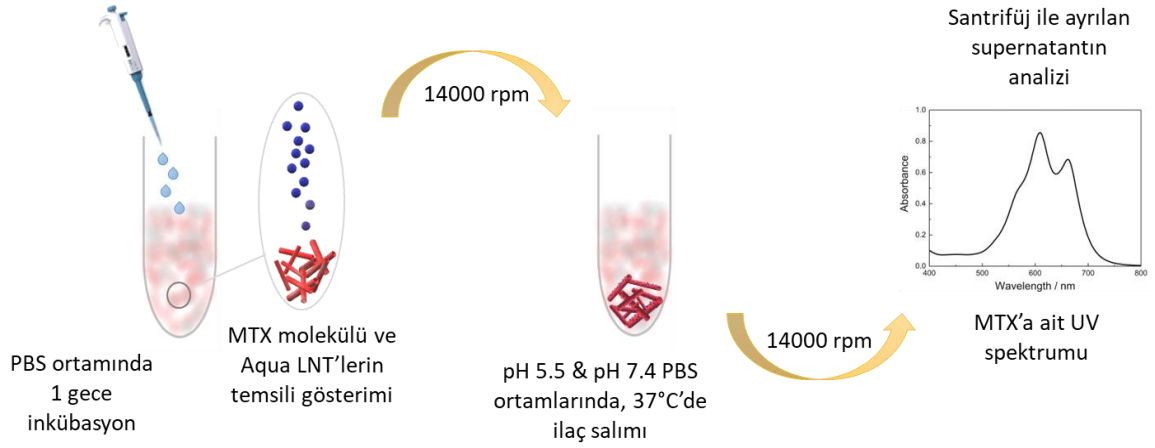
$$\text{İlaç tutma kapasitesi (mg/mg)} = \frac{\text{Yüklenen MTX Miktarı (mg)}}{\text{Başlangıç Aqua Miktarı (mg)}} \quad (3.3)$$

$$\text{Yükleme Verimliliği (\%)} = \frac{\text{Yüklenen MTX Miktarı (mg)}}{\text{Başlangıç MTX Miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.4)$$

İlaç tutma kapasitesi (TK, mg/mg ) kullanılan birim nanotaşıyıcı başına ne kadar ilaç yüklenebildiğini, yükleme verimliliği (YV, %) ise başlangıç miktarındaki ilacın hangi oranda taşıyıcıya yüklenebildiğini ifade eden değerlerdir ve ilaç alım çalışmalarında en çok göz önüne alınan ölçütlerdir. Her iki değerinde, optimum ilaç yükleme koşullarının belirlenebilmesi aşamasında dikkate alınmıştır.

#### **3.4.2. Aqua Nanotüplerin Mitoksantron Salım Özelliklerinin İncelenmesi**

İlaç salım çalışmaları, MTX yüklü Aqua nanotüplerin salımın gerçekleştirileceği koşullardaki (sıcaklık ve pH değerinde) PBS ortamı içerisinde dağıtılması ve önceden belirlenmiş zaman aralıklarında 14000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenerek bu ortamdaki ayrılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Salınan ilaç miktarını tayin etmek adına santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar yine tutma çalışmalarında olduğu gibi UV-visible spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Her bir örnek alımından sonra ortama yine aynı pH ve sıcaklık değerine sahip taze PBS tampon çözeltisi eklenerek ilaç salımına devam edilmiştir.



Şekil 3.5. Aqua nanotüplerce ilaç tutma ve ilaç salımı çalışmalarının şematik gösterimi

### 3.5. Aqua Nanotüplerinin İkili İlaç Alım ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi

#### 3.5.1. Aqua Nanotüplerin Mitoksantron ve Doksorubisin Tutma Özelliklerinin İncelenmesi

İkili ilaç tutma deneylerinde de ağırlıkça % 1'lik Aqua nanotüp çözeltisi kullanılmıştır. Aqua nanotüplere, 1 mg/ml derişimindeki MTX ve DOX çözeltilerinden 0,1 ml eş zamanlı olarak eklenmiş ve karışım bir gece inkübe edilmiştir. 14000 rpm'de 5 dakikalık santrifüj ile ortamdaki ayrılan ikili ilaç yüklemesi yapılmış Aqua nanotüplerin (Aqua-MD) enkapsüle ettiği ilaç miktarı UV-visible spektroskopisi kullanılarak tayin edilmiştir. Bunun için, DOX'un 485 nm, MTX'un ise 664 nm dalgaboyundaki absorbanlarından yararlanılmıştır (Ek 3). Ardından Aqua-MD salım çalışmalarına geçilmiştir.

#### 3.5.2. Aqua Nanotüplerin Mitoksantron ve Doksorubisin Salım Özelliklerinin İncelenmesi

Aqua nanotüplerden MTX ve DOX'un eş zamanlı salım çalışmaları Bölüm 3.4.2'de anlatılan prosedür ile aynı şekilde uygulanmıştır. İlaç salımları pH 5,5 ve pH 7,4 ortamlarında, 37 °C'de gerçekleştirilmiştir. Analiz yöntemi olarak UV-visible spektroskopisi kullanılmıştır.

### **3.6. İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerinin Yüzey Kaplama İşlemleri**

Aqua nanotüpler MTX ve MTX/DOX ilaçları ile yüklendikten sonra dış yüzeyleri sırasıyla aljinat (ALG) ve folik asit-kitosan (FACHI) konjuge yapısıyla kaplanmıştır. Her iki tabakanın da kaplanması sonrasında nanotüplerin inert yüzeyler üzerinde AFM görüntüleri alınmış ve yüzey yüklerindeki değişim zeta potansiyel ölçümleri ile belirlenmiştir. Ayrıca bu iki tabakanın salım özellikleri üzerine nasıl bir etkide bulunduğu detaylı biçimde incelenmiştir.

#### **3.6.1. İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerinin Aljinat ile Kaplanması**

İlaç yüklü tüplerin yüzeylerinin ALG ile kaplanması işlemi için öncelikle 3.4.1. ve 3.5.1.'ci kısımlarda anlatıldığı gibi MTX ve MTX/DOX enkapsüle edilmiş Aqua nanotüpler (Aqua-M ve Aqua-MD) hazırlanmıştır. Daha sonra 0,1 M'lık NaCl çözünmüş ve Aqua nanotüplere göre ağırlıkça 1:2 (ALG:Aqua-M) oranında ALG içeren 1 ml çözeltide 1 saat, 6 saat, 8 saat ve 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. İlaç yükleme çalışmalarında olduğu gibi ALG kaplanmış nanotüplerin ortamdan ayrılması 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra ALG ile kaplı ilaç yüklü Aqua nanotüpler Aqua-M-ALG veya ikili ilaç yüklemesi durumunda Aqua-MD-ALG şeklinde ifade edilecektir.

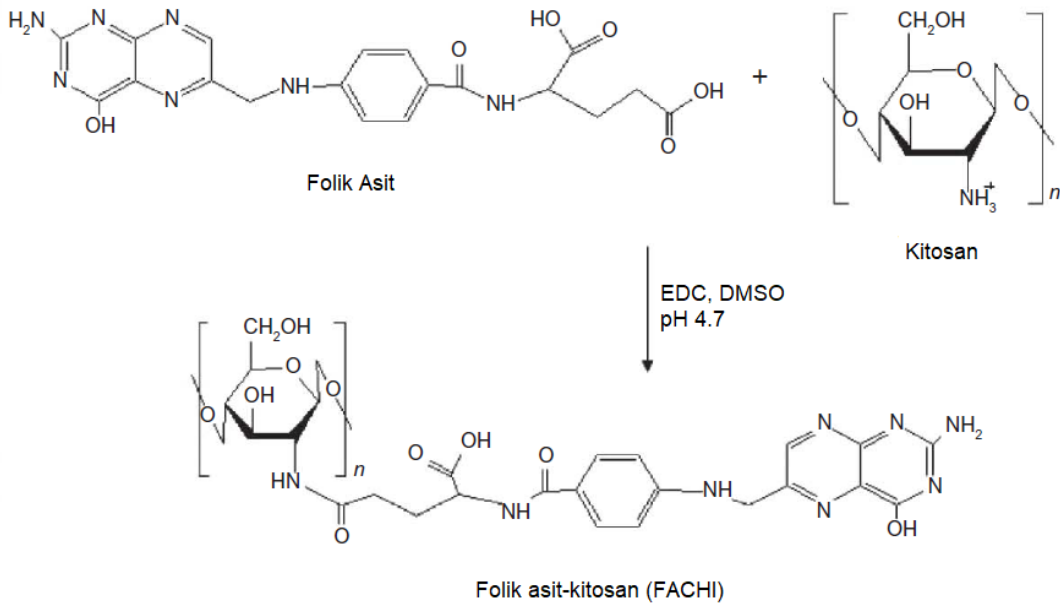
#### **3.6.2. İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerin Folik Asit-Kitosan ile Kaplanması**

Aqua nanotüplere ilaç yüklendikten ve yüzeyleri ALG ile kaplandıktan sonra, ikinci tabaka olan folik asit-kitosan (FACHI) konjuge yapısı ile kaplanması işlemine geçilmiştir. Bunun için öncelikle folik asit (FA) ve kitosan (CHI) kimyasal olarak birbirine bağlanmış ve konjuge bir yapı elde edilmiştir.

Kimyasal bağlı FACHI konjugesinin hazırlanması için, ağırlıkça % 1 derişimindeki CHI çözeltisi ve 1-(3-dimetillaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC) ile karboksilik asit grupları aktifleştirilmiş 0.065 M FA çözeltileri kullanılmıştır ve bu şekilde reaksiyon başlangıcında FA ve CHI zincirlerinde yer alan NH<sub>2</sub> grupları arasında 1:1 oranı sağlanmıştır [54]. CHI çözeltisi asetat tamponda 4 saat karıştırma ile FA çözeltisi ise molce 1:1 oranında EDC varlığındaki susuz DMSO içerisinde ve azot ortamında 2 saat karıştırma ile hazırlanmıştır. Tepkimenin

başlatılması sırasında CHI çözeltisi, FA çözeltisi üzerine damla damla eklenmiştir. 16 saat boyunca karanlıkta süren reaksiyon, 1 M NaOH ile ortam pH'ının 9'a getirilmesiyle sonlandırılmıştır. Bu aşamada gözlenen parlak sarı renkli çökelekler 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj işlemiyle toplanmıştır [55].

Elde edilen ürünün, tepkimeye girmeyen kısımdan ayrılması adına katı yeniden PBS ortamında dağıtılarak, 2 gün boyunca PBS ortamına karşı diyaliz edilmiştir. PBS tuzlarının uzaklaştırılması için de devamındaki 2 gün boyunca saf su içinde diyalize tabi tutulmuştur. Diyalizin tamamlanmasıyla ürün vakum altında kurumaya alınmıştır ve Şekil 3.6'da kimyasal formülü gösterilen FACHI maddesi elde edilmiştir [56].



Şekil 3.6. Folik asit-kitosan (FACHI) eldesinde kullanılan kimyasal reaksiyonunun şematik gösterimi

Tamamen kurduğuna emin olunan katı formdaki FACHI konjuge yapısının analizi için FTIR ve UV-Vis spektroskopisi ölçümlerinden yararlanılmıştır.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), temel olarak bir madde içerisinde, IR ışınlarına maruz kalan molekül veya atomların bağlarının eğilmesi,

bükülmesi, gerilmesi, titreşimi veya dönme hareketleri sonucu bir absorpsiyon vermesi ile elde edilen spektrumun değerlendirilmesidir. Molekül içi bu kompleks olaylar, moleküllerin fonsiyonel grupları tarafından karakterize edildiği için her bir molekülün IR spektrumu kendine hastır ve o molekülün tanınması veya tanımlanmasında faydalanılmaktadır [57].

FACHI konjuge yapısındaki atomik grupların tayin edilebilmesi için ATR-FTIR (Attenuated Total Reflection - Fourier Transform Infrared) Spektrofotometresi (Thermo Scientific, Nicolet 6700, ABD) kullanılarak, 400-4000 cm<sup>-1</sup> dalga sayıları arasında analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Kitosan içinde yer alan amin grupları ve bağlanan FA arasındaki mol oranının bir başka deyişle bağlanma derecesinin tayini içinse UV-vis spektroskopisi kullanılmıştır. Buna göre konjuge yapıda gözlenen ve FA'e ait olduğu bilinen 363 nm'deki absorbands değeri ölçülerek yine FA için oluşturulan kalibrasyon doğrusu (Ek 4) üzerinden miktar tayini yapılmıştır [58]. Daha sonrasında Eşitlik 3.3'te verilen bağıntı kullanılarak FA'in bağlanma derecesi (BD) şeklinde ifade edilen değere ulaşılmıştır.

$$BD = \frac{m/MA_{FA}}{m - m_t/MA_{CHI}} \quad (3.5)$$

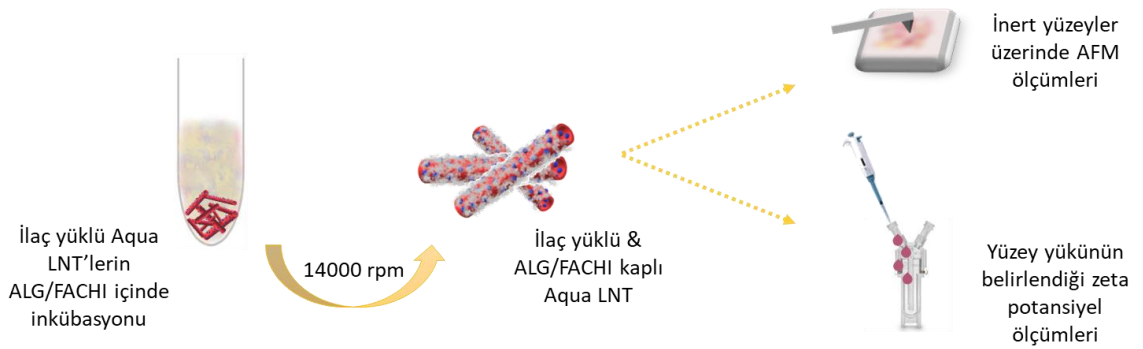
Eşitlik 3.5'te yer alan ifadelerden; m: bağlanan FA miktarı, m<sub>t</sub>: FACHI konjugesinin miktarı, MA<sub>FA</sub>: FA'in moleköl ağırlığını ve MA<sub>CHI</sub>: CHI'nın moleköl ağırlığını göstermektedir. Devamında asetilasyon derecesi üzerinden bir mol CHI'da ne kadar amin grubu bulunduğu hesaplandıktan sonra FA:NH<sub>2</sub> oranına geçilmiştir.

FACHI konjuge yapısının ilaç yüklü Aqua nanotüplerin yüzeyine kaplanması aşamasında ise, asetik asit (% 2) ve NaOH (1 M) çözeltileri ile pH değeri 9'a ayarlanan sulu çözeltileri hazırlanarak belirlenen süre boyunca ön işlemleri tamamlanmış ilaç yüklü Aqua nanotüplere bu çözeltili ile muamele edilmiştir.

FACHI kaplama işlemi sonrasında elde edilen Aqua-M-ALG-FACHI veya Aqua-MD-ALG-FACHI yapılarının tamamı için karakterizasyon basamağına geçilmiştir.

### 3.6.3. Yüzey Kaplama İşlemi Sonrasında Aqua Nanotüplerin Karakterizasyonu

Aqua nanotüplerin başarılı şekilde ALG veya ALG/FACHI tabakaları ile kaplanmış olduğu hem AFM görüntülerinden hem de zeta potansiyel ölçümlerinden teyit edilmiştir (Şekil 3.7). Bu amaç doğrultusunda, kaplama işlemi sonrası ortamdan ayrılan MTX veya MTX/DOX yüklü Aqua nanotüpler yeniden kaplanmanın gerçekleştiği koşuldaki PBS ortamında dağıtılmıştır. AFM görüntüleri için elde edilen örnekler temiz bir katı substrat yüzey üzerinde kurutulmuştur.



Şekil 3.7. İlaç yüklü Aqua nanotüplerin yüzeylerinin ALG veya FACHI ile kaplanması ve ardından gerçekleştirilen karakterizasyon basamaklarının şematik gösterimi

Zeta potansiyel ölçümü, kullanılması planlanan taşıyıcı yapıların yüzey yüklerini ölçmeye yarayan bir tekniktir. Bu hedef doğrultusunda, taşıyıcı yapılar bir çözelti içinde dağıtılarak, anot ve katot uçlar arasına belli bir potansiyel farkın uygulandığı bir hücreye konular. Çözelti içindeki bu yapıların anot veya katoda yönelmeleri ve elektroforetik mobilite adı verilen hareket hızlarının belirlenmesi ile ölçüm gerçekleştirilir [59]. Tez çalışmasında sonuçları verilen zeta potansiyel ölçümleri, Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK) cihazı kullanılarak elde edilmiştir. Örnekler, hazırlandığı koşulda (çözücü pH'ı ve seyreltme yapılmadan) analiz edilmiştir.



### 3.6.4. Yüzey Kaplaması Gerçekleştirilen Aqua Nanotüplerden İlaç Salım Özelliklerinin İncelenmesi

ALG ve FACHI kaplı ilaç yüklü Aqua nanotüpler Bölüm 3.6.1 ve 3.6.2’de anlatıldığı gibi hazırlandıktan sonra, 1 ml hacmindeki pH 5,5 ve pH 7,4 PBS ortamlarında ve 37 °C’de ilaç salım çalışmalarına geçilmiştir. Deney prosedürü olarak Aqua nanotüplerden ilaç salımı ile ALG veya ALG/FACHI kaplı olanlardan gerçekleştirilecek ilaç salımı birbiriyle aynıdır.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel araştırmaları ve bunlar üzerinde denenen farklı parametreleri toplu bir bakış altında özetlemek gerekirse, Çizelge 3.2’de gösterildiği şekliyle MTX ve MTX/DOX taşınımı olmak üzere iki ana başlık altında ifade etmek mümkündür.

Çizelge 3.2. Tez çalışması kapsamında araştırılan deneysel parametreler

İlaç Yükleme		Yüzey Kaplaması (saat)		İlaç Salımı	
MTX:Aqua	pH	ALG	FACHI	Örnek	pH
1:1	5,5	1	-	Aqua-M	
1:1	7,4	6	2	Aqua-M-ALG (6)	5,5 - 7,4
1:1	9	8		Aqua-M-ALG-FACHI (6-2)	
				Aqua-M-ALG (8)	
2:1	9	16	-	Aqua-M-ALG-FACHI (8-2)	

İkili İlaç Yükleme		Yüzey Kaplaması (saat)		İkili İlaç Salımı	
MTX:DOX:Aqua	pH	ALG	FACHI	Örnek	pH
1:1:1	9	8	2	Aqua-MD	
				Aqua-MD-ALG (8)	5,5 – 7,4
				Aqua-MD-ALG-FACHI (8-2)	

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Aqua Molekülünün Sentez ve Karakterizasyonu

Aqua molekülü Şekil 3.1'de gösterilen reaksiyon üzerinden sentezlenirken daha önceki çalışmalarda optimum parametreler olarak belirlenmiş koşullardan yararlanılmıştır. Buna göre çözücü ortamı olarak 5/2 su/DMSO karışımı, ortam pH'ını alkali duruma getirmek üzere 11-aminoundekanoik asit'in iki katı miktarda NaOH ve reaksiyon süresi olarak 48 saat tercih edilmiştir. Bu şartlar altında % 77 reaksiyon verimi elde edilmiştir ve literatürdeki değerler üzerinden bir kıyaslama yapıldığında oldukça yüksek bir verime ulaşıldığı görülmüştür [60, 61].

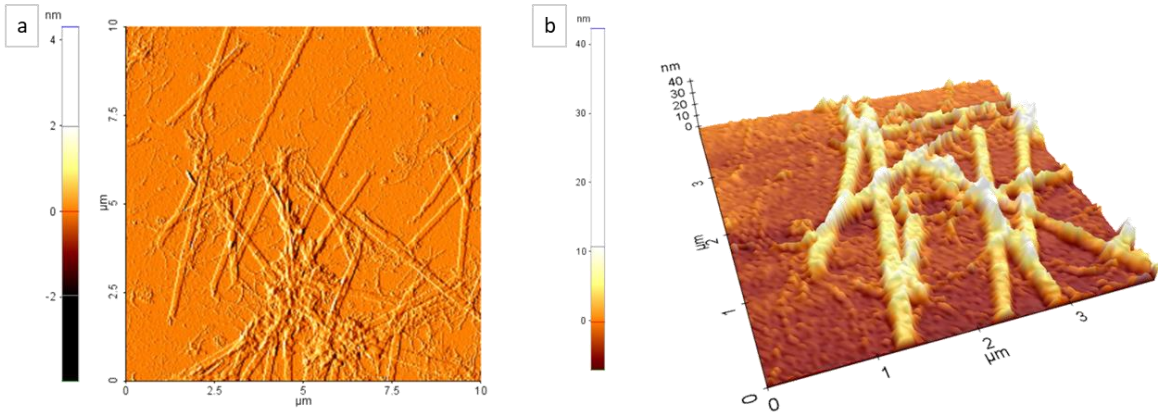
Elde edilen ürünün saflık derecesi ise NMR analizi ile belirlenmiştir. NMR analizine ait <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR spektrumları Ek 1'de ve spektrumda yer alan piklerin ait olduğu gruplarla, kimyasal kayma değerleri ise Bölüm 3.2.1'de bulunmaktadır. <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda 3.2 ve 6.9 ppm kimyasal kayma değerlerinde görülen pikler hammaddelerde bulunmayan, yalnızca ürüne ait olan piklerdir. Buna göre <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda 3.2 ppm'de gözlenen pik NHCH<sub>2</sub> piki, 6.9 ppm'deki pik ise antrakinon halkasına NH grubu bağlı olması sonucu açığa çıkan piktir. Yine <sup>1</sup>H-NMR spektrumundaki pik alanlarına bakıldığında ise ürünün oldukça saf bir şekilde elde edildiği anlaşılmaktadır. <sup>13</sup>C-NMR spektrumunda da benzer şekilde yaklaşık 43 ppm ve 152 ppm kimyasal kayma değerlerinde görülen pikler yine sırasıyla NH-CH<sub>2</sub> ve antrakinon halkasına bağlı NH gruplarına aittir.

Tepkime verimini belirlemek için, tepkime tamamlandıktan sonra ortamda mevcut olan ve herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmamış reaksiyon karışımının <sup>1</sup>H-NMR analizleri gerçekleştirilmiş ve ürüne ait piklerden elde edilen birim alan değerlerinin, reaksiyona girmemiş hammaddeye ait olan piklerin birim alanlarına oranından faydalanılmıştır.

#### 4.2. Aqua Nanotüplerin Sentez ve Karakterizasyonu

Aqua molekülünün saf olarak elde edildiğinin belirlenmesinden sonra, bu molekül ile kendiliğinden kümeleşme yöntemi kullanılarak sulu çözelti içinde lipit nanotüp yapıları elde edilmiştir. Aqua molekülünün etanolamin varlığındaki yüksek çözünürlüğünden faydalanılarak ağırlıkça %1'lik sulu karışımından ısıtma-soğutma prosedürü sayesinde tubüler formdaki nanoyapılar sentezlenmiştir.

Oluşturulan nanotüp yapılarının karakterizasyon aşamasında, örnekler inert bir yüzey üzerine alınarak kurutulmuş ve bunlardan elde edilen AFM görüntülerinden şekil ve boyut incelemeleri yapılmıştır. Şekil 4.1a'da görüldüğü gibi Aqua nanotüpler düzgün silindirik forma sahip asimetric yapılarıdır ve bu görüntüler üzerinden yapılan okumalar sonucunda uzunluklarının 4-9  $\mu\text{m}$ , çaplarının ise 120-250 nm aralığında değiştiği tespit edilmiştir [2, 38].



Şekil 4.1. Aqua nanotüperin AFM'den elde edilen a) error b) üç boyutlu topografya görüntüsü

AFM analizi ile aynı zamanda bu nanotüp yapılarının üç boyutlu geometrisinin ve yüzey morfolojisinin incelenmesi de mümkündür. Şekil 4.1b'de sunulduğu gibi bu görüntülerden elde edilen sonuçlara göre nanotüplerin yüzeylerinin kavisli ve düzgün silindirik yapıda olduğu, düz ya da levha şekilli olmadığı açık bir şekilde ortaya konulmaktadır.

Bu analiz aşamasında çıkarılabilecek bir diğer önemli sonuç ise, AFM analizi için hazırlanan kuru örneklerin düzgün silindirik formlarını koruyabildiklerinden ve çökme veya kırılmalara rastlanmadığından dolayı kurumaya karşı dayanımlarının mevcut olduğu ve morfolojik olarak büyük değişikliklere maruz kalmadıklarıdır. Ancak AFM analiziyle ortaya konulan çap bulguları, tarama prosedürü ve kullanılan tip özelliklerine bağlı olarak kümeleşme kalınlıklarını olduğundan fazla ölçebildiği için aynı yöntem ile hazırlanan örneklerin daha yüksek doğruluk değeri taşıdığı kabul edilen TEM/STEM ölçümleri ile görüntülenmeleri yinelenmiştir [62]. Buna göre nanotüplerin 110-190 nm aralığında farklı çap değerlerine sahip oldukları görülmüştür [2, 38].

### **4.3. Aqua Nanotüplerinin İlaç Alım ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi**

Aqua nanotüpler tasarım aşamasından itibaren lipit yapısının sağladığı yüksek biyouyumlulukları ve tübüler geometrisinin yarattığı geniş iç hacim düşünülerek vücut içerisinde kontrollü salım uygulamalarında yararlanılmak üzere değerlendirilmiştir. Oldukça yüksek boy/çap oranına sahip olan Aqua nanotüpler, küçük çap değerleri sayesinde vücut içerisindeki çeşitli bariyerlerden rahatlıkla geçebilirken, büyük bir iç hacme sahip olmaları da ulaştıkları bölgeye hayli yüksek oranda madde taşıyabilme imkanını sağlamaktadır. Madde tutma konusundaki bu yüksek potansiyelinin yanı sıra morfoloji ve yüzey yük dağılımının tersinir olarak değiştirilebilmesi sayesinde kontrollü salım açısından da oldukça avantajlı olan Aqua nanotüplerin, tez çalışması kapsamında öncelikle model ilaç molekülü olarak seçilen MTX'u daha sonra ise DOX ile kombine durumdaki ilaç tutma ve salım özelliklerine dair incelemeler yapılmıştır.

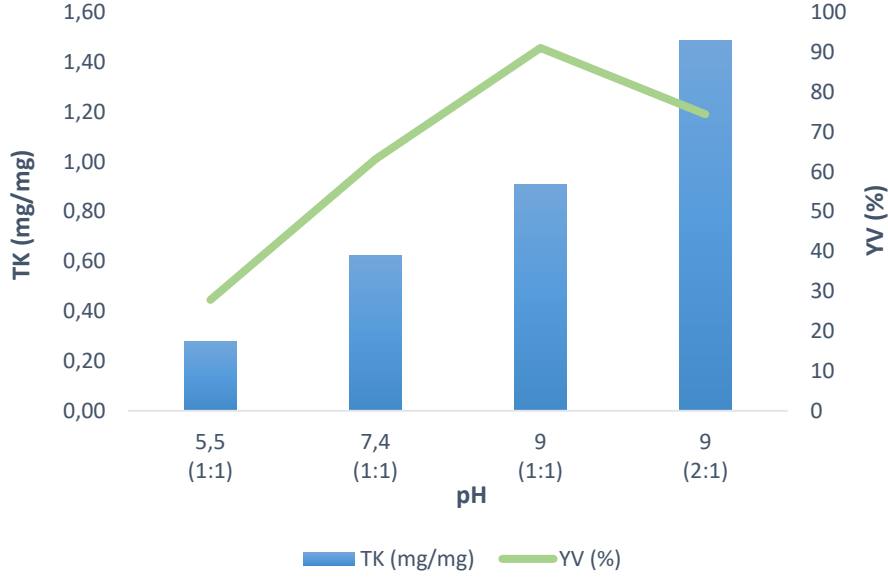
#### **4.3.1. Aqua Nanotüplerin Mitoksantron Tutma Özelliklerinin İncelenmesi**

MTX; meme, prostat ve lenfoma başta olmak üzere pek çok farklı kanserin tedavisinde kullanılan ve antineoplastik sınıfına giren bir kemoterapi ajanıdır. Molekül ağırlığı 517,4 g/mol olan MTX'a ait molekül yapısı Şekil 3.4a'da gösterilmektedir [63]. 1970'li yılların sonunda sentetik olarak üretilen MTX, yer aldığı sınıftaki diğer antrasiklinlere kıyasla yalınlaştırılmış molekül yapısı ve geniş kullanım alanı gibi avantajlarına rağmen kardiyotoksisite, akciğer ve tiroitte birikim

vb. yan etkileri dolayısıyla taşıyıcı sistemler ile vücuda verilmesi son derece uygun bir konumdadır ve son yıllarda kontrollü taşıyıcı sistemleri tarafından uygulanmasına yönelik literatür araştırmaları dikkat çekmektedir. [64-67]. Bu nedenle yüksek lisans tez çalışması kapsamında Aqua nanotüpler tarafından kontrollü taşıyıcı sistemleri incelenmek üzere seçilen model ilaç molekülü olmasına karar verilmiştir.

Aqua nanotüplerin MTX tutma kapasitesi üzerindeki çalışmalara, araştırma grubumuzda gerçekleştirilen ve yine Aqua nanotüplerce DOX tutulmasına etki eden parametreler referans alınarak başlanmıştır. Bu doğrultuda, 1 mg/ml derişimindeki ilaç çözeltisi ve ağırlıkça % 1'lik Aqua nanotüp çözeltisi ile çalışılmaya karar verilmiştir [2]. İlaç tutma kapasitesi (TK, mg/mg) ve yükleme verimliliği (% YV) hesaplamaları UV-vis spektroskopisi ve Bölüm 3.4.1'de verilen 3.3 ve 3.4 eşitlikleri kullanılarak yapılırken, MTX:Aqua oranı ve çözelti pH'ı değiştirilerek Aqua nanotüplere optimum ilaç yüklemesinin sağlanması hedeflenmiştir.

İlk olarak 1:1 MTX:Aqua oranında çalışıldığında, ortam pH'ı ile birlikte tutulan ilaç miktarında meydana gelen değişiklik incelenmiştir. Şekil 4.2'de gösterildiği gibi pH 5'ten 9'a kadar arttırıldığında kullanılan Aqua miktarı başına tutulan MTX miktarı sürekli olarak artış göstermiştir. Buna göre TK değeri pH 5,5'te 0,28 mg/mg, pH 7,4'te ise 0,62 mg/mg'dır. En yüksek orana ulaştığı pH 9 durumunda ise belirlenen TK değeri 0,91 mg/mg olmuştur.



Şekil 4.2. Aqua nanotüplerin farklı MTX:Aqua oranlarında (1:1 ve 2:1) ve çözelti pH'larında MTX tutma kapasitesi (TK, mg/mg) ve yükleme verimliliği (YV, %)

Tutulan MTX miktarında ortam pH'ına bağlı olarak böyle bir farklılık gözlenmesinin sebebi Aqua nanotüpler ve MTX arasında kurulan elektrostatik etkileşimin değişiminden kaynaklanmaktadır. Yapısındaki karboksilik asit varlığı sebebiyle Aqua nanotüplerin net eksi yükleri pH değeri arttıkça artmaktadır [2]. MTX ise yapısında  $pK_a$  değeri 8,5 olan amin grupları içermektedir ve bu değer altındaki pH'larda net pozitif yüke sahip iken üzerinde kalan pH koşullarında % 50'si yüklü olmaktadır [29]. pH değişiminin her iki grubu da zıt şekilde etkilediği bu aralıkta, MTX üzerindeki yük miktarının azalmasına rağmen Aqua nanotüplerdeki eksi yük artışının daha baskın hale gelmesiyle elektrostatik etkileşim de karboksilik asit üzerinden kontrollü hale gelerek yüksek ilaç tutma kapasitesinin pH 9'da elde edilmesine sebep olmaktadır.

Ortam pH'ı 9 olduğu zaman YV'nin % 90'ın üzerine çıkmasıyla birlikte eklenen ilaç miktarının daha fazla artırılabilceği düşünülerek bu oran 2:1 MTX:Aqua şeklinde yeniden denenmiştir. 2:1 MTX:Aqua oranında, TK değeri beklenildiği üzere artarak 1,48 mg/mg'a kadar ulaşmıştır ancak YV değeri % 75 seviyesine gerilemiştir. Bu noktada salım çalışmalarına geçilmeden önce optimum yükleme koşulunu

belirlemek adına, TK veya YV değerlerinin hangisinin öncelik verileceğine karar verilmesi gerekliliği doğmuştur ve detaylı bir literatür araştırması ile elde edilen bulgular değerlendirilmiştir.

Elektrostatik etkileşimden yararlanılarak MTX yüklemesinin gerçekleştirildiği ve elde edilen sonuçlar itibarıyla literatürde öne çıkan bazı nanotaşıyıcı sistemler Aqua LNT'lerin MTX tutma özellikleri ile karşılaştırmalı olarak Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. MTX taşınımı ve kontrollü salımı için geliştirilen bazı sistemlerin MTX tutma kapasiteleri ve yükleme verimlilikleri

<i>Taşıyıcı Yapı</i>	<i>Büyükük (nm)</i>	<i>TK (mg/mg)</i>	<i>YV (%)</i>	<i>Kaynak</i>
Aqua LNT	110-190	0,91	90	-
Silika NP	80-100	0,30	60	[29]
Silika NP	86	0,18	60	[68]
Silika NP	25	0,283	71	[69]
Kitosan NP	48	0,184	78	[70]
Kitosan-PEG NP	210	0,080	98	[66]

MTX taşınımında inorganik yapıdaki silika nanopartiküllerden geliştirilen taşıyıcı sistemlere sıkça rastlanılmaktadır. Örneğin, Che ve arkadaşlarının tasarladığı sistemde mezo gözenekli silika nanopartiküller kullanıldığında MTX'un yükleme miktarı 0,3 mg/mg ve verimlilik % 60 olarak bulunmuştur [29]. Xiao ve Zong tarafından ortaya konulan çalışmada ise daha büyük boyutlara sahip kitosan yapılı partiküller kullanılmıştır ve yükleme verimi % 98'e kadar artırılmasına rağmen tutulan ilaç miktarının yalnızca 0,08 mg/mg seviyesinde kaldığı dikkat çekmektedir [66].

Görüldüğü üzere Aqua nanotüplerin hem TK (mg/mg) hem de YV (%) değerleri literatürde yer alan ve elektrostatik etkileşim aracılığıyla MTX yüklemesi gerçekleştirilen başlıca nanotaşıyıcı sistemlerden oldukça üstündür. Bu sonucun

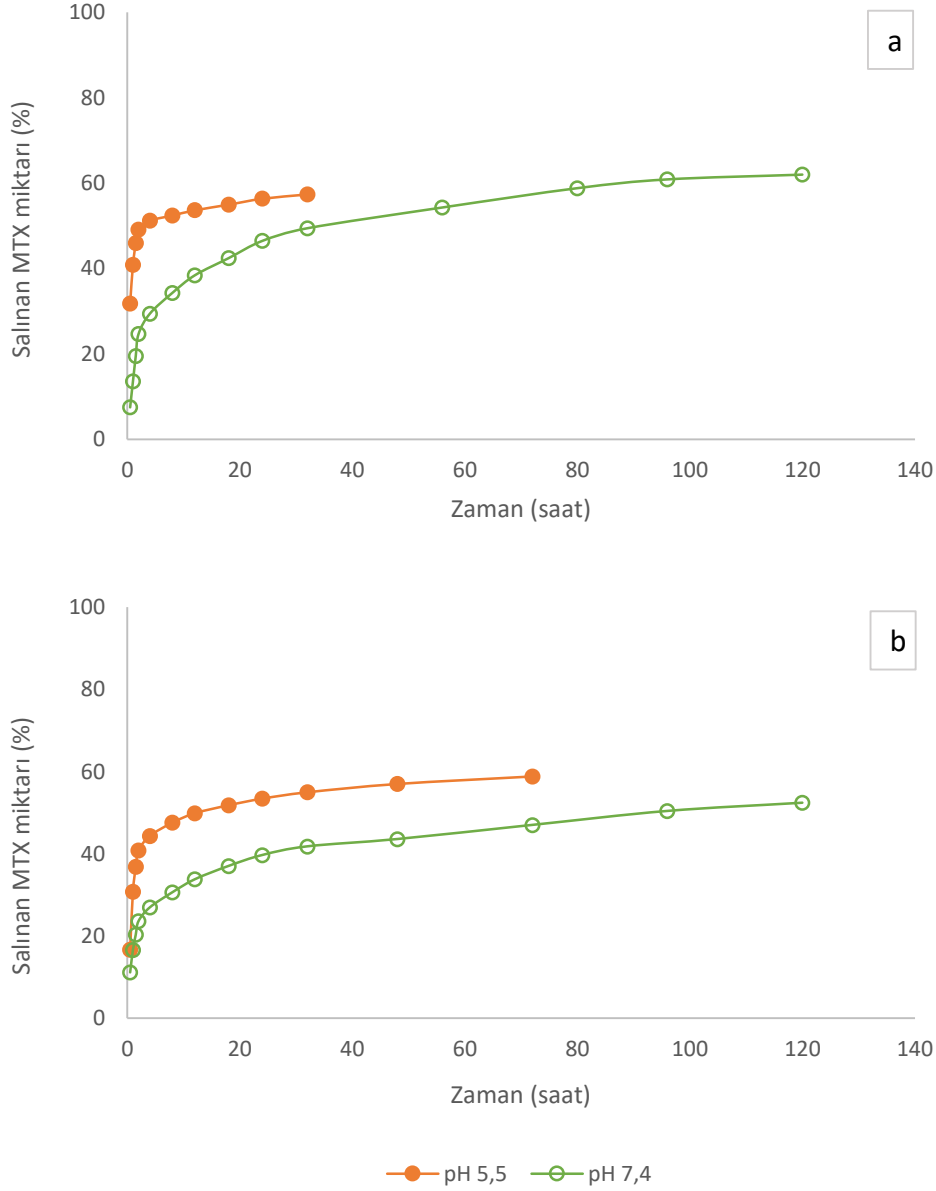
ortaya çıkmasını sağlayan en önemli sebep ise, MTX'da olduğu gibi Aqua nanotüplerin yapısında da yer alan antrakinon grubu sayesinde ilaç ve taşıyıcı moleküller arasında elektrostatik etkileşime ek olarak kurulduğu düşünülen  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleridir. Her iki etkileşimin avantajından da yararlanılarak, Aqua nanotüplere neredeyse kendi ağırlığınca MTX yüklemesinin yapılabilen olduğu görülmektedir.

Elde edilen bu bilgiler ışığında ilaç yüklemesini arttırmak adına yükleme verimliliğinden ödün verilmesine gerek duyulmadığına karar verilerek, ileri aşamalarda gerçekleştirilecek salım çalışmalarına 1:1 yükleme oranında ve ortam pH'ının 9 olduğu koşullarda hazırlanan ilaç yüklü Aqua nanotüpler ile devam edilmiştir.

#### **4.3.2. Aqua Nanotüplerin Mitoksantron Salım Özelliklerinin İncelenmesi**

Aqua nanotüplere başarılı bir biçimde ve yüksek verim oranında MTX yüklemesinin sağlanmasının ardından bir sonraki adım olan salım çalışmalarına geçilmiştir. MTX salım profili üzerine pH etkisi incelenirken fizyolojik koşulları yansıtmaları açısından sağlıklı doku pH'ı olarak bilinen 7,4 ve tümörlü doku pH'ı olan 5,5 salım ortamlarında deneysel araştırmalar yapılmıştır [71]. Bu amaç doğrultusunda uygun pH ayarlaması sağlanmış PBS tampon çözeltisinden yararlanılmıştır. Ayrıca, tüm salım çalışmaları vücut sıcaklığı olan 37 °C'de gerçekleştirilmiştir ve her bir deney seti için üçer kez tekrarlandıktan sonra elde edilen sonuçların ortalamaları şeklinde sunulmaktadır. Şekil 4.3'te bahsedilen koşullara ait MTX salım profilleri gösterilmektedir.





Şekil 4.3. Farklı MTX:Aqua başlangıç oranlarında yüklemesi gerçekleştirmiş Aqua nanotüplerden iki ayrı pH'ta MTX salım profili a) 1:1 b) 2:1

Bölüm 4.3.1'de optimum yükleme koşulu olarak belirlenen 1:1 MTX:Aqua oranında elde edilen ilaç yüklü Aqua nanotüplere ait salım sonuçları Şekil 4.3'ün a kısmında yer almaktadır. Buna göre ortam pH'ı 5,5 olduğu zaman ilk 4 saatin sonunda yaklaşık % 50 oranında MTX'un salındığı, pH değerinin 7,4'e olduğu ortamda ise bu değer % 28'e düştüğü görülmektedir. 24 saatin sonunda ise salınan MTX miktarı pH 5,5 ve pH 7,4 için sırasıyla % 56 ve % 46 olarak belirlenmiştir. Bu sürenin sonunda MTX salımının dengeye ulaştığı da ayrıca gözlemlenmektedir.

1:1 MTX:Aqua oranının yanı sıra 2:1 yükleme oranı için de salım profilinin incelenerek aynı eğilimin gözlemlenip gözlemlenmeyeceğinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Şekil 4.3b'de de görüldüğü gibi 4 saatin sonunda pH 5,5'te % 45 oranında MTX salınırken, pH 7,4 için aynı sürede bu değer % 25'e kadar inmektedir. Yine 24 saat sonundaki oranlar karşılaştırıldığında da pH 5,5'te % 44 ve pH 7,4'te % 27'lük bir MTX salımı ortaya çıkmaktadır.

2:1 yükleme oranına çıkıldığında miktar olarak daha fazla MTX tutulduğu bilindiğinden yalnızca salınan yüzdenin değil, bu yüzdeye karşılık gelen ilaç derişimlerinin de incelenmesi gerekliliği daha sağlıklı bir sonuca ulaşabilmek adına önem kazanmıştır. Bu aşamada, referans derişimi olarak MTX'un terapötik açıdan etkin olduğu değer göz önüne alınabileceği fikri doğmuştur. Yapılan literatür araştırması ile terapötik dozajın hastanın yaş, kilo, vücut yüzey alanı ve tedavi geçmişi gibi özelliklerine veya ilacın uygulanma sıklığına bağlı olarak çok hassas değişkenlikler gösterdiği fark edilmiştir [63-65]. Öte yandan MTX için belirlenen maksimum tolare edilebilir dozaj (MTD) ise tüm bu değişkenlerden bağımsız olarak yüksek bir kesinlik değeri ile ifade edilmektedir ve tek bir intavenöz uygulama esnasında  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  olduğu belirtilen MTD değerinin üzerine çıkılmaması gerektiği özellikle belirtilmektedir [72]. Bu MTD değeri sağlıklı bir bireyin ortalama vücut ağırlığı ve bunun yaklaşık olarak % 7-8'ni oluşturan kan hacmi dikkate alındığında 0,06-0,07 mg/ml aralığında bir ilaç derişimine karşılık gelmektedir [73].

Bu aşamada her iki yükleme oranı için de özellikle daha fazla ilaç salımının gerçekleştiği pH 5,5 ortamında Aqua nanotüplerden salınan ilaç derişiminin ulaştığı son konsantrasyon değerleri önemli hale gelmiştir ve bu değerler Çizelge 4.2'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.2. Aqua nanotüplerden MTX salımı tamamlandığı andaki ilaç derişimleri

<b>Başlangıç MTX:Aqua Oranı</b>	<b>pH 5,5 (mg/ml)</b>	<b>pH 7,4 (mg/ml)</b>
1:1	0,05	0,06
2:1	0,09	0,07

Görüldüğü üzere 2:1 başlangıç oranında MTX yüklemesi yapılan Aqua nanotüplerden salınan ilaç miktarı MTD'den daha yüksektir ve *in vivo* sistemlere uygulanma konusunda risk oluşturma potansiyeli mevcuttur. Dolayısıyla ilaç yüklemesinde başlangıç oranı olarak 1:1 MTX:Aqua değerinin seçilmesi salım profili ile de desteklenmiş ve optimum ilaç yükleme oranı olarak devam edilmesine karar verilmiştir.

Tüm bu incelemeler sonucunda, Aqua nanotüplerden pH değeri 5,5 olan tampon çözeltide salınan MTX miktarının, her iki koşulda da pH 7,4 durumuna kıyasla daha fazla olması Aqua nanotüplerinin pH duyarlı bir ilaç taşıyıcı sistem davranışına sahip olduğunu ortaya koyması açısından oldukça önemli bir bulgudur. Bu sayede MTX'un seçici olarak kanserli hücrelere daha fazla salınmasının yani kontrollü salımının mümkün kılınabileceği ortaya konulmuştur.

Ancak salım profili daha detaylı biçimde incelendiğinde, pH 7,4'te ilaç salımının uzun süreli devam etmesine karşılık, pH 5,5'te ani ilaç bırakımının (ing: burst release) gözlemlendiği ve bu nedenle salımın oldukça kısa sürede gerçekleştiği fark edilmektedir. Dolayısıyla salım süresi ilerledikçe her iki pH arasında salınan MTX miktarı arasındaki fark azalmaktadır. Oysa ideal bir ilaç taşınım sisteminde hedeflenen salım profilinin bu durumun tam tersini yansıtacak şekilde olması gerektiği bilinmektedir. Yüksek seçiciliği sağlamak adına kanserli bölge ve sağlıklı dokuya taşınan ilaç miktarları arasındaki fark mümkün olduğunca yüksek tutulmalı ve aynı zamanda uzatılmış bir salım profiline ulaşılmalıdır [45]. Dolayısıyla Aqua nanotüplerden MTX salım profili üzerinde iyileştirmeler yapılması gerekliliği doğmuştur.

Bu hedef doğrultusunda tabaka-tabaka-kaplama (TTK) yönteminden yararlanılarak Aqua nanotüplerin dış yüzeylerinin kaplanmasıyla ilaç salımına karşı ek bir bariyer yerleştirilerek MTX salımında farklılık sağlanabileceği fikri ortaya çıkmış ve buna yönelik incelemelere başlanmıştır.

#### **4.4. İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerinin Yüzey Kaplamaları**

Aqua nanotüplerden gerçekleştirilen MTX salımlarının iyileştirmelerinin sağlanabilmesi adına zıt yüklü malzemeler arasında elektrostatik etkileşim kurulması esasına dayanan tabaka-tabaka-kaplama (TTK) yöntemi ile tüp yüzeylerinin farklı katmanlarla kaplanmasına yönelik çalışmalara geçilmiştir. Bu amaç doğrultusunda ilk katman olarak anyonik bir polielektrolit olan aljinat (ALG) kullanılması, devamında ise folik asit ile modifiye edilmiş kitosan tabakasıyla yapının zenginleştirilmesi hedeflenmiştir. Böylelikle salım profilini geliştirmenin yanı sıra aynı uygulama üzerinden moleküler ilaç hedeflemesinin de sağlanabilmesi olası hale getirilmiştir.

Aqua nanotüpler üzerine uygulanan bu katmanların yüzeyde başarıyla tutunduğunun belirlenmesi ve yine kaplamalar sırasında değişen parametrelerin nasıl bir etkiye sahip olduğunun takip edilmesi aşamasındaysa iki farklı değişken üzerinden çift yönlü bir kontrol sağlanmıştır. Bu değişkenler; nanotüp çaplarındaki artışın AFM görüntülerinden ölçümü ve tüplerin yüzey yük değerlerindeki değişimin zeta potansiyel ölçümüne yansıyan etkisidir.

##### **4.4.1. İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerinin Aljinat ile Kaplanması**

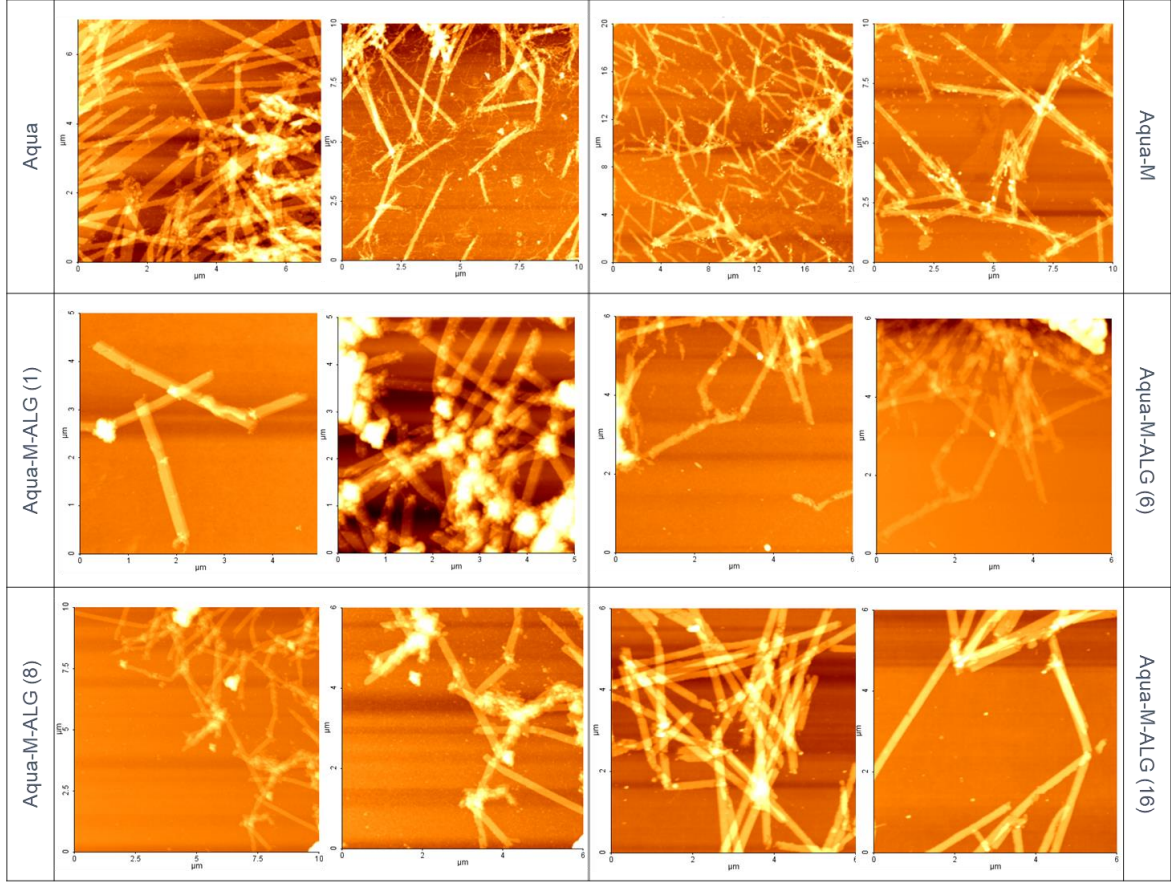
###### **4.4.1.1. Aljinat Kaplı Aqua Nanotüplerin Karakterizasyonu**

Aljinat (ALG)  $\beta$ -D-mannuronik asit ve  $\alpha$ -L-guluronik asit monomerlerinden oluşan ve kahverengi alglerden elde edilen doğal bir kopolimerdir. Sulu çözeltisinde yapısındaki karboksilik asit grupları ( $pK_a$ : 3,6) iyonlaşarak eksi yükü yüklenmesini sağlamaktadır. Yüksek biyouyumluluk, düşük toksisite, kolay jelleşme ve düşük maliyet gibi sebeplerden dolayı ilaç taşınımı, doku mühendisliği ve yara kapama gibi uygulamalarda kullanımı sıklıkla tercih edilmektedir [74]. Çalıştığımız Aqua nanotüp sisteminde de bu avantajlarından faydalanmak adına ilk yüzey kaplama

tabakası olarak kullanılması tercih edilmiştir. ALG tabakasının bir sonraki kaplama işlemine geçilmeden önce ara basamak olarak kullanılması planlanmıştır.

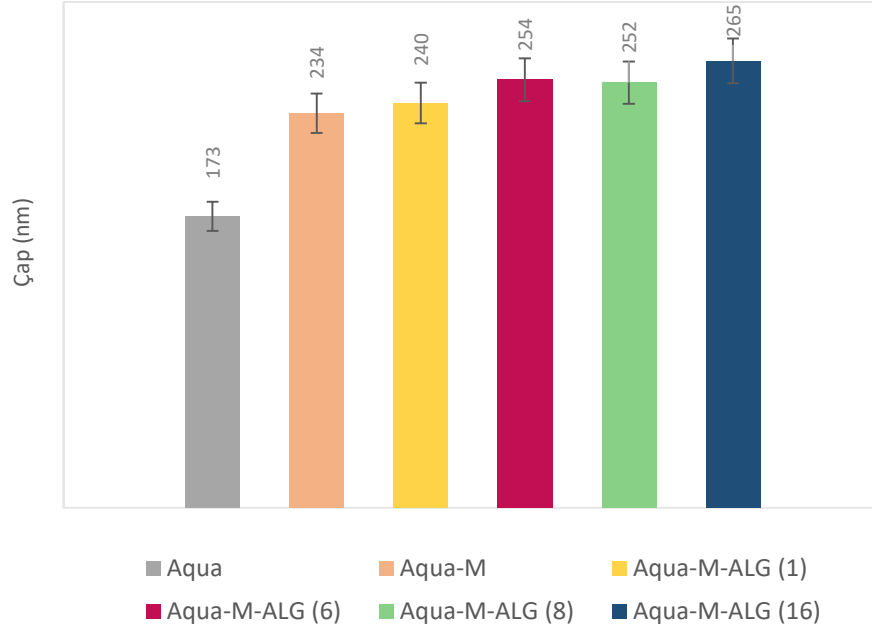
Yapılan ilk denemelere ağırlıkça 1:1 orana denk gelecek şekilde ALG ve MTX yüklü Aqua nanotüpler kullanılarak başlanmıştır ancak bu orandaki kaplamanın ilaç salımını hedeflenenden çok daha fazla derecede azaltması ve salınan ilaç derişimin etkisiz düzeye inmesiyle nanotüp miktarı artırılarak 1:2 ALG:Aqua-M oranına geçilmiştir. Kaplama işlemi için, ilaç yüklü Aqua nanotüpler 1 ml hacminde ve pH değeri 9 olan ALG çözeltisi içinde çeşitli süreler boyunca inkübe edilmiştir. Yapılan literatür araştırmasında 16 saate denk geldiği düşünölen bir gece ifadesinden yola çıkılarak bu sürenin inkübasyon için üst limit olarak belirlenmesine karar verilmiş ancak 1 saat, 6 saat ve 8 saat gibi daha kısa süreli denemelerin de yapılması tercih edilmiştir [71].

Kaplama sonrasında santrifüj ile ortamdan ayrılan nanotüpler Aqua-M-ALG kısaltmasıyla ifade edilecektir ve parantez içindeki değerler ALG kaplama süresini yansıtmaktadır. Aqua-M-ALG formunda elde edilen nanotüplerin karakterizasyonlarına ilk olarak AFM incelemesi ile başlanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Yalın, ilaç yüklü ve farklı sürelerce ALG kaplaması gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM üzerinden elde edilen topografya görüntüleri

AFM görüntüleri üzerinden yapılan ilk değerlendirme ALG kaplaması sonrasında Aqua nanotüplerin düzgün silindirik formlarını koruyup korumadıklarına dairdir ve Şekil 4.4'te de net bir biçimde görüldüğü gibi tübüler yapılarının varlığını sürdürdüğü söylenebilmektedir. İkinci adım olarak, kaplama süresinin etkisini incelemek üzere görüntülerdeki nanotüp çaplarının ölçümü gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için en az 15 farklı tüp çapı üzerinden yapılan değerlendirmelere ait ortalama sonuçlar Şekil 4.5'te sunulmaktadır.

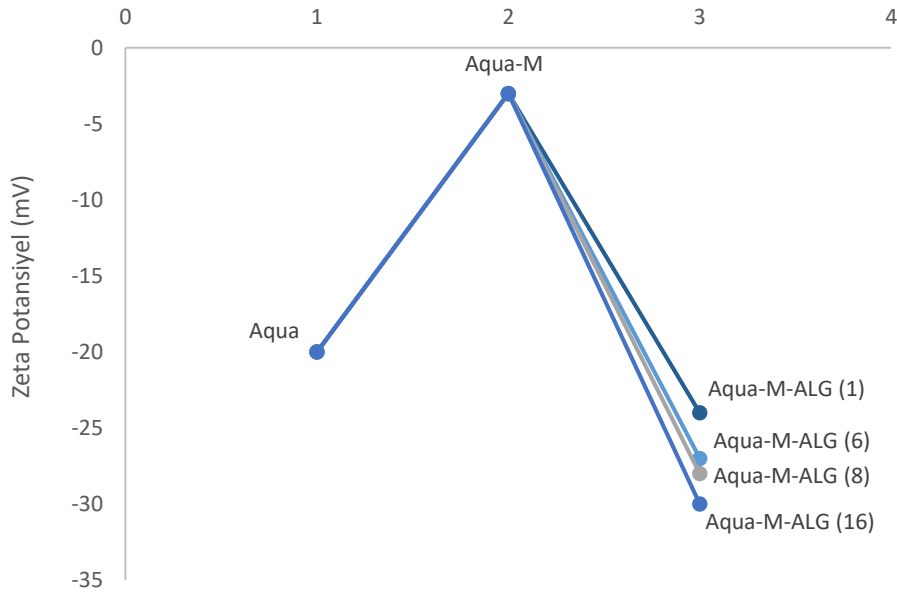


Şekil 4.5. Yalın, ilaç yüklü ve ALG kaplaması gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM görüntüleri üzerinden ölçülen ortalama çap değerleri

Aqua nanotüpler üzerine kaplanan ALG tabakasının etkisini daha net anlayabilmek adına ölçümlere yalın Aqua nanotüpler ve yalnızca MTX yüklemesi gerçekleştirilmiş olanlar (Aqua-M) ile başlanmıştır. Buna göre Aqua nanotüpler 160-184 nm arasında değişen çap uzunluğuna sahiptir. Yalın Aqua nanotüplere ait daha önce gerçekleştirilen TEM ölçümleri ile bu sonuçlar karşılaştırılacak olursa AFM ile elde edilen ölçüm sonuçlarının da son derece kabul edilebilir olduğu görülecektir. MTX yüklemesi sonrasındaki çap değerlerinin ise 215-246 nm arasında değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. Yani ortalama değerler üzerinden gözlenen artış yaklaşık olarak 60 nm'dir. Böyle bir artışın kıyasını yapabilmek adına tekrar literatür sonuçlarına bakılarak çeşitli nanotüp formlarında ilaç yüklemesi durumunda ne gibi değişiklikler gözlemlendiği incelenmiştir. Örneğin, Zhang ve çalışma arkadaşları karbon nanotüplere DOX yüklemesi gerçekleştirdikten sonra tüp çapında bariz bir artış ölçüldüğünü raporlandırmıştır [75]. Nicel olarak ulaşılabilen kaynaklarda ise bir çeşit inorganik nanotüp formu olan halositlerde yine DOX yüklemesi sonrası çap değerlerinin yaklaşık iki katına kadar arttığı dolayısıyla ilacın büyük bir kısmının yüzeyde bulunduğu belirtilmiştir [76]. Dolayısıyla, Aqua nanotüplerde ilaç yüklemesiyle birlikte gözlenen bu çap artışlarının da kabul edilebilir bir sonuç olduğu görülmektedir.

ALG tabakası kaplandıktan sonra 1 saat, 6 saat, 8 saat ve 16 saat kaplama süreleri için tüp çapları sırasıyla  $240 \pm 18$ ,  $254 \pm 28$ ,  $252 \pm 16$  ve  $265 \pm 13$  nm ortalama değerlerinde ölçülmüştür. Bu durumda referans noktası olarak alınabilecek Aqua-M tüp çapı ile ALG kaplılar arasındaki çap kalınlığı farkı 1 saat için 6 nm, 6 saat için 20 nm, 8 saat için 18 nm ve 16 saat için 31 nm'dir. Görüldüğü üzere kaplama süresi uzadıkça beklenildiği gibi tüp çapları da artış göstermiştir.

Ancak AFM görüntülemeleri sonucunda kaplama sürelerindeki değişimin miktar olarak etkisi tam olarak belirlenememiştir. Bu nedenle zeta potansiyel ölçümü ile yüzeydeki yük miktarına bakılarak ikinci bir değerlendirme yapılması yoluna gidilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Yalın, ilaç yüklü ve ALG kaplaması gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin zeta potansiyel değerleri

İlaç yüklemesinden önce pH 9 ortamında -20 mV net yüke sahip olan Aqua nanotüplerde MTX alımıyla birlikte bu değer -3 mV'a yükseldiği görülmektedir. ALG tabakasının kaplanmasından sonraysa yüzey yeniden eksi yükle yüklenerek 1 saat, 6 saat, 8 saat ve 16 saatlik kaplama periyotları için düzgün bir artış göstermiş ve sırasıyla  $-24 \pm 3$ ,  $-27 \pm 1$ ,  $-28 \pm 2$  ve  $-30 \pm 2$  mV olarak ölçülmüştür. Bu bulgulara dayanarak kaplama süresini arttırmanın yüzeye tutunan ALG miktarında

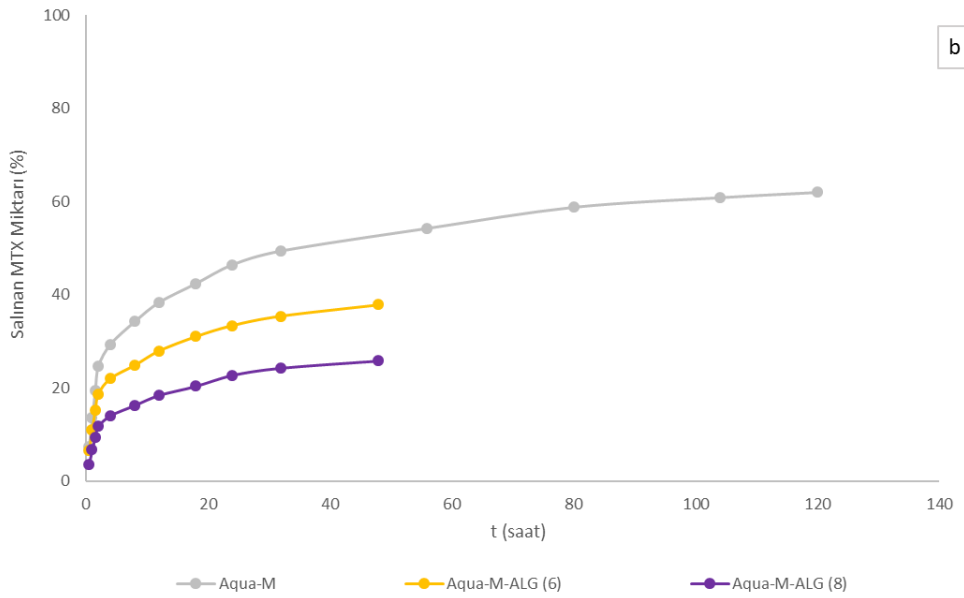
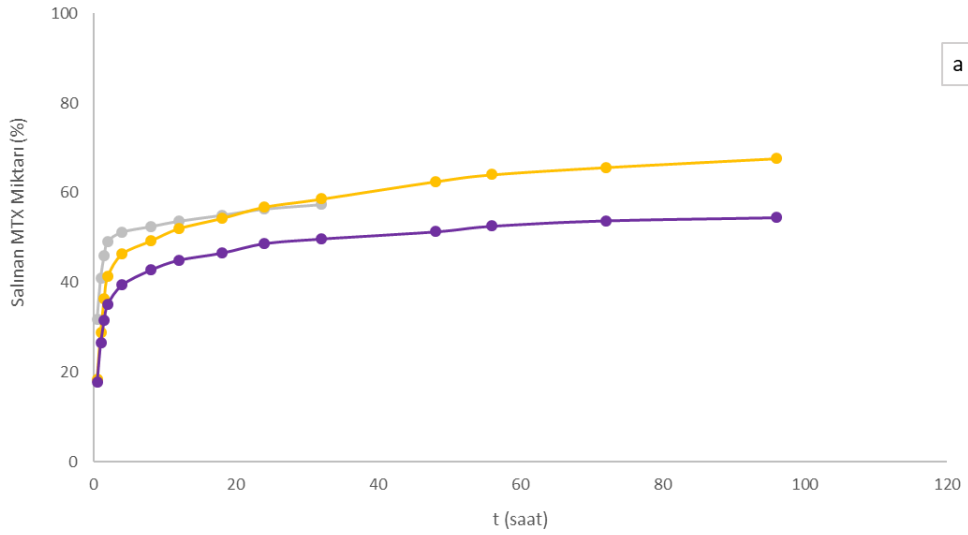


önemli bir farklılığa sebep olmadığı söylenebilmektedir. Ayrıca yüzey yük miktarının ALG kaplaması sonrasında yalın hadeki Aqua nanotüplerden daha negatif hale gelmiş olması zeta potansiyeldeki bu düşüşün yalnızca kaplama sırasındaki bir miktar ilaç kaybından değil, ALG tabakasının yüzeyde başarıyla tutunmasından kaynaklandığını göstermesi açısından öneme sahiptir.

AFM ve zeta potansiyel ölçümünden elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, Aqua nanotüplerin üzerine ALG tabakasının başarılı şekilde kaplanabildiği ancak inkübasyon süresini değiştirmenin tabaka kalınlığı üzerinde bariz bir farklılığa sebep olacak bir etkisinin gözlemlenmediğini söylemek mümkündür. Bu noktada Aqua-M-ALG yapısındaki nanotüplerden ilaç salımına geçilmeden önce 16 saat boyunca Aqua nanotüplere yüklenmiş MTX'un bir kısmının kaybedilmesi ihtimali de göz önünde bulundurularak görece daha uzun olan bu bekleme süresinin elimine edilmesine karar verilmiştir. 6 saat ve 8 saatlik süreler ise kaplama sırasında birbirlerine oldukça yakın ve ihmal edilebilecek miktarda ilaç kaybının da gözlemlenmesi sebebiyle salımı incelenecek nanotüp formları olarak seçilmiştir.

#### **4.4.1.2. Aljinat Kaplı Aqua Nanotüplerden İlaç Salım Özelliklerinin İncelenmesi**

ALG tabakasının MTX salımı üzerinde yarattığı etkiyi görmek için daha önce belirtilen nedenler dolayısıyla 6 saat ve 8 saatlik kaplama süreleri tercih edilmiştir. Aqua-M-ALG (6) ve Aqua-M-ALG (8) olarak ifade edilecek bu nanotüp formlarına ait salım profilleri Şekil 4.7'de gösterilmektedir.



Şekil 4.7. Yalın haldeki ve ALG kaplaması gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerden iki ayrı pH ortamlarındaki MTX salım profilleri a) pH 5,5 b) pH 7,4

İlk olarak Şekil 4.7a'da verilen pH 5,5 ortamındaki MTX salımları incelenirse, hem 6 saatlik hem de 8 saatlik ALG kaplamalarıyla birlikte ilk ve ani salım miktarının oldukça azaldığı görülecektir. Aqua-M nanotüplerde yaklaşık % 32 olan bu değer Aqua-M-ALG (6) ve Aqua-M-ALG (8) için sırasıyla % 26 ve % 18 değerlerine gerilemiştir. Salım süresine bakılacak olduğunda ise, Aqua-M'de 32 saat devam eden MTX salımının 96 saate kadar başarıyla uzatılmıştır.

Şekil 4.7b'de yer alan pH 7,4 salım ortamındaki sonuçlara bakıldığında ise, pH 5,5 salımının aksine sürenin kısılması ve salınan MTX miktarının azalması hedeflerine ulaşıldığı açıkça görülmektedir. Aqua-M'e ait sonuçlarda yaklaşık % 30 olarak ölçülen 4. saatin sonundaki salınan MTX miktarı Aqua-M-ALG (6) ve Aqua-M-ALG (8) için sırasıyla % 22 ve % 14'e kadar düşürülmüştür. Salım sonunda ise Aqua-M'lerden salınan miktar % 60'a kadar çıkarken, Aqua-M-ALG (6) ve Aqua-M-ALG (8)'de yalnızca % 37 ve % 30 oranlarında MTX salımı gerçekleşmiştir. Yine aynı şekilde Aqua-M'de 120 saate varan salım süresi, 6 saat ve 8 saatlik kaplamalar için 48 saat ve 80 saatte sona ermiştir.

İki farklı pH ortamında ALG tabakasının salımı daha uzun süreye yayma ve daha kısa sürede tamamlanması şeklinde zıt etki göstermesinin değişen koşullarla birlikte Aqua nanotüpler, MTX ve ALG arasında kurulan elektrostatik etkileşimlerin farklılaşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. pH 7,4'te ALG ve Aqua nanotüplerin negatif yükleri  $pK_a$  değerleri 3,4 ve 4,9 olan  $-COOH$  grupları nedeniyle artarak, MTX'un her ikisi tarafından da daha iyi tutulmasına ve salınan miktarının düşmesine neden olacaktır. pH 5,5'te ise yükü azalan ALG tabakası salımı MTX ile yük etkileşimini kuvvetlendirerek azaltmaktan ziyade salım sırasında aşılması gereken fazladan bir engel oluşturarak yapmaktadır. Dolayısıyla MTX daha az ancak daha uzun süreye yayılmış bir salım profili sergileyebilmektedir.

ALG kaplamasının getireceği bir diğer önemli avantaj ise inorganik yapıdaki karşılıklarına göre (ör: KNT) daha az mekanik dayanımı olan lipid Aqua nanotüplerin uzayan salım süreleri boyunca biyolojik koşullardaki kararlılığını arttıracak olmasıdır [77].

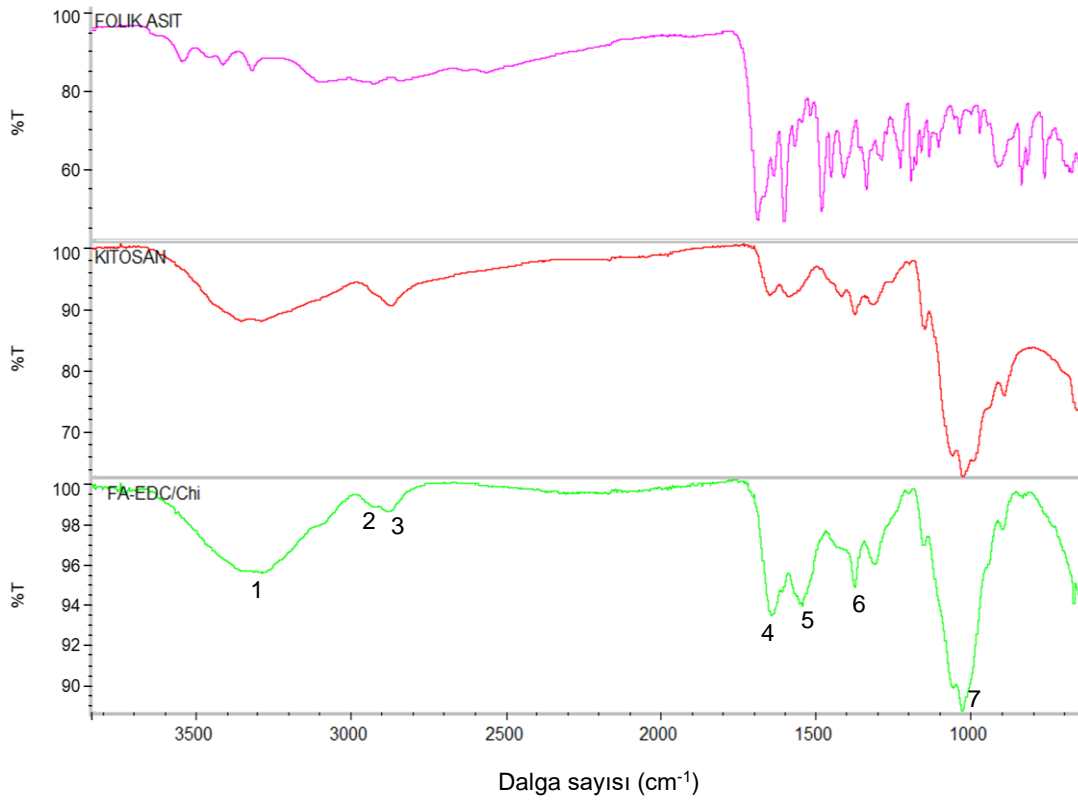
AFM görüntülemeleri ve zeta potansiyel ölçümleri ile kaplama süresinin tutunan ALG miktarı üzerindeki kesin olarak belirlenemeyen etkisi salım sonuçları ile net biçimde ortaya konulmuştur. Her iki koşulda da salınan MTX miktarının, Aqua-M-ALG (6)'da Aqua-M-ALG (8)'den daha fazla olması tahmin edildiği gibi kaplama süresi uzadıkça nanotüp yüzeyinde tutunan ALG miktarının artmış olabileceğini göstermektedir.

## 4.4.2. İlaç Yüklü Aqua Nanotüplerinin Folik Asit-Kitosan ile Kaplanması

### 4.4.2.1. Folik Asit-Kitosan Konjuge Yapısının Sentez ve Karakterizasyonu

ALG tabakası ile ilk aşama yüzey kaplaması gerçekleştirilen ilaç yüklü Aqua nanotüplere, ikinci katman olarak beraberinde pek çok farklı avantajı da getirecek, kimyasal bağ ile konjuge yapı haline getirilmiş folik asit-kitosan (FACHI) tabakasının kaplanmasına karar verilmiştir. Bu noktada, ilk olarak FACHI yapısının eldesine ait kimyasal reaksiyon ve karakterizasyon basamaklarına değinilecektir.

FACHI konjuge yapısının sentezi için, karboksilik asit grupları 1-(3-dimetillaminopropil)-3-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC) ile aktif hale getirilmiş folik asit (FA) ve düşük molekül ağırlıklı, % 75 asetilasyon derecesine sahip kitosan (CHI) kullanılmıştır. Sentez karakterizasyonu FTIR analizi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Yalın FA ve CHI ile FACHI konjuge yapısına ait FTIR spektrumu

Şekil 4.8'de reaksiyon öncesi yalın hallerinde bulunan FA ve CHI'a ek olarak sentez sonucu elde edilen FACHI konjuge yapısına ait FTIR spektrumları yer almaktadır. FACHI konjuge yapısının FTIR spektrumu üzerinde yapılan incelemelerde kitosana ait karakteristik piklere ek olarak, bu zincire dahil olan folik asit gruplarının varlığını gösteren özel pikler belirlenmiştir. Buna göre; 1, 3, 4 ve 7 numaraları ile gösterilen pikler, sırası ile  $3287\text{ cm}^{-1}$  (O-H gerilme),  $2868\text{ cm}^{-1}$  (C-H gerilme),  $1643\text{ cm}^{-1}$  (N-H eğilme) ve  $1028\text{ cm}^{-1}$  (C-O-C gerilme) konumlarındadır ve kitosana ait karakteristik pikleri ifade etmektedir. Bunlar arasında  $3287\text{ cm}^{-1}$  konumunda yer alan pikin reaksiyon sonrası oluşan N-H grupları ile örtüşmesinden dolayı daha şiddetli hale geldiği görülmektedir [58]. 2, 5 ve 6 numaraları ile belirtilmiş pikler ise folik asitin sırasıyla  $2927\text{ cm}^{-1}$  (C-H gerilme),  $1542\text{ cm}^{-1}$  (serbest N-H eğilme) ve  $1439\text{ cm}^{-1}$  (aromatik halkadaki C=C gerilmesi) konumunda yer alan pikleridir ve böylelikle iki molekül arasındaki kimyasal konjugasyonun başarılı şekilde gerçekleştiği ortaya konulmaktadır [58, 78, 79].

FA'in başarılı biçimde CHI üzerine bağlandığının tespit edilmesinin ardından bu yapı içindeki nicel tayinine geçilmiştir. Bu amaçla, UV-Vis spektrofotometresinden yararlanılmış ve ilk olarak FA'e ait 363 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu elde edilmiştir (Ek 4). Daha sonrasında Eşitlik 3.5'te verilen bağıntı kullanılarak FA'in bağlanma derecesi (BD) şeklinde ifade edilebilecek değere ulaşılmıştır. Buna göre, 1 mol CHI üzerinde 47,54 mol FA yer aldığı belirlenmiştir. Ancak CHI oldukça geniş bir aralıkta molekül ağırlığı değişen bir biyopolimer olduğu için bu değeri daha anlamlı kılabilmek ve literatürle karşılaştırabilmek adına CHI zincirindeki amin gruplarında ne kadar FA bağlandığını gösteren oran temel alınmıştır. Sentez sonrası elde edilen ürünlerdeki FA:NH<sub>2</sub> oranı 0,084 olarak bulunmuştur.

Literatürde yer alan çeşitli FACHI sentez sonuçlarına bakıldığında reaksiyon sonrasında elde edilen bağlanma dereceleri Çizelge 4.3'te verilerek tez çalışmasında sentezlenen FACHI konjuge yapısıyla karşılaştırılmıştır.

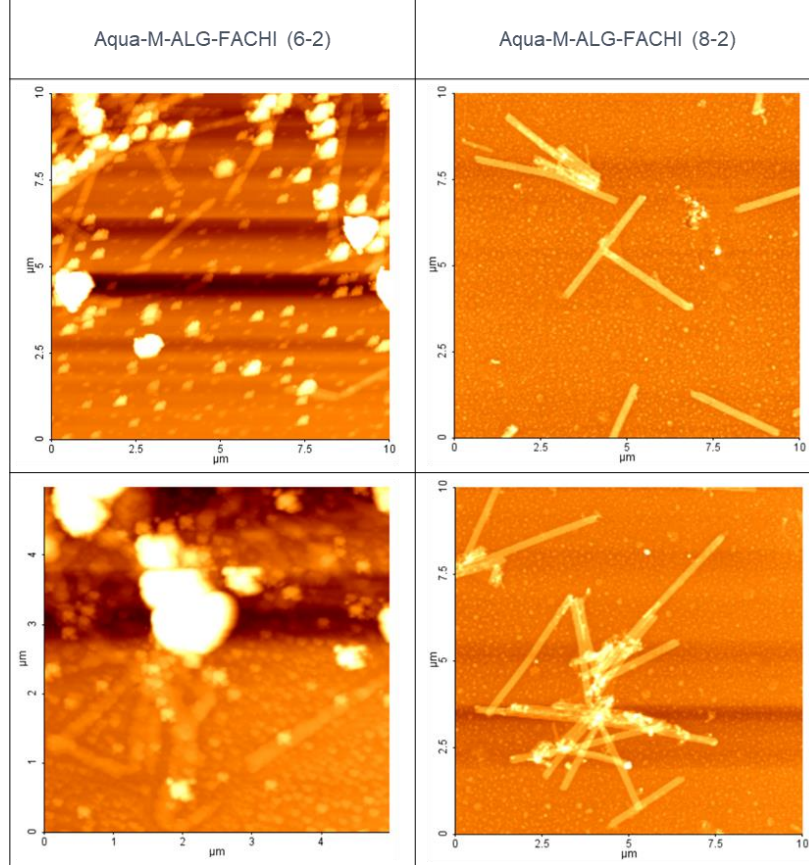
Çizelge 4.3. FACHI sentezi gerçekleştirilen bazı çalışmalarda ulaşılan bağlanma dereceleri

<i>CHI Molekül Ağırlığı (kDa)</i>	<i>Başlangıç FA:NH<sub>2</sub></i>	<i>Sentezlenen FA:NH<sub>2</sub></i>	<i>Kaynak</i>
120	1	0,084	-
150	0,1	0,033	[79]
150	0,2	0,059	[79]
400	1	0,085	[80]
400	2	0,124	[78]

Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi kitosan ağırlığı ne olursa olsun, amin gruplarına oranla reaksiyona sokulan FA miktarı arttıkça bağlanma derecesi de artmıştır. Tez çalışmasında sentezlenen FACHI yapısı da 1:1 başlangıç oranı göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir ve elde edilen ürünlerdeki bağlanma derecesinin de literatürle son derece uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

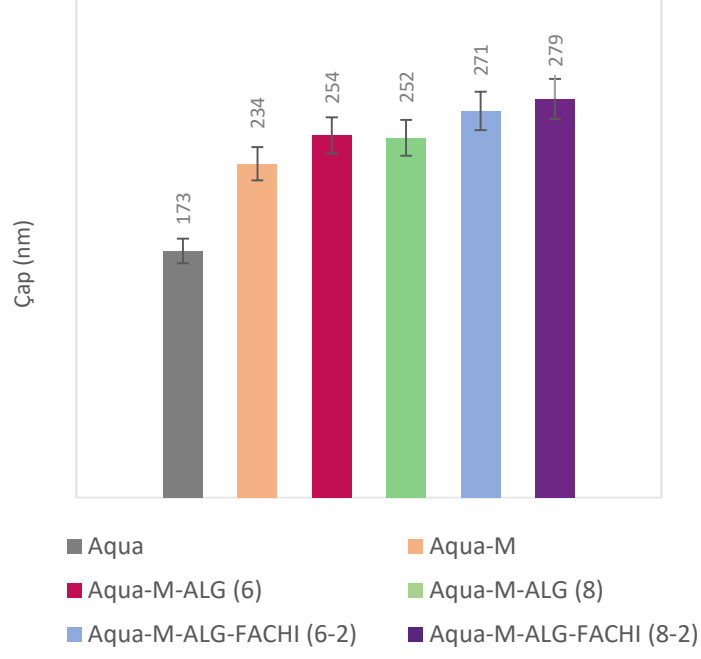
#### 4.4.2.2. Folik Asit-Kitosan Kaplı Aqua Nanotüplerin Karakterizasyonu

FACHI kaplı Aqua nanotüplerin karakterizasyon çalışmalarında da ALG tabakasında olduğu gibi AFM görüntüleri elde edilerek tüp çapında meydana gelen değişim ölçülmüş ve zeta potansiyellerinin ne şekilde farklılaştığı incelenmiştir.



Şekil 4.9. ALG ve FACHI tabakaları ile yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM üzerinden elde edilen topografya görüntüleri

Şekil 4.9'da da görüldüğü üzere Aqua nanotüplerin tübüler formunda FACHI kaplaması sonrası herhangi bir bozulma meydana gelmediği tespit edildikten sonra tüp çaplarının değerlendirilmesine geçilmiştir.



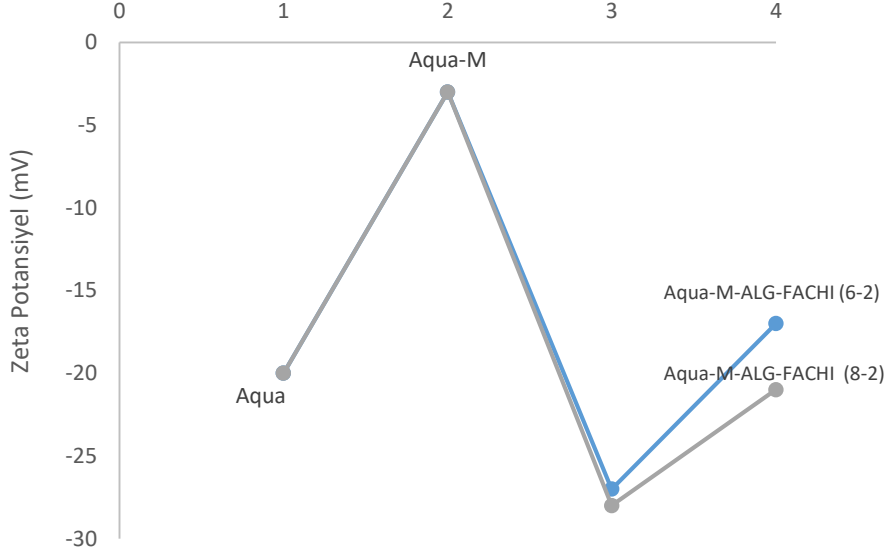
Şekil 4.10. Yalın, ilaç yüklü ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM görüntüleri üzerinden ölçülen ortalama çap değerleri

Şekil 4.10'da verilen sonuçlar AFM görüntülerinden elde edilen ve en az 15 farklı nanotüp üzerinden okunan çap değerlerinin ortalamasını yansıtmaktadır. Buna göre ALG üzerine 2 saat FACHI konjuge yapısının kaplanmasıyla birlikte ortalama çap değeri yaklaşık olarak 20 nm'lik bir artış göstererek Aqua-M-ALG-FACHI (6-2) ve Aqua-M-ALG-FACHI (8-2) için sırasıyla  $271 \pm 10$  ve  $279 \pm 12$  nm değerine ulaşmıştır. FACHI çözeltisine aynı koşullarda ve aynı süre boyunca muamele edilmiş ilaç yüklü Aqua nanotüpler için böylesine yakın sonuçlar elde edilmesi son derece doğaldır.

İkili tabaka kaplanması sonrasında nanotüplerin ulaştığı son çap değerlerinin hata payları da göz önüne alındığında 300 nm'yi aşmadığının görülmesi canlı sistemlerde çalışıldığı durumlarda doğabilecek kısıtlamaların önüne geçebilmek adına önemli bir sonuçtur. Nanotüp çapındaki en yüksek artışın gözlenebileceği Aqua-M-ALG-FACHI formunda dahi intravenöz uygulama ile vücuda verilmesi planlanan ilaç taşıyıcı sistemlerde tercih edilmesi gereken uygun boyut aralığı içinde kalınması dikkate değer pozitif bir bulgudur [16].



AFM görüntülemelerinin ardından, kaplamanın gerçekleştiği koşullarda Aqua-M-ALG-FACHI (6-2) ve Aqua-M-ALG-FACHI (8-2) için zeta potansiyel değerlerinin ölçümüne geçilmiştir (Şekil 4. 11.).



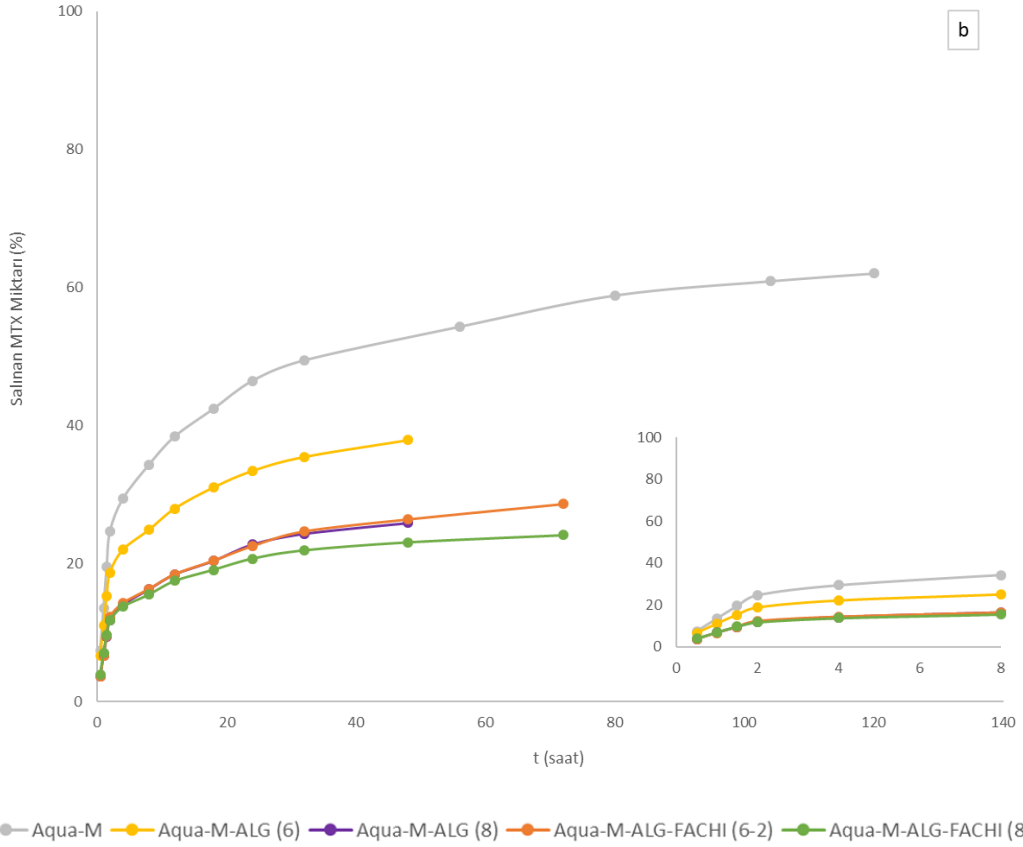
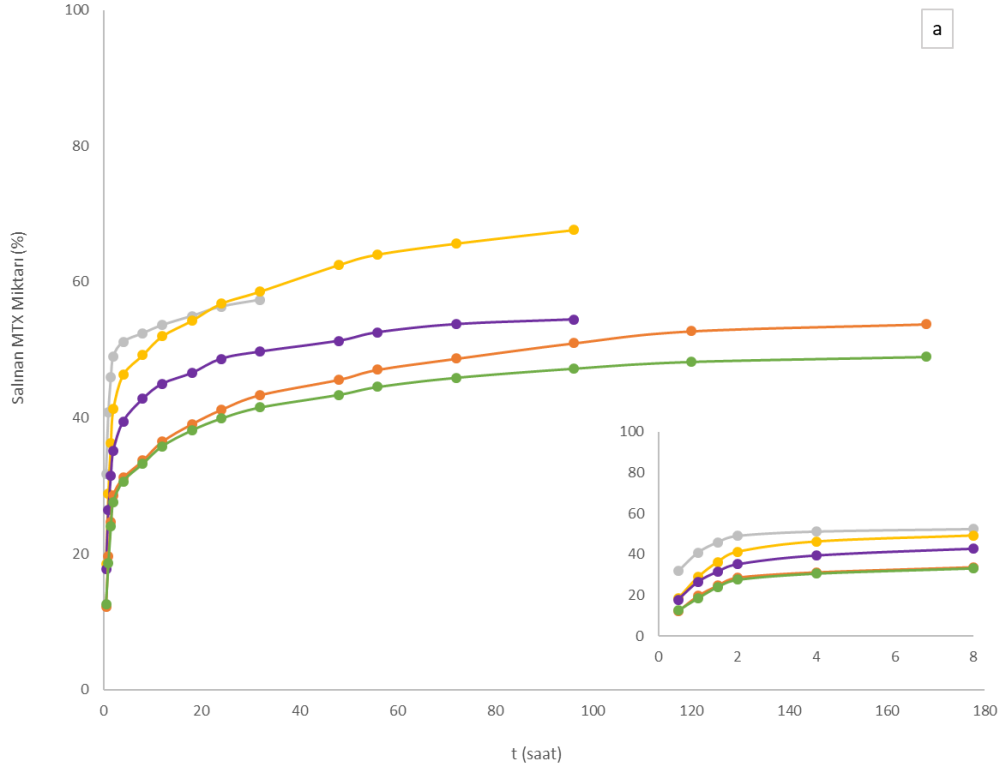
Şekil 4.11. Yalın, ilaç yüklü ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin zeta potansiyel değerleri

Bu ölçüm sonuçlarına göre Aqua-M-ALG-FACHI (6-2) ve Aqua-M-ALG-FACHI (8-2) formundaki Aqua nanotüplere ait yüzey yükleri sırasıyla  $-17 \pm 1$  ve  $-21 \pm 2$  mV olarak bulunmuştur. Üzerine herhangi bir işlem uygulanmayan CHI çözeltilerinin farklı koşullarla (sıcaklık, çözücü, pH vs.) değişiklik göstermekle birlikte net pozitif yüke sahip olduğu bilinmektedir [81]. Ancak FA ile fonksiyonelleştirilmesinin ardından üzerindeki amin gruplarının bir kısmının kapanmasından dolayı toplam pozitif yükünde belli bir azalma meydana gelmesi de beklenen bir sonuçtur [79]. Bu nedenle ALG tabakası sonrasında FACHI tabakası ile kaplanan Aqua nanotüplerde net bir pozitif yük gözlenmemekle birlikte, yüzey yükünün artan yöndeki değişikliği, tüpler üzerinde tutunan FACHI varlığını doğrulamak adına önemli bir bulgudur.

#### 4.4.2.3. Folik Asit-Kitosan Kaplı Aqua Nanotüplerden İlaç Salım Özelliklerinin İncelenmesi

İlaç yüklü Aqua nanotüpler üzerine başarıyla kaplanan ALG tabakasıyla MTX salım profili üzerinde hedeflenen etkiye büyük ölçüde ulaşılmıştır. Ancak ilaç taşıyıcı sistemizi bir adım ileri götürebilmek adına nanotüpler üzerine, aynı yapıda moleküler hedefleme yapılabilmesini de sağlayacak olan FACHI konjuge yapısının da kaplanması tercih edilmiştir. TTK yöntemi kullanılarak hazırlanan ikinci yüzey kaplamasının varlığı AFM görüntülemeleri ve zeta potansiyel ölçümleri ile doğrulandıktan sonra MTX salım profilinde meydana gelecek değişikliklerin incelenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. MTX salımları yine UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak incelenmiştir. FACHI yapısının, spektrumun analiz edilen bölgesinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir.

Şekil 4.12'de daha önce verilen salım profillerine ek olarak ALG tabakası üzerine 2 saat süreyle FACHI konjuge yapısının kaplandığını belirten Aqua-M-ALG-FACHI (6-2) ve Aqua-M-ALG-FACHI (8-2) formlarından MTX salımları ilk 8 saatlik yakınlştırılmış görüntüleriyle birlikte yer almaktadır. Ayrıca MTX salımı sonrasında Aqua nanotüplerin morfolojisinde farklılaşma ya da yüzeyde tutunan tabakalarda kayıp olmadığını gösteren AFM görüntüleri Ek 5'te sunulmuştur.



— Aqua-M — Aqua-M-ALG (6) — Aqua-M-ALG (8) — Aqua-M-ALG-FACHI (6-2) — Aqua-M-ALG-FACHI (8-2)

Şekil 4.12. Yalın haldeki ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplere ait iki ayrı pH ortamında kısa süreli ve denge anına kadar olan MTX salım profilleri a) pH 5,5 b) pH 7,4

İlk olarak Şekil 4.12a'da verilen pH 5,5 ortamındaki MTX salımları karşılaştırılacak olursa, FACHI tabakasıyla beraber ilk ve ani salım miktarının ciddi biçimde azaltıldığı ve aynı zamanda birim zamanda salınan ilaç miktarının da düşürüldüğü görülmektedir. İlk 24 saatlik süre boyunca Aqua-M-ALG-FACHI (6-2) ve Aqua-M-ALG-FACHI (8-2) yapısındaki nanotüplerden salınan MTX miktarları arasında ciddi bir farklılık oluşmaz iken bu süreden sonra zamanla Aqua-M-ALG-FACHI (8-2)'de daha az miktarda ilaç salımının gerçekleştiği gözlemlenmektedir. Yalnızca ALG tabakasıyla kaplanmış Aqua nanotüplerde de kaplama süresi uzadıkça salınan MTX miktarının azaldığı düşünülürse bunun beklenen bir sonuç olduğu görülecektir.

FACHI tabakasının sağladığı en önemli katkılardan biri de salım süresini ilk defa olarak 96 saatin üzerine çıkarması ve böylelikle uzatılmış bir salım profili oluşturabilmesidir. Denge anına ulaşana dek 168 saate yayılmış bir salım profili gözlenen ikili tabakaya sahip bu nanotüplerden belirtilen süre sonunda salınan ilaç miktarları Aqua-M-ALG-FACHI (6-2) ve Aqua-M-ALG-FACHI (8-2) için sırasıyla % 53,8 ve 49,1'dir.

Bir diğer salım ortamı olan pH 7,4'e ait salım verileri incelendiğinde ise Aqua-M-ALG-FACHI (6-2) ve Aqua-M-ALG-FACHI (8-2)'in yine aynı davranışı sergilediği ortadadır. Çift katmanlı bu nanotüplerde, yalın Aqua nanotüplere kıyasla salınan MTX miktarı yarıdan daha fazla azaltılarak 24 saatte Aqua-M-ALG-FACHI (6-2) için % 24,6'ya, Aqua-M-ALG-FACHI (8-2)'de ise %21,8'e kadar indirilmiştir.

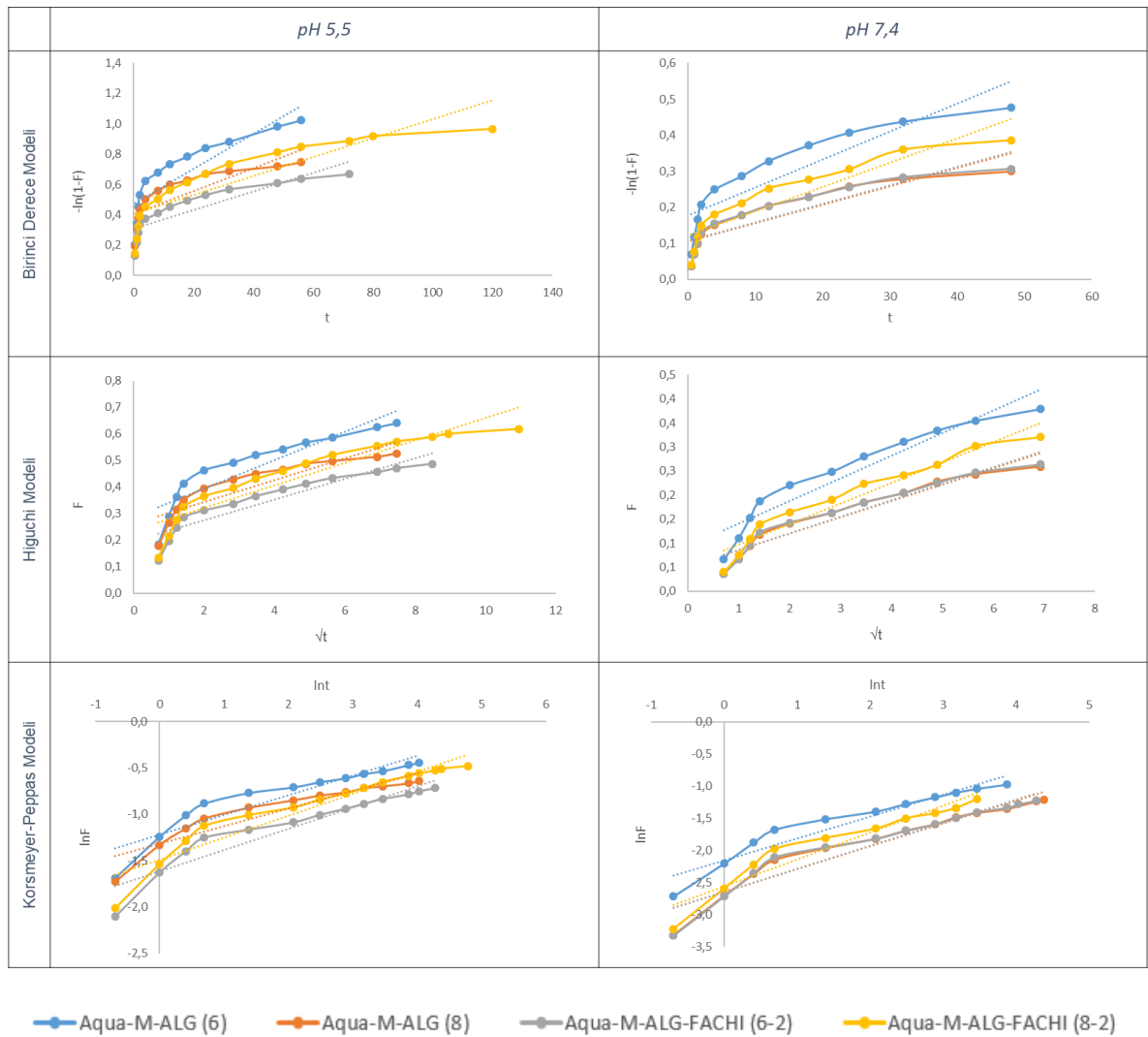
Yapılan çalışmalarla Aqua nanotüplerden MTX salım profilinde gelinen son noktayı literatürde yer bulmuş çeşitli taşıyıcı sistemlerle karşılaştırılarak değerlendirmek faydalı olacaktır. Zheng ve çalışma grubunun geliştirdiği, silika nanopartiküllerinden oluşan sistemde pH 5'te salımın neredeyse 5 saatte dengeye ulaştığı ve bu sürede MTX'un yaklaşık % 40'ının salındığı belirtilmiştir [69]. Che ve çalışma grubunun ortaya koyduğu ve yine silika nanopartiküllerin kullanıldığı bir diğer araştırmada ise aynı pH koşulunda salınan MTX miktarının % 40'a ulaşması için 48 saatlik bir sürenin gerektiği görülmüştür [82]. Ho ve araştırma grubuna ait çalışmada bir tür nanoelmas yapılarından yararlanılarak MTX salımı üzerine incelemelerde bulunulmuş ve asidik koşullarda ilacın % 45'in salımına 12 saatte

ulaştığı, 72 saate devam eden süreçte de salınan miktarda büyük bir değişim olmadığı belirtilmiştir [83]. Öte yandan Ping ve araştırma grubunun incelediği foksionelleştirilmiş polietilen glikolden sentezlenen misel yapılarıyla sağlanan MTX taşınımında ise pH 5 ortamında 48 saatte ilacın % 80'den fazlasının salındığı raporlanmıştır [84]. Dikkate değer bir başka çalışma olan Yang ve araştırma grubunun verdiği sonuçlara göre çok hızlı MTX salımına sebep olan polulan nanopartiküllerden tasarlanan sistemlerinde 48 saatte %90'ın üzerine çıkan bir salım oranı söz konusudur [85]. Bahsedilen tüm bu sistemlerde pH 7 ortamındaki MTX salımlarında ise ortak biçimde % 15-25 aralığında kalınmış olması kendi taşıyıcı sistemimiz Aqua nanotüpler ile örtüşen bir başka bulgudur.

Görüldüğü gibi taşıyıcı sistemimiz olan Aqua nanotüplerin en büyük avantajının uzatılmış salım süreleri olduğunu söylemek yanlış olmayacaktır. Ancak asidik pH koşullarında salınan MTX miktarının % 60'a yaklaşan değerleri ile benzerlerine oranla kısmen daha düşük seviyede kaldığı da düşünülebilir. Aqua nanotüplerin MTX tutma kapasitesinin ele alındığı Bölüm 4.3.1'de de detaylı şekilde bahsedildiği gibi literatürdeki karşılıklarına göre çok daha fazla MTX taşıyor olması, daha düşük yüzdeyle salım yapmalarına rağmen miktar olarak etkinliğinin kısıtlanmasının önüne geçmektedir.

#### 4.4.3. Aqua Nanotüplerden Mitoksantron Salımının Modellenmesi

Aqua nanotüplerden MTX salımı çeşitli koşullar altında elde edildikten sonra bu yapılara ait salım davranışlarının daha iyi anlaşılabilmesi adına kinetik modelleme yapılması yoluna gidilmiştir. Bu amaçla literatürde kontrollü ilaç salım çalışmalarında en sık örneğine rastlanan farklı kinetik modellerden olan birinci-derece modeli, Higuchi modeli ve Korsmeyer-Peppas modelinden yararlanılarak MTX salımı modellenmiştir. Salımın modellenmesi hesaplamalarında, plato bölgesine ulaşmadan önceki veri noktaları dikkate alınmıştır ve Bölüm 2.4'te her bir salım modeli için verilen eşitlikler kullanılmıştır.



Şekil 4.13. Belirli şekillerde yüzey kaplaması gerçekleştirilen Aqua nanotüplerden MTX salım davranışının farklı modellere göre hesaplanan profilleri

MTX salımına ait profilin hangi modelle daha uygun biçimde ifade edilebileceğini anlayabilmek için uygun eşitlikler ile hesaplama yapıldıktan sonra her bir yüzey kaplaması veri grubu için eğilim çizgileri eklenerek (Şekil 4.13) bunlar üzerinden o salım profilini tanımlayan determinasyon katsayısı ( $R^2$ ), salım hız sabiti (k) ve salımın derecesi (n) değerleri elde edilmiştir (Çizelge 4.4). Ortaya çıkan  $R^2$  değerleri birbirleri ile karşılaştırıldıktan sonra en yüksek değere ait modelin o deney grubunun salım profilini en iyi biçimde tanımladığına karar verilmiştir.

Çizelge 4.4. Yüzey kaplaması gerçekleştirilen Aqua nanotüplerden MTX salımı için hesaplanan kinetik parametreler

		Birinci Derece Modeli		Higuchi Modeli		Korsmeyer-Peppas Modeli		
		$R^2$	k	$R^2$	k	$R^2$	k	n
pH 5,5	Aqua-M-ALG (6)	0,76	0,012	0,82	0,053	0,86	0,295	0,21
	Aqua-M-ALG-FACHI (6-2)	0,77	0,006	0,86	0,041	0,90	0,199	0,23
	Aqua-M-ALG (8)	0,68	0,008	0,79	0,039	0,88	0,267	0,19
	Aqua-M-ALG-FACHI (8-2)	0,77	0,006	0,86	0,042	0,91	0,225	0,24
pH 7,4	Aqua-M-ALG (6)	0,80	0,008	0,91	0,047	0,92	0,117	0,34
	Aqua-M-ALG-FACHI (6-2)	0,81	0,005	0,92	0,034	0,93	0,071	0,36
	Aqua-M-ALG (8)	0,81	0,005	0,91	0,034	0,93	0,071	0,36
	Aqua-M-ALG-FACHI (8-2)	0,84	0,007	0,92	0,042	0,94	0,077	0,42

Çizelge 4.4'te uygulanan kinetik modellere göre Aqua-M-ALG ve Aqua-M-ALG-FACHI formundaki nanotüplerden her iki pH ortamında da elde edilen sonuçlar yer almaktadır. Açıkça görüldüğü üzere birinci derece modeli her örnek için en düşük  $R^2$  değerini vermektedir ve bu nedenle uygun model olarak seçilmesi söz konusu olmamıştır. Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modellerinin  $R^2$  değerleri arasında ise kısmen düşük farklar gözlemlenmesine rağmen Korsmeyer-Peppas modelinin

taşınım sistemimizden ilaç salımını daha yüksek doğrulukla tanımlayacağı düşülmüştür.

Korsmeyer-Peppas modeli uygun salım modeli olarak belirlendikten sonra, empirik eşitlikte yer alan ifadelerden 'n' ve 'k' değerlerinin incelemesine geçilmiştir. Özellikle salımı karakterize etmek adına kullanılan 'n' parametresinin 0,45'ten küçük bulunmasıyla yüzey kaplaması sağlanmış Aqua nanotüplerden MTX salımının Fickian difüzyon mekanizmasına uygun gerçekleştiği görülmüştür. Bu tür durumlarda, salım ilk olarak hızlı şekilde başlasa da devamında giderek yavaşlamakta olduğu ve sonunda bir denge noktasına ulaştığı bilinmektedir [51]. Aqua nanotüplerden MTX salımında ortaya konulan deneysel sonuçlarda da böyle bir profilin elde edildiği daha önceki başlıklarda açıkça bahsedilmiştir.



#### 4.5. Aqua Nanotüplerinin İkili İlaç Alım ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi

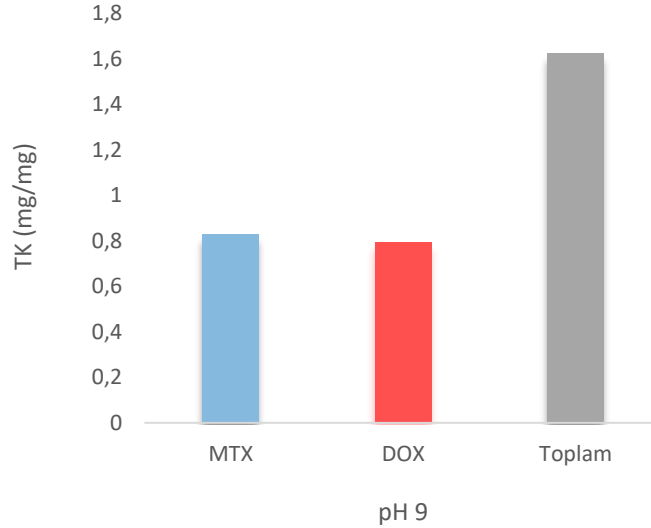
Aqua nanotüplerin MTX için avantajlı bir taşıyım sistemi olarak uygulanabilme potansiyelinin başarıyla ortaya konulmasından sonra kombine terapi alanındaki kullanım potansiyelini araştırmak üzere yüksek lisans tez çalışmasına devam edilmiştir. Aynı taşıyım sisteminde iki ya da daha fazla kemoterapi ajanının birlikte sunulmasını ifade eden kombine terapi için MTX'a ek olarak tercih edilecek ikinci model etkin maddenin yapısal özellikleri ve analiz edilebilirliği gibi çeşitli değerlendirmeler göz önüne alındıktan sonra doksorubisin (DOX) olmasına karar verilmiştir [66]. Molekül ağırlığı 578,98 g/mol olan DOX molekülüne ait kimyasal yapı ise Şekil 3.4b'de verilmektedir.

DOX, MTX'da olduğu gibi antrakininon temelinde dayanan ve çeşitli kötü huylu tümörlerin ve meme, masane, safra kanalı, yumurtalık ve karaciğer gibi kanserlerin tedavisinde yaygın biçimde kullanılan bir antibiyotiktir [86, 87]. Her iki ilaç da topoizomerez II inhibitörü sınıfında yer alan kemoterapi ajanları olmasına karşılık kanserli hücreler üzerinde sinerjetik etki yaratılması ve MDR oluşumunun önüne geçilmesi gibi sebepler gözetildiğinde MTX/DOX kombine uygulamasının kanserli hücrelere karşı daha etkin bir tedavi imkanı sağlayabileceği düşünölmektedir [29].

MTX/DOX kombine taşıyımına yönelik araştırılan parametrelerde MTX üzerinde en uygun sonucu verdiği düşünölen sonuçlardan yola çıkılmıştır. Bu sebeple ALG ve FACHI kaplamaları sıyasıyla 8 saat ve 2 saat tercih edilmiş, eş zamanlı alım ve salım çalışmalarında da Aqua-M ile aynı yöntem takip edilmiştir.

#### 4.5.1. Aqua Nanotüplerin Mitoksantron ve Doksorubisin Tutma Özelliklerinin İncelenmesi

Aqua nanotüplere kombine olarak MTX ve DOX yüklenmesi aşamasında, her iki ilaç çözeltisi de 1 mg/ml derişimde hazırlanmıştır ve incelenen literatür sonuçlarına göre en yüksek sinerjetik etkinliği gösterebildiği belirlenen 1:1 MTX:DOX oranında Aqua nanotüplere yüklemesinin yapılmasına karar verilmiştir [29]. Yükleme ortamı olan PBS tampon çözeltisinin pH'ı ise en yüksek ilaç yükleme kapasitesine ulaşılan 9'a ayarlanmıştır. MTX ve DOX'un birlikte yüklendiği Aqua nanotüpler bu noktadan itibaren Aqua-MD olarak ifade edilecektir. Elde edilen bulgular Şekil 4.14'te sunulmaktadır.



Şekil 4.14. Aqua nanotüplerin ikili ilaç yüklemesinde MTX ve DOX tutma kapasitesi (TK, mg/mg)

İkili ilaç alım çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında, Aqua nanotüplere 0,829 mg/mg MTX ve 0,793 mg/mg DOX yüklenebildiği yani Aqua nanotüplerin taşıdığı toplam ilaç miktarının 1,622 mg/mg olduğu görülmektedir. Tutulan MTX ve DOX miktarları ele alındığında aralarında % 5'ten daha az bir farklılık olduğu gözle çarpılmaktadır. MTX'un moleküler yapısında yer alan iki ayrı amin grubu ile Aqua nanotüplerle etkileşime girdiği, buna karşılık DOX'un tek bir amin grubu aracılığıyla Aqua nanotüplere bağlandığı düşünülürse MTX lehine gözlenen bu görece daha düşük farklılığın nedeni ortaya konulabilir.

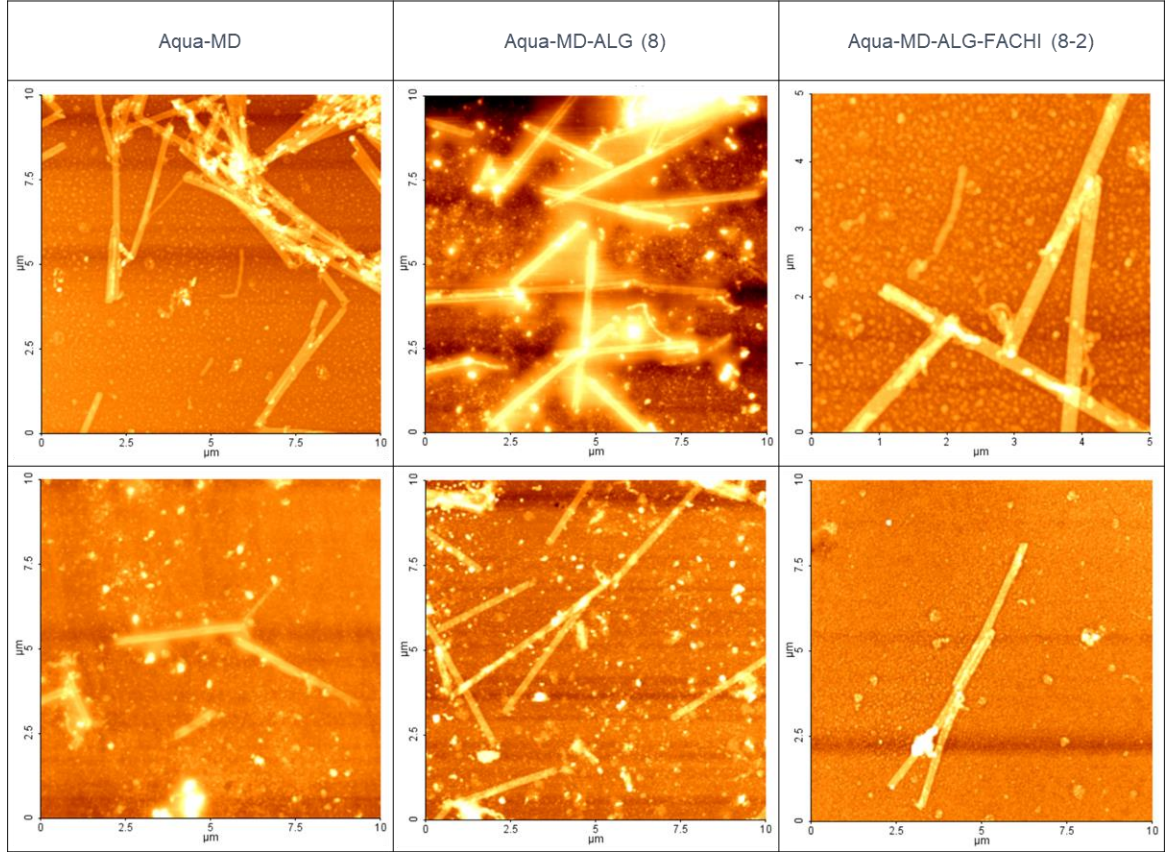
Aqua nanotüplerin seçimli olarak iki ilaçtan birine daha yüksek afinite göstermemesi ve yükleme sonrasında da nanotüplerin taşıdığı MTX:DOX oranının başlangıç koşulunda planlanan 1:1 oranından sapma meydana gelmeden devam ediyor olması hedeflenen sinerjik etkinin yakalanabilmesi açısından olduğu kadar, bu oranda değişiklik meydana geldiğinde sağlıklı hücrelerde yüksek oranda hücre ölümüne sebebiyet verdiği bilindiği için ayrıca kayda değerdir [29].

İkili ilaca ait toplam yükleme oranlarının karşılaştırılabileceği değer ise, şüphesiz toplam ilaç yüklemesi aynı orana denk gelen başlangıç MTX:Aqua oranı 2:1 olan koşuldur. 2:1 MTX:Aqua yükleme oranında ve aynı çözelti pH'ında 1,48 mg/mg MTX yüklenebildiği Bölüm 4.3.1'de verilmiştir. Görüldüğü gibi bu iki başlangıç koşulu arasında toplam ilaç tutma kapasitesi açısından % 10'un altında bir farklılık söz konusudur. İlk durumda kullanılan MTX'un bir kısmının yerini alan DOX, Aqua nanotüplere bağlanma yönünden daha az avantajlı olsa da molekül ağırlığının daha yüksek olması sebebiyle nanotüplere yüklenen ilaç miktarının ağırlıkça değerinde artış gözlemlendiğini söylemek mümkündür.

MTX/DOX yüklü Aqua nanotüplerden eş zamanlı ilaç salım özelliklerinin incelenmesi yüzey kaplaması gerçekleştirilmiş olan Aqua-MD'ler ile birlikte 4.5.3 bölümü içerisinde verilecektir.

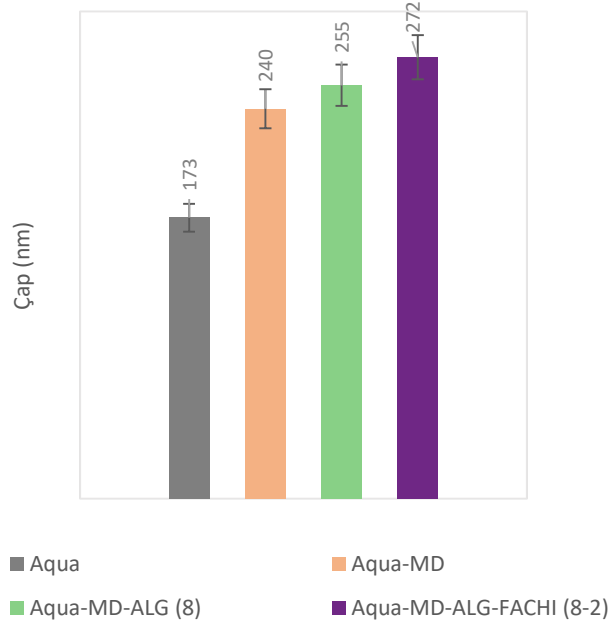
#### 4.5.2. Mitoksantron ve Doksorubisin Yüklü Aqua Nanotüplerin Yüzey Kaplamaları

İkili ilaç yüklemesi yapılan ve ardından yüzey kaplama işlemleri tamamlanan Aqua nanotüplerden Aqua-MD, Aqua-MD-ALG (8) ve Aqua-MD-ALG-FACHI (8-2) formlarına ait AFM topografya görüntüleri Şekil 4.15'te sunulmaktadır.



Şekil 4.15. İkili ilaç yüklü ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM üzerinden elde edilen topografya görüntüleri

MTX yüklülerde olduğu gibi değişik formdaki MTX/DOX yüklü Aqua nanotüplerin ortalama çap değerleri de AFM görüntüleri üzerinden elde edilmiştir. Şekil 4.16'da gösterildiği gibi Aqua-MD, Aqua-MD-ALG (8) ve Aqua-MD-ALG-FACHI (8-2) için sırasıyla  $240 \pm 12$  nm,  $255 \pm 8$  nm ve  $272 \pm 15$  nm genişliğinde ortalama çap değerleri tespit edilmiştir.



**Şekil 4.16.** Yalın, ikili ilaç yüklü ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin AFM görüntüleri üzerinden ölçülen ortalama çap değerleri

Aqua-MD nanotüpler için AFM görüntülerinden elde edilen ortalama çap bulguları Aqua-M sonuçları ile kıyaslanacak olursa nanotüplerin taşıdığı etkin madde miktarındaki artışa rağmen tüp kalınlığında bariz bir farklılaşma olmadığından sözü edilebilir. Bahsedilen sonuçlar Çizelge 4.5'te özet biçimiyle sunulmuştur.

**Çizelge 4.5.** Tekli ve ikili ilaç yüklendiği durumlarda Aqua nanotüplerin çeşitli formlarında gözlenen ortalama çap değerleri (nm)

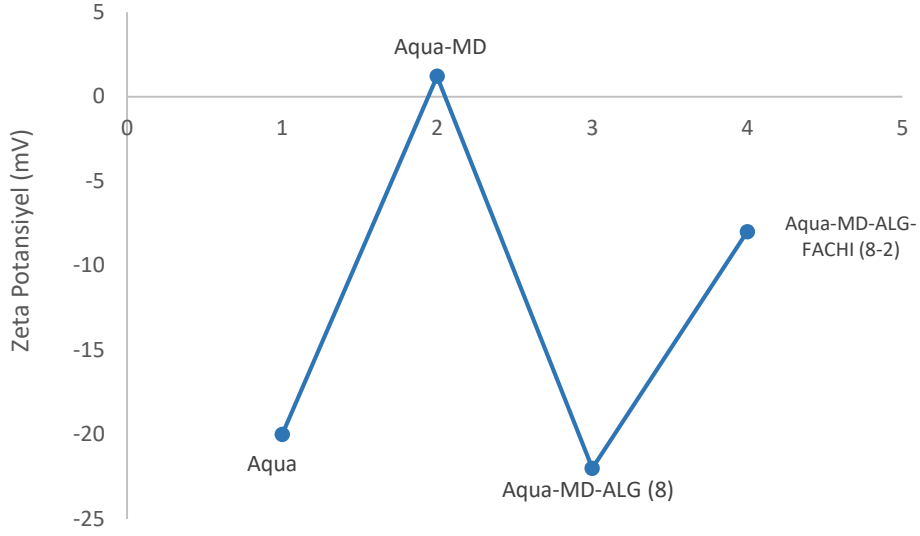
<i>Tabaka Sayısı</i>	<i>MTX Yüklü</i>	<i>MTX/DOX Yüklü</i>
0	234 ± 9	240 ± 12
1	252 ± 16	255 ± 8
2	279 ± 12	272 ± 15

Görüldüğü gibi yalın MTX veya MTX/DOX yüklü Aqua nanotüpler arasında ortalama çap değeri olarak elde edilen bulgular son derece yakındır. Aynı şekilde tekli tabakaya sahip Aqua-M-ALG (8) formu ile Aqua-MD-ALG (8) ve iki tabaka ile kaplanmış Aqua-M-ALG-FACHI (8-2) formu ile de Aqua-MD-ALG-FACHI (8-2)

arasında ortalama çap değeri olarak bariz bir farklılık gözlemlenmemiştir. Bu benzerlikler Aqua nanotüplerin etkin madde taşıma kapasitesinin kendi ağırlığından daha fazlaya çıktığı Aqua-MD durumunda dahi tüp çaplarının ortalama boyutunu koruduğu şekilde değerlendirilebilir. Bu sonucun arkasında yatan en önemli nedenlerden biri nanotüplere yüklemesi yapılan MTX ve DOX etkin maddelerinin taşıyıcı sisteme kıyasla çok daha küçük moleküller olmalarıdır. ALG veya FACHI konjuge yapısı gibi görece büyük polimerik malzemeler nanotüp yüzeyine kaplanırken meydana getirdikleri boyut farklılığı rahatlıkla tespit edilebilirken, aynı durum taşınımı sağlanan kemoterapi ajanları için mümkün olmamaktadır.

Ayrıca yine bu sonuçlara bakıldığında Aqua nanotüplerden maksimum ilaç taşıma kapasitesinde yararlanılmıyor olabileceği gibi olumsuz bir değerlendirme ortaya çıkabilir. Ancak kemoterapi ajanlarının toksik özellikleri de dikkate alındığında bu denli yüksek seviyede ilaç yüklemesinin avantajdan çok dezavantaj yaratacağı düşünülerek TK'nin artırılmaması yönünde tercihte bulunulmuştur. Fakat istenildiği takdirde yan etkileri arasında yüksek kardiyotoksisite bulundurmayan farklı ilaç etkin maddeleri ya da değerli kimyasalların taşınımı konusunda planlanan çalışmalarda Aqua nanotüplerin madde tutma kapasitesinden en yüksek seviyede faydalanılması açısından bir engel bulunmamaktadır.

İkili ilaç taşınımında yüzey kaplamasının etkisini araştırmaya Şekil 4.17'de verilen zeta potansiyel ölçümleri ile devam edilmiştir.



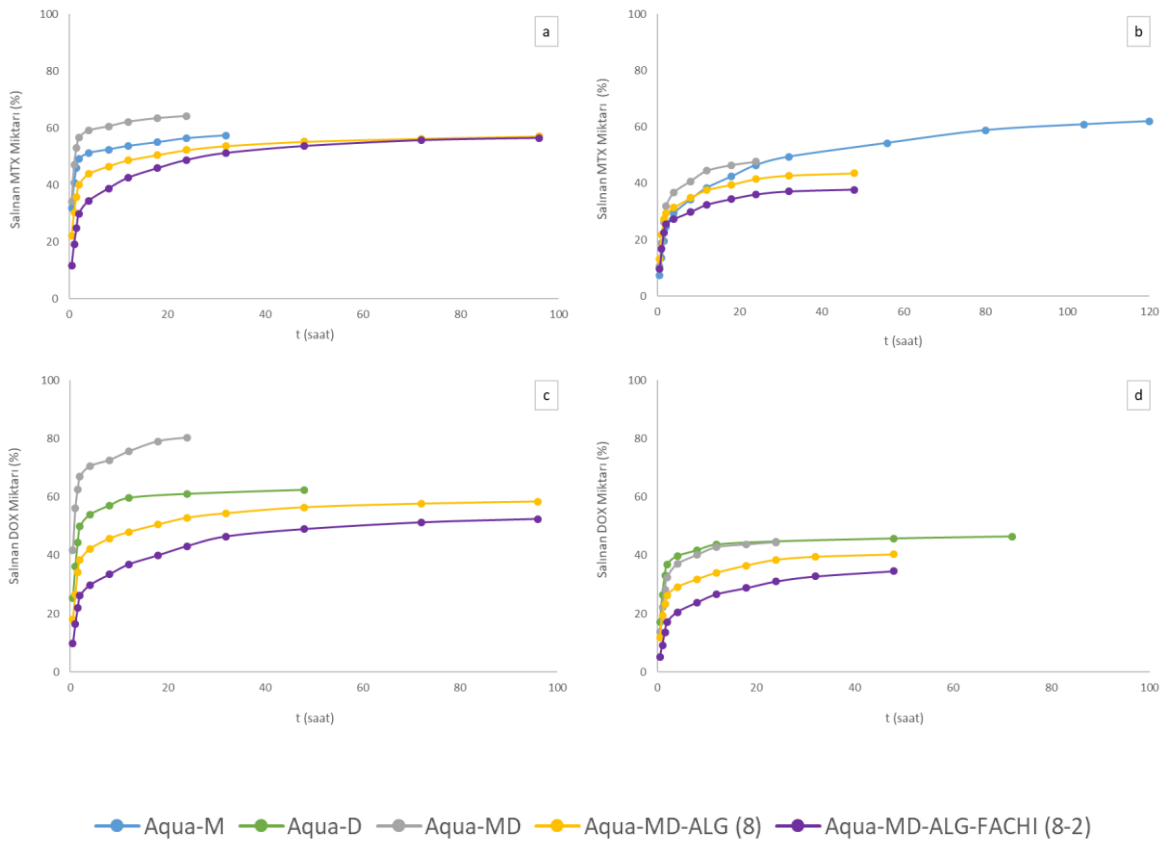
Şekil 4.17. Yalın, ikili ilaç yüklü ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerin zeta potansiyel değerleri

İkili ilaç yüklemesi sonrasında Aqua nanotüplerin -20 mV olan zeta potansiyel değeri pozitif yüklü ilaçların katkısıyla 1,2 mV'a yükselmiştir. 8 saat süresince ALG ile muamele edilmesinin ardından yüzey yeniden negatif yükle yüklenerek  $-22 \pm 2$  mV olarak ölçülmüştür. Aqua nanotüpler üzerine ikinci katman olarak kaplanan FACHI tabakasıyla birlikte ise ulaşılan son zeta potansiyel değeri  $-8 \pm 1$  mV olmuştur. Bu sonuçların tamamı birlikte değerlendirildiğinde, elektrostatik etkileşim esasına dayanan TTK yönteminin başarıyla uygulanmış olduğu görülmektedir.

Bu bulguların ardından Aqua nanotüplerden MTX ve DOX'un eş zamanlı salım çalışmalarına geçilmiştir.

### 4.5.3. Aqua Nanotüplerden Mitoksantron ve Doksorubisin Salım Özelliklerinin İncelenmesi

Aqua nanotüplerden eş zamanlı MTX ve DOX salımları pH 5,5 ve pH 7,4 PBS tampon çözeltilerinde ve vücut sıcaklığı olan 37 °C'de gerçekleştirilmiştir. Belirlenen aralıklarla alınan örnekler UV-Vis yöntemi ile MTX için 664 nm, DOX için 485 nm dalga boyunda analiz edilmiştir. Her bir ortam koşulu ve farklı yüzey kaplamasına sahip Aqua nanotüplerden MTX ve DOX salım sonuçları ayrı ayrı olacak biçimde Şekil 4.18'de sunulmaktadır.



Şekil 4.18. Yalın haldeki ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplere ait iki ayrı pH ortamındaki eş zamanlı ilaç salım profilleri a) MTX salımı pH 5,5 b) MTX salımı pH 7,4 c) DOX salımı pH 5,5 d) DOX salımı pH 7,4

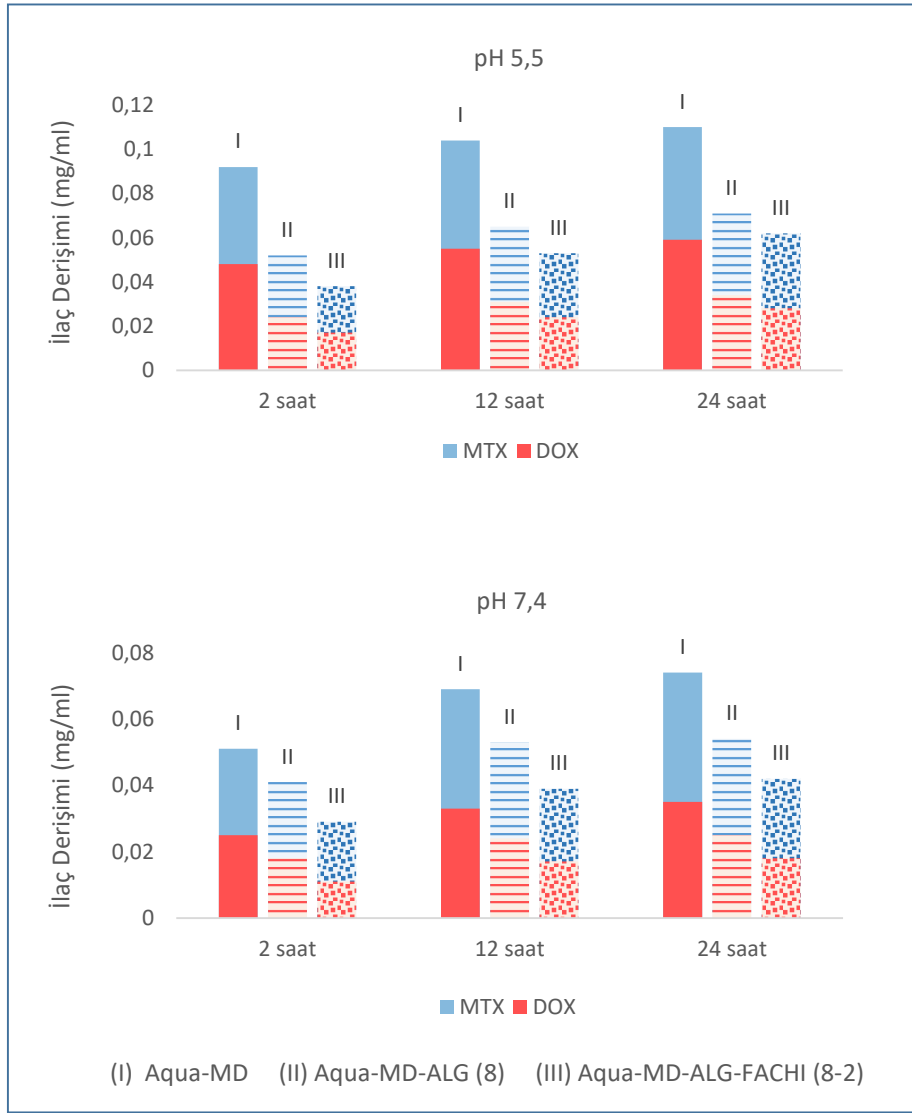


Şekil 4.18'de yer alan sonuçlardan a ve b panellerinde yer alan MTX salımlarının incelemesine ilk olarak Aqua nanotüplerden yalnızca MTX salımın sağlandığı durumla karşılaştırılarak başlanacaktır. Buna göre her iki pH ortamında da ikili ilaç yüklenmesiyle salınan MTX miktarının Aqua-M salımına göre arttığı görülmektedir. Örneğin pH 5,5'te, 12 saat göz önüne alındığında salınan MTX miktarı Aqua-M için % 53,7 iken aynı değer Aqua-MD'de % 62,2'ye yükselmiştir. Aynı sürede ve aynı yapılarda pH 7,4 ortamında da benzer bir durum söz konusudur. Aqua-M'den MTX'un % 38,2'si salınırken, ikili ilaç yüklemesiyle bu değer % 44,5'e çıkmıştır. Taşıdığı ekstra madde miktarı sonucunda Aqua nanotüpler ile salım ortamı arasındaki konsantrasyon farkı artmış ve böylelikle salınan MTX miktarı da Aqua-M'e göre yükselmiştir.

ALG ve ALG-FACHI tabakalarıyla kaplanmış Aqua nanotüplerde ise yalnızca MTX yüklendiği durumda olduğu gibi salım miktarının ve hızının düşmesi, aynı zamanda da salım süresinin uzaması beklenilmektedir ve hedeflenen sonuçlara ulaşılmıştır. Bu yapılardan Aqua-MD-ALG (8) ve Aqua-MD-ALG-FACHI (8-2) için pH 5,5'te MTX salımı 96 saatte tamamlanarak sırasıyla % 57,2 ve % 56,5'lik salım miktarlarına ulaşılmıştır.

Aqua nanotüplere kombine olarak yüklenen bir diğer ilaç olan DOX'a ait bulgular da ayrıca değerlendirilmiştir. Öncelikle, sağlıklı bir karşılaştırma yapabilmek adına daha önce yer verilmeyen Aqua-D yani DOX'un tek başına yalın Aqua nanotüplerden salımına dair veriler de bu başlık altındaki araştırmalara dahil edilmiştir ve Şekil 4.18'in c ve d panellerinde sunulmaktadır. Bu sonuçlara göre, ikili ilaç yüklemesiyle artan derişim farkı sayesinde salınan DOX miktarında da artış gözlenmiştir. 12 saatte Aqua-D formundan DOX salımı pH 5,5 ve pH 7,4 ortamlarında sırasıyla % 59,7 ve % 42 iken, bu değerler Aqua-MD'ye ait olduğu zaman % 75,6 ve % 43,7'ye yükselmiştir.

Kombine terapi araştırmasında eş zamanlı olarak salınan toplam MTX ve DOX derişimleri de ayrıca dikkate alınmıştır ve bu iki ilacın belirli zaman aralıklarında salım ortamındaki miktarlarını gösteren sonuçlar Şekil 4.19'da verilmektedir.

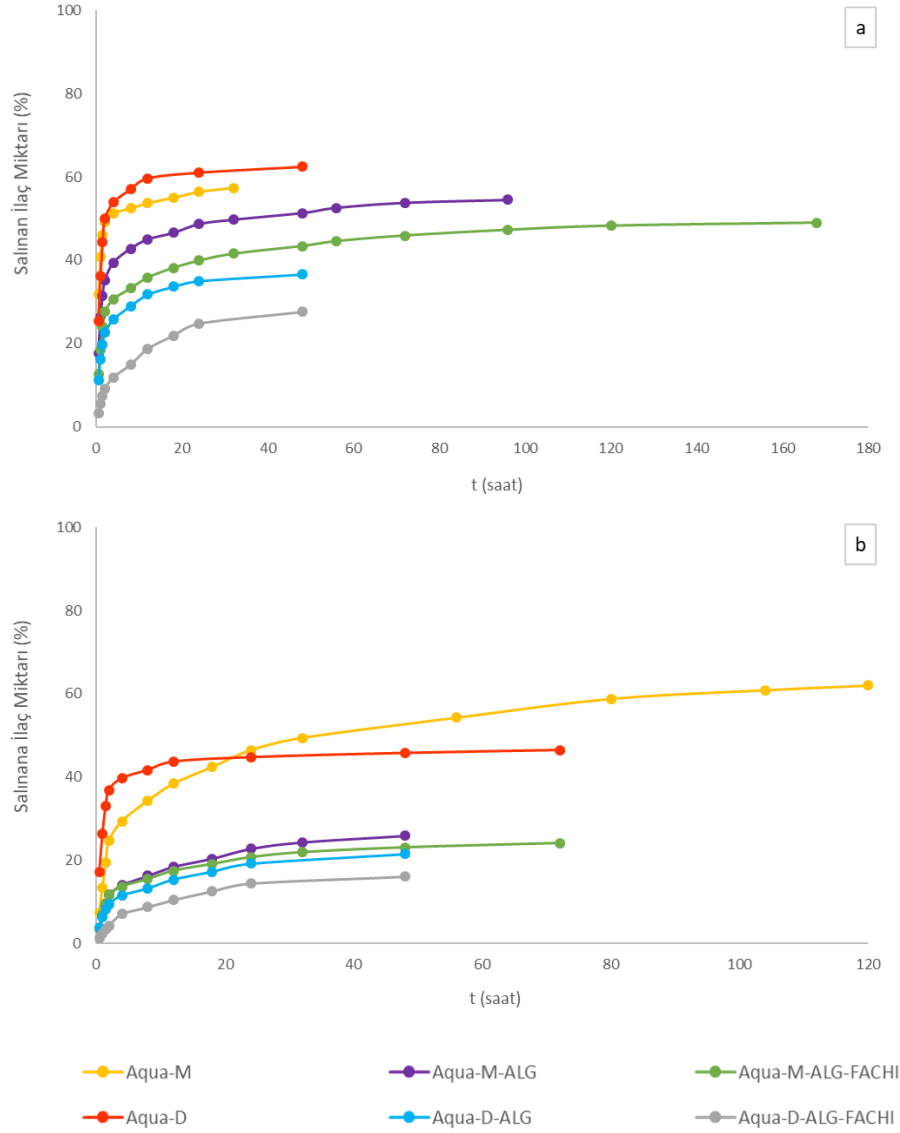


Şekil 4.19. İkili ilaç salımında Aqua nanotüplerden pH 5,5 ve pH 7,4 ortamlarına belirli zamanlarda salınan toplam ilaç derişimleri

Şekil 4.19'da verilen sonuçlar mg/ml cinsinden olup, salım ortamındaki toplam ilaç miktarını yansıması açısından önemlidir. Buna göre, pH 5,5 ortamında 24 saatlik sürede ulaşılan toplam ilaç derişimi Aqua-MD-ALG (8) ve Aqua-MD-ALG-FACHI (8-2) için sırasıyla 0,071 mg/ml ve 0,062 mg/ml'dir. Aynı değerlerin pH 7,4 ortamındaki karşılıkları ise 0,054 mg/ml ve 0,042 mg/ml derişimlerine denk gelmektedir. Bu sonuçlar ikili ilaç salımında MTX'un yanı sıra DOX için de maksimum tolere edilebilir dozajın (MTD) üzerine çıkılmadığını göstermesi açısından önemli bir bulgudur [72, 88].

Eş zamanlı salım sonuçlarına göre ALG ve ALG-FACHI katmanlarının nanotüpler üzerine uygulanmasıyla ani ve hızlı salımın başarıyla azaltıldığı ve uzatılmış bir salım grafiği elde edildiği görülmektedir. Ayrıca bu bulgular dikkatle değerlendirildiğinde Aqua LNT'lere yüklenen MTX ve DOX etkin maddelerinin yalın haldeki nanotüplerde olduğu gibi TTK sonrasında da salımlarının eş zamanlı olarak gerçekleştiği görülmektedir ve bu salım profillerinin arasında herhangi bir gecikme süresi oluşmadığı da ortadadır. Bu durum kovalent olmayan yöntemler ile yüzey fonksiyonelleştirmesinin sağlandığı yapılara bakıldığında genel olarak beklenen bir sonuçtur [89]. Ancak TTK ile yapıya katılan ALG ve FACHI yüzey kaplamalarının salınan DOX miktarı üzerinde, MTX'a göre daha fazla etki etmiş olduğu da fark edilecektir. Örneğin pH 5,5'te ALG tabakası salınan DOX yüzdesini 24 saatte yaklaşık % 30 azaltırken, bu değişiklik MTX için % 12 seviyelerindedir. FACHI tabakasıyla beraber aralarındaki farklılık daha da artmıştır. Yine aynı sürede, salınan DOX yüzdesi % 38 düşüş göstermiş, buna karşılık MTX salımında yalnızca % 15,5'lik azalma meydana gelmiştir. pH 7,4'teki salımlarda da benzer bir durum mevcuttur.

Aqua-MD formundaki nanotüplerde yüzey kaplamasının ardından gözlenen bu durumun, etkin maddelerin ayrı ayrı yüklendiği durumlarda da aynı eğilim içinde olup olmayacağı sorusu gündeme gelmiştir. Bu nedenle yine aynı ortam koşullarında ve 37 °C sıcaklıkta Aqua-D-ALG ve Aqua-D-ALG-FACHI yapılarına ait salım profillerinin de incelenmesine karar verilerek salım profilindeki değişiklikler TTK sonrası gözlenen MTX salım sonuçları ile kıyaslanmıştır (Şekil 4.20).



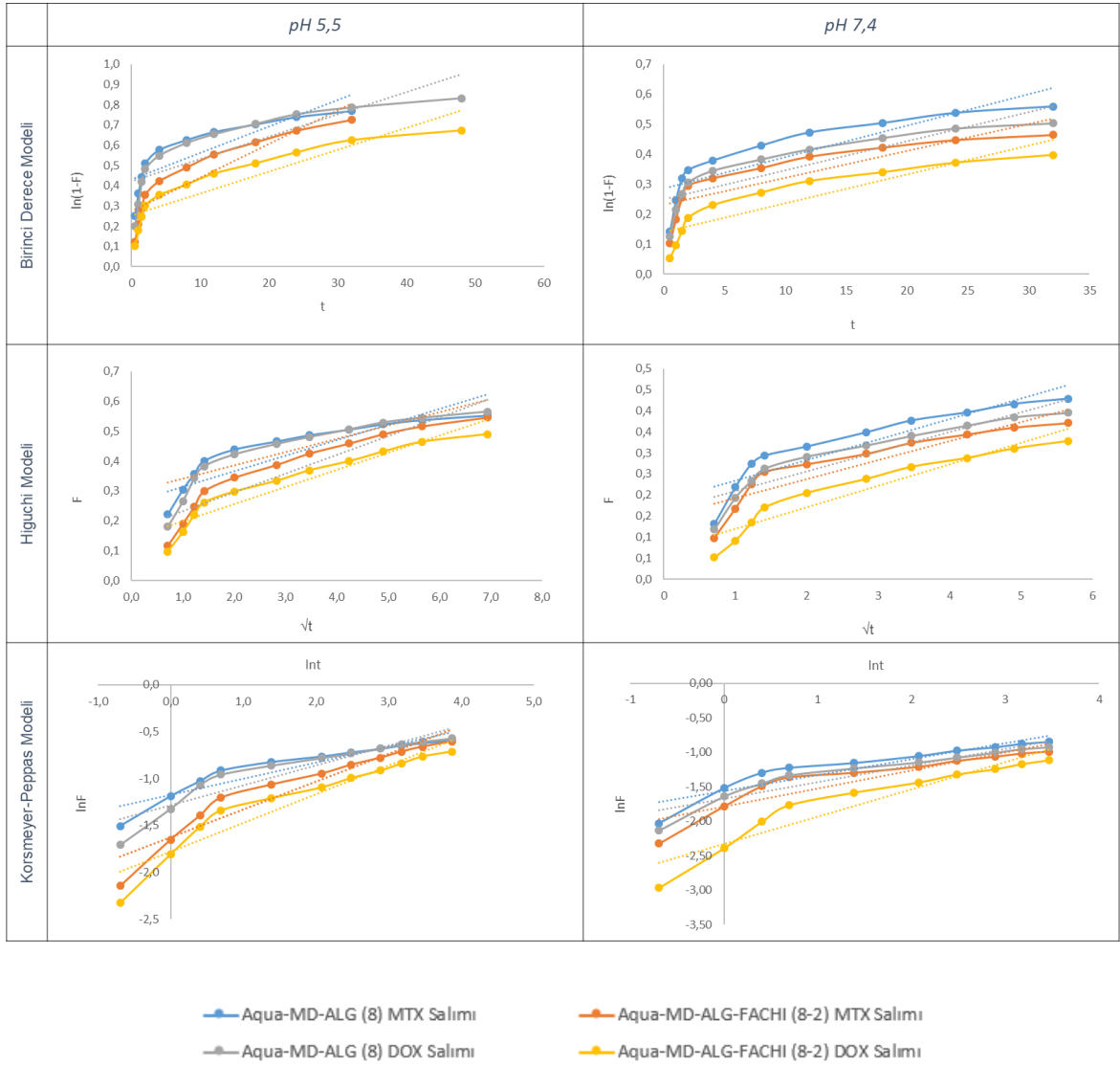
Şekil 4.20. Yalın haldeki ve yüzey kaplamaları gerçekleştirilmiş Aqua nanotüplerden iki ayrı pH ortamında MTX ve DOX salım profilleri  
a) pH 5,5 b) pH 7,4

Şekil 4.20'de de görüldüğü üzere iki terapötik ajanın eş zamanlı salımında da olduğu gibi, tekli ve çiftli yüzey tabakalarının DOX salımına olan etkileri yine aynı tabakaların MTX salımına olan etkilerinden daha fazladır. pH 5,5 ortamında ALG tabakasıyla MTX salımı 24 saatte yaklaşık % 9 azalırken bu oran DOX salımında % 26'ya kadar yükselmiştir. FACHI tabakasının eklenmesinden sonra ise her iki durum arasındaki fark daha da artmıştır, yine ilk 24 saatte MTX salımındaki düşüş % 16,5 ile ifade edilebilecekken aynı süre sonunda DOX salımında gözlenen düşüş % 36'ya ulaşmıştır. pH 7,4 ortamında da benzer bir durum söz konusudur.

İkili ilacın Aqua nanotüplere yüklenmesi aşamasında da bahsedildiği gibi her iki etkin maddenin Aqua nanotüplere yüklenmesi sırasında elektrostatik etkileşimlerden faydalanılmakta, bu durum MTX'un yapısındaki iki, DOX'un yapısında bulunan tek  $-NH_2$  grubu ile sağlanmaktadır. Ancak yüzey kaplamaları sonrasında, kinetik modelleme çalışmalarında daha detaylı ele alınacağı gibi Aqua LNT'lerden ilaç salımına difüzyonla ilaç salımı mekanizması da dahil edilmektedir [90]. DOX'un hem molekül ağırlığının daha fazla olduğu hem de yüzey konformasyonu açısından daha geniş bir alan kapladığı göz önüne alınırsa difüzyonla geçmesi gereken tabakaların varlığından da daha fazla etkilenmesinin doğal bir sonuç olduğu görülecektir [91, 92].

#### 4.5.4. Aqua Nanotüplerden Mitoksantron ve Doksorubisin Salımının Modellenmesi

MTX yüklü Aqua nanotüplerde olduğu gibi ikili ilaç yüklemesi gerçekleştirilmiş ve yüzey kaplama işlemleri tamamlanmış olan Aqua-MD nanotüplere ait salım profilleri için de kinetik modelleme incelemesi yapılmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Belirli şekillerde yüzey kaplaması gerçekleştirilen Aqua nanotüplerden eş zamanlı MTX ve DOX salım davranışının farklı modellere göre hesaplanan profilleri

Çizelge 4.6. Yüzey kaplaması gerçekleştirilen Aqua nanotüplerden eş zamanlı MTX ve DOX salımı için hesaplanan kinetik parametreler

		$R_{MTX}^2$	$R_{DOX}^2$	$n_{MTX}$	$n_{DOX}$	$k_{MTX}$	$k_{DOX}$
pH 5,5	Aqua-MD-ALG (8)	0,88	0,87	0,18	0,21	0,309	0,277
	Aqua-MD-ALG- FACHI (8-2)	0,91	0,91	0,30	0,31	0,192	0,168
pH 7,4	Aqua-MD-ALG (8)	0,85	0,88	0,23	0,24	0,210	0,187
	Aqua-MD-ALG- FACHI (8-2)	0,84	0,90	0,26	0,39	0,168	0,098

Birinci derece, Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modelleri arasında en yüksek  $R^2$  değerine sahip olan Korsmeyer-Peppas modelinin Aqua nanotüplerden eş zamanlı MTX ve DOX salımını en uygun biçimde ifade ettiği görülmüştür. Korsmeyer-Peppas modeli üzerinden elde edilen kinetik parametreler Çizelge 4.6'da sunulurken diğer modellere ait veriler Ek 6'da yer almaktadır. Korsmeyer-Peppas modeline göre 0,45'ten küçük  $n$  değerlerine sahip olmaları sebebiyle kombine ilaç salımında da MTX salımında olduğu gibi Fickian difüzyon mekanizmasının korunduğunu işaret etmektedir.

Çizelge 4.6'da verilen durumların tamamında MTX salım hız sabitin, DOX salım hız sabitinden daha fazla olduğu ve tekli tabakadan ikili tabakaya geçişte DOX salım hızındaki düşüş oranının, MTX'a göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Molekül yapısında bir tane  $-NH_2$  grubu içeren DOX'un Aqua nanotüplerle elektrostatik etkileşim kurmakta MTX kadar avantajlı olmadığından Bölüm 4.5.1'de bahsedilmiştir. Ayrıca DOX molekülü yüzey alanı olarak  $206,1 \text{ A}^2$ lik bir alan kaplarken MTX'un yüzey alanının  $163 \text{ A}^2$  olduğu bilinmektedir [91, 92]. Bu iki etken beraber değerlendirildiğinde kaplanan tabakalarla birlikte DOX salımında difüzyonla kontrolün daha baskın hale geldiği ileri sürülebilir. Böylece ilacın difüzyonla ALG ve FACHI tabakalarından geçişi zorlaşmakta ve TTK'nın DOX üzerinde daha yüksek kısıtlama yaratmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak organik yapılı ve özel olarak tasarlanmış Aqua nanotüplere tekli ve ikili ilaç yüklemesi başarıyla sağlandıktan sonra literatürde ilk defa olarak bu türde bir organik LNT'ye elektrostatik etkileşimle yüklenen kemoterapi ajanlarının TTK yöntemi sayesinde difüzyon kontrollü salımı gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde uzatılmış salım profilleri elde edilen Aqua LNT'ler üzerine pH duyarlı özelliğine ek olarak moleküler hedeflemenin de yapılabilmesine olanak sağlayacak ligandların (folik asit) yine TTK yönteminden faydalanılarak yerleştirilmesi başarılmıştır.



## 5. SONUÇLAR

Yapılan tez çalışması kapsamında, Aqua molekülünün sentez aşamasından başlanılarak kendiliğinden kümeleşme yöntemi ile elde edilen ve uyarı-cevap özelliğine sahip Aqua nanotüpler ile kanser tedavisinin hem geleneksel uygulamasında hem de kombine terapisinde kullanıma yönelik pH duyarlı bir akıllı ilaç taşıyım sistemi geliştirilmiştir. Önceden belirlenen parametreler ve hedeflenen amaçlar doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmalarla ortaya konulan önemli bulgular aşağıda sıralanmaktadır:

- Çalışma kapsamına ilk olarak ilaç taşıyıcı sistemin temelini oluşturan ve birbirlerine 11 karbonlu bir hidrokarbon zinciriyle bağlanmış 1-aminoantrakinon ve karboksilik asit fonksiyonel gruplarından meydana gelen Aqua molekülünün sentezlenmesi ile başlanmıştır. Aqua molekül sentezi NMR analizi ile karakterize edilmiştir.
- Taşıyıcı sistem olarak kullanılacak Aqua nanotüpler, Aqua molekülünün kendi ile molce eşit miktarda etanolamin varlığındaki ve ağırlıkça % 1 derişime sahip sulu çözeltisine ısıtma-soğutma prosedürü uygulanarak kendiliğinden kümeleşme yöntemiyle oluşturulmuştur.
- Aqua nanotüplerin ilaç taşıma performanslarının değerlendirilebilmesi için, model ilaç molekülü olarak seçilen mitoksantron (MTX) tutma koşullarının optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla üzerinde çalışılan parametreler; ortam pH'ı ve Aqua:MTX (w/w) başlangıç oranı olmuştur. Tüm ilaç alım-salım deneylerinde UV-Vis spektrofotometresinden yararlanılmıştır.
- Aqua nanotüplerin, pH 9 durumunda ve Aqua:MTX (w/w) oranının 1:1 olduğu koşulda tuttuğu MTX miktarının 0,91 (mg/mg) değerinde olduğu ve enkapsülasyon verimliliğinin % 90'ın üzerine çıktığı tespit edilmiştir. Salım çalışmalarına bu koşullarda optimum miktarda MTX yüklenmiş Aqua nanotüplerle (Aqua-M) devam edilmiştir.
- İlaç salımı aşamasında fizyolojik koşulları taklit etmesi açısından, 37 °C sıcaklıkta ve 5,5 ile 7,4 pH değerine sahip PBS tampon çözeltisi ortamlarında çalışılmıştır. Beklenildiği gibi, MTX salımının pH 5,5'te pH 7,4'e göre daha hızlı ve çok miktarda olduğu görülmüştür. Buna göre, ilk 24

saatlik süre sonunda Aqua nanotüplerden pH 5,5 ortamına % 56,4, pH 7,4 ortamına % 49,2 oranında MTX salımı gerçekleştiği belirlenmiştir.

- Aqua nanotüplerden MTX salımını daha uzatılmış bir profilde elde edebilmek için ilaç yüklü nanotüplere yüzey modifikasyonu yapılması gerektiğine karar verilmiştir. Bu amaçla, Aqua-M nanotüpler ilk olarak anyonik özellikteki doğal bir polisakkarit olan aljinat (ALG) tabakası ile kaplanmıştır.
- ALG kaplama prosedürü, farklı kaplama süreleri (1 saat, 6 saat, 8 saat, 16 saat) denenerek optimize edilmiştir. TTK yöntemi ile yüzey kaplaması sağlanan Aqua nanotüplerde işlem sonrası kırılma veya yüzeylerinde çökme meydana gelmediği AFM görüntüleri ile desteklenmiştir. Ayrıca bu görüntüler üzerinden çeşitli süreler sonunda ulaşılan ortalama çap değerleri belirlenmiştir.
- 1 saat, 6 saat, 8 saat ve 16 saatlik kaplama periyotları sonunda ilaç yüklü nanotüplerin ortalama çap değerleri sırasıyla  $240 \pm 18$ ,  $254 \pm 28$ ,  $252 \pm 16$  ve  $265 \pm 13$  nm olarak ölçülmüştür.
- Yüzey kaplaması analizinde ikinci yöntem olarak zeta potansiyel ölçümü uygulanmıştır. Kaplama öncesi zeta potansiyeli -3 mV olan Aqua-M'lerin yüzey yükü 1 saat, 6 saat, 8 saat ve 16 saatlik ALG kaplamasıyla beraber  $-24 \pm 3$ ,  $-27 \pm 1$ ,  $-28 \pm 2$  ve  $-30 \pm 2$  mV'a düşmüştür.
- Kaplama süreleri arasında yapılan değerlendirmeler sonucunda 6 saat ve 8 saatlik sürelerde elde edilen Aqua-M-ALG formundaki nanotüplerden MTX salımında meydana gelen değişiklikler incelenmiştir. Buna göre, ani ve hızlı salımın (ing: burst release) belirli ölçüde iyileştirildiği belirlenerek pH 5,5'te % 31,8'den Aqua-M-ALG (6) ve Aqua-M-ALG (8) için sırasıyla %30 ve %26,4'e indiği tespit edilmiştir. pH 7,4'te ise bu oranlar % 6,7'den % 6,4 ve % 3,6'ya düşüş biçiminde gözlemlenmiştir. Ayrıca ALG tabakasıyla birlikte salım süresi pH 5,5'te 96 saate kadar uzatılabilmiştir.
- Aqua nanotüplerin TTK yöntemi kullanılarak fonksiyonelleştirilmesi çalışmalarına ikinci katman olarak kaplanması planlanan FACHI konjuge yapının sentezlenmesi ile devam edilmiştir. Bu sayede Aqua nanotüplerin FA reseptörlerine bağlanarak moleküler ilaç hedeflemesinde de kullanılması amaçlanmıştır.

- FACHI konjuge yapısının sentezi için düşük molekül ağırlıklı CHI ve EDC ile aktifleştirilmiş FA kullanılmıştır. Sentez sonrası elde edilen ürünün karakterizasyonu FTIR ve UV-Vis spektrofotometresi ile sağlanmıştır. Konjuge yapıdaki FA oranının CHI zincirlerinde yer alan –NH<sub>2</sub> gruplarına bağlanma oranının 0,084 olduğu belirlenmiştir.
- Literatür araştırmalarıyla Aqua-M-ALG formundaki nanotüplerin 2 saat boyunca FACHI çözeltisinde inkübe edilmesine karar verilmiştir. FACHI kaplamasına ait karakterizasyon işlemleri de AFM görüntülemeleri ve zeta potansiyel ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir.
- Aqua-M-ALG-FACHI (6-2) ve Aqua-M-ALG-FACHI (8-2) formundaki nanotüplerin ortalama çaplarının  $271 \pm 10$  ve  $279 \pm 12$  nm değerine yükseldiği belirlenmiştir. Aynı koşullardaki nanotüplerin yüzey yükleri de  $-17 \pm 1$  ve  $-21 \pm 2$  Mv olarak bulunmuştur.
- ALG ve FACHI tabakalarının beraber uygulanması sonrasında Aqua nanotüplerden MTX salımında ilk ve ani salımın önemli ölçüde azaltıldığı ve buna ek olarak uzatılmış salım profiliyle pH 5,5'te 168 saate varan sonuçların ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu sürede Aqua-M-ALG-FACHI (6-2) ve Aqua-M-ALG-FACHI (8-2)'den salınan MTX miktarı sırasıyla % 53,8 ve 49,1'dir. Literatürdeki karşılıklarına oranla kısmen daha düşük seviyede kalan ilaç salımının Aqua nanotüplerin yüksek ilaç tutma kapasitesi gözetildiğinde, bu sonucun dezavantajlı bir etki yaratmayacağı şeklinde yorumlanmıştır. pH 7,4 otamında salınan MTX miktarı ise benzerleri ile örtüşerek %15-25 aralığında kalmış ve taşınım sistemimizin kanser tedavisinde uygulanabilirliği açısından bir başka önemli bulgu ortaya konulmuştur.
- Aqua nanotüplerin çeşitli formlarından elde edilen MTX salım profilleri literatürde yer alan başlıca kinetik modeller üzerinden değerlendirilerek salım mekanizması incelenmiştir. Elde edilen bulgular, Korsmeyer-Peppas modelinin Aqua nanotüplerden MTX salımını en uygun biçimde ifade edilebileceğini ortaya koymaktadır. Ek olarak, salım mekanizmasını tanımlakta kullanılan bir Korsmeyer-Peppas parametresi olan n değerlerinin 0,45'ten küçük bulunmasıyla MTX salımının Fickian difüzyon

mekanizmasına uygun biçimde gerçekleştiğini söylemek mümkün hale gelmiştir.

- Tez çalışmasının ikinci kısmında ikili ilaç taşınımına yönelik çalışmalara yoğunlaşmıştır. Aqua nanotüplerin kombine terapilerdeki kullanım potansiyelinin belirlenebilmesi adına ikili ilaç tutma ve salım deneylerinde MTX'un yanında ikinci ilaç olarak kullanılmak üzere, hem farmokolojik özelliklerinin bir arada kullanıma uygunluğu açısından hem de literatürde bu konuda yer alan ihtiyaç gözetilerek pek çok farklı kanser tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı bilinen bir kanser ilacı olan doksorubisin (DOX) seçilmiştir.
- İlaç alımında, pH değeri 9 olan PBS tampon çözeltisinde ve 1:1:1 MTX:DOX:Aqua başlangıç oranında yüklemesi gerçekleştirilen Aqua nanotüplerin 0,829 mg/mg MTX ve 0,793 mg/mg DOX, dolayısıyla toplam 1,622 mg/mg ilaç taşıyabildiği belirlenmiştir. Yükleme sonrasında da iki ilaç arasındaki belirlenen başlangıç oranının korunması hedeflenen sinerjik etkinin sağlanabileceği gözetilerek optimum koşul olarak değerlendirilmiştir.
- Aqua-MD nanotüplerin başarıyla yüzey kaplanmasının gerçekleşmiş olduğu AFM görüntüleri ve zeta potansiyel değerleri ölçülerek test edilmiştir. Aqua-MD, Aqua-MD-ALG (8) ve Aqua-MD-ALG-FACHI (8-2) için bulunan ortalama çap değerleri  $240 \pm 12$  nm,  $255 \pm 8$  nm ve  $272 \pm 15$  nm'dir. Aynı örneklerle ait yüzey yükleri ise  $1,2 \pm 1$  mV ,  $-22 \pm 2$  mV ve  $-8 \pm 1$  mV olarak ölçülmüştür.
- Aqua nanotüplerin kombine terapideki uygulanabilirliğini araştırmak adına gerçekleştirilen *in vitro* eş zamanlı salım çalışmalarında, ilk olarak ikili yüklemeye beraber artan konsantrasyon farkı sonucunda salınan ilaç miktarının da hem MTX hem DOX için yükseldiği belirlenmiştir. Salınan ilaç miktarları ayrı ayrı ele alındığında ise Aqua-MD-ALG (8) nanotüplerden 12 saatte pH 5,5'te % 48,8 MTX ve % 48,0 DOX salındığı, FACHI tabakasıyla birlikte bu değerlerin % 42,2 MTX ve % 36,5 DOX seviyesine gerilediği görülmüştür. Bunun yanı sıra ALG-FACHI tabakalarının DOX üzerine MTX'a göre daha fazla etkisinin olduğu dikkat çekmiştir. Yalın Aqua nanotüplere kıyasla 24 saatteki DOX salımı pH 5,5'te % 38 azalırken MTX salımlarındaki fark % 15,5 olarak gözlenmiştir. Bu durum moleküler

konformasyonu sebebiyle daha yüksek yüzey alanı kaplaması ve sonucunda da difüzyonla geçmesi gereken tabakaların varlığından daha fazla etkilenmesiyle ilişkilendirilmiştir.

- Eş zamanlı ilaç salımlarına ait profiller de kinetik model incelemesine tabi tutulduktan sonra sistemimizi en uygun yansıtan modelin Korsmeyer-Peppas olduğu ve bu modelin parametrelerine göre Fickian difüzyonuna uygun salım gerçekleştiği bir kez daha görülmüştür. Beklenildiği şekliyle MTX salım hız sabiti, DOX salım hız sabitinden daha yüksek hesaplanmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] A. Wakasugi, M. Asakawa, M. Kogiso, T. Shimizu, M. Sato, Y. Maitani, Organic nanotubes for drug loading and cellular delivery, *Int J Pharm*, 413 (2011) 271-278.
- [2] H. Unsal, Özel Tasarım Yüzey Aktif Maddeler Kullanılarak Nano/Mikro Boyutlu Tübüler Yapıların Oluşturulması, Karakterizasyonu ve Uygulamaları, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014.
- [3] P. Tharkar, A.U. Madani, A. Lasham, A.N. Shelling, R. Al-Kassas, Nanoparticulate carriers: an emerging tool for breast cancer therapy, *J Drug Target*, 23 (2015) 97-108.
- [4] J. Shi, P.W. Kantoff, R. Wooster, O.C. Farokhzad, Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities, *Nat Rev Cancer*, 17 (2017) 20-37.
- [5] M.J. Webber, R. Langer, Drug delivery by supramolecular design, *Chemical Society Reviews*, 46 (2017) 6600-6620.
- [6] J. Liu, Y. Huang, A. Kumar, A. Tan, S. Jin, A. Mozhi, X.J. Liang, pH-sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy, *Biotechnol Adv*, 32 (2014) 693-710.
- [7] A. Zırh Gürsoy, Kontrollü Salım Sistemleri, Kontrollü Sallım Sistemleri Derneği 2014.
- [8] R. Langer, D.A. Tirrell, Designing materials for biology and medicine, *Nature*, 428 (2004) 487-492.
- [9] N. Kamaly, B. Yameen, J. Wu, O.C. Farokhzad, Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release, *Chem Rev*, 116 (2016) 2602-2663.
- [10] B. Haley, E. Frenkel, Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment, *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 26 (2008) 57-64.
- [11] M. Kanamala, W.R. Wilson, M. Yang, B.D. Palmer, Z. Wu, Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review, *Biomaterials*, 85 (2016) 152-167.
- [12] M. Karimi, A. Ghasemi, P. Sahandi Zangabad, R. Rahighi, S.M. Moosavi Basri, H. Mirshekari, M. Amiri, Z. Shafaei Pishabad, A. Aslani, M. Bozorgomid, D. Ghosh, A. Beyzavi, A. Vaseghi, A.R. Aref, L. Haghani, S. Bahrami, M.R. Hamblin, Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems, *Chem Soc Rev*, 45 (2016) 1457-1501.
- [13] C. Kojima, S. Tsumura, A. Harada, K. Kono, A Collagen-Mimic Dendrimer Capable of Controlled Release, *Journal of the American Chemical Society*, 131 (2009) 6052-6064.
- [14] X.K. Liu, M. Jiang, Optical switching of self-assembly: Micellization and micelle-hollow-sphere transition of hydrogen-bonded polymers, *Angewandte Chemie-International Edition*, 45 (2006) 3846-3850.

- [15] F.Y. Li, J.X. Lu, X.Q. Kong, T. Hyeon, D.S. Ling, Dynamic Nanoparticle Assemblies for Biomedical Applications, *Advanced Materials*, 29 **(2017)**.
- [16] E. Perez-Herrero, A. Fernandez-Medarde, Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy, *Eur J Pharm Biopharm*, 93 **(2015)** 52-79.
- [17] K. Ulbrich, K. Hola, V. Subr, A. Bakandritsos, J. Tucek, R. Zboril, Targeted Drug Delivery with Polymers and Magnetic Nanoparticles: Covalent and Noncovalent Approaches, Release Control, and Clinical Studies, *Chem Rev*, 116 **(2016)** 5338-5431.
- [18] G.B.o.D.C. Collaboration, Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study, *JAMA Oncology*, 3 **(2017)** 524-548.
- [19] M. Estanqueiro, M.H. Amaral, J. Conceicao, J.M. Sousa Lobo, Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 126 **(2015)** 631-648.
- [20] M. Overchuk, G. Zheng, Overcoming obstacles in the tumor microenvironment: Recent advancements in nanoparticle delivery for cancer theranostics, *Biomaterials*, 156 **(2018)** 217-237.
- [21] D. Schmaljohann, Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 **(2006)** 1655-1670.
- [22] M.I. Nounou, F. ElAmrawy, N. Ahmed, K. Abdelraouf, S. Goda, H. Syed-Sha-Qhattal, Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies, *Breast Cancer (Auckl)*, 9 **(2015)** 17-34.
- [23] I. Smith, Hutcheon, A., Heys, S., Current and Potential Chemotherapeutic Agents Used for Induction Chemotherapy in the Treatment of Breast Cancer, *Current Pharmaceutical Design*, 6 **(2000)** 327-343.
- [24] X. Xu, W. Ho, X. Zhang, N. Bertrand, O. Farokhzad, Cancer nanomedicine: from targeted delivery to combination therapy, *Trends Mol Med*, 21 **(2015)** 223-232.
- [25] M. Talelli, S. Oliveira, C.J.F. Rijcken, E.H.E. Pieters, T. Etrych, K. Ulbrich, R.C.F. van Nostrum, G. Storm, W.E. Hennink, T. Lammers, Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy, *Biomaterials*, 34 **(2013)** 1255-1260.
- [26] F. Canal, M.J. Vicent, G. Pasut, O. Schiavon, Relevance of folic acid/polymer ratio in targeted PEG-epirubicin conjugates, *J Control Release*, 146 **(2010)** 388-399.
- [27] Y. Jiang, S. Chekuri, R.H. Fang, L. Zhang, Engineering biological interactions on the nanoscale, *Current Opinion in Biotechnology*, 58 **(2019)** 1-8.
- [28] K.Y. Choi, H. Chung, K.H. Min, H.Y. Yoon, K. Kim, J.H. Park, I.C. Kwon, S.Y. Jeong, Self-assembled hyaluronic acid nanoparticles for active tumor targeting, *Biomaterials*, 31 **(2010)** 106-114.

- [29] T. Ramasamy, J.H. Kim, J.Y. Choi, T.H. Tran, H.-G. Choi, C.S. Yong, J.O. Kim, pH sensitive polyelectrolyte complex micelles for highly effective combination chemotherapy, *Journal of Materials Chemistry B*, 2 **(2014)**.
- [30] P. Parhi, C. Mohanty, S.K. Sahoo, Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy, *Drug Discov Today*, 17 **(2012)** 1044-1052.
- [31] T. Ramasamy, J. Kim, H.-G. Choi, C.S. Yong, J.O. Kim, Novel Dual Drug-Loaded Block Ionomer Complex Micelles for Enhancing the Efficacy of Chemotherapy Treatments, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 10 **(2014)** 1304-1312.
- [32] J. Zhou, J. Li, X. Du, B. Xu, Supramolecular biofunctional materials, *Biomaterials*, 129 **(2017)** 1-27.
- [33] G.A. Hughes, Nanostructure-mediated drug delivery, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 1 **(2005)** 22-30.
- [34] A.G. Cattaneo, R. Gornati, E. Sabbioni, M. Chiriva-Internati, E. Cobos, M.R. Jenkins, G. Bernardini, Nanotechnology and human health: risks and benefits, *Journal of Applied Toxicology*, 30 **(2010)** 730-744.
- [35] G. Hong, S. Diao, A.L. Antaris, H. Dai, Carbon Nanomaterials for Biological Imaging and Nanomedicinal Therapy, *Chem Rev*, 115 **(2015)** 10816-10906.
- [36] N. Kameta, Soft nanotube hosts for capsulation and release of molecules, macromolecules, and nanomaterials, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 79 **(2014)** 1-22.
- [37] T. Shimizu, N. Kameta, W. Ding, M. Masuda, Supramolecular Self-Assembly into Biofunctional Soft Nanotubes: From Bilayers to Monolayers, *Langmuir*, 32 **(2016)** 12242-12264.
- [38] H. Unsal, N. Aydogan, Formation of chiral nanotubes by the novel anthraquinone containing-achiral molecule, *J Colloid Interface Sci*, 394 **(2013)** 301-311.
- [39] H.M. Bi, D.G. Fu, L. Wang, X.J. Han, Lipid Nanotube Formation Using Space-Regulated Electric Field above Interdigitated Electrodes, *Acs Nano*, 8 **(2014)** 3961-3969.
- [40] T. Shimizu, M. Masuda, H. Minamikawa, Supramolecular nanotube architectures based on amphiphilic molecules, *Chemical Reviews*, 105 **(2005)** 1401-1443.
- [41] Y.S. Lee, *Self-Assembly And Nanotechnology: A Force Balance Approach*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2008.
- [42] S. Ilbasmis-Tamer, H. Unsal, F. Tugcu-Demiroz, G.D. Kalaycioglu, I.T. Degim, N. Aydogan, Stimuli-responsive lipid nanotubes in gel formulations for the delivery of doxorubicin, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 143 **(2016)** 406-414.
- [43] K. Ariga, J.P. Hill, Q. Ji, Layer-by-layer assembly as a versatile bottom-up nanofabrication technique for exploratory research and realistic application, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9 **(2007)** 2319-2340.



- [44] K. Ariga, Y. Yamauchi, G. Rydzek, Q. Ji, Y. Yonamine, C.W. Kevin, J.P. Hill, Layer-by-layer nanoarchitectonics: Invention, innovation, and evolution, *Chemistry Letters*, 43 **(2014)** 36-68.
- [45] T. Ramasamy, Z.S. Haidar, T.H. Tran, J.Y. Choi, J.H. Jeong, B.S. Shin, H.G. Choi, C.S. Yong, J.O. Kim, Layer-by-layer assembly of liposomal nanoparticles with PEGylated polyelectrolytes enhances systemic delivery of multiple anticancer drugs, *Acta Biomater*, 10 **(2014)** 5116-5127.
- [46] D. Bhowmik, Gopinath, H., Kumar, B.P., Duraivel, S., Kumar, K.P.S.,, Controlled Release Drug Delivery Systems, *The Pharma Innovation*, 1 **(2012)** 24-32.
- [47] H.A. Ebrahimi, Y. Javadzadeh, M. Hamidi, M.B. Jalali, Repaglinide-loaded solid lipid nanoparticles: effect of using different surfactants/stabilizers on physicochemical properties of nanoparticles, *Daru-Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23 **(2015)**.
- [48] P. Costa, J.M. Sousa Lobo, Modeling and comparison of dissolution profiles, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13 **(2001)** 123-133.
- [49] N.V. Mulye, S.J. Turco, A Simple Model Based on First Order Kinetics to Explain Release of Highly Water Soluble Drugs from Porous Dicalcium Phosphate Dihydrate Matrices,, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 21 **(1995)** 943-953.
- [50] D. Jain, R. Banerjee, Comparison of ciprofloxacin hydrochloride-loaded protein, lipid, and chitosan nanoparticles for drug delivery, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 86 **(2008)** 105-112.
- [51] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Kinetic Modeling On Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67 **(2010)** 217-223.
- [52] Y. Seo, W. Jhe, Atomic force microscopy and spectroscopy, *Reports on Progress in Physics*, 71 **(2008)**.
- [53] T.F. B.J. Clark, M.A. Russell, *UV Spectroscopy: Techniques, instrumentation and data handling*, Springer Science & Business Media 1993.
- [54] S. Mansouri, Y. Cuie, F. Winnik, Q. Shi, P. Lavigne, M. Benderdour, E. Beaumont, J.C. Fernandes, Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy, *Biomaterials*, 27 **(2006)** 2060-2065.
- [55] M.P. Daryasari, M.R. Akhgar, F. Mamashli, B. Bigdeli, M. Khoobi, Chitosan-folate coated mesoporous silica nanoparticles as a smart and pH-sensitive system for curcumin delivery, *RSC Advances*, 6 **(2016)** 105578-105588.
- [56] N.L. Dhas, P.P. Ige, R.R. Kudarha, Design, optimization and in-vitro study of folic acid conjugated-chitosan functionalized PLGA nanoparticle for delivery of bicalutamide in prostate cancer, *Powder Technology*, 283 **(2015)** 234-245.
- [57] J. Gaffney, Marley, N., Jones, D., *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, Optical Imaging and Spectroscopy*, **(2012)** 1104-1135.
- [58] L. Li, Y. Liu, J. Wang, L. Chen, W. Zhang, X. Yan, Preparation, in vitro and in vivo evaluation of bexarotene nanocrystals with surface modification by folate-chitosan conjugates, *Drug Deliv*, 23 **(2016)** 79-87.

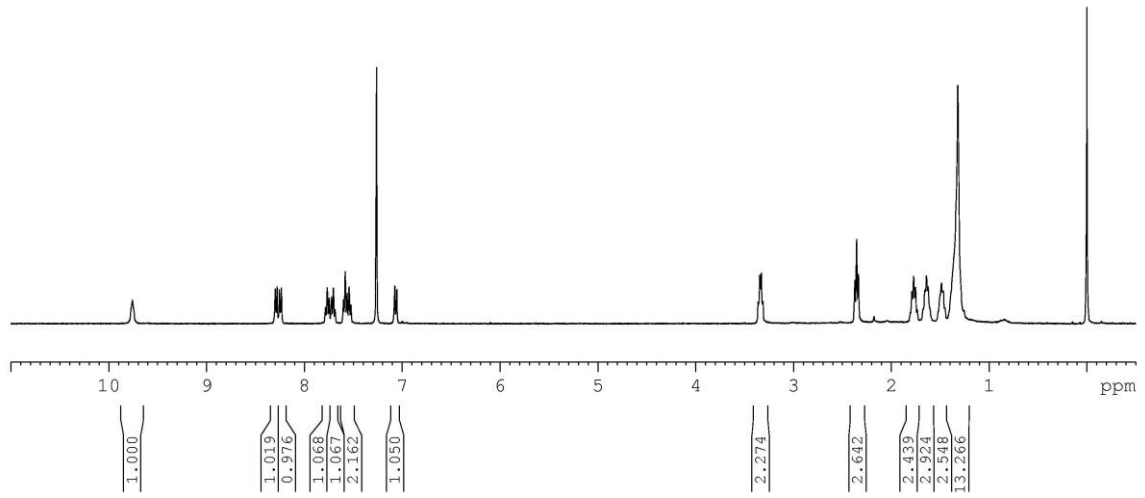
- [59] A. Sze, D. Erickson, L.Q. Ren, D.Q. Li, Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow, *Journal of Colloid and Interface Science*, 261 **(2003)** 402-410.
- [60] Z. Liu, W. Cao, Y. Sun, A.C.L. Su, C.L. Liotta, Synthesis of polycondensable anthraquinone dyes and coloured nylon fibres: II, *Polymer International*, 44 **(1997)** 134-136.
- [61] D. Gibson, I. Binyamin, M. Haj, I. Ringel, A. Ramu, J. Katzhendler, Anthraquinone intercalators as carrier molecules for second-generation platinum anticancer drugs, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 32 **(1997)** 823-831.
- [62] D.E.Q. Yang, Y.U.Q. Xiong, Y. Guo, D.A. Da, W.G. Lu, Sizes correction on AFM images of nanometer spherical particles, *Journal of Materials Science*, 36 **(2001)** 263-267.
- [63] O. Neuhaus, B.C. Kieseier, H.P. Hartung, Therapeutic role of mitoxantrone in multiple sclerosis, *Pharmacol Ther*, 109 **(2006)** 198-209.
- [64] E.M. Malik, C.E. Muller, Anthraquinones As Pharmacological Tools and Drugs, *Med Res Rev*, 36 **(2016)** 705-748.
- [65] B.J. Evison, B.E. Sleebs, K.G. Watson, Mitoxantrone, More than Just Another Topoisomerase II Poison, *Medicinal Research Reviews*, 36 **(2016)** 248–299.
- [66] J. Wang, S. Asghar, L. Yang, S. Gao, Z. Chen, L. Huang, L. Zong, Q. Ping, Y. Xiao, Chitosan hydrochloride/hyaluronic acid nanoparticles coated by mPEG as long-circulating nanocarriers for systemic delivery of mitoxantrone, *Int J Biol Macromol*, 113 **(2018)** 345-353.
- [67] G. Ling, T. Zhang, P. Zhang, J. Sun, Z. He, Nanostructured lipid-carrageenan hybrid carriers (NLCCs) for controlled delivery of mitoxantrone hydrochloride to enhance anticancer activity bypassing the BCRP-mediated efflux, *Drug Dev Ind Pharm*, 42 **(2016)** 1351-1359.
- [68] A. Wani, E. Muthuswamy, G.H. Savithra, G. Mao, S. Brock, D. Oupicky, Surface functionalization of mesoporous silica nanoparticles controls loading and release behavior of mitoxantrone, *Pharm Res*, 29 **(2012)** 2407-2418.
- [69] H. Zheng, C.W. Tai, J. Su, X. Zou, F. Gao, Ultra-small mesoporous silica nanoparticles as efficient carriers for pH responsive releases of anti-cancer drugs, *Dalton Trans*, 44 **(2015)** 20186-20192.
- [70] W. Wang, C. Tong, X. Liu, T. Li, L. B., W. Xiong, Preparation and functional characterization of tumor-targeted folic acid-chitosan conjugated nanoparticles loaded with mitoxantrone, *J. Cent. South Univ.*, 22 **(2015)** 3311–3317.
- [71] X. Zhang, L. Meng, Q. Lu, Z. Fei, P.J. Dyson, Targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells using modified single wall carbon nanotubes, *Biomaterials*, 30 **(2009)** 6041-6047.
- [72] L.R. Cordeiro Pedrosa, O. van Tellingen, T. Soullie, A.L. Seynhaeve, A.M. Eggermont, T.L. Ten Hagen, M. Verheij, G.A. Koning, Plasma membrane targeting by short chain sphingolipids inserted in liposomes improves anti-tumor activity of mitoxantrone in an orthotopic breast carcinoma xenograft model, *Eur J Pharm Biopharm*, 94 **(2015)** 207-219.

- [73] N. Yurtseven, Toraman, F., Yardi, O. F., Kaplan, M., Ozkul, V., Tuygun, A., Canik, S., The Comparison of Sensitivity of Blood Volume Determination Methods with Radioactive Cr51 Method, *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg*, 11 **(2003)** 101-104.
- [74] K.Y. Lee, D.J. Mooney, Alginate: properties and biomedical applications, *Prog Polym Sci*, 37 **(2012)** 106-126.
- [75] Z. Ji, G. Lin, Q. Lu, L. Meng, X. Shen, L. Dong, C. Fu, X. Zhang, Targeted therapy of SMMC-7721 liver cancer in vitro and in vivo with carbon nanotubes based drug delivery system, *J Colloid Interface Sci*, 365 **(2012)** 143-149.
- [76] L. Li, H. Fan, L. Wang, Z. Jin, Does halloysite behave like an inert carrier for doxorubicin?, *RSC Advances*, 6 **(2016)** 54193-54201.
- [77] K.Y. Lee, D.J. Mooney, Alginate: Properties and biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, 37 **(2012)** 106-126.
- [78] S. Esfandiarpour-Boroujeni, S. Bagheri-Khoulenjani, H. Mirzadeh, S. Amanpour, Fabrication and study of curcumin loaded nanoparticles based on folate-chitosan for breast cancer therapy application, *Carbohydr Polym*, 168 **(2017)** 14-21.
- [79] F.-H.L. Shu-Jyuan Yang, Kun-Che Tsai, Ming-Feng Wei, Han-Min Tsai, Jau-Min Wong, , M.-J. Shieh, Folic Acid-Conjugated Chitosan Nanoparticles Enhanced Protoporphyrin IX Accumulation in Colorectal Cancer Cells, *Bioconjugate Chemistry*, 21 **(2010)** 679–689.
- [80] S. Esfandiarpour-Boroujeni, S. Bagheri-Khoulenjani, H. Mirzadeh, Modeling and optimization of degree of folate grafted on chitosan and carboxymethyl-chitosan, *Prog Biomater*, 5 **(2016)** 1-8.
- [81] F.P. Ramanery, A.A.P. Mansur, H.S. Mansur, One-step colloidal synthesis of biocompatible water-soluble ZnS quantum dot/chitosan nanoconjugates, *Nanoscale Research Letters*, 8 **(2013)** 1-13.
- [82] Y. Ma, L. Zhou, H. Zheng, L. Xing, C. Li, J. Cui, S. Che, pH-responsive mitoxantrone (MX) delivery using mesoporous silica nanoparticles (MSN), *J. Mater. Chem.*, 21 **(2011)** 9483–9486.
- [83] T.B. Toh, D.K. Lee, W. Hou, L.N. Abdullah, J. Nguyen, D. Ho, E.K. Chow, Nanodiamond-mitoxantrone complexes enhance drug retention in chemoresistant breast cancer cells, *Mol Pharm*, 11 **(2014)** 2683-2691.
- [84] N.E. Guissi, H. Li, Y. Xu, F. Semcheddine, M. Chen, Z. Su, Q. Ping, Mitoxantrone- and Folate-TPGS2k Conjugate Hybrid Micellar Aggregates To Circumvent Toxicity and Enhance Efficiency for Breast Cancer Therapy, *Mol Pharm*, 14 **(2017)** 1082-1094.
- [85] X. Tao, S. Jin, D. Wu, K. Ling, L. Yuan, P. Lin, Y. Xie, X. Yang, Effects of Particle Hydrophobicity, Surface Charge, Media pH Value and Complexation with Human Serum Albumin on Drug Release Behavior of Mitoxantrone-Loaded Pullulan Nanoparticles, *Nanomaterials (Basel)*, 6 **(2015)**.
- [86] C. Du, D. Deng, L. Shan, S. Wan, J. Cao, J. Tian, S. Achilefu, Y. Gu, A pH-sensitive doxorubicin prodrug based on folate-conjugated BSA for tumor-targeted drug delivery, *Biomaterials*, 34 **(2013)** 3087-3097.

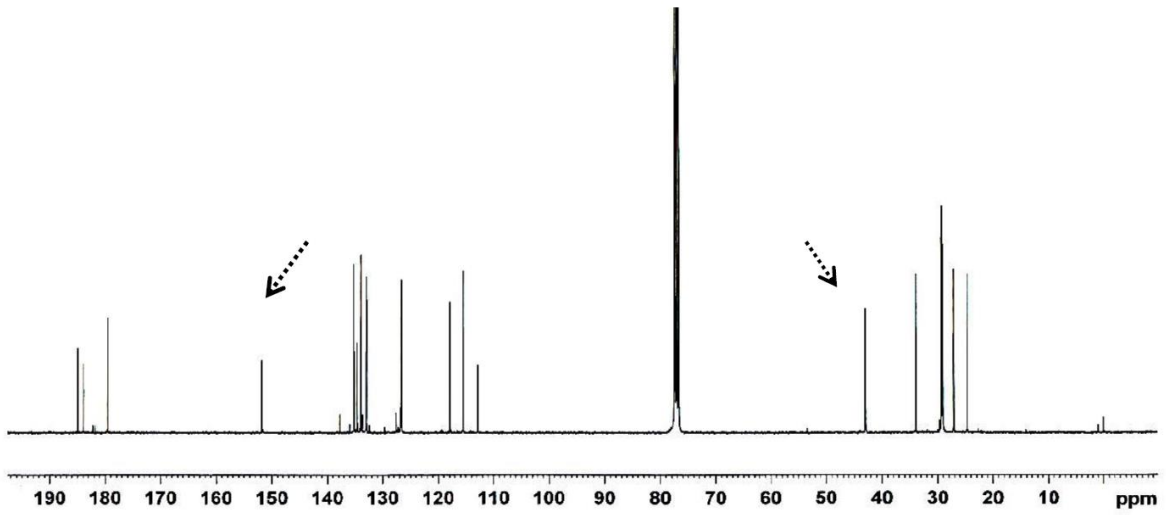
- [87] B. Cote, L.J. Carlson, D.A. Rao, A.W.G. Alani, Combinatorial resveratrol and quercetin polymeric micelles mitigate doxorubicin induced cardiotoxicity in vitro and in vivo, *Journal of Controlled Release*, 213 (2015) 128-133.
- [88] W.J. Aston, D.E. Hope, A.K. Nowak, B.W. Robinson, R.A. Lake, W.J. Lesterhuis, A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice, *BMC Cancer*, 17 (2017) 684-684.
- [89] K.C. Wood, H.F. Chuang, R.D. Batten, D.M. Lynn, P.T. Hammond, Controlling interlayer diffusion to achieve sustained, multiagent delivery from layer-by-layer thin films, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (2006) 10207.
- [90] M. Keeney, X.Y. Jiang, M. Yamane, M. Lee, S. Goodman, F. Yang, Nanocoating for biomolecule delivery using layer-by-layer self-assembly, *J Mater Chem B*, 3 (2015) 8757-8770.
- [91] Anonim, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mitoxantrone#section=Computed-Properties>, (Erişim Tarihi: 17 Mayıs 2019).
- [92] Anonim, <https://www.guidetopharmacology.org/GRAC/LigandDisplayForward?ligandId=7069>, (Erişim Tarihi: 17 Mayıs 2019).

# EK 1 Aqua molekülünün $^1\text{H}$ - NMR ve $^{13}\text{C}$ - NMR spektrumları

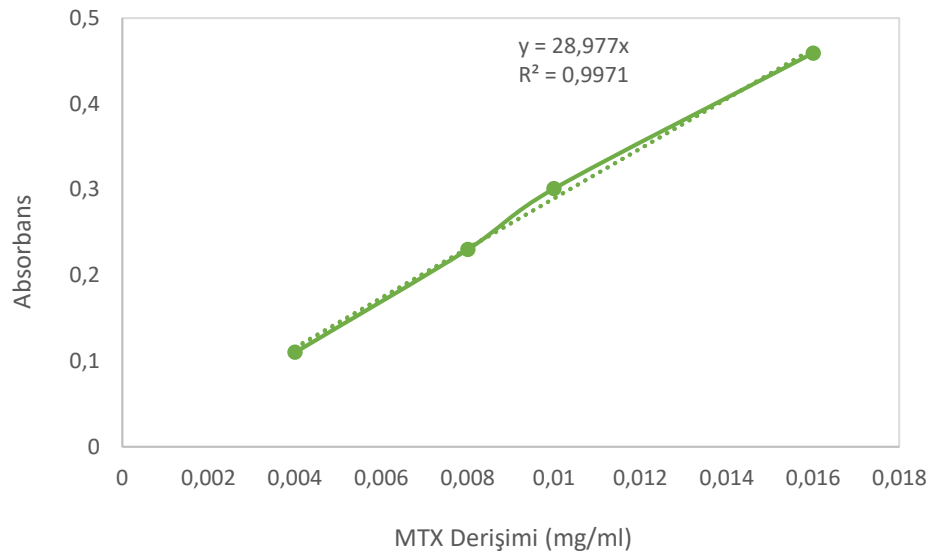
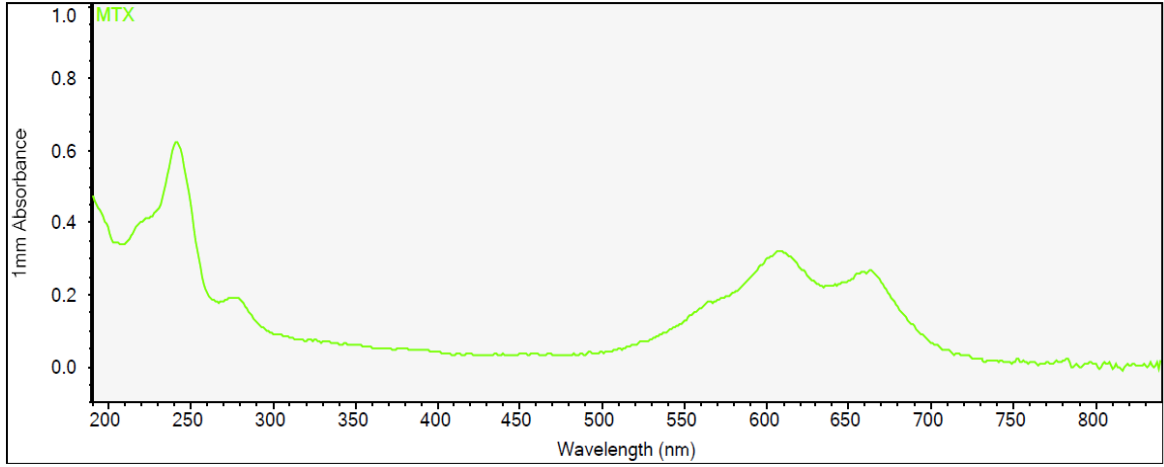
## $^1\text{H}$ - NMR



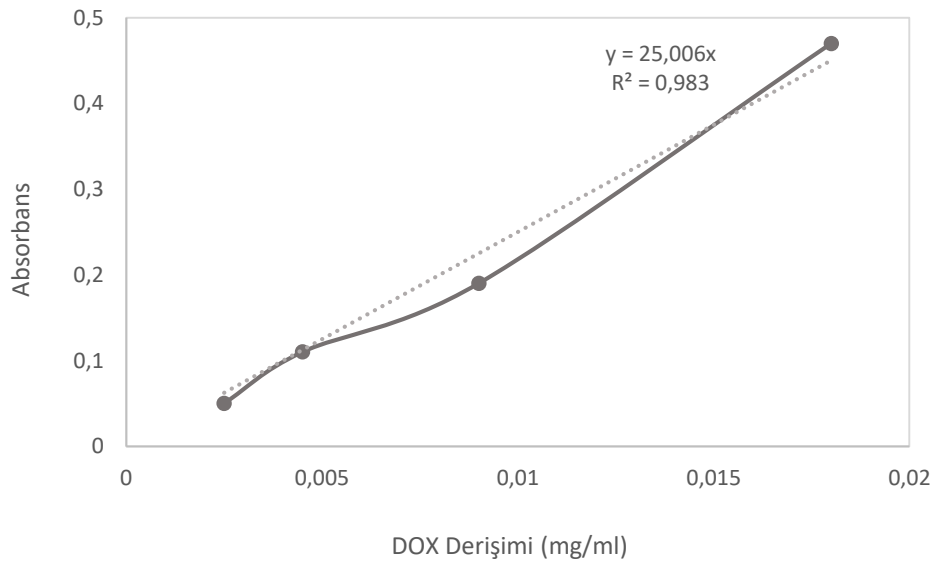
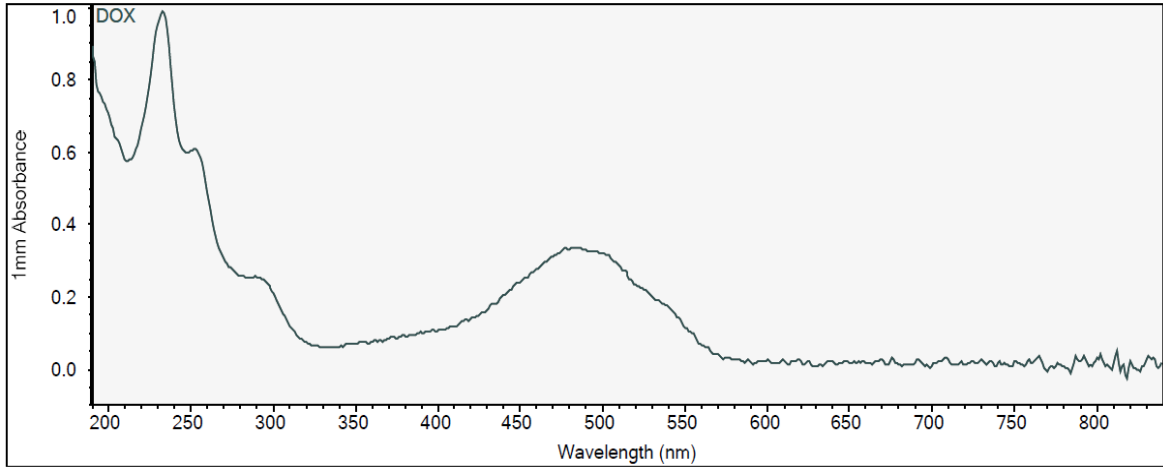
## $^{13}\text{C}$ - NMR



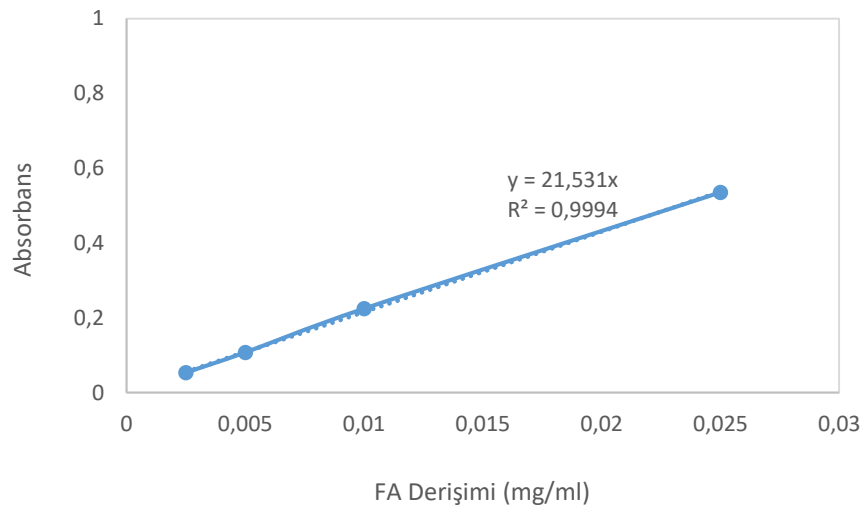
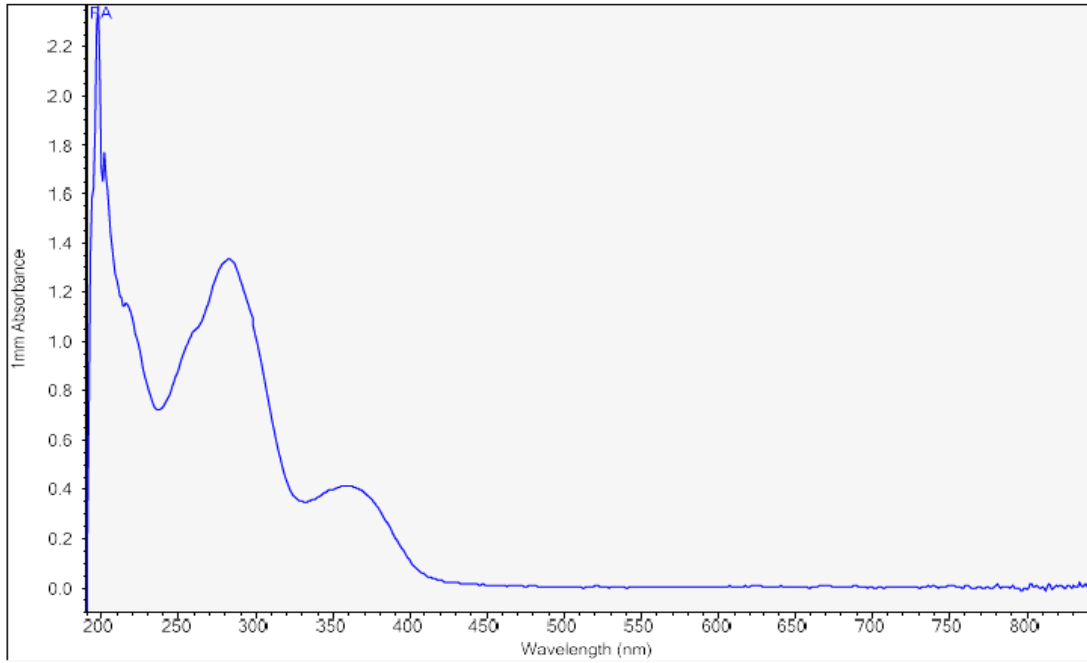
## EK 2 MTX'a ait UV-Vis spektrumu ve 664 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu



**EK 3** DOX'e ait UV-Vis spektrumu ve 485 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu

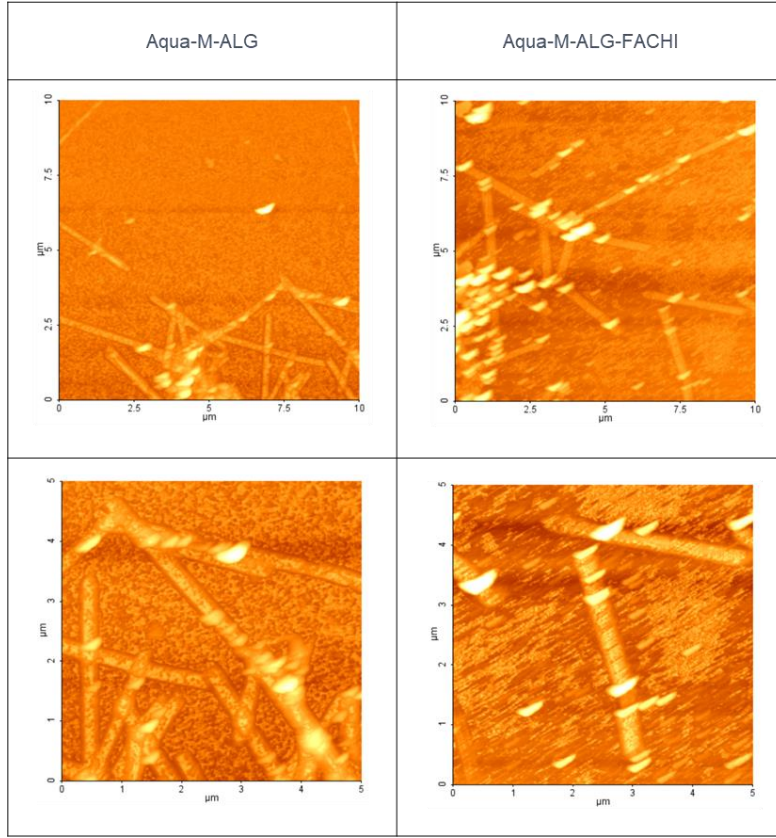


#### EK 4 FA'e ait UV-Vis spektrumu ve 363 nm dalga boyundaki kalibrasyon doğrusu





**EK 5** MTX salımı sonrasında Aqua-M-ALG ve Aqua-M-ALG-FACHI yapılarına ait AFM görüntüleri



**EK 6** Yüzey kaplaması gerçekleştirilen Aqua nanotüplerden eş zamanlı MTX ve DOX salımı için Birinci derece ve Higuchi modellerine göre hesaplanan kinetik parametreler

		Birinci Derece Modeli			
		$R_{MTX}^2$	$R_{DOX}^2$	$k_{MTX}$	$k_{DOX}$
pH 5,5	Aqua-MD-ALG (8)	0,71	0,70	0,013	0,011
	Aqua-MD-ALG-FACHI (8-2)	0,83	0,81	0,016	0,011
pH 7,4	Aqua-MD-ALG (8)	0,74	0,75	0,011	0,009
	Aqua-MD-ALG-FACHI (8-2)	0,71	0,80	0,010	0,009

		Higuchi Modeli			
		$R_{MTX}^2$	$R_{DOX}^2$	$k_{MTX}$	$k_{DOX}$
pH 5,5	Aqua-MD-ALG (8)	0,78	0,79	0,044	0,052
	Aqua-MD-ALG-FACHI (8-2)	0,88	0,89	0,063	0,057
pH 7,4	Aqua-MD-ALG (8)	0,82	0,85	0,048	0,046
	Aqua-MD-ALG-FACHI (8-2)	0,81	0,90	0,045	0,051



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

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 20.06.2019

Tez Başlığı / Konusu: Göğüs Kanseri Tedavisinde Kontrollü İlaç Taşınım Sistemi Olarak Lipit Nanotüplerin Kullanım Potansiyelinin İncelenmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 92 sayfalık kısmına ilişkin, 11/06/2019 tarihinde ~~çalışmam~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5'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 Orjinallik 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.

Tarih ve İmza  
20.06.2019

Adı Soyadı: Ayşe Nazlı Karakuşcu

Öğrenci No: N16123145

Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği

Programı: Yüksek Lisans

Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

**DANIŞMAN ONAYI**

UYGUNDUR

Prof. Dr. Nihal Aydoğan  
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı Ayşe Nazlı Karakuşcu  
Doğum Yeri Ankara  
Medeni Hali Bekar  
E-posta nazlikarakuscu@gmail.com  
Adresi Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı,  
Beytepe, Çankaya, Ankara

## Eğitim

Lisans Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi  
(2011-2016) Kimya Mühendisliği Bölümü (İngilizce)

Yüksek Lisans Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
(2016-2019) Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

**Yabancı Dil ve Düzeyi** İngilizce (iyi derecede)

## İş Deneyimi

---

## Deneyim Alanları

Nanoteknoloji, yüzey mühendisliği, kontrollü ilaç taşınımı, moleküler ilaç hedeflemesi

## Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

---

## Tezden Üretilmiş Yayınlar

---

### **Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar**

- Karakuscu, N., Hunter Unsal, H., Aydogan, N., “Smart Lipid Nanotubes: Drug Delivery System for the Breast Cancer Therapy”, 9th Eastern Mediterranean Chemical Engineering Conference (EMCC), Ankara, 2018, Poster sunumu.