

**PANKREAS KANSERİ KOMBİNE FOTOTERMAL/KEMO  
TERAPİSİNDE ALTIN  
NANOPARTİKÜLLERLE DEKORE EDİLMİŞ SICAKLIĞA  
DUYARLI LİPOZOMLARIN KULLANIM POTANSİYELİNİN  
İNCELENMESİ**

**POTENTIAL INVESTIGATION OF USING TEMPERATURE  
SENSITIVE LIPOSOMES DECORATED WITH GOLD  
NANOPARTICLES FOR COMBINED  
PHOTOTHERMAL/CHEMO THERAPY OF PANCREATIC  
CANCER**

**EMİNE YILMAZ**

**PROF. DR. NİHAL AYDOĞAN**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

## ÖZET

# PANKREAS KANSERİ KOMBİNE FOTOTERMAL/KEMO TERAPİSİNDE ALTIN NANOPARTİKÜLLERLE DEKORE EDİLMİŞ SICAKLIĞA DUYARLI LİPOZOMLARIN KULLANIM POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

**EMİNE YILMAZ**

**Yüksek Lisans Biyomühendislik A.B.D.**

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

**Haziran 2023, 112 sayfa**

Pankreas kanseri, beş yıllık sağkalım oranı %4-8 ve ölüm oranı %98 olan oldukça ölümcül bir hastalıktır. Bu hastalığın görülme sıklığı ve ölüm oranları artmaktadır ve 2030 yılına kadar kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olacağı tahmin edilmektedir. Pankreas kanserinin belirtileri genellikle hastalığın ileri aşamalarında ortaya çıkar ve bu da tedaviyi zorlaştırır. Cerrahi rezeksiyon mevcut tek tedavi seçeneğidir, ancak hastaların yalnızca küçük bir yüzdesinde mümkündür. Rezeksiyon yapılsa bile hastalığın nüks etme oranı yüksektir. Rezeksiyon yapılamayan hastalarda kemoterapi kullanılır, ancak tümörlerde düşük ve heterojen ilaç birikimi, tümörü çevreleyen fibrotik stroma tarafından direnç gelişimi ve toksisite gibi çeşitli faktörler nedeniyle etkinliği sınırlıdır. Nanotaşıyıcı sistemler, kemoterapinin sınırlamalarının üstesinden gelmenin bir yolu olarak önerilmiştir. Özellikle lipozomların immünojenik ve toksik olmadığı bulunmuştur, bu da onları terapötik ajanların kapsüllenmesi için popüler bir seçim haline getirmiştir. Sıcaklığa duyarlı lipozomlar da ilaç salım etkinliğini artırmak için bir alternatif olarak araştırılmıştır.

Ayrıca, fototermal terapi, hipertermiyi indüklemek ve kanser hücrelerini yok etmek için foto-emici ve yakın kızılötesi NIR ışınlamasını kullanan yeni bir kanser terapisi. Altın nanopartiküller, iyi foto emici özellikleri nedeniyle fototermal tedavide giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bu çalışma, fototermal terapi varlığında altın nanopartiküllerle süslenmiş bir lipozomal ilaç dağıtım sisteminin hipertermi ve ilaç salım özelliklerini araştırmayı amaçlamaktadır. Amaç, pankreas kanseri için sinerjik bir terapi ajanı olarak kullanılabilir bir sistem geliştirmektir. Çalışma, hipertermi ve ilaç salınım özelliklerini kontrol etmek ve incelemek için ön araştırmaları içerecektir. Başarılı bir şekilde tamamlanmasının ardından, formülasyon geliştirme ve in-vivo/in-vitro çalışmaları da içeren kapsamlı bir proje hazırlanacaktır. Bu çalışmanın bulguları potansiyel olarak pankreas kanseri için etkili bir tedavinin geliştirilmesine yol açarak hastaların hayatta kalma oranını ve yaşam kalitesini artırabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Pankreas kanseri, Fototermal terapi, Au NP, Lipozom, Hipertermi, Kemoterapi

## **ABSTRACT**

# **POTENTIAL INVESTIGATION OF USING TEMPERATURE SENSITIVE LIPOSOMES DECORATED WITH GOLD NANOPARTICLES FOR COMBINED PHOTOTHERMAL/CHEMO THERAPY OF PANCREATIC CANCER**

**EMİNE YILMAZ**

**Master of Science, Division of Bioengineering**

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

**June 2023, 112 pages**

Pancreatic cancer is a highly fatal disease with a 5-year survival rate of 4-8% and a mortality rate of 98%. The incidence and mortality rates of this disease are increasing and it is predicted to be the second leading cause of cancer-related deaths by 2030. Symptoms of pancreatic cancer often appear in the advanced stages of the disease, making it difficult to treat. Surgical resection is the only treatment option available but is only possible in a small percentage of patients. Even with resection, the recurrence rate of the disease is high. Chemotherapy is used in patients who cannot be resected, but its effectiveness is limited due to various factors such as low and heterogeneous drug accumulation in tumors, development of resistance by the fibrotic stroma surrounding the tumor, and toxicity. Nanocarrier systems have been proposed as a way to overcome the limitations of chemotherapy. In particular, liposomes are immunogenic and non-toxic, making them a popular choice for encapsulation of therapeutic agents. Temperature-sensitive liposomes have also been explored as an alternative to increase drug release efficacy. Also, photothermal therapy is a new cancer therapy that uses photo-absorbing and near-infrared NIR irradiation to induce hyperthermia and destroy cancer cells. Gold nanoparticles are increasingly used in photothermal therapy due to their good photo-absorbing properties. This study aims to investigate the hyperthermia and drug release

properties of a liposomal drug delivery system decorated with gold nanoparticles in the presence of photothermal therapy. The aim is to develop a system that can be used as a synergistic therapy agent for pancreatic cancer. The work will include preliminary research to control and examine hyperthermia and drug release properties. Upon successful completion, a comprehensive project will be prepared, including formulation development and in-vivo/in-vitro studies. The findings of this study could potentially lead to the development of an effective treatment for pancreatic cancer, improving patients' survival rate and quality of life.

**Keywords:** Pancreatic cancer, Photothermal therapy, Au NP, Liposome, Hyperthermia, Chemotherapy

## İÇİNDEKİLER

ETİK.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
Simgeler.....	xii
Kısaltmalar.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Pankreas.....	4
2.2. Pankreas Kanseri.....	5
2.3. Nanopartiküller, Nanoteknoloji ve Nanotıp.....	9
2.4. Lipozomlar.....	10
2.4.1. Lipozomların Hazırlama Yöntemleri.....	13
2.4.1.1. İnce Film Hidrasyon Yöntemi.....	13
2.4.1.2. Deterjan Giderme Yöntemi.....	14
2.4.1.3. Solvent Enjeksiyon Yöntemi.....	15
2.4.1.4. Ters Fazlı Buharlaştırma Yöntemi.....	16
2.5. Uyarıcıya Duyarlı Sistemler.....	16
2.5.1. Sıcaklığa Duyarlı Lipozomlar.....	17
2.6. Hipertermi.....	23
2.7. Altın Nanopartiküller.....	25
2.7.1. Altın Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri.....	26
2.8. Altın nanopartiküller ve altın kaplı sıcaklığa duyarlı lipozomlar.....	28
2.9. Hipertermide Altın Kaplı Sıcaklığa Duyarlı Lipozomların Kullanımına.....	31
İlişkin Önceki Çalışmalar.....	31
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	35

3.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	35
3.2. İlaç Taşıyıcı Sistemin Hazırlanma.....	35
3.2.1.Lipozomların Hazırlanması.....	35
3.2.2. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Yüzeyine Altın Nanopartiküllerin İndirgenmesi.....	37
3.3.Fototermal Etki ve Fototermal Verimlilik Çalışmaları.....	38
3.4. Lipozomal Taşıyıcı Sisteme İlaçların Enkapsülasyonu ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi.....	39
3.4.1. Salım Çalışmaları.....	39
3.4.1.1. Sıcaklıkla İndüklenen İlaç Salımı.....	39
3.4.1.2. NIR ile İndüklenen İlaç Salımı.....	39
3.5. İlaç Taşıyıcı Sistemin Karakterize Edilmesi.....	42
3.5.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM).....	43
3.5.2. Zeta-potansiyel ölçümleri.....	43
3.5.3. Işık Saçınım Yöntemi (LS).....	44
3.5.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC).....	44
3.5.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	44
3.5.6. UV-vis spektrofotometre.....	44
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	46
4.1. Lipozomların Hazırlanması.....	46
4.1.1. Lipidlerin ve Yöntemin Belirlenmesi.....	46
4.1.3. Lipozomların Karakterizasyonu.....	48
4.2. Lipozomların Yüzeyine Altın Nanopartiküllerin Kaplanması Altın Kaplı Lipozomların (AL) Karakterizasyonu.....	50
4.2.1. Altın Miktarının ve İndirgeyici Ajan Askorbik Asit Oranının Belirlenmesi... ..	55
4.2.2. Altın Kaplı Lipozomların Triton X-100 ile Bozulması.....	58
4.3. LAL.....	61
4.4. Stabilite Çalışmaları.....	66
4.5. Fototermal Etki ve Fototermal Verimliliklerinin İncelenmesi.....	66
4.6. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemin Enkapsülasyon ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi.....	71
4.7. L2, AL2 ve L1AL2 Lipozomlarıyla Yapılan Deneysel Çalışmalar.....	77
5. YORUM.....	85
6. KAYNAKLAR.....	90
7. EKLER.....	104
Ek 1- HPLC 5-Fluorourasil standart kalibrasyon eğrisi.....	104

Ek 2- HPLC Oksaliptatin standart kalibrasyon eğrisi.....	105
Ek 3- UV-vis spektrofotometre Resveratrol standart kalibrasyon denklem grafiği	106
.....	106
Ek 4- UV-vis spektrofotometre Rhodamine B standart kalibrasyon denklem grafiği	107
.....	107
.....	107
Ek 5– AL2 ve L1AL2'nin fototermal terapi etkisinin değerlendirilmesi.....	108
Ek 6- Tez alışması Orijinallik Raporu.....	109
ÖZGEÇMİŐ.....	<b>Hata! Yer işareti tanımlanmamış.</b>



## ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Kliniğe uyarlanmış lipozomal formülasyonlar13

Çizelge 2.2. Kliniğe uyarlanmış sıcaklığa duyalı lipozomal formülasyonlar22

Çizelge 4.1: DPPC dispersiyonunun 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap değerleri.50

Çizelge 4.2: Altın kaplı veziküllerin farklı oranlarda DTT ile inkübe edilmiş DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçapları.54

Çizelge 4.3: Farklı HAuCl<sub>4</sub> konsantrasyonlarına işleme tabi tutulan lipozomların DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçapları.57

Çizelge 4.4: Altın kaplı vezikül ve Triton X-100 ile inkübe edilmiş altın kaplı lipozomların sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap tablosu60

Çizelge 4.5: LAL 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap boyut değerleri.63

Çizelge 4.6: AL ve LAL üç ay sonra 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap boyut değerleri.66

Çizelge 4.7: DPPC, AL ve LAL veziküllerinin sırasıyla 5-fu, 5-fu ve Res, 5-fu, Res ve RhoB kapsüllenmiş veziküllerin DLS sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap değerleri.77

Çizelge 4.8: L2 , AL2 ve L1AL2 lipozomlarının DLS sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap değerleri.78

## ŞEKİLLER

Şekil 1.1: Farklı tedavi stratejileri kullanılırken tümör içine ilaç verilmesinin tasviri.  
[119]33

Şekil 3.1: Lipozomların ince film hidrasyon yöntemiyle hazırlama37

Şekil 4.1: DPPC vezikülün a AFM topografya görüntü b AFM çizgi profili ve c DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.48

Şekil 4.2: Lipozomların ekstrüde edilmemiş(a) ve ekstrüde edilmiş çözelti renginin hamilton şırıngalarındaki görüntüsü.49

Şekil 4.4: DPPC dispersiyonu DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü. A)Sonikasyon işlemi B) Ekstrüzyon işlemi49

Şekil 4.5: a DPPC lipozomu ve AL dispersiyon görüntüsü b AL lipozomu şeması.52

Şekil 4.6: AL vezikülünün a AFM topografya görüntü b AFM çizgi profili ve c DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.52

Şekil 4.7: Altın kaplı lipozomların 46,8µg HAuCl<sub>4</sub>/mg lipid oranında UV-vis spektrumu.53

Şekil 4.8: Altın kaplı lipozomların farklı oranlarda DTT inkübesi sonucunda DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.54

Şekil 4.8: Farklı oranlarda HAuCl<sub>4</sub>/mg lipid uv-vis spektrumu.55

Şekil 4.9: Altın kaplı lipozomların(sarı eğri) ve DTT ile inkübe edilmiş altın kaplı lipozomların (kırmızı eğri) 15 dakika 1 W/cm<sup>2</sup> 808nm'de NIR uygulama ısınma grafiği.56

Şekil 4.10: AL(sol) ve Triton X-100 ile inkübe edilmiş AL(sağ) görüntüsü.58

Şekil 4.11: Altın kaplı lipozom ve Triton X-100 ile inkübe edilmiş altın kaplı lipozomun UV-vis spektrumu.59

Şekil 4.12: Triton X-100 ile inkübe edilmiş altın kaplı lipozomların DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntü60

Şekil 4.13: LAL lipozomlarının a)AFM topografya görüntüsü b) AFM çizgi profili, c) DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.61

Şekil 4.14:DPPC, AL ve LAL uv-vis spektrumları A) 46,8µg HAuCl<sub>4</sub>/mg lipid B) 93,7µg HAuCl<sub>4</sub>/mg lipid61

Şekil 4.15: DPPC , AL ve LAL AFM topografya görüntüsü ve çizgi profilleri.64

Şekil 4.16: DPPC lipozomunun , AL ve LAL'in yüzey pürüzlülük bar grafiği ve şematize görüntüsü.65

Şekil 4.17: AL ve LAL'in fototermal etkisi. a 15 dakika boyunca 1 W/cm<sup>2</sup> güçte 808 nm lazer ışınımı altında AL ve LAL'in fototermal etkisinin değerlendirilmesi. A) 46,8µg H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>/mg lipid B) 93,7µg H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>/mg lipid67

LAL'nin termal kararlılığının doğrulanması.A) 46,8µg H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>/mg lipid B) 93,7µg H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>/mg lipid68

Şekil 4.19: Lazer ışınlanmasının 46,8µg H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>/mg lipid oranına sahip AL ,LAL lipozomlarında uv-vis spektrumu.69

Şekil 4.20: Lazer ışınlanmasının 93,7µg H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>/mg lipid oranına sahip AL ,LAL lipozomlarında uv-vis spektrumu etkisinin değerlendirilmesi.70

Şekil 4.21: 5-Fluorourasilin DPPC lipozomu, AL ve LAL'deki salım profilleri.72

Şekil 4.22: Resveratrol DPPC lipozomu, AL ve LAL'deki salım profilleri.73

Şekil 4.23: Rhodamine B DPPC lipozomu, AL ve LAL'deki salım profilleri.75

Şekil 4.24: DPPC lipozomu ve LAL lipozomu salımlarının karşılaştırılması.76

Şekil 4.24: L2 lipozomlarının a)AFM topografya görüntüsü b) AFM çizgi profili, c) DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.79

Şekil 4.25: AL2 lipozomlarının a)AFM topografya görüntüsü b) AFM çizgi profili, c) DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.79

Şekil 4.26: L1AL2 lipozomlarının a)AFM topografya görüntüsü b) AFM çizgi profili, c) DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.80

Şekil 4.27: L2 ,AL2 ve L1AL2'nin yüzey zeta potansiyeli değerleri81

Şekil 4.28:AL2(46,8µg H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>/mg lipid ) ve L1AL2(46,8µg H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>/mg lipid)'in fototermal etkisi. A) 15 dakika boyunca 1 W/cm<sup>2</sup> güçte 808 nm lazer ışınımı altında AL ve LAL'in fototermal etkisinin değerlendirilmesi. B) Lazer açma/kapama döngüsünün 3 tekrarı sırasında termal kararlılığının doğrulanması.82

Şekil 4.29: Lazer ışınlanmasının 6,8µg H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>/mg lipid oranına sahip AL2 ,L1AL2 lipozomlarında uv-vis spektrumu etkisinin değerlendirilmesi.83

Şekil 4.30: OXA, RES ve 5-FU'nun sıcaklıkla indüklenmiş salım profilleri.84

Şekil 4.31:OXA, RES ve 5-FU'nun NIR'la indüklenmiş salım profilleri.84

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

FDV: Fototermal dönüşüm verimliliği

h: Isı transfer katsayısı

S: Kuvars banyosunun yüzey alanı

Tmax: Maksimum kararlı dağılım sıcaklığı

Tsurr: Çevre sıcaklığı

I: Lazer gücü

$\Lambda$ : Dağılımın absorbanası

$\theta$ : Boyutsuz değer

$\tau$ s: Zaman sabiti

mD: Su kütlesi

CD: Suyun ısı kapasitesi

### Kısaltmalar

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

AFM: Atomik Kuvvet Mikroskobu

AL: Altın kaplı lipozom

LAL: İç lipozomu altın kaplı iç içe lipozom

L2: DPPC, DSPC, kolesterol bileşiminden oluşan lipozom

AL2: DPPC, DSPC, kolesterol bileşiminden oluşan lipozomun altın kaplanması

L1AL2: İç içe lipozom; iç lipozom DPPC, DSPC, kolesterol ve ardından altın kaplanması ve dış lipozom katmanında DPPC, MSPC, DSPE-PEG (2000)

5-FU: 5-Fluorourasil

OXA: Oksaliplatin

RhoB: Rhodamine B

DLS: Dinamik Işık Yayılmı

RES: Resveratrol

EPR: Artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi

DSC: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri

EE: Kapsülleme Verimliliği

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

MDR: Çoklu İlaç Direnci

NIR: Yakın Kızılötesi Reflektans

PBS: Fosfat Tampon Salın

PTT: Fototermal Terapi

UV-Vis: Ultraviyole-Görünür Spektrofotometre

DL: İlaç Yükleme Kapasitesi

# 1. GİRİŞ

Pankreas kanseri %4-8 beş yıllık sağkalım ve %98 ölüm oranı ile kötü bir prognoza sahiptir. 2030'da kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olacağı düşünülmektedir ve görülme sıklığı ve ölüm oranı giderek artmaktadır. [1] Pankreas kanseri belirtileri genellikle hastalığın ileri evrelerinde ortaya çıkar. Cerrahi rezeksiyon pankreas kanseri için tek tedavi seçeneğidir ve hastaların sadece %10-20'sinde hastalık rezeke edilebilmektedir. [1] Rezeksiyon yapılsa bile hastalığın tekrarlama oranı yüksektir. Rezeksiyon yapılamayan hastalarda gempitabin, gempitabin nab-paklitaksel kombinasyonu ve FOLFIRINOX protokolleri uygulanmaktadır. Bu tedaviler kalıcı çözümler olmayıp sadece yaşam süresini uzatmaya yöneliktir. Kemoterapinin etkinliğini sınırlayan bir dizi faktör vardır: Tümörlerde düşük ve heterojen ilaç birikimi genellikle tedavi başarısızlığının ana nedeni olarak kabul edilir. [2] Hastalardaki suboptimal sonuç büyük ölçüde tüm kanser hücrelerine yeterli miktarda ilaç verilememesinden kaynaklanmaktadır. Toksikite nedeniyle daha yüksek ilaç seviyelerine ulaşmak için doz daha fazla artırılamaz. [3] Tümörü çevreleyen büyük fibrotik stroma, terapötik ajanları, anormal vaskülarizasyonu ve sonuç olarak hipoksiyi inhibe ederek ilaçların tümör mikroçevresine alımını sınırladığından, kemoterapötiklere karşı kısa sürede direnç geliştirir. [4] Bu sorunun üstesinden gelmek için nanotaşıyıcı sistemlerin kullanılması önerilmektedir. Nanotaşıyıcılar anormal vaskülarizasyonun neden olduğu artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi (EPR)'den etkilenmez, aksine tümör dokusuna nüfuz edebilirler. [5] Lipozomlar immünojenik ve toksik olmadıkları için birçok çalışmada kullanılabilirler. Ayrıca, lipozomlar kullanılarak terapötik ajanların kapsüllenmesi, daha yüksek stabilite, uzun dolaşım özellikleri, vücuttaki sızıntı bölgelerinde ekstrasvazasyon ve tümörle ilişkili alanlarda daha iyi birikim elde edilebilir. Sıcaklığa duyarlı lipozomlar, ortalama normal vücut sıcaklığının birkaç derece üzerinde lokal hafif hipertermi ile kullanıldığında ilaç salım etkinliğini artırmak için faydalı bir alternatif olabilir. Fototermal terapi, hipertermiyi indüklemek ve kanser hücrelerini yok etmek için foto-emici ve yakın kızılötesi (NIR) ışık ışınlamasının bir kombinasyonunu kullanan gelişmekte olan kanser terapötiklerinden biri haline gelmektedir. Altın nanopartiküller, absorpsiyon bandının uygulanabilirliği nedeniyle iyi fotoabsorblama özelliklerine sahiptir. Önerilen bu çalışmada, altın nanopartiküllerle süslenmiş lipozomal ilaç taşıyıcı sistemin

fototermal terapi varlığında hipertermi ve buna bağlı olarak ilaç salınım özelliklerinin kontrol

Edilmesi/incelenmesi amaçlanmaktadır. Böylece sinerjik terapi ajanı olarak kullanılacak bir sistemin geliştirilmesi için gerekli ön çalışmalar tamamlanmış olacaktır. Pankreas kanseri, yoğun fibrotik stroma ve immünosupresif tümör mikroçevresi nedeniyle tedavisi ve hedeflenmesi zor bir kanser türüdür. [6] Lokal olarak ilerlemiş pankreas kanserli hastaların etkili tedavisi, karşılanmamış önemli bir klinik ihtiyaç olmaya devam etmektedir. Çalışmamızda, bugüne kadar bildirilen kemoterapötik ajan kombinasyonları arasında pankreas kanserine en iyi yanıt veren dört ilaçlı kombinasyon olan FOLFIRINOX (oxaliplatin, leucovorin, irinotecan, 5-FU) protokolü kullanılacaktır. [7] FOLFIRINOX protokolü, pankreas kanserli hastalarda diğer ajan ve kombinasyonlara kıyasla daha iyi sağkalım iyileşmeleri göstermiştir. Ancak toksisiteler FOLFIRINOX'un tam doz kullanımını engellemiştir. [8] Literatürde FOLFIRINOX grubu ilaçlarla yapılan çalışmalara bakıldığında, bu dört ilaç kombinasyonundan iki veya üçünün mikrokabarcık veya biyotin avidin fonksiyonelleştirmesi ile kapsüllendiği görülmektedir. [8,10] Ancak literatürde bu dörtlü kombinasyonun bizim önerdiğimiz şekilde enkapsüle edildiği bir ilaç taşıyıcı sistem çalışması bulunmamaktadır. Çalışmamızda, önerdiğimiz nanoformülasyonun ana bileşeni olarak lipozomlar kullanılacaktır. Basit hazırlanmaları ve iyi biyouyumlulukları nedeniyle piyasadaki birkaç ürünle (Doxil, ThermoDox, Lipoplatin) yaygın olarak translasyonel olarak kabul edilirler ve bu dörtlü ilaç kombinasyonu kapsüllenecektir. Çalışmamızda tasarlayacağımız ısıya duyarlı lipozomlarımız kliniğe en yakın formülasyondur. Nanomedikal ürünlerden biri olan ThermoDox, hipertermi ve pankreas kanserinde klinik deneme aşamasında olan sıcaklığa duyarlı bir lipozom formülasyonudur (sadece DOX içeren). [ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04852367]. Literatürde pankreas kanseri ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında ısıya duyarlı lipozom ve polimerlerin sınırlı sayıda çalışmada kullanıldığı görülmektedir. Çalışmamızda lizolipidler kullanılarak daha etkin ve güvenli kemo-fototermal sinerjik tedavi için kullanılacak bir sistem tasarlanması planlanmaktadır. Fototermal terapi ile birlikte kullanılacak olan sıcaklığa duyarlı lipozomal taşıyıcı sistemimiz, Au NP'lerin konumu ve yoğunluğu ayarlanarak daha etkin bir performans ile çoklu ilaç salınımına uygun çift katmanlı bir ilaç taşıyıcı sistem içerisinde kapsüllenecektir. Pankreas kanseri için benzer bir uygulama olmadığından literatürdeki önemli bir boşluğu

dolduracaktır. Ayrıca FOLFIRINOX kemoterapi rejimi diğer kanser türlerinin (kolorektal, karaciğer vb.) tedavisinde de kullanılmaktadır. Bu yeni ilaç taşıma sisteminin diğer kanser türlerinin tedavisinde de kullanılabileceği düşünölmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Pankreas

Sindirim sisteminin hayati bir parçası ve kan şekeri seviyelerinin kritik bir kontrolörü olan altı inç uzunluğunda mide, ince bağırsak, karaciğer, dalak ve safra kesesi ile çevrili bir salgı bezidir. Pankreas hem ekzokrin hem de endokrin hücrelerden oluşur ve iki ana işlevi vardır: sindirim ve kan şekerinin düzenlenmesi. Pankreasın ekzokrin hücreleri sindirime yardımcı olan enzimler üretir. Yiyecekler mideye girdiğinde, ekzokrin hücreler pankreatik enzimleri ana pankreatik kanala giden küçük kanallar sistemine bırakır. Pankreatik kanal pankreasın uzunluğu boyunca uzanır ve pankreatik enzimleri ve topluca pankreas suyu olarak adlandırılan diğer salgıları taşır. Ana pankreas kanalı, safra kesesinden safra taşıyan ortak safra kanalı ile birleşir ve birlikte vater ampulla adı verilen bir noktada duodenuma bağlanırlar. Burada safra ve pankreatik enzimler yağların, karbonhidratların ve proteinlerin sindirimine yardımcı olmak için on iki parmak bağırsağına girer. Pankreasın endokrin hücreleri hormon üretir. Hormonlar vücuttaki belirli işlevleri kontrol eden veya düzenleyen maddelerdir. Genellikle vücudun bir bölümünde üretilir ve vücudun başka bir bölümünde harekete geçmek için kan yoluyla taşınırlar. İki ana pankreas hormonu insülin ve glukagondur. Adacık hücreleri, pankreas içinde insülin ve glukagon üreten ve kan dolaşımına salgılayan endokrin hücrelerdir. İnsülin kan şekeri seviyesini düşürürken glukagon kan şekeri seviyesini yükseltir. Bu iki ana hormon birlikte kandaki uygun şeker seviyesini korumak için çalışır. Pankreas dört ana bölümden oluşur: Baş bölümü, pankreasın en geniş kısmıdır. Karnın sağ tarafında duodenumun kıvrımına yerleşmiştir. Pankreasın başı ve gövdesi arasındaki ince kısım boyun bölümüdür. Gövde, pankreasın boynu ve kuyruğu arasındaki kısımdır. Üst mezenterik arter ve ven bu kısmın arkasında kalmaktadır. Dalağa yakın olan ince ucu ise kuyruğu olarak adlandırılmaktadır. Unsinat prosesi, pankreasın baş bölümünün geriye doğru kıvrılan ve pankreasın gövde bölümünün altında kalan bölgesidir. Unsinat proses, iki önemli kan damarının kesiştiği superior mezenterik arter ve superior mezenterik ven kesiştiği yerdir. Baş bölümünün en geniş kısmıdır.

## 2.2. Pankreas Kanseri

Kanser hem dünyada hem de ülkemizde %22'lik oran ile kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedenidir. Dünyada her altı ölümden birinin, ülkemizde ise her beş ölümden birinin nedeni kanserdir. [9] Aslında son yılların verilerine bakınca kanseri bir toplum sağlığı problemi olarak görmek hiç de yanlış olmayacaktır.

Pankreas kanserinin 2030 yılında ABD'de kansere bağlı ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olması beklenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre pankreas kanseri, dünya çapında kanserden ölümlerin 7. önde gelen nedenidir.[1] Pankreas kanseri insidansı bölgelere göre büyük farklılıklar göstermekte olup en yüksek oranlar Kuzey Amerika ve Avrupa'da, en düşük oranlar ise Afrika ve Asya'da görülmektedir. Pankreas kanseri görülme sıklığı erkeklerde kadınlara göre biraz daha yüksektir. Pankreas kanseri yaşlı yetişkinlerde daha yaygındır ve en yüksek insidans oranları 65 yaşın üzerindeki kişilerde görülür. [1] Pankreas kanseri genellikle ileri bir aşamada teşhis edilir, bu da tedavisini zorlaştırır ve kötü prognozuna katkıda bulunur. Pankreas kanseri için 5 yıllık hayatta kalma oranı sadece yaklaşık %10'dur, yani hastalığı olan her 10 kişiden sadece 1'i tanıdan sonra 5 yıl veya daha uzun süre hayatta kalacaktır. [10]

Pankreas kanseri midenin arkasında yer alan ve sindirime yardımcı olmak için hormon ve enzim üreten bir organ olan pankreasın hücrelerinde başlayan belirsiz üst abdominal semptomlar ve başka rahatsızlıklara yorulabilecek benzerlikleri ile hastalık ileri invazyon göstermiş bir evresinde teşhis edilebilmekte ve dünyada ölümcül kanser sıralamasında dördüncü sırada yer almaktadır. [11,12] Nispeten nadir görülen bir kanser türüdür. Prognozu genellikle kötüdür ve çok düşük hayatta kalma oranıyla en ölümcül olanlardan biridir.

Derin yerleşimi nedeniyle pankreas tümörlerinin çoğu karına bastırıldığında hissedilemez. Pankreas kanseri belirtileri genellikle tümör pankreasın veya mide, onikiparmak bağırsağı, karaciğer veya safra kesesi gibi diğer yakın organların işlevini engellemeye başlayana kadar ortaya çıkmadığından, bu durum geç teşhise yol açar. Pankreasın iki işlevini anlamak önemlidir çünkü: Büyük pankreas tümörleri bu önemli vücut fonksiyonlarının her ikisini de engelleyecektir. Tümörler ekzokrin veya endokrin

olmak üzere her iki bileşende de ortaya çıkabilir. Pankreas tümörlerinin büyük çoğunluğu ekzokrin kısımda ortaya çıkar ve bu kanserler mikroskop altında pankreas kanalları gibi görünür.[13] Bu nedenle bu tümörler "duktal adenokarsinomlar" veya basitçe "adenokarsinom" veya daha da basitçe "pankreas kanseri" olarak adlandırılır. [13] Tümörler ekzokrin sistemi bloke ettiğinde, hastalar sindirim enzimlerinin bağırsak yerine pankreas maddesine anormal salınımından kaynaklanan pankreatit ve ağrı geliştirebilir ve yiyeceklerin tam olarak sindirilmemesinden kaynaklanan ishal gibi sindirim sorunları geliştirebilirler. Daha az yaygın olarak, tümörler pankreasın endokrin bileşeninden kaynaklanır ve bu endokrin tümörler "pankreatik nöroendokrin tümörler" veya kısaca "adacık hücre tümörleri" olarak adlandırılır. Tümörler pankreasın endokrin işlevini yok ettiğinde, hastalarda şeker diyabeti (anormal derecede yüksek kan şekeri seviyeleri) gelişebilir. Pankreas kanseri genellikle sindirim sistemini etkileyerek kilo kaybına ve/veya diyabete neden olur. Buna ek olarak, pankreas kanserinin cerrahi tedavisi sırasında sindirim sisteminin akışı sıklıkla değişmektedir. Erken teşhis etmek zor olabilir çünkü genellikle vücudun diğer bölgelerine yayılana kadar belirtilere neden olmaz. Belirtiler arasında karın veya sırt ağrısı, açıklanamayan kilo kaybı, iştahsızlık, sarılık, bulantı ve kusma yer alabilir. Sigara içilmesi, obezite, genetik faktörler, Lynch ve Peutz-Jeghers gibi sendroma sahip bireylerde de kansere yatkınlık sonucu görülme riski de artmaktadır. Ayrıca kronik pankreatitin erken teşhis ve tedavisinin yapılmaması da pankreas kanserine sebep olabilmektedir. [14] Pankreas kanserinde tümörü çevreleyen geniş fibrotik stroma, terapötik seçenekleri engeller, tümör mikro ortamı ilaç alımını sınırlar ve kemoterapötiklere kısa sürede direnç geliştirir. Tümör hücrelerinin direnç kazanma kapasitesi tedavinin başarısız olmasına neden olan bir faktördür ve sonrasında kötü bir prognoz ve mortalite ile sonuçlanır. [13] Sonuç olarak kemoterapinin etkinliğini sınırlayan bir dizi faktör vardır: Tümörlerde genellikle düşük ve heterojen ilaç birikimi tedavi başarısızlığının başlıca nedeni sayılmaktadır. Katı bir tümör anormal bir vasküler ağ, fibrotik stromanın yanı sıra yüksek düzeyde katı ve sıvı stresi oluşturur. Sızdıran tümör kan damarları artmış interstisyel sıvı basıncına neden olur ve bu, yeterli sıvı drenajına izin vermeyen sıkıştırılmış lenfatik damarlar tarafından daha da şiddetlenir. İnterstisyel sıvı basıncı (IFP) sırayla, yüksek IFP'li tümör bölgeleri tarafından ilaç alımını engelleyen kan akışının durmasına ve ters kan akışına neden olur. İlaç alımını engelleyen başka bir durum katı stres ve tümör damarlarına katkıda bulunan hücre dışı matris proteinlerinin aşırı üretimidir. Bu engellerle, nekrotik ve

perfüze olmayan tümör bölgeleri hipoksi ve asidoz ile sonuçlanır. Bu bölgelerde kanser hücreleri genellikle kemoterapötik ilaçlara daha dirençlidir. [15] Pankreas kanseri tedavisi kanserin evresine bağlıdır ve cerrahi, kemoterapi, radyasyon tedavisi veya bu tedavilerin bir kombinasyonunu içerebilir. Pankreas kanserinde tedavisinde öncelikli yöntem, cerrahi olarak tümörün çıkarılmasıdır. Ameliyat sonrası dönemde kemoterapi ve radyoterapi neredeyse hastaların tümünde ihtiyaç haline gelmektedir. Tümörün cerrahi olarak çıkarılmasının mümkün olmadığı lokal ileri evrede kemo-radyoterapi ile kitle boyutlarında küçülme sağlanarak cerrahi şansı elde edilebilmektedir. Pankreas organ olarak karın arka duvarında yerleşmiş ve birçok kan ve lenf damarının akım yolu üzerinde yer almaktadır. Bu nedenle tedavi sonrasında hastalığın nüksetme olasılığı yüksektir. Kemoterapi, pankreas kanseri için kullanılan ana sistemik tedavi türüdür. Bununla birlikte, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapi bazen kullanılmaktadır. Aşağıdaki ilaçlar pankreas kanseri için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır:

- Kapesitabin (Xeloda)
- Florourasil (5-FU)
- Gemsitabin (Gemzar)
- İrinotekan (Camptosar)
- Leucovorin (Wellcovorin)
- Nab-paklitaksel (Abraxane)
- Nanolipozomal irinotekan (Onivyde)
- Oksaliplatin (Eloksatin)

Son zamanlarda çoklu ilaç kombinasyonu FOLFIRINOX (5-FU, lökovorin, irinotekan ve oksaliplatin) kemoterapi amaçlı kullanılmaktadır. Alternatif seçenek, tek bir ilaç olarak veya kapesitabin adı verilen ikinci bir ilaçla kombinasyon halinde gemsitabindir. Çoklu ilaç kombinasyonlarının tek başına gemsitabinden daha etkili olduğu gösterilmiştir, ancak ishal, yorgunluk, nöropati, düşük beyaz kan hücresi seviyeleri ve el-ayak sendromu gibi daha fazla yan etki ile ilişkilidir. Ameliyattan önce tedavi görmüş hastalarda ameliyat sonrası ek tedavi ihtiyacı her hastanın durumuna

ve genel sağlığına bağlıdır. Lokal ileri pankreas kanserinde birinci basamak tedavi seçenekleri Őunları içerir:

- Agresif seyirli hastalar için FOLFIRINOX, gemitabin+nab-paklitaksel.
- Sağlıklı olmayan hastalar için gemitabin tek başına. Bazen, gemitabin+sisplatin, gemitabin+kapesitabin veya FOLFOX gibi başka bir gemitabin bazlı veya fluorourasil bazlı kombinasyon kullanılabilir.

İkinci basamak tedavi hastalığın kötüleŐtiđi veya hastaların birinci basamak tedavi sırasında ciddi yan etkiler yaŐadıđı durumlar içindir. Fluorourasil tek başına veya nanolipozomal irinotekan, irinotekan veya oksaliptatin ile kombine olarak hastanın genel sağlığına bağlı olarak önerilebilir. Gemitabin tek başına veya nabpaklitaksel ile kombinasyon halinde uygulanabilir. Pembrolizumab, kanser yüksek mikro uydu kararsızlığına (MSI-yüksek) veya uyumsuzluk onarım eksikliğine (dMMR) sahip olduğunda önerilmektedir. Pankreas kanseri olan kiŐilerin sadece %1'inde MSI-yüksek hastalığa sahip olduğuna dikkat etmek önemlidir. İdame tedavisi, hastalığı birinci basamak tedavide ilerlememiŐ ancak yan etkiler nedeniyle artık orijinal tedavilerine devam edemeyecek durumda olan hastalar için de bir seçenek olarak önerilmektedir. Onaylanmış tek idame tedavisi, birinci basamak platin bazlı kemoterapiyi takiben kalıtsal BRCA mutasyonu ile ilişkili metastatik pankreas kanseri olan kişilerde faydalı olan olaparib'dir (Lynparza). Diğer hastalar için idame tedavisi, orijinal kemoterapi rejimlerini basitleŐtirmek anlamına gelebilir. Örneğin, gemitabin/nab-paklitakselden tek başına gemitabine veya FOLFIRINOX'tan FOLFOX, FOLFIRI veya kapesitabine basitleŐtirilebilir. Anormal damarlanma yapısına sahip tümör bölgeleri, lokal tümörün nüksetmesine katkıda bulunur ve hatta ilaç direncine neden olabilir. [15] Kötü ileti mi telafi etmek için kemoterapi dozunun arttırılması bu nedenle tipik olarak bir seçenek değildir, çünkü bu aynı zamanda sistemik dokuların maruz kalmasını da arttırır ve bu nedenle daha yüksek toksisite ile sonuçlanır. Bu bileşiklerin çoğu hem kanser hücreleri hem de normal doku hücreleri için oldukça sitotoksiktir. Ortaya çıkan morbidite o kadar Őiddetlidir ki, uygulanan doz tipik olarak toksisiteler ile sınırlıdır. Bu toksisiteler, kemoterapötiklerin sadece kanser hücrelerine ulaŐmayı hedeflememesinin ve ajanların kanser hücrelerine seçici olarak sitotoksik olmamasının sonucudur. Bu doz sınırlayıcı toksisiteler sonucunda tümörlerde nispeten düşük ilaç seviyeleri elde edilmektedir. Pankreas kanserinin

nedenleri, önlenmesi ve tedavisine yönelik araştırmalar devam etmektedir, ancak yönetilmesi zor bir hastalık olmaya devam etmektedir. Genel olarak pankreas kanseri, yüksek ölüm oranı ve erken teşhis ve tedavideki zorluklar nedeniyle önemli bir küresel sağlık sorunudur. Hastalığın nedenlerini daha iyi anlamak ve etkili önleme ve tedavi stratejileri geliştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu nedenle, pankreas kanseri tedavisi amacıyla hem mikroçevrenin üstesinden gelebilmek için hiperterminin hemde yüksek doz kemoterapinin sağlıklı dokuya zarar vermemesi için nanotaşıyıcı sistemlerin kullanıldığı ve terapötik ajanları doğrudan pankreasa iletebilen bir sistemin tasarımı öngörülmektedir.

### **2.3. Nanopartiküller, Nanoteknoloji ve Nanotıp**

Nanopartiküller, tipik olarak 1 ila 100 nanometre boyutlarında küçük parçacıklardır ve metaller, polimerler ve lipitler gibi çeşitli malzemelerden oluşabilirler. [20] Artan yüzey alanı ve gelişmiş optik ve manyetik özellikler de dahil olmak üzere benzersiz özellikleri, onları biyoteknoloji, tıp ve malzeme bilimi gibi çeşitli alanlarda önemli kılmaktadır. [17]

Ulusal Nanoteknoloji Girişimi tarafından nano ölçekte madde veya madde topluluklarının sentezi, karakterizasyonu ve kontrolü olarak tanımlanan nanoteknoloji, Allhoff ve arkadaşları tarafından kapsamlı bir şekilde genişletilerek “Büyük ölçeklerde bulunanlardan önemli ölçüde farklı özelliklere sahip malzemeler, cihazlar ve sistemler geliştirmeyi ve kullanmayı içeren geniş bir bilim ve mühendislik alanı.” olarak tanımlamıştır. [18,19] Tıp alanında nanopartiküller, belirli hücreleri veya dokuları hedefleme ve ilaçları kontrollü bir şekilde salma yetenekleri nedeniyle ilaç dağıtımı için bir platform olarak incelenmektedir. Ayrıca, benzersiz özellikleri sayesinde tıbbi görüntüleme ve radyografi tarama tekniklerinde kolayca tespit edilebilmektedirler. Ancak, hücrelere ve dokulara girebildikleri ve biyolojik moleküllerle beklenmedik şekillerde etkileşime girebildikleri için nanopartiküllerin potansiyel etkileri, toksisitesi, kontrol edilebilirliği ve güvenliği değerlendirilmelidir. [20] Nano tıp, nanoteknoloji ve nanopartiküllerin diğer kullanımlarının yanı sıra hastalıkların teşhisi, tedavisi ve önlenmesinde uygulanmasıdır. Görüntüleme ve tedavi ajanları, sensörler ve çip üzerinde laboratuvar cihazları gibi çok çeşitli buluşları kapsar. [21] Nanopartiküller

nano tıpta temel bir rol oynar ve ilaçlar, görüntüleme ajanları ve terapötik ajanlar için taşıyıcı görevi görür. Vücuttaki belirli hücreleri veya dokuları hedef alacak ve vücudun mikro çevresindeki değişikliklere yanıt verecek şekilde tasarlanabilirler, bu da onları hedefe yönelik ilaç dağıtım sistemleri geliştirmek için umut verici bir seçenek haline getirir. [22] Genel olarak nanoparçacıklar, onları aynı malzemenin daha büyük parçacıklarından ayıran benzersiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir. Çeşitli işlevsellikleri, ilaç dağıtımı, görüntüleme ve teşhis testleri de dahil olmak üzere tıpta geniş bir uygulama yelpazesi için yararlı olmalarını sağlar ve hem nanoteknolojinin hem de nano tıbbın ayrılmaz bir bileşenidir. [23]

## 2.4. Lipozomlar

Vezikül ilaç dağıtım sistemleri, ilaçları vücuttaki belirli bölgelere taşımak için lipid bazlı vezikülleri kullanan bir ilaç dağıtım sistemi türüdür. Bu veziküller iki ana tipte sınıflandırılabilir: lipozomlar ve eksozomlar. [24] Lipozomlar, bir ilacı veya terapötik ajanı kapsülleyen bir lipid çift tabakasından oluşan küresel veziküllerdir. [25] İlacı kontrollü bir şekilde salmak üzere tasarlanabilirler ve ilacın uzun bir süre boyunca sürekli olarak salınmasına izin verirler. Lipozomlar kemoterapi ajanları, antibiyotikler ve gen terapisi vektörleri de dahil olmak üzere çok çeşitli ilaçları vermek için kullanılmıştır. [26,27] Eksozomlar ise hücreler tarafından salgılanan ve hücreler arası iletişimde rol oynayan doğal veziküllerdir. Kan ve idrar dahil olmak üzere çeşitli biyolojik sıvılardan izole edilebilirler ve hedefe yönelik ilaç dağıtımı için terapötik ajanlarla yüklenebilirler. Eksozomlar kanser tedavisi, rejeneratif tıp ve aşı geliştirme dahil olmak üzere bir dizi uygulamada umut vaat etmektedir. Genel olarak, vezikül ilaç dağıtım sistemleri, geleneksel ilaç dağıtım yöntemlerine göre gelişmiş ilaç hedeflemesi, azaltılmış toksisite ve artan terapötik etkinlik gibi bir dizi avantaj sunmaktadır. [28] Bununla birlikte, vezikül boyutu ve bileşiminde tekdüzeliğin sağlanmasındaki zorlukların yanı sıra stabilite ve depolama ile ilgili sorunlar da dahil olmak üzere vezikül ilaç dağıtımıyla ilgili bazı zorluklar da vardır. Bu tez çalışmasında özellikle nano tıbbın kemoterapötikler vermek üzere daha önce tasarlanmış, ticarileştirilmiş, FDA onaylı iki lipozom formülasyonuna odaklanarak pankreas kanserinde şuana kadar en iyi terapötik etkinin elde edildiği FOLFIRINOX ilaç grubunda ve pankreas gibi intrapertoneal birçok organ kanserinde meydana gelen

karın içi asidik mai artışıyla birlikte kanserin kötü bir hal alarak ölümcül hale gelmesini engelleyebilecek hipertermi uygulaması ile birleştirilmesine odaklanılmaktadır.

Lipozomlarla ilk çalışma Bangham ve ark., (1964) tarafından yapılmıştır. [33] Sadece hücre membranına model oluşturmak üzere başlatılan bu çalışmalar lipozomların etkin madde taşıyıcı olarak kullanılabilmesinin anlaşılması ile yoğunlaşmıştır. Bugün tedavide kullanılan az sayıda lipozomlanmış etkin madde olmasına karşın klinik araştırma aşamasında birçok çalışma vardır. Lipozomlar amfifilik lipid moleküllerin kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluşan koloidal küresel yapılar olarak tanımlanır. Sulu bir ortamda, fosfolipidler, amfipatik karakterlerinden dolayı kararlı çift tabakalar oluşturabilmektedir.[30] Ayrıca fosfolipidlerin amfifilik karakteri, doğal hücre zarlarını taklit ederek lipozomlar ile memeli hücre zarları arasında etkileşimlere izin vererek hücre alımını teşvik etmektedir. [30] Lipozomal membran, polar baş grupları iç ve dış sulu faza yönlendirilmiş bir iç sulu çekirdek etrafında organize edilmiş bir veya daha fazla lipid çift katmanından oluşabilir. [30,31] Hem hidrofobik hem de hidrofilik maddelerin iletimi için tercih edilen biyobozunur, toksik ve immünojenik olmayan biyoyumlu yapıları nedeniyle güçlü ilaç dağıtım sistemleridirler. Lipozomlar, yapılarına göre, lipid çift katmanlarının sayısına ve vezikül boyutuna göre sınıflandırılır. Katmanlılıklarına göre lipozomlar tek katmanlı (ULV), çok katmanlı (MLV, >500 nm) ve multiveziküler (MVV, >1000 nm) veziküller olarak sınıflandırılabilir. [32] ULV ayrıca boyutlarına göre küçük tek lamelli veziküller (SUV'ler, 20 – 100 nm), büyük tek lamelli veziküller (LUV'ler, >100 nm) ve dev tek lamelli veziküller (GUV'ler, >1000 nm) olmak üzere üç kategoriye ayrılabilir. ULV'ler, hidrofilik bileşiklerin kapsüllenmesi için daha fazla yeteneğe sahip tek bir çift katmanın varlığı ile karakterize edilmektedir. [32] MLV'ler, lipofilik bileşiklerin kapsüllenmesi için uygun şekilde, iki veya daha fazla eş merkezli lipid çift katmanı sunar. Lipozomlar yüksek derecede biyoyumluluk ve biyobozunurluğa sahiptir, bu da onları vücut tarafından iyi tolere edilir hale getirir. Hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları kapsüllemek için kullanılabilirler ve çok çeşitli terapötik ajanların verilmesine izin verirler. Lipozomların boyutu ve yüzey yükü, farmakokinetiklerini ve biyodağılımlarını optimize etmek için uyarlanabilir. Lipozomlar, belirli hücre tipleri veya dokulara özgüllüklerini artırmak için hedefleme molekülleri ile işlevselleştirilebilir. Sentezleri ve saflaştırılmaları zor ve zaman alıcı olabilir, bu da yaygın kullanımlarını sınırlandırabilir. Lipozomlar bağışıklık sisteminin bileşenleriyle etkileşime girebilir, bu da farmakokinetiklerini ve



immünojenisitelerini etkileyebilir. [33] Belirli koşullar altında lipozomlar, depolama ve taşıma sırasında etkinlik ve güvenliklerini etkileyebilecek agregasyona, sızıntıya ve destabilizasyona eğilimlidir, bu da terapötik etkinliklerini tehlikeye atabilir. Sentezleri ve saflaştırılmaları zordur ve zaman alıcı olabilir. Bu da yaygın kullanımlarını sınırlayabilir. Lipozomların boyut ve şekli davranışlarında ve terapötik etkinliklerinde rol oynayabilir. Uygulamaya bağlı olarak belirli bir boyut ve şekle sahip olacak şekilde tasarlanabilmektedirler. [25] Örneğin, daha küçük lipozomlar en küçük kılcal damarlardan geçebildikleri için intravenöz enjeksiyon için tercih edilebilirken, daha büyük lipozomlar tümörlere lokalize dağıtım için tercih edilebilir. En yaygın şekil olan küresel bir şekle veya belirli hücreler veya dokular tarafından daha fazla alım gibi farklı avantajlar sağlayabilen çubuk benzeri veya diskoid bir şekle sahip olacak şekilde tasarlanabilmektedirler. [34] Lipid seçimi, lipozomların stabilitesi, boyutu ve ilaç salım özellikleri gibi özellikleri ve davranışları üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilir. [25] Örneğin, fosfatidilkolin lipitlerinden yapılan lipozomlar tipik olarak daha kararludur ve diğer lipit türlerinden yapılan lipozomlara kıyasla kan dolaşımında daha uzun bir dolaşım süresine sahiptir. [25] Lipid türüne ek olarak, lipozomların bileşimi de belirli özellikler veya işlevler elde etmek için uyarlanabilir. Örneğin, kolesterol ilavesi lipozom membranının stabilitesini ve sertliğini artırabilirken, hedefleme ligandlarının veya antikörlerin dahil edilmesi belirli hücrelere veya dokulara bağlanma yeteneklerini artırabilir. [30] Lipozomların stabilitesini artırmak için stabilize edici ajanların kullanımı veya kaplama malzemelerinin eklenmesi gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir. Stabilize edici ajanlar, lipozom membranı ile sulu ortam arasındaki arayüzey gerilimini azaltmak, serum proteinlerinin lipozom yüzeyine adsorpsiyonunu önlemek veya lipozomların birbirleriyle füzyonunu engellemek gibi çeşitli mekanizmalarla etki edebilir. Lipozom formülasyonlarında kullanılan yaygın stabilize edici ajanlar arasında trehaloz, sukroz veya mannitol gibi şekerler bulunur; bunlar lipozomların etrafında camsı bir matris oluşturarak agregasyon veya füzyonu önler. [35] Lipozomların stabilitesini artırmanın bir başka yöntemi de lipozomların yüzeyine lipitler, polimerler veya proteinler gibi kaplama malzemeleri eklemektir. Örneğin, PEG-lipid konjugatları lipozom formülasyonuna eklenerek kaplanmamış lipozomlara göre daha stabil ve agregasyona daha az eğilimli lipozomlar oluşturulabilir. Bağışıklık sistemi tarafından opsonizasyonu azaltan ve kan dolaşımındaki dolaşım süresini uzatan bir "gizli" kaplama oluşturmak için lipozom yüzeyine kovalent olarak bağlanabilen polietilen glikol (PEG) gibi polimerler bulunur. [36]

Lipozomlar, özellikle antikanser ajanlar ve antimikrobiyal ilaçlar için ilaç dağıtım aracı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca gen iletimi ve görüntüleme uygulamaları için de kullanılabilirler. Lipozomlar aşı ve immünoterapinin yanı sıra yara iyileşmesi ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere araştırılmıştır.

Çizelge 2.1. Kliniğe uyarlanmış lipozomal formülasyonlar

Ticari adı	Aktif bileşen	Lipit Bileşimi
Doxil	Doksorubisin	Hydrogenated soy PC/cholesterol [37]
DaunoXome	Daunorubicin	Egg PC/cholesterol [38]
Myocet	Doksorubisin	Soy PC/cholesterol [39]
DepoCyt	Sitarabin	DPPC/cholesterol [40]
Visudyne	Verteporfin	DSPC/cholesterol [41]
AmBisome	Amfoterisin B	HSPC/cholesterol [42]
Abraxane	Paklitaksel	Soy PC/cholesterol [43]
Onivyde	İrinotekan	DSPC/cholesterol [44]
Marqibo	Vinkristin sülfat lipozom enjeksiyonu	HSPC/cholesterol [45]

#### 2.4.1. Lipozomların Hazırlama Yöntemleri

Lipozom nanoformülasyonun oluşumunun ana hedefleri, dar bir boyut dağılımına sahip monodispers partiküller oluşturmak, istenen lamellarite derecesini elde etmek, ilaçları verimli bir şekilde dahil etmek ve uzun vadeli kolloidal stabiliteyi korumaktır. Lipozom hazırlama için geleneksel yöntemler, lipidlerin organik bir çözücüde çözülmesini, elde edilen lipid çözeltisinin kurutulmasını, lipidin sulu bir ortamla hidratlanmasını, partiküllerin küçültülmesini, oluşum sonrası lipozom dispersiyonunu karakterizasyonunu içerir. Bununla birlikte, geleneksel yöntemlerde organik

çözücülerin kullanılması, aktif bileşiklerin kimyasal özelliklerini ve elde edilen nanoformülasyonun stabilitesini etkileyebilir.

#### **2.4.1.1. İnce Film Hidrasyon Yöntemi**

İnce film hidrasyon tekniği olarak da bilinen Bangham yöntemi, multilamellar veziküllerin (MLV'ler) hazırlanması için yaygın olarak kullanılan basit bir yöntemdir. Bu yöntemde, fosfolipid bileşenleri önce organik bir çözücüde çözülür ve ardından ince, kuru bir lipid filmi oluşturmak için vakum altında buharlaştırılır. Bu lipid film daha sonra distile su veya tampon çözelti kullanılarak hidratlanır ve sonuçta MLV'lerin heterojen bir süspansiyonu elde edilir. İlaç yükleme işlemi, ince lipid filmin oluşumundan önce veya hidrasyon aşaması sırasında yapılabilir. Bu yöntemin dezavantajları arasında organik çözücünün uzaklaştırılmasındaki zorluklar, düşük hapsedme verimliliği ve küçük ölçekli üretim yer almaktadır. İnce film hidrasyon tekniğinin çeşitli avantajları vardır. İlk olarak, lipozom üretmek için nispeten basit bir yöntemdir. İkinci olarak, yaygın olarak kullanılan ve köklü bir yöntemdir, bu da farklı çalışmalar arasında sonuçları yeniden üretmeyi ve karşılaştırmayı kolaylaştırır. Üçüncü olarak, kullanılan lipid bileşimine ve hidrasyon koşullarına bağlı olarak bir dizi lipozom boyutunun ve lamellaritesinin hazırlanmasına izin verir. Dördüncü olarak, çeşitli hidrofilik ve lipofilik ilaçların enkapsülasyonu için uygundur. Son olarak, ölçeklenebilir bir yöntemdir ve ticari uygulamalar için büyük miktarlarda lipozom üretmeyi mümkün kılar. Bu yöntemin bir diğer avantajı da basitliği ve kullanım kolaylığıdır; yalnızca temel laboratuvar ekipmanı ve minimum teknik uzmanlık gerektirir. Ayrıca, lipid konsantrasyonu ve hidrasyon koşullarını ayarlayarak MLV'ler, SUV'ler ve LUV'ler dahil olmak üzere çeşitli lipozom formülasyonları hazırlamak için kullanılabilen çok yönlü bir yöntemdir. Ek olarak hem hidrofilik hem de lipofilik çok çeşitli ilaçların ve biyomoleküllerin kapsüllenmesine izin vererek ilaç dağıtım uygulamaları için yararlı bir araç haline getirir. Dahası bu yöntem yüksek oranda tekrarlanabilir ve ölçeklenebilirdir, bu da onu büyük ölçekli lipozom üretimi için uygun hale getirir. Ayrıca diğer yöntemlere kıyasla nispeten düşük bir maliyeti vardır, bu da onu sınırlı kaynaklara sahip araştırmacılar için cazip bir seçenek haline getirir. Genel olarak, ince film hidrasyon yöntemi basitliği, çok yönlülüğü, tekrarlanabilirliği ve ölçeklenebilirliği sayesinde lipozomların hazırlanması için popüler ve yaygın olarak kullanılan bir teknik olmaya devam etmektedir. [47]

#### **2.4.1.2. Deterjan Giderme Yöntemi**

Deterjan uzaklaştırma yöntemi, lipozom oluşumu için lipitleri çözündürmek üzere deterjan kullanımını içeren ve daha sonra lipozomları oluşturmak üzere uzaklaştırılan bir süreçtir. Yöntemde, karışık miseller oluşturmak üzere fosfolipidlerle birleşen sodyum kolat, Triton X-100, sodyum deoksikolat ve alkil glikozit gibi yüksek CMC'ye sahip deterjanlar kullanılır. Deterjanın kademeli olarak uzaklaştırılması lipid konsantrasyonunda artışa yol açarak unilamellar veziküllerin oluşumunu teşvik eder. Deterjan giderimi, seyreltme, diyaliz, kolon jel kromatografisi, santrifüjleme ve hidrofobik reçine boncuklarına adsorpsiyon dahil olmak üzere farklı yaklaşımlarla elde edilebilir. Bununla birlikte, deterjan diyaliz yöntemi, homojen boyutta lipozom popülasyonlarının oluşumu ile en iyi tekrarlanabilirliği sunar. Deterjan giderme yöntemi, dar bir boyut dağılımına ve yüksek derecede lamelli lipozomlar üretmenin yanı sıra etkili ilaç dahil etme ve uzun vadeli koloidal stabilite avantajına sahiptir. Ayrıca hidrofobik ilaçlar, peptitler ve nükleik asitler de dahil olmak üzere çok çeşitli aktif bileşiklerin dahil edilmesine olanak sağlar. Bununla birlikte, yöntemin düşük lipozom konsantrasyonu ve hidrofobik bileşiklerin düşük hapsedme etkinliği gibi bazı dezavantajları vardır. Ayrıca, nihai üründe artık deterjan kalabilir ve bu da lipozomların stabilitesini ve biyolojik aktivitesini etkileyebilir. [46]

#### **2.4.1.3. Solvent Enjeksiyon Yöntemi**

Etanol enjeksiyon yöntemi, fosfolipidlerden oluşan lipozomları oluşturmak için kullanılan basit ve tekrarlanabilir bir tekniktir. Bu yöntem, etanolde çözünmüş bir fosfolipid çözeltisinin ısıtılmış bir tampon çözeltisine hızla enjekte edilmesini içerir. Bu da etanolün seyrelmesine ve lipidlerin sulu fazda kendi kendine birleşmesine neden olur. Bu da iki katmanlı düzlemsel parçaların oluşumuyla sonuçlanır ve bunlar daha sonra birleşerek kapalı unilamellar veziküller oluşturur. Eklenen etanolün hacmi, lipozomların boyutunu ve homojenliğini belirlemede kritik bir faktördür; daha küçük miktarlar küçük, homojen unilamellar veziküllerin oluşumuyla sonuçlanır. Kalan etanol, diyaliz veya filtrasyon kullanılarak lipozom çözeltisinden çıkarılabilir. Bununla birlikte, artık etanolün uzaklaştırılması zor olabilir ve yöntem, düşük miktarlarda etanol varlığında bile biyolojik olarak aktif makromoleküllerin inaktivasyonu için potansiyel risk taşıyan heterojen bir lipozom popülasyonu ile sonuçlanabilir. [48]

Eter enjeksiyon yöntemi, lipidlerin eter içinde çözülmesini ve ısıtılmış bir sulu faza yavaşça enjekte edilmesini içerir. Çözücü daha sonra LUV'ler veya SUV'ler oluşturmak için düşük basınç altında uzaklaştırılır. Bu yöntem, organik çözücünün daha verimli bir şekilde uzaklaştırılması avantajına sahiptir ve yüksek hapsetme verimliliğine sahip konsantre lipozom çözeltilerine yol açar. Bununla birlikte, nihai lipozom popülasyonunun yüksek polidispersitesi (60 ila 200 nm) ve aktif maddelerin organik çözücülere ve yüksek sıcaklıklara maruz kalması güvenlik ve stabiliteyi tehlikeye atabilir. Bu yöntem, partikül boyutu ve ilaç katılımı üzerinde hassas kontrol ile tekrarlanabilir SUV'ların oluşumuna ve ölçeklendirme için yüksek potansiyele izin verir. [48]

#### **2.4.1.4. Ters Fazlı Buharlaştırma Yöntemi**

Bu yöntem, ters çevrilmiş miseller oluşturmak için lipidlerin organik bir çözücü içinde çözülmesini içerir. Yağ içinde su mikroemülsiyonu oluşturmak için sulu bir faz eklenir ve daha sonra homojen bir dispersiyon oluşturmak için emülsifiye edilir.

Verimliliği artırmak için genellikle distile su ya da fosfat salin tamponu eklenir. Düşük basınç altında devam eden döner buharlaştırma organik çözücüyü uzaklaştırarak lipozom oluşumunu teşvik eder. %65'e kadar kapsülleme elde edilebilir ve bu da büyük miktarda makromolekülün kapsüllenmesine olanak sağlar. Bununla birlikte, bu yöntemin organik çözücünün kalıntı varlığı, ölçek büyütme ile ilgili zorluklar ve peptitler gibi kırılabilir moleküller için uygun olmaması gibi dezavantajları vardır. Ayrıca, biyomoleküller mekanik çalkalama ve organik çözücüye maruz kalma nedeniyle konformasyonel değişikliklere uğrayabilir. Genel olarak, bu yöntemin avantajları olsa da lipozom oluşumunu içeren deneyler tasarlarırken sınırlamalarını göz önünde bulundurmaları önemlidir. [49]

#### **2.5. Uyarıcıya Duyarlı Sistemler**

pH, sıcaklık, ışık veya belirli moleküllerin varlığı gibi belirli bir tetikleyiciye yanıt olarak yapılarını değiştirerek veya içeriklerini serbest bırakarak çevrelerindeki değişikliklere yanıt verebilen, hedeflenen ilaç dağıtımına izin veren, geleneksel ilaç dağıtım yöntemleriyle ilişkili yan etkileri en aza indirebilen sistemlerdir.[55] İlaç dağıtımını için nanotaşıyıcılara uyarıcıya duyarlı özellikler kazandırmak amacıyla pH, enzim, redoks ve ışık gibi farklı kimyasal aktivasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu

yöntemler, taşıyıcıların yapısal durumunu değiştirerek belirli bir biyolojik ortamda bir ajanın salınmasını teşvik edebilirler. Lipozomlar tetiklenen ilaç dağıtım sistemleri olarak kullanılabilir. Kimyasal (pH, hipoksi vb.) ve fiziksel (ışık, ultrason, manyetik alan vb.) uyarılar tarafından tetiklenme sağlanabilmektedir.[56] Uyarıcıya duyarlı lipozomlar kullanılarak, ilaçlar sağlıklı hücrelerden kaçınarak, yan etkileri en aza indirerek ve terapötik etkileri en üst düzeye çıkararak doğrudan tümör hücrelerine iletilebilir. Lipozom sınıfı içerisinde sıcaklığa duyarlı lipozomlar kliniğe en yakın formülasyon gruplarını oluşturmaktadır. Lipozom belirli bir sıcaklığa kadar ısıtıldığında, lipozomun zarı kararsız hale gelir ve içeriğin serbest kalmasına izin verir. Bu tip lipozomlar örneğin iltihaplı dokular gibi sıcaklık değişimlerinin meydana geldiği vücut bölgelerine ilaç iletimi için kullanışlıdır. [57] Özellikle kanser tedavisinde revaçta olan sinerjetik kemo ve hipertermi tedavisinin kombinesi düşünüldüğünde sıcaklığa duyarlı lipozomlarla ilgili yapılan çalışmalara büyük bir ilgi vardır. Şu ana kadar en çok FDA onayı almış lipozom grubu ve en çok klinik çalışma yapılan sistemleri oluşturmaktadırlar. Pankreas kanserinde pan-DOX klinik çalışması ile birlikte bu tarz sistemlerin kliniğe uygulanma umudu daha da artış göstermiştir. Genel olarak, uyarıcıya duyarlı lipozomlar, hedeflenen ilaç dağıtımına izin vererek ve geleneksel ilaç dağıtım yöntemleriyle ilişkili yan etkileri en aza indirerek ilaç dağıtımında devrim yaratma potansiyeline sahiptir.

### **2.5.1. Sıcaklığa Duyarlı Lipozomlar**

Termosensitif lipozomlar, belirli bir sıcaklıkta akışkan hale gelen ve içeriklerini serbest bırakmasına izin veren lipitlerden oluşurlar. Odaklanmış bir ultrason veya lazer tarafından üretilen ısı ile ilacın istenen bölgede salınmasına neden olarak hedeflenen ilaç dağıtımını için kullanılabilir. Bu, özellikle kanser tedavisinde yararlı olan belirli dokulara veya hücrelere ilaç dağıtımını hedeflemenin bir yolunu sağlar. Örneğin, ısıya duyarlı lipozomlar, normal vücut sıcaklığı olan 37°C'den biraz daha yüksek olan bir tümörün yüksek sıcaklığında içeriklerini serbest bırakacak şekilde tasarlanabilir. Bu, sağlıklı dokular üzerindeki yan etkileri azaltırken ilaçların tümöre daha etkili ve seçici bir şekilde verilmesiyle sonuçlanabilir. Küçük moleküllü ilaçlar, biyolojik maddeler ve nükleik asitler de dahil olmak üzere çok çeşitli terapötik ajanlarla yüklenebilirler, sıcaklığın yanı sıra pH ve ışık gibi çeşitli uyarılara yanıt olarak içeriklerini serbest bırakacak şekilde uyarlanabilirler.

Termosensitif lipozomların ilk versiyonları, hafif hipertermi (HT) ile uygulama için ideal olan, 16 karbonlu doymuş yağ asidi zincirlerine sahip bir fosfolipit olan ve 41°C'lik bir erime sıcaklığına (T<sub>m</sub>) sahip dipalmitoil fosfokolin (DPPC)'ye dayanmaktadır. Yatvin ve arkadaşları tarafından DPPC ile hafif HT aralığında terapötik özellikte lipozom oluşturan ilk kişilerdir [53]. Daha sonra yapılan çalışmalar DPPC bazlı lipozomlar hipertermi ile kombinasyon halinde kullanıldığında tümör ekstravazasyonunu artırıp terapötik etkinliğe arttıran bir ilaç seviyesi elde edildiği görülmüştür. Termal doz ölçümlerine dayalı olarak, bu termosensitif lipozom formülasyonları, sağlıklı doku için önemli bir nekroz tehdidi oluşturan ısıtma koşulları gerekmektedir. DPPC'nin diğer lipidlerle desteklenmesinin membranın geçirgenliğini artırabileceği düşünülmüştür. Mills ve arkadaşları ilaç salımının, çift tabakada artan ilaç çözünürlüğü nedeniyle basit bir geliştirmeden ziyade lizolipid ile stabilize edilmiş nanogözenekler yoluyla meydana geldiğini göstermişlerdir. LTSL'de MPPC (monopalmitilfosfotilkolin), MSPC (1stearoyl-2-hidroksi-sn-glisero-3-fosfokolin) gibi lizolipitler bu sınırlarda birikir ve stabilize kusurlar oluşturarak ilaç salımının artmasına neden olur. Lipid karışımlarını kullanmanın mantığı, çoklu lipid türlerinin mevcudiyetinin, bir nevi nanoboyutta kusurlar oluşturarak gözenek artışına ve dolayısıyla geçirgenliğin artmasına yol açmasıdır. Yapıların termal doz eşiklerini hafif hipertermi (39-42°C) aralığına düşürerek bir patlama salımı oluşturabilmektir. Ayrıca termal doz maruziyetinin süresini azaltarak sağlıklı hücrelerin nekroza uğraması da engellenmektedir. [8]

Termosensitif lipozomların bileşimi ve tasarımı, belirli terapötik hedeflere ulaşmak ve in vivo davranışlarını optimize etmek için uyarlanabilir. Bu da onları çeşitli biyomedikal alanlarda potansiyel uygulamaları olan çok yönlü ve umut verici bir ilaç dağıtım platformu haline getirmektedir.

Genel olarak, TSL'ler de kullanılan lipidlerin seçimi stabilitelelerini, salım özelliklerini ve terapötik etkinliklerini etkileyebilir. Bu nedenle, ilaç dağıtım uygulamaları için TSL'ler tasarlanırken lipidlerin seçimi önemli bir husustur. TSL çeşitleri açısından, bileşimleri, boyutları ve stabiliteleleri bakımından farklılık gösteren birkaç farklı TSL türü vardır. Örneğin, bazı TSL'ler fosfolipitlerden oluşurken, diğerleri kolesterol veya polimerler gibi ek bileşenler içerebilir. TSL'lerin boyutu da amaçlanan uygulamaya bağlı olarak birkaç nanometreden birkaç mikrometreye kadar büyük ölçüde değişebilir.

Sıcaklığa duyarlı lipozomlar üç tip formülasyon halinde düzenlenebilmektedir:[8]

- Sıcaklığa bağlı faz geçişlerine maruz kalan lipitlerden oluşan geleneksel ısıya duyarlı lipozomlar (TTSL),
- Lizolipid içeren ısıya duyarlı lipozomlar (LTSL) ve
- Polimerle modifiye edilmiş ısıya duyarlı lipozomlar (PTSL). Polimerle modifiye edilmiş ısıya duyarlı lipozomlar (PTSL).

Termosensitif lipozomlar (TSL'ler), bileşimlerinde kullanılan lipitlerin türüne göre sınıflandırılabilir: Belirli uygulamalar için geliştirilmiş çeşitli TSL türleri de vardır. Örneğin, "tetiklenerek salınan" TSL'ler belirli bir uyarıcıya yanıt olarak içeriklerini salmak üzere tasarlanırken, "duyarlı" TSL'ler pH veya diğer çevresel faktörlerdeki değişikliklere yanıt olarak içeriklerini salmak üzere tasarlanmıştır. Termosensitif lipozomlar ilaç dağıtımı, gen terapisi ve görüntüleme gibi çeşitli biyomedikal uygulamalar için kullanılabilir. İlaç dağıtımındaki kullanımlarına ek olarak, ısıya duyarlı lipozomlar görüntüleme gibi diğer biyomedikal uygulamalar için de araştırılmıştır. Örneğin, kontrast maddeleri veya görüntüleme problemleri lipozomların içine yerleştirilerek, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya ultrason gibi tıbbi görüntüleme tekniklerinin hassasiyetini ve özgüllüğünü artırmak için kullanılabilirler. [8] Ayrıca gadolinyum veya demir oksit nanopartikülleri gibi kontrast maddelerle yüklenebildikleri görüntüleme alanında da potansiyel uygulamalara sahiptir. Bu kontrast maddelerin salınımı, ilaç salınımını tetikleyen aynı sıcaklık ipuçları tarafından tetiklenebilir ve tümörlerin veya ilgilenilen diğer bölgelerin sıcaklığa duyarlı görüntülenmesine olanak tanır. Tasarımlarını optimize etmek ve in vivo davranışlarını daha iyi anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Isıya duyarlı lipozomlar, geleneksel ilaç dağıtım sistemlerine göre çok sayıda avantaj sunan umut verici bir ilaç dağıtım platformudur. TSL'ler geleneksel lipozomlardan daha uzun bir dolaşım süresine sahiptir, bu da ilaç dağıtım araçları olarak etkinliklerini artırabilir. [59] Devam eden araştırmalar, tasarımlarını iyileştirmeye, terapötik etkinliklerini artırmaya ve biyotıpta yeni uygulamalar geliştirmeye odaklanmıştır. TSL'lerin geleneksel lipozomlara göre çeşitli avantajları da vardır. Örneğin, TSL'ler yüklerini belirli bir sıcaklıkta serbest bırakacak şekilde tasarlanabilir, bu da ilaç salınımı üzerinde daha fazla kontrol sağlar ve toksisiteyi en aza indirmeye yardımcı olabilir. [58] Isıya duyarlı lipozomların birden fazla ilaç veya terapötik ajanın aynı lipozom içinde kapsüllenebildiği kombinasyon tedavileri için potansiyelleridir.



Sıcaklıkla tetiklenen mekanizmalar aracılığıyla her bir ajanın salınımını kontrol ederek, kombinasyon tedavileri sinerjik etkiler elde etmek ve terapötik sonuçları iyileştirmek için uyarlanabilir. Isıya duyarlı lipozomların bir diğer avantajı da ilaçları vücutta bozulmaya ve eliminasyona karşı koruma yetenekleridir. [60] İlaçlar lipozomlar içinde kapsüllenenek vücutun bağışıklık sisteminden korunabilir, bu da temizlenme oranlarını azaltabilir ve kan dolaşımındaki dolaşım sürelerini uzatabilir.

TSL'ler geleneksel ilaç dağıtım yöntemlerine göre birçok avantaj sunarken, hala ele alınması gereken çeşitli zorluklar vardır. Bunlar arasında TSL stabilitesinin ve in vivo dolaşım süresinin iyileştirilmesi, TSL'nin sıcaklığa tepkisinin optimize edilmesi yer almaktadır. Örneğin, ilaç salınımları özellikle karmaşık biyolojik ortamlarda her zaman öngörülebilir veya tek tip olmayabilir. Ayrıca, ilaç salınımını tetiklemek için gereken ısı sağlıklı dokuya zarar verebilir, bu nedenle ısıtma işleminin dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi gerekir. Bazı çalışmalar TSL'lerin enjeksiyon veya infüzyon bölgesinde toksisiteye veya enflamasyona neden olabileceğini ve TSL'lerle ilişkili riskleri tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu öne sürmüştür. [56] Bununla birlikte, bu çalışmaların çoğunun hayvan modellerinde yapıldığını ve TSL'lerin insanlarda güvenliğini ve etkinliğini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu belirtmek önemlidir. [57]

TSL'lerin geliştirilmesindeki zorluklardan biri, lipozomların faz değişimine uğradığı ve içeriklerini serbest bıraktığı sıcaklık olan istenen faz geçiş sıcaklığına ulaşmaktır. Bu sıcaklık, lipozomların kan dolaşımında ve vücutun daha düşük sıcaklıklara sahip diğer bölgelerinde stabil kalmasını, ancak iltihaplanma veya diğer faktörler nedeniyle daha yüksek bir sıcaklığa sahip olabilecek hedef bölgede içeriklerini serbest bırakabilmelerini sağlamak için dikkatlice kontrol edilmelidir. Bu zorluğun üstesinden gelmek için araştırmacılar TSL'lerin faz geçiş sıcaklığını modüle etmek için çeşitli stratejiler araştırmışlardır. Örneğin, lipozom membranına farklı lipitlerin dahil edilmesi, yardımcı çözücülerin veya yüzey modifikasyonlarının kullanılması gibi faz geçiş sıcaklığını etkileyebilir. [58,59] Güvenlik endişelerine ek olarak, TSL'ler için şu anda insanlarda kullanım için onaylanmış TSL bazlı bir ilaç ürünü bulunmamakla birlikte, TSL bazlı birkaç tedavi şu anda klinik deneylerde yer almaktadır.

Her yeni ilaç veya ilaç dağıtım sisteminde olduğu gibi, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda TSL'lerin güvenliğini ve etkinliğini dikkatle değerlendirmek ve

kullanımlarıyla ilişkili potansiyel riskleri ve faydaları göz önünde bulundurmak önemlidir. Son birkaç yıldır araştırmacılar TSL tasarımı ve işlevinin çeşitli yönlerini araştırmaktadır. Odaklanılan alanlardan biri TSL'lerin salım profilini optimize etmeye yönelik yöntemlerin geliştirilmesi olmuştur. Örneğin, araştırmacılar TSL'lerin salım özelliklerini modüle etmek için farklı lipid bileşimlerinin kullanımının yanı sıra faz geçişini indükleyen ajanların dahil edilmesini araştırmışlardır. [59] Öte yandan, etilen polioksitin (PEO) lipozomun stabilitesini ve dolaşım süresini modüle edebileceği tespit edilmiştir [65,66]. Kolesterol ve polietilen glikolden (PEG) oluşan diblok kopolimerler, lipozomların hidrofilitliğini, protein adsorpsiyonunu ve bozunmaya karşı korumayı geliştirmiştir. [54] Triptofan amino asidi ile lipid etkileşimleri, lipozomların in vivo dolaşım süresini, stabilitesini ve özgüllüğünü artırır [62]. Bir başka araştırma alanı da TSL'lerin çeşitli terapötik ajanların iletimi için kullanımına odaklanmıştır. Örneğin, TSL'ler doksorubisin ve paklitaksel gibi kemoterapötik ajanların yanı sıra sitokinler ve siRNA gibi immünoterapötik ajanların iletimi için araştırılmıştır. [63] Çok sayıda çalışma TSL'lerin kanser tedavisi için kullanımını araştırmış, klinik öncesi modellerde ve erken faz klinik çalışmalarda umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Bir çalışmada, kemoterapi ilacı doksorubisin yüklü TSL'lerin tümör dokusunda biriktiği ve lazer ışınlamasının neden olduğu hafif hipertermiye yanıt olarak ilacı saldırdığı gösterilmiştir. [64] Diğer çalışmalar, kan-beyin bariyeri terapötik ajanların girişini sınırlayabildiğinden, beyne hedefli ilaç iletimi için TSL'lerin kullanımını araştırmıştır. [65]

TSL'lerin ilaç dağıtımında kullanımı, özellikle kanser tedavisinde klinik öncesi çalışmalarda umut verici sonuçlar göstermiştir. TSL'lerin kemoterapi ilaçlarının tümörlere iletimini artırdığı, ilaç etkinliğini artırdığı ve sistemik toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir. [66] Bu klinik öncesi çalışmalara ek olarak, insanlarda TSL'lerin güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için çeşitli klinik çalışmalar da yürütülmüştür. Örneğin, tekrarlayan meme kanseri olan hastalarda doksorubisinin TSL formülasyonunun faz I/II klinik çalışması, TSL'lerin iyi tolere edildiğini ve umut verici antitümör aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur. [67] Benzer şekilde, ilerlemiş solid tümörlü hastalarda paklitakselin TSL formülasyonunun faz I klinik çalışması, TSL'lerin iyi tolere edildiğini ve antitümör aktivite kanıtı gösterdiğini ortaya koymuştur. [68] Klinik uygulamalar açısından, şu anda insanlarda kullanım için onaylanmış birkaç TSL formülasyonu bulunmaktadır. Örneğin, ThermoDox® birincil karaciğer kanserinin

tedavisi için onaylanmış bir doksorubisin TSL formülasyonudur ve Onivyde® pankreas kanserinin tedavisi için onaylanmış bir irinotekan TSL formülasyonudur. ThermoDox® şu anda primer karaciğer kanseri tedavisinde RFA tarafından üretilen ısıya yanıt olarak doksorubisini serbest bırakmak üzere tasarlanmıştır, bu da ilaç dağıtımını ve etkinliğini artırabilir.

ThermoDox'a ek olarak, diğer bazı TSL formülasyonları şu anda meme kanseri, prostat kanseri ve melanom tedavisi gibi çeşitli uygulamalar için klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir. Bu denemeler TSL'lerin insan hastalarda güvenlik ve etkinliğini değerlendirmeyi amaçlamaktadır ve TSL'lerin potansiyel klinik faydası hakkında değerli bilgiler sağlayacaktır.

Çizelge 2.2. Kliniğe uyarlanmış sıcaklığa duyalı lipozomal formülasyonlar

<b>Ticari adı</b>	<b>Aktif bileşen</b>	<b>Lipit Bileşimi</b>
ThermoDox	Doksorubisin	DSPC/cholesterol/DSPE-PEG2000 [69]
Vyxeos TSL	Daunorubicin ve Sitarabin	DPPC/DSPE-PEG2000/Cholesterol [70]
STEALTH Liposomal	Doksorubisin	DSPC/cholesterol/DSPE-PEG2000[72]
Lipo-Dox	Doksorubisin	HSPC/cholesterol/DSPE-PEG2000[44]
Onivyde	İrinotekan	DSPC/cholesterol [44]

Ayrıca, Pan-Dox, PharmaCyte Biotech tarafından pankreas kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisi için geliştirilmekte olan kemoterapi ilacı doksorubisin için nanopartikül bazlı bir dağıtım sistemidir. Pan-Dox henüz hastalarda kullanım için onaylanmamış olsa da güvenliğini ve etkinliğini araştıran prelinik ve klinik çalışmalar devam etmektedir. (NCT04852367) Pankreas kanserinin tedavisi zor bir hastalık olduğunu ve yeni ve etkili tedavilere ihtiyaç duyulduğunu belirtmek

gerekir. Klinik araştırmalar, yeni tedavilerin güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmede önemli bir rol oynamaktadır ve pankreas kanserli hastaların sonuçlarını iyileştirmek için bu alanda sürekli araştırma yapılması gerekmektedir. Sonuç olarak, TSL'ler geleneksel ilaç dağıtım yöntemlerine göre çeşitli avantajlar sunan umut verici bir ilaç dağıtım platformudur. TSL tasarımı optimize etmek ve klinik sonuçları iyileştirmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulsa da bu alanda devam eden çabaların kişiselleştirilmiş tıp ve hastalık tedavisine yeni ve yenilikçi yaklaşımlar getirmesi muhtemeldir.

## 2.6. Hipertermi

Hipertermi, vücut sıcaklığının tedavi amacıyla kasten normal seviyelerin üzerine çıkarılmasını içeren tıbbi bir tedavi yöntemidir. Bu teknik bulaşıcı hastalıklardan kansere kadar çeşitli durumları tedavi etmek için yüzyıllardır kullanılmaktadır. Teknolojideki gelişmelerle birlikte alta yatan etki mekanizmalarının anlaşılması, umut verici bir terapötik yaklaşım olarak hipertermiye olan ilginin artmasına yol açmıştır. Hiperterminin tıbbi ve bilimsel araştırmalardaki önemi, geleneksel tedaviler in etkinliğini artırarak yan etkileri azaltma ve hasta sonuçlarını iyileştirme potansiyelinde yatmaktadır. Bir tedavi yöntemi olarak hipertermi, çeşitli rahatsızlıklar için ısı terapisini kullanan Mısırlılar, Yunanlılar ve Romalılar gibi eski uygarlıklara kadar uzanan uzun bir geçmişe sahiptir. 19. yüzyılda hipertermi frengi ve tüberküloz tedavisinde kullanılmıştır. Hipertermi zerine ilk bilimsel çalışmalar 20. yüzyılın başlarında, bulaşıcı hastalıkların ve kanserin tedavisinde ısı kullanımına odaklanarak yapılmıştır.

1950'lerde kanser hastalarını tedavi etmek için tüm vücut hipertermi kullanılmış, ancak standartlaştırılmış protokollerin eksikliği ve sıcaklığın kontrol edilememesi nedeniyle denemeler başarısızlıkla sonuçlanmıştır. 1970'lerde bölgesel ve lokal hipertermi daha etkili ve kontrol edilebilir bir teknik olarak tekrar dikkatleri üzerine çekmiştir. Bu durum baş, boyun ve uzuvlar gibi belirli vücut bölgelerini ısıtmak için özel ekipmanların geliştirilmesine yol açmıştır.

1980'lerde ve 1990'larda hiperterminin kemoterapi ve radyasyon tedavisi gibi diğer tedavi yöntemleriyle birlikte kullanımı popülerlik kazanmıştır. Bu durum, kanser

tedavisinde hiperterminin kullanımına odaklanan termo-onkoloji adı verilen yeni bir araştırma alanının ortaya çıkmasına yol açmıştır.

Hiperterminin tarihsel gelişimi, bu tekniğin altında yatan etki mekanizmalarını ve klinik kullanım potansiyelini anlamamızda önemli ilerlemelere yol açmıştır. Kanser hastalarında damar geçirgenliğinin artması sebebiyle yüksek interstisyel sıvı basıncına düzensiz vaskülatür kan beslenmesine sahip tümör mikro ortamı ilaç salımını sınırlar. Buda zamanla ilaç direncine sebep olur. Nekrotik ve perfüze olmayan tümör bölgeleri hipoksi ve asidoz ile sonuçlanır. Bu bölgeler kemoterapik ajanlara daha dirençlidir. Bu desmoplazmik reaksiyon tümör elemanlarının etrafındaki hücre dışı matris proteinleri içeren yoğun bir matris ağının çökmesine neden olur ve tümör kan damarlarını sıkıştırır ve bozar. Kemoterapi ilaç uygulamasına fiziksel bir engel oluşturur. Hipertermi tedavisi terapötik etkilerini hücrel metabolizma, immün yanıt ve tümör mikro çevresindeki değişiklikler de dahil olmak üzere çoklu mekanizmalar yoluyla gösterir. [74] Bu etki mekanizmaları, geleneksel tedavilerin etkinliğini artırabilir ve tedavi sonuçlarını iyileştirebilir. Protein sentezi glikoliz ve mitokondriyal fonksiyonlar da dahil olmak üzere çeşitli hücrel tepkileri indükleyebilir.[75] Aynı zamanda hücre zarlarının geçirgenliğini değiştirerek ilaç ve besin maddelerinin daha iyi alınmasını sağlar. [77] Hipertermi ile birlikte kullanılan kemo ve radyasyon tedavisinin etkinliği hücrel metabolizmadaki değişiklikler ile birlikte arttırılabilir.[83] Ayrıca hipertermi ısı şoku proteinlerinin (HSP) ekspresyonunu arttırarak bağışıklık sistemini aktive edebilir. [78] HSP'ler bağışıklık hücrelerini tümör bölgesine iten sitokin ve kemokinlerin üretimini uyarabilir. Bağışıklık aktivasyonunu arttırarak immünoterapi etkinliğinde arttırabilir. Hipertermi tedavisi tümör kan akışında, oksijenasyonda ve pH 'da değişikliklere neden olarak tümör mikro çevresini değiştirebilir. [79] Hipertermi tümöre giden kan akışını artırabilir, bu da ilaç iletimini iyileştirebilir kemoterapi ve radyasyon tedavisinin etkinliğini artırabilir. [77] Hipertermi ayrıca tümör hücrelerinin kemoterapi ve radyasyon tedavisine duyarlılığını arttıran tümör oksijenasyonunu da iyileştirebilir. Ek olarak, hipertermi tümör mikroçevresinde asidozu indükleyerek kemoterapi ve radyasyon tedavisinin sitotoksik etkilerini artırabilir. [77]

Hipertermi, farklı tıbbi durumlara ve hedef alanlara uyarlanabilen çok yönlü bir teknik olmasıyla birlikte tekniğin seçimi, spesifik klinik senaryoya ve tedavinin hedeflerine bağlı olabilmektedir. Tıbbi duruma bağlı olarak lokal veya sistemik olarak

uygulanabilmektedir. Lokal hipertermi vücudun belirli bir bölgesine uygulanmaktadır. Mikrodalgalar, radyofrekans, ultrason ve kızılötesi radyasyon gibi çeşitli teknikler kullanılarak verilebilmektedir. Bu teknikler hedeflenen dokuyu 40°C ile 45°C arasındaki sıcaklıklara kadar ısıtır, bu da kanser hücrelerine veya vücuttaki diğer anormal hücrelere zarar verebilmektedir. Lokal hipertermi genellikle kemoterapi veya radyasyon tedavisi gibi diğer tedavilerin etkinliğini artırmak için bu tedavilerle birlikte kullanılmaktadır. Sistemik hipertermi ise vücudun genel sıcaklığının yükseltilmesini içermektedir.[80]

Günümüzde hipertermi, tedavi parametrelerini optimize etmeye, yeni uygulamaları belirlemeye ve hasta sonuçlarını iyileştirmeye odaklanan devam eden çalışmalarla aktif bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir. Antwerp Üniversitesi'nin bir yan kuruluşu olarak kurulan ElmediX şirketi tarafından hastaların birkaç saat boyunca 41,5°C'ye kadar kontrollü ısıtmaya tabi tutulmasını sağlayan bir teknoloji platformu geliştirilmiştir. Bu tür bir tedavi, kanser hücrelerinin kemo ve radyoterapiye duyarlılığını artırarak tedavinin başarılı olma şansını yükseltebileceği vaadi ile yola çıkmıştır. Özellikle pankreas kanseri veya metastatik kanserler gibi zor tümörlerde ElmediX teknolojisinin önemli bir etkiye sahip olabileceği düşünülmüş ve pankreas kanseri tedavisinde, Flaman yenilikçi teknoloji platformu tarafından geliştirilmiş bu yeni sistemle ilerleme kaydedilmiştir. (NCT04467593)

## **2.7. Altın Nanopartiküller**

Altın nanopartiküller, tipik olarak 1 ila 100 nanometre boyutunda olan küçük altın parçacıklarıdır. Küçük boyutları nedeniyle altın nanoparçacıkları, yığın altınına kıyasla farklı olan benzersiz optik ve elektronik özelliklere sahiptir. [81] Boyutlarına ve şekillerine bağlı olarak kırmızıdan maviye kadar farklı renklerde görünebilirler. [81] Altın nanopartiküller kimyasal indirgeme, elektrokimyasal yöntemler ve lazer ablasyon dahil olmak üzere çeşitli yollarla sentezlenebilir. [88] Nanopartiküllerin boyutu, şekli ve yüzey özellikleri bu sentez yöntemleriyle kontrol edilebilir ve bu da optik ve elektronik özelliklerini etkileyebilir. [81]

Genel olarak, altın nanopartiküller, onları çeşitli alanlarda geniş bir uygulama yelpazesi için cazip kılan benzersiz özelliklere sahiptir. Altın nanopartiküllerin optik ve elektronik özellikleri boyutlarına ve şekillerine bağlıdır. Boyut ne kadar küçükse,

yüzey alanı/hacim oranı o kadar yüksek olur, bu da yüzeyde daha fazla sayıda atom ve dolayısıyla daha yüksek reaktivite sağlar. Nanopartikülün şekli de özelliklerini etkiler; küresel partiküller, küresel olmayanlara göre daha düzgün bir yüzey yükü dağılımına sahip olma eğilimindedir. Altın nanopartiküller, elektronlarının belirli dalga boylarında ışığı emdiği ve saçtığı yüzey plazmon rezonansı adı verilen bir fenomen sergiler. Bu durum, altın nanoparçacıkların boyutlarına ve şekillerine bağlı olarak kırmızı, mavi veya diğer renklerde görünebildikleri benzersiz bir optik özellik ile sonuçlanır. Altın nanopartiküller kimyasal olarak inerttir, yani diğer maddelerle kolayca reaksiyona girmezler. Bu özellik onları kararlı hale getirir ve zaman içinde bozulmalarını önler.

Altın nanopartiküller, sentetik prosedürler sayesinde iyi karakterize edilmiş elektronik ve fiziksel özelliklere sahip geniş bir uygulama alanı için çok yönlü malzemelerdir. Optoelektronik özellikler organik fotovoltailer, duyuşal problemler, terapötik ajanlar, biyolojik ve tıbbi uygulamalarda ilaç dağıtımı, elektronik iletkenler ve kataliz gibi yüksek teknoloji uygulamalarında araştırılmış ve kullanılmıştır. [82, 83,84,85] Altın nanopartiküllerin optik ve elektronik özellikleri, boyut, şekil, yüzey kimyası veya agregasyon durumu değiştirilerek ayarlanabilir.

[86,87] Altın nanopartiküllerin ışıkla etkileşimi, çevresel etkiler ve fiziksel boyutları tarafından belirlenir. Kolloidal bir nanoparçacığın yakınında yayılan bir ışık ışınının salınan elektrik alanları, serbest elektronlarla etkileşime girer ve görünür ışığın frekansıyla rezonans içinde olan elektron yükünün uyumlu bir salınımına neden olur. Bu rezonans salınımları yüzey plazmonları olarak bilinir. Yüzey plazmon rezonansı, nanopartiküllerin boyutu veya şekli değiştirilerek ayarlanabilir, bu da farklı uygulamalar için uyarlanmış optik özelliklere sahip partiküllere yol açar. [86] Bu altın çözeltisine fazla tuz eklendiğinde de görülür. Altın nanoparçacığın yüzey yükü nötr hale gelir ve nanoparçacıkların toplanmasına neden olur. [96] Sonuç olarak, çözelti rengi kırmızıdan maviye değişir. Bu yüzey modifikasyonu, altın nanopartiküllerin biyomedikal uygulamalarda dolayı sıklıkla kullanılır. Biyomedikal uygulamalar için araştırılan nanoparçacık yapıları katı altın küreler olan nanoküreler (20-35nm), altın tabakası ile kaplanmış katı silika çekirdek nanokabuklar (143nm), kübik altın nanokafesler (45nm), katı altın silindirler olan nanorodlardır (46,5-57nm). [38] Altın nanopartikülün geometrisine göre UV-vis spektrumunda farklı dalga boylarında pik elde edilebildiği dolayısıyla çözeltisinin renginin farklı olduğu bilinen bir gerçektir.

Altın nanopartiküller üzerine araştırmalar devam etmektedir ve kanser tedavisinde, çevresel iyileştirmede ve nanoelektronikte kullanımları da dahil olmak üzere gelecekte birçok potansiyel gelişme vardır. Genel olarak, altın nanopartiküller çeşitli alanlarda geniş bir uygulama yelpazesi için potansiyele sahip umut verici bir araştırma alanıdır.

### **2.7.1. Altın Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri**

In situ sentez yöntemi; Altın nanopartiküllerin sentez yöntemine uygun spesifik bir ajan kullanılarak kimyasal indirgeme yöntemiyle hazırlanmasıdır.[91] Altın nanopartikül sentezinde, altın klorür iyonlarının sodyum borohidrit vb. bir indirgeyici ajan kullanılarak önce tohum hazırlanması ve ardından sıcaklık pH ve reaksiyon süresi ayarlanarak ek indirgeyici ajan veya stabilize edici kimyasallarla tohum çözeltisine eklenmesi ile nanopartikül büyümesi adımı ile sonlanmaktadır. Bu yöntem nanopartikül uniform boyut dağılımına sahip partikül elde etmek ve iyi kontrol edilebilir şekil özellikleri açısından tercih edilmektedir.

Turkevich yöntemi, 1951 yılında, Turkevich ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir Kloroaurik asit kaynatılır, karıştırılır ve trisodyum sitrat dihidrat eklenerek altın nanopartiküller stabilize edilir. [91] Daha sonra çözelti dinlenmeye bırakılır. Belirli bir süre bekletildikten sonra şarap kırmızı kolloidal bir süspansiyona dönüşür. İlk adımda sitrat dikarboksilik asetona oksitlenir ve ikinci adımda aurik tuzlar, altın nanopartikülleri oluşturmak için Au<sup>0</sup> atomları üzerinde toplanan bir auröz tuza indirgenir. [88] Temel stabilize edici etki, reaksiyonda üretilen dikarboksilik asetondur. Sitrik asit indirgenmesiyle sentezlenen altın nanopartiküllerin yanı sıra, indirgeyici olarak askorbik asit kullanımı da oda sıcaklığında içe yaramaktadır. [89]

Brust-Schiffrin, 1994 yılında önerilen iki fazlı bir sentez olarak, tiyolat-stabilize AuNP'leri üretebilen ilk spesifik yöntemdir. [90] Tetraoktilamonyum bromür faz transfer reaktifi olarak kullanılır ve sodyum borhidrür indirgeyici ajan olarak kullanılır. Daha kararlı ve monodispers bir partikül elde edebilmeiin tiyol eklenir. Elde edilen partiküller 2-6nm aralığındadır. Sodyum borhidrürün hızlı bir şekilde eklenmesi ve çözeltinin soğutulması da daha küçük ve daha monodispers AuNP'lerle sonuçlanmıştır. [90]

NaBH<sub>4</sub> ve sitrat yoluyla metal iyonu indirgenmesinin bir dizi dezavantajı mevcuttur. Brust-Schiffrin yönteminde indirgeme işleminde sodyum borhidrür kullanılmıştır. [90]



Bu yöntemde kolayca boyut kontrolü sağlansada sodyum borhidrür toksiktir ve biyolojik aktivitede değişime sebep olabilir. Turkevich yöntemi sitrat indirgeyici ajan olarak kullanılsada bu işlemin gerçekleşebilmesi için gereken yüksek sıcaklık lipozomları tahrip edebilir. Bu sebeple; AuNP'lerin sentezi için toksik olmayan, ekonomik, yüksek verimli ve basit bir süreç olan tetrakloroaurik asitin sulu çözeltisi içinde çözüldüğünde biyouyumlu ve basit bir metodoloji olarak hızlı ve kontrollü bir reaksiyonla sonuçlanan askorbik asit ve gliserol vb. indirgeyici ajanlarıyla altın nanopartikül sentezleri gerçekleştirilmiştir. Bizde bu tez çalışmamız kapsamında altın nanopartiküllerimizi elde edebilmek için indirgeyici ajan olarak doğal ve biyouyumlu olan askorbik asiti kullanmaktayız. Askorbik asit (C Vitamini) en çok biyokimyasal reaksiyonlardaki antioksidan rolüyle bilinir. Çevre dostudur ve biyolojik olarak parçalanabilirliğe, biyouyumluluğa, düşük toksisiteye ve yüksek suda çözünürlüğe sahiptir.

Altın nanopartikülleri ters misel olarak kullanılmış ve lipozom yüzeyinde in situ olarak oluşturulmuştur. Lipozom yüzeyine indirgenecek bu altın nanopartiküllerin boyutu, sayısı ve agregasyonu kullanılan lipidin konsantrasyonu yük seçimi ile belirlenebilmektedir. Altın nanopartiküllerin sayısı ve toplanma derecesi üzerindeki kontrol derecesi, yüklü veziküllerin işlevi için temel öneme sahiptir. Negatif yüklü lipidler lipozom yüzeyinde izole nanopartiküllerin oluşumuna yol açarken pozitif yüklü lipidler, lipozom yüzeyinde daha yüksek derecede nanopartikül agregasyonuna neden olabilir. Lipozom-nanopartikül kompoziti için lokalize fotokimya, optik spektroskopi için lipozom yüzeyinde gelişmiş elektrik alanlarının optik üretimini ve lipid membranından kontrollü difüzyon için lokalize ısıtmanın tetiklenebilir bir üretimini içermektedir. Altın nanopartiküllerin lipozom membranlarına kontrollü yüklenmesi için pratik, oda sıcaklığında ve biyouyumlu bir metodoloji tez yönteminde tercih edilmiştir. [92]

## **2.8. Altın nanopartiküller ve altın kaplı sıcaklığa duyarlı lipozomlar**

Son yıllarda, özellikle kanser tedavisi alanında, ilaç dağıtımı için TSL'lerin kullanımına olan ilgi artmaktadır. Araştırılan yaklaşımlardan biri, TSL'lerin dokuların normal vücut sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklara lokalize olarak ısıtılmasını içeren hipertermi ile birlikte kullanılmasıdır. Tümör dokusunun çevresindeki dokudan biraz daha yüksek bir sıcaklığa ısıtılmasıyla, sağlıklı hücreler nispeten zarar görmeden

kalırken kanser hücreleri seçici olarak yok edilebilir. Termosensitif lipozomlar, belirli bir sıcaklığa yanıt olarak ısıya neden olan ajanları serbest bırakacak şekilde tasarlanabilir, bu da hipertermi tedavisini belirli dokulara veya hücelere hedeflemenin bir yolunu sağlar. Hiperterminin ilaç iletimini geliştirdiği ve kemoterapinin etkinliğini artırdığı, ayrıca tümör hücresi ölümünü tetiklediği gösterilmiştir. Lazerle ısıtma, TSL tabanlı hipertermi tedavisinde kullanım için umut verici bir tekniktir. Termosensitif lipozomların (TSL'ler) lazer uygulamaları, ilaç dağıtımını ve görüntülemeyi iyileştirme potansiyelleri açısından incelenmiştir. TSL'lerin birincil lazer uygulamalarından biri, ilaç salınımı üzerinde hassas uzamsal ve zamansal kontrol sağlayabilen odaklanmış lazer ışığına yanıt olarak ilaçların veya diğer kargoların salınımını tetiklemektir. [54]

Lazer ısıtmanın avantajı, sağlıklı dokuya zarar vermekten kaçınırken tümör bölgesinin hassas bir şekilde ısıtılmasını sağlayabilmesidir. Bunun nedeni, lazer ışınının tümöre sıkıca odaklanabilmesi ve yüksek oranda lokalize ısıtmaya izin vermesidir. [93]

Kanser tedavisi için TSL'lerden lazerle tetiklenen ilaç salınımının kullanımını araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, 2015 yılında Journal of Controlled Release'de yayınlanan bir çalışma, TSL'lerden lazerle tetiklenen doksorubisin salınımının, lazerle tetiklenmeyen salıma kıyasla bir fare meme kanseri modelinde tümör büyümesi inhibisyonunu önemli ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir. [94] Kanser tedavisine ek olarak, TSL'lerden lazerle tetiklenen salım, gen tedavisi gibi diğer uygulamalar için de incelenmiştir. [95] TSL'lerin bir başka lazer uygulaması da görüntüleme, özellikle de fotoakustik görüntüleme (PAI) içindir. PAI, dokuda akustik dalgalar oluşturmak için lazer ışığını kullanan, daha sonra tespit edilebilen ve yüksek çözünürlüklü görüntüler üretmek için kullanılabilen invazif olmayan bir görüntüleme tekniğidir.[96] TSL'lere kontrast maddeler veya floresan boyalar yüklenebilir ve ardından lazer ışığına yanıt olarak bunları serbest bırakmaları için tetiklenebilir, bu da PAI kontrastını artırabilir ve görüntüleme çözünürlüğünü iyileştirebilir. PAI için TSL'lerin kullanımını araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, 2020 yılında Jin ve ark. tarafından yayınlanan bir çalışma da TSL'lerden lazerle tetiklenen indosiyanin yeşili (ICG) salınımının, bir fare modelinde meme tümörlerinin PAI'sinde kontrastı ve çözünürlüğü iyileştirdiğini göstermiştir. [97]

TSL tabanlı hipertermi tedavisinde lazer ısıtmanın kullanımı umut vaat ederken, ele alınması gereken bazı sınırlamalar da vardır. Dikkat edilmesi gereken önemli bir husus, ısıtma sürecinin hassas bir şekilde kontrol edilmesi gerekliliğidir. Bu, sağlıklı dokuya zarar vermekten kaçınırken hedeflenen dokunun istenen sıcaklık aralığına ısıtılmasını sağlamak için gereklidir. Bunu başarmak için manyetik ısıtma, ultrason ve lazer ısıtma dahil olmak üzere çeşitli ısıtma teknikleri araştırılmıştır. Sınırlamalardan biri, derin yerleşimli tümörlerde kullanımını kısıtlayabilen lazer ışınının penetrasyon derinliğidir. Diğer bir sınırlama ise lazer ışınının uygun şekilde kontrol edilmemesi durumunda doku hasarı potansiyelidir.

Benzer şekilde, altın nanopartiküller içeren TSL'ler de hipertermi tedavisinde potansiyel kullanımları açısından araştırılmıştır. GNP'leri hipertermi tedavisinde kullanmak için, tipik olarak TSL formülasyonuna ya birlikte kapsülleme ya da lipozom yüzeyine konjugasyon yoluyla dahil edilirler. TSL'ler bir lazer ışını tarafından ısıtıldığında, altın nanopartiküller lazer enerjisini emer ve ısıya dönüştürerek TSL'lerin yüklerini serbest bırakmasına neden olur. TSL tabanlı hipertermi tedavisinde GNP'lerin kullanılmasının avantajlarından biri, lazer ışınlamasına yanıt olarak yerel olarak ve hızla ısı üretebilmeleridir. Bu, tümör bölgesinin hedeflenmesinde yüksek derecede hassasiyetin yanı sıra TSL kargosunun hızlı bir şekilde salınmasına yol açabilir. Altın nanopartiküllerin lazer enerjisi için yüksek emilim katsayılarına sahip olduğu gösterildiğinden, ısıtma elemanı olarak altın nanopartiküllerin kullanılması ısıtma işleminin verimliliğini artırabilir. Ayrıca, GNP'ler biyoyumludur ve vücuttan kolayca atılabilir, bu da onları klinik kullanım için güvenli bir seçenek haline getirir.

Altın nanopartiküllerin kullanımına ek olarak, TSL tabanlı hipertermi tedavisinde lazer ısıtma için başka yaklaşımlar da araştırılmıştır. Yaklaşımlardan biri, dokuya görünür ışıktan daha derin nüfuz edebilen yakın kızılötesi (NIR) lazer ışınlamasını kullanmaktır. TSL'ler NIR ışığını absorbe edecek şekilde tasarlanabilir ve ısıtıldıklarında kargolarını serbest bırakırlar.

Çeşitli çalışmalar lazerle ısıtılmış TSL'lerin klinik öncesi kanser modellerinde etkinliğini göstermiştir. Örneğin, bir çalışmada doksorubisin ve altın nanopartiküller ile yüklenmiş TSL'lerin bir fare meme kanseri modelinde kullanımını araştırılmıştır. TSL'ler tümör bölgesine iletilmiş ve ardından bir lazer ışını kullanılarak ısıtılmıştır. Sonuçlar,

TSL'lerin lazerle ısıtılmasının, tedavi edilmemiş kontrollere kıyasla tümör hacminde önemli bir azalmaya yol açtığını göstermiştir. [98]

TSL'lerin lazerle ısıtılmasının, tedavi edilmemiş kontrollere kıyasla tümör hücresi ölümünde önemli bir artışa yol açtığını göstermiştir. [99,100] Genel olarak, TSL'lerin lazer uygulamaları, özellikle kanser tedavisi ve PAI için ilaç dağıtımını ve görüntülemeyi iyileştirmek için büyük umut vaat etmektedir. Bu uygulamalar için TSL tasarımını ve lazer parametrelerini optimize etmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulsa da bu alanda devam eden çabaların kişiselleştirilmiş tıp ve hastalık teşhisine yeni ve yenilikçi yaklaşımlar getirmesi muhtemeldir. [101]

Bununla birlikte, TSL tabanlı hipertermi tedavisinde GNP'lerin kullanımıyla ilgili bazı zorluklar da vardır. Başlıca zorluklardan biri, ısı üretimi ve TSL kargo salınımının verimliliğini etkileyebileceğinden, GNP'lerin tümör bölgesi içinde optimum konsantrasyon ve dağılımının sağlanmasıdır. Bir diğer zorluk ise lazer parametrelerinin (ör. güç, dalga boyu, süre) çevredeki sağlıklı dokuya zarar vermektan kaçınmak için dikkatli bir şekilde kontrol edilmesini sağlamaktır. Bu zorluklara rağmen, TSL tabanlı hipertermi tedavisinde GNP'lerin kullanımı prelinik çalışmalarda ve erken faz klinik deneylerde umut vaat etmektedir. Devam eden araştırmalar, TSL-GNP komplekslerinin tasarımını ve formülasyonunu optimize etmeye, daha hassas ve etkili lazer ısıtma teknikleri geliştirmeye ve bu yaklaşımların güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için daha fazla klinik çalışma yürütmeye odaklanmıştır. Ancak devam eden araştırmalar, lazerle ısıtılan hipertermi tedavisinde kullanılmak üzere TSL'lerin tasarımını ve formülasyonunu optimize etmenin yanı sıra klinik ortamlarda kullanılmak üzere daha hassas ve etkili lazer ısıtma teknikleri geliştirmeyi amaçlamaktadır.

## **2.9.Hipertermide Altın Kaplı Sıcaklığa Duyarlı Lipozomların Kullanımına İlişkin Önceki Çalışmalar**

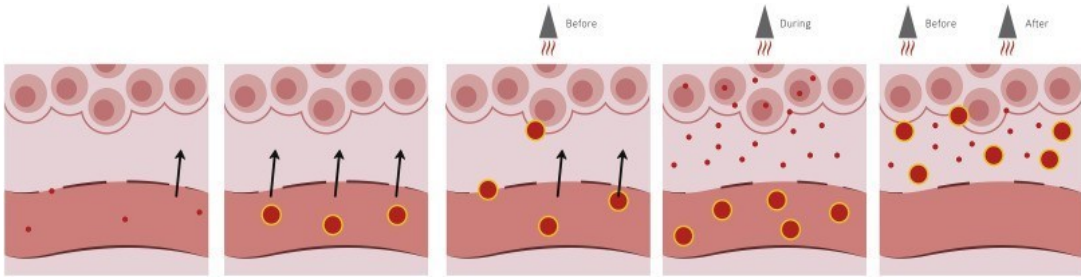
Hipertermi kemoterapiyle birlikte kullanılan revaçta tedavi yöntemlerinden birini oluşturmaktadır. Bu kombinasyonun hasta tedavi yanıtını iyileştirdiği görülmüştür. Hipertermi sıcaklığa duyarlı lipozomlarla birleştirildiğinde tümör vaskülatür geçirgenliğini arttırarak lipozom birikimini sağlar. Lipozomlardan tümör vaskülatürüne ve interstiyumuna ilaç salımını teşvik ettiği görülmüştür.[102] MÖ 1700'deki eski kullanımından bu yana, meme kanserini tedavi etmek için ateşin parlayan ucu

kullanıldığında ısı, tümör tedavisindeki işlevselliğini göstermiştir, William Cole 1800'lerde ısıyla kanser tedavisini gündeme getirmiş ve dokuları tüm vücut ya da lokal olarak fizyolojik sınırların üstünde 42-45°C arasında özel cihazlarla ısıtarak tümörlü bölgenin ısını arttırmayı amaçlamıştır. Hipertermi tümörde damar gözenek boyutunu arttırarak kombine kemoterapi tedavisinde tedavi ajan etkinliğini arttırmaktadır. İnsan klinik deneylerinde manyetik rezonans görüntüleme rehberliğinde yüksek yoğunluklu ultrason kullanılırken hayvan klinik deneylerinde ise mikrodalga cihazları ve fotodinamik, fototermal terapi gibi çeşitli ışık kaynakları kullanılmaktadır. Kanserli hücreler düzensiz vaskülatür, düşük oksijen seviyesi, asit konsantrasyonunun yüksekliği ve yetersiz besin sebebiyle stres altındadır ve sıcaklığa normal hücreler kadar dayanıklı değildir. Bu yüzden daha umut verici bir modalite olan hedeflenmiş, nanoparçacık ile lokal hipertermidir. Son zamanlarda, endoskopik ultrason kılavuzluğunda ablasyon, gerçek zamanlı görüntüleme ve fokal ablasyon sayesinde, rezeke edilemeyen pankreas tümörü (tümör boyutu 3 cm'den küçük) için potansiyel olarak güvenli ve etkili bir tedavi seçeneği olarak geliştirmek üzere çalışmalar yapılmaktadır. Lokal pankreas tümörlerini doğrudan tedavi etmek için yüksek yoğunluklu odaklanmış ultrason (HIFU), radyofrekans ablasyon (RFA) ve interstisyel lazer ablasyon (ILA) gibi çeşitli ablatif termal teknikler üzerinde durulmaktadır. [102] Fototermal terapi, NIR lazer ışınması kullanımıyla ışığa duyarlılaştırıcı ajanları/yapıları aktive ederek tümör dokularına hipertermi yönteminde sıcaklık artışını indüklemek için kullanılır. PTT'nin temel avantajları, derin doku penetrasyonu ve sağlıklı dokulara daha az zarar veren ışığın kolayca düzenlenebildiği, odaklanabildiği ve kontrol edilebildiği daha iyi hedeflenmiş tedavileri mümkün kılar. [102]

Altın nanoparçacıklar kanser dokularında lokalize ısı üretimine imkân vermesi ve beraberinde terapötik ajanların kontrollü ve hedefli bir şekilde salınımına izin vermektedir. Bu nanoparçacıkları fototermal terapide kullanmak için birçok özelliğe sahiptir, örneğin: yüksek biyouyumluluk, sentezleme, yüzey modifikasyonu kolaylığı, optik ve fiziksel özellik ayarlama kolaylığı, spesifik olmayan dağılımı en aza indirirken lokal tümör alanına uygulanabilirler, biyolojik dokulara derinlemesine nüfuz etme yeteneği yaratarak yakın kızılötesi (NIR) lazer ışığı ile etkinleştirilebilirler ve çok yönlü kanser PTT ve ilaç dağıtım sistemleri oluşturmak için modüle edilebilirler. Ayrıca AuNP'lerin radyasyon içermeyen özellikleri, fototermal kanser tedavisinde büyük

potansiyel göstermiştir. [103,104 Altın kaplı lipozomların absorpsiyonu, eklenen HAuCl<sub>4</sub> miktarına bağlıdır ve doksorubisin<sub>4</sub> kapsüllenmiş altın kaplı lipozomlar tarafından NIR lazer ışığının absorpsiyonu için uygun olan 636'dan 795 nm'ye kaydırmaktadır. Sıcaklığa duyarlı lipozomlarla kapsüllenmiş ilacın, NIR lazer ışınlanması (660nm) altında 1 dakika içinde %80'den fazla doksorubisin altın kaplı lipozomlardan salındığı rapor edilmiştir [105]. Bu çalışmada HAuCl<sub>4</sub> miktarı altın kaplı lipozomların partikül boyutuna ve lazer güç<sub>4</sub> parametresinin sıcaklık artışı üzerindeki etkisi incelenmiştir. İlk olarak eklenen HAuCl<sub>4</sub> miktarının altın kaplı sıcaklığa duyarlı lipozomların oluşumu üzerindeki etkisini araştırılmıştır. Altın kaplı sıcaklığa duyarlı lipozomların partikül boyutu dağılımı, eklenen HAuCl<sub>4</sub> miktarı artırılarak değiştirilmiştir. HAuCl<sub>4</sub>'ün eklenmesi sıcaklığa duyarlı lipozomların yüzeyinde altın bir nanoyapının kaplanması için aynı zamanda altın kaplı sıcaklığa duyarlı lipozomlar tarafından emilen dalga boylarının aralığını ayarlamak için de gerekli olduğu görülmüştür. NIR lazer ışınlanması ile birleştirilen doksorubisin kapsüllenmiş altın kaplı sıcaklığa duyarlı lipozomlar, akciğer kanseri hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Tek başına serbest doksorubisin solüsyonu kullanan monoterapi veya tek başına altın kaplı sıcaklığa duyarlı lipozomlar kullanan fototermal tedavi orta derecede sitotoksik iken, ikisinin birleştirilmesiyle sinerjistik bir etki gözlemlenmiştir. [105] Sıcaklığa duyarlı lipozomlarla yapılan başka bir çalışmada Au nanopartiküllerle lipozomları dekore etmek istikrarlı ısı üretimi ve düşük yan etkilere sahip olma avantajlarına sahip nanotaşıyıcı üretilebileceğini göstermiştir [104]. Yapılan bu çalışmada NIR (780nm) ışınlanması için farklı süreler seçilmiştir. Kullanılan hidrofobik ilacımız kurkuminin sıcaklığa duyarlı lipozom kullanımıyla polar özelliği başarılı bir şekilde değiştirilmiş sudaki çözünürlüğü iyileştirilmiş ve kapsülleme sağlanmıştır ve güçlü bir anti bakteriyel, antikanser etkinlik göstermiştir. Altın nanopartiküllerin kısa dolaşım süresi nedeniyle düşük tümör hedefleme yeteneği, vücut sisteminde uzun süreli tutulma nedeniyle potansiyel toksisite ve biyolojik dağılımın invaziv olmayan değerlendirilmesinin zorluğu gibi dezavantajları göz önünde bulundurularak yapılan başka bir çalışmada altın kaplı lipozomlardan tekrar lipozomla kaplanarak daha stabil ve kararlı terapötik etkinliği yüksek bir taşıyıcı sentezlenmiş ve meme kanserinin ortotopik fare modelinde gösterilmiştir. Böylece fototermal veriminin daha yüksek olarak elde edildiği de gösterilmiştir. [109] Anjiyotensin-(1-9) peptidi kanda kısa bir yarı ömre sahip altın kaplı sıcaklığa duyarlı lipozomlarla yapılan bir çalışma da hipertansiyon üzerinde olumlu etkiye sahip olan kontrollü bir salınım ihtiyacı olduğu

görülmüştür. Bu peptit lipozomlarla kapsülendirilerek yeterli bir yerel sıcaklık kontrolü elde etmek amacıyla altın kaplanmıştır. NIR ışınması (808nm) altında hafif hipertermi uygulanmıştır. MSPC(1-stearoyl-2-hidroksi-sn-glisero-3-fosfokolin), 1,2-distearoyl-snglycero-3 phosphatidylcholine (DSPC) gibi lizolipitlerin lipozomların lipid çift katmanlı yapısına dahil edilmesiyle, yüklenen miktarı artırmak ve Tm'de lipid çift tabakası içinde nanogözenekler oluşturularak terapötik maddenin sulu çekirdekten salınımını hızlandırmanın mümkün olduğu gösterilmiştir. [110]



Şekil 1.1: Farklı tedavi stratejileri kullanılırken tümör içine ilaç verilmesinin tasviri. [107]

Şekil 1'de Li ve arkadaşları tarafından önerilen iki aşamalı hafif hipertermi yaklaşımı ele alınmaktadır. Bu yaklaşımdaki amaç hipertermi aracılı ekstrasvazyonu ve hipertermi aracılı tetiklenen ilaç salınımını birleştirmektir. Tümör hücreleri önce 42°C'ye kadar ısıtılmaktadır. Endotel hücreleri arasındaki boşluklar büyümekte, nanopartiküller ekstrasvaze olmaktadır. Nanopartiküller, tümör interstisyel boşluğa yayılmış ve tümöral dokuya afinite olduğu görülmüştür. Çalışmada önceki maksimum ilaç birikimini tetiklemek amacıyla ikinci bir ısı uygulaması daha gerçekleştirilmiştir. [104] Yine pankreas kanseri hücreleri üzerinde yapılan başka bir çalışma da polimerlerle modifiye edilmiş sıcaklığa duyarlı lipozomlarda gemsitabin ve sisplatin kemoterapi ilaç kombinesi termal olarak tetiklenmiştir. Bu çalışmada hücre canlılığının azaldığı görülmüştür.[109] Bu çalışmada da lipozomların kemoterapik ilaçların kanser hücrelerine iletimi için etkili nanotaşıyıcılar olduğu görülmüştür. EPR etkisinden dolayı tümörlü bölgede yeterli ilaç birikimi sağlanamamaktadır. Bu nedenle, pankreas kanseri tedavisi için lokal bir ilaç salım sistemi geliştirmek çok önemlidir. Tüm bu çalışmalar hipertermi uygulamasının kanser tedavisine farklı açılardan katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Yapılan bir başka çalışmada

iyontoforetik cihaz ile iletimi yoluyla lokal kemoterapi uygulaması in vivo deneylerle gösterilmiştir. Burada en iyi terapötik etkinliğin dörtlü ilaç kombinesi olduğu gösterilmiştir. [111] Hastanın boy kilo vb. gibi parametrelerine bağlı olarak doz ayarlanması, dozun yüksek toksisite sebebiyle artırılmaması ve plazmada klirens uğrayarak tümöral bölgeye yeterli miktarda ulaşamayan kemoterapi ajanları pankreas kanseri tedavisinde yetersiz kalmaktadır. Tümör dokusunun kompleks olması sebebiyle yeterli miktarda kemoterapi ilacı ekstravaze olamamaktadır ve hücreler kemoterapik ilaca direnç göstermeye başlamaktadır.

### **3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR**

#### **3.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar**

Çalışma kapsamında ilaç taşıyıcı sistemler olarak DPPC (Sigma Aldrich), DSPC (Avanti Polar Lipids, AL), kolesterol (Sigma Aldrich), MSPC (Avanti Polar Lipids, AL), DSPE-PEG (Avanti Polar Lipids, AL)'den oluşan lipit bileşimleri kullanılarak lipozomlar sentezlenmiştir. Lipozomların sentezi için organik çözücü olarak kullanılan kloroform, sistemin ilaç alım/salım yeteneğinin test edilebilmesi için model ilaçlar olan 5Fluorouracil(5-FU), Rhodamin B(RhoB) ve Resveratrol (Res) Sigma-Aldrich'den, Oxaliptatin (OXA) TCI chemicals (Tokyo, Japan)'dan temin edilmiştir. Bu lipozomların altın nanopartikül ile kaplanması amacıyla altın (III) klorür trihidrat ve indirgeyici ajan olarak askorbik asit Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. HPLC analizleri kapsamında mobil faz karışımlarını hazırlamak amacıyla asetronitril, metanol, izopropil alkol ve pH ayarlamak amacı ile de hidroklorik asit kimyasallarında yine Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Sentez ve



seyreltme için ultra saf su kullanılmıştır (Millipore Direct- Q3 UV). Tüm malzemeler daha fazla saflaştırılmadan kullanılmıştır. Dinamik Işık Saçılım (ALV GmbH); boyut dağılımı, UV-vis spektrofotometre (Thermo-Scientific); dalga boyu absorpsiyon eğrisinden etken maddelerin tutunma/salınma hesaplamaları, optik rezonans analizleri, Atomik Kuvvet Mikroskobu (Park Systems); boyut dağılım ve morfoloji HPLC (Thermo-Scientific), etken maddelerin salınma/tutunma hesaplamaları için miktar tayini amacıyla kullanılmıştır.

### **3.2. İlaç Taşıyıcı Sistemin Hazırlanma**

Literatürde ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmak üzere lipozomları hazırlamak amacıyla kullanılan çeşitli yollar mevcuttur. Tez çalışması kapsamında hazırlanan lipozomlar ince film hidrasyon yöntemi kullanılmış altın nanopartiküller lipozom yüzeyine in situ reaksiyon yöntemi ile indirgenerek hazırlanmıştır.

#### **3.2.1.Lipozomların Hazırlanması**

Model çalışma kapsamında erime sıcaklığı 41 °C ü olan DPPC (1,2-Dipalmitoylsnglycero-3-phosphocholine) fosfolipiti ile vezikül oluşturmakla başlanmıştır. 2.7mM DPPC lipiti kloroform içinde 5mg/mL konsantrasyonda çözdürdük ve ardından organik çözücünün buharlaşması amacıyla desikatöre bırakılmıştır. Organik çözücünün tamamen buharlaştığından emin olduğunda ise lipit ince filmin daha iyi hidrate olması için 4°C'ye gece boyu bırakılmıştır. Ertesi gün, lipit ince filmi 2.5 ml PBS (7.2) ile hidrate edilmiştir. DPPC dispersiyonu 55-60°C'de otuz dakika ısıtılmıştır. Daha sonra 55-60°C'de bir saat manyetik bir karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Yine 55-60°C'de yedi saat sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Lipid vezikülleri sonikasyona tabi tutulduğunda, görünümünde vezikül oluşumunun bir göstergesi olan süt renginden daha homojen yarı saydam bir renge geçiş gözlemlenmesi beklenmiştir. Ekstrüzyon yönteminde ise yukarıda anlatılan tüm bu aşamalar tekrarlanarak sonikasyon işlemi yedi saat yerine üç saatlik bir periyotta gerçekleştirilmiştir. Ekstrüder aparatı ve lipozom dispersiyonu lipit faz geçiş sıcaklığının üzerinde ısıtılarak 100nm boyutta polikarbonat membranlardan yirmi döngülü ekstrüzyona tabi tutulmuştur. Tamponlu çözeltilerde, lipozom preparatlarının spektral özelliklerini ve dolayısıyla yapısal stabilitelerini koruması amacıyla 4 °C'de saklanmıştır. DPPC' nin vezikül hazırlanmasının yanı sıra tez çalışması kapsamında

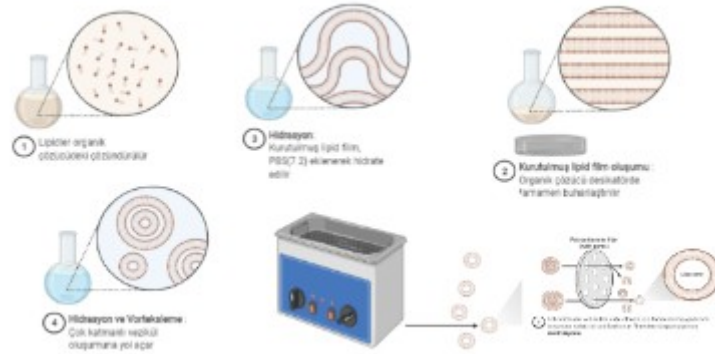
gerçekleştirilmesi planlanan iki temel lipid kompozisyonumuzla gerçekleştirilmesi planlanan biri L1 ve diğeri L2 iki sıcaklığa duyarlı lipozom formülasyonu hazırlanmıştır. L1 formülasyonunun hazırlama protokolü, Celsion'un ThermoDox'unu mümkün olduğunca yakından taklit etmektedir. Bu lipid bileşimleri;

L1=DPPC: MSPC: DSPE-PEG2000=86:10:4 M,

L2=DPPC: DSPC: chol= 59:39:2 M lipid bileşim oranları kullanılmıştır.

Uygulanacak yöntem özetle şu şekildedir;

Sıcaklığa duyarlı lipozomlar, ince lipid film hidrasyon yöntemi kullanılarak L2 lipozomu DPPC: DSPC: chol 59:39:2 M oranında oluşturulmuştur. 100 µmol lipid olacak şekilde 5mg/ml oranındaki kloroform içinde çözülmüş, ardından desikatörde organik çözücü buharlaştırılmış çözücünün tamamen uzaklaştırıldığından emin olduğunda lipid film 4°C'de gece boyunca daha iyi hidrate olabilmesi için bekletilmiştir. Burada L1 lipozomu DPPC: MSPC: DSPE-PEG2000=86:10:4 M oranında kloroform içinde çözüldürülmüştür ve organik çözücünün tamamen buharlaştığından emin olunmuştur. Daha iyi hidrate olabilmesi için 4°C'de gece boyunca bırakılmıştır. L2 lipozomunun hidratlanması aşamasında PBS (7.2) ile değil, L2 lipozom süspansiyonu ile hidratlanmıştır. Sırasıyla sonikasyon ve ekstrüzyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1: Lipozomların ince film hidrasyon yöntemiyle hazırlama

### **3.2.2. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistem Yüzeyine Altın Nanopartiküllerin İndirgenmesi**

Lipozomlar elde edildikten sonra yüzeylerinde altın NP oluşturulması amacı ile önce 39,4mg/mL altın (III) klorür trihidrat tuzundan hazırlanan çözeltisi ve ardından indirgeyici ajan olan 88,06 mg/mL askorbik asit ilave edilmiştir ve on beş dakika hafifçe çalkalanmıştır. Lipozom dispersiyonlarına askorbik asit farklı oranlarda (stokiyometrik oranın dört katına kadar fazla) eklenerek reaksiyonun gözlenmesi planlanmıştır. Lipozom yüzeyinde oluşan altın nanopartikül miktarına bağlı olarak lipozomların karakteristik yarı saydam beyazından mavi-yeşil renk değişimi görülmesi beklenmiştir. Renk değişimini takiben on sekiz dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Altın kaplanmış lipozom dispersiyonu suya karşı 4 °C'de diyaliz edilmiştir. Altın nanopartiküllerin indirgenmesi çalışmaları için kullanılan lipid miktarı altın tuzu ve indirgeyici ajan askorbik asit farklı oranları denenmiştir ve bu oran optimize edilmiştir. Tüm numuneler çözeltide eşit miktarlarda lipid ve dolayısıyla birim hacim başına eşit sayıda lipozom olacak şekilde hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Lipozom yüzeyine altın nanopartikül indirgeme işlemine öncelikle model çalışmalarımız için kullandığımız DPPC vezikülü ile başlanmıştır. Kullanılan lipid başına 18.91 µg altın tuzu ve 70.45µg askorbik asit sulu çözeltileri eklenmiştir. Burada DPPC vezikülümüz altın kaplandıktan sonra oluşturulan DPPC lipid filmini hidratlamak için kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında kullanılması hedeflenen iki lipid kompozisyonumuz vardır. Lipozomların hazırlanması aşamasında açıklanan iki lipid kompozisyonumuzdan L2 lipozomu üzerine altın nanopartiküller kullanılan lipid miktarına göre altın tuzu ve indirgeyici ajan askorbik asit eklenerek indirgenmiştir. Altın kaplı L2 lipozomunun dispersiyonu L1 lipid filmini hidratlamak için kullanılmıştır. (L1AL2) Lipozom yüzeyde altın nanopartikül varlığı zeta potansiyeldeki değişim, AFM, DLS ve UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific) ile karakterize edilerek değerlendirilmiştir.

### **3.3.Fototermal Etki ve Fototermal Verimlilik Çalışmaları**

Fototermal etkiyi göstermeden önce, lipozom, altın kaplı lipozom ve lipozom kaplanmış altın kaplı lipozomların absorpsiyon spektrumları, 600-1000nm'de ışığı

emdiğini doğrulamak için UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific) ile ölçülmüştür. Altın kaplı lipozom ve lipozom kaplanmış altın kaplı lipozomların fototermal etkisi ve etkinliği 1 W/cm<sup>2</sup> güçte 808 nm lazer ile gösterilmiştir. Termal görüntüleme kamerası kullanılarak lipozom, altın kaplı lipozom ve lipozom kaplanmış altın kaplı lipozomların lazer ışınlanması altındaki sıcaklık değişimleri 15 dakika boyunca ölçülmüş ve termal görüntüler eş zamanlı olarak elde edilmiştir. Altın kaplı lipozom ve lipozom kaplanmış altın kaplı lipozomların termal kararlılıkları, 15 dakika boyunca lazer ışınlama ve açma/kapama döngüsü ile gösterilmiştir. Bu döngü 3 kez tekrarlanmış ve sıcaklıklar her 60 saniyede bir ölçülmüş ve kaydedilmiştir.

Fototermal dönüşüm verimliliği;

$$FDV = \frac{hA(T_{max} - T_{sur}) - Q_{diss}}{I(1 - 10^{-A})} = \frac{mc(T_{max} - T_{sur}) - Q_{diss}}{TsI(1 - 10^{-A})}$$

(Eşitlik 1)

T<sub>max</sub>: Çözeltinin en yüksek sıcaklığı

T<sub>sur</sub>: Çözeltinin başlangıç sıcaklığı

Q<sub>diss</sub>: Isı dağılımı

A:808nm'deki absorbans

M: Çözelti ağırlığı

C: Suyun özgül ısı kapasitesi

$$T = (-t)/\ln\theta \quad \text{(Eşitlik 2)}$$

t: Karşılık gelen zamanı

Θ: Boyutsuz itici kuvveti

### 3.4. Lipozomal Taşıyıcı Sisteme İlaçların Enkapsülasyonu ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi

Lipozomlar tarafından tutulan ilaç miktarını belirlemek için diyaliz yöntemi kullanılmıştır. İlaç yüklü nanotaşıyıcılar çözeltisinden 1 ml diyaliz membrana (MW cut-off = 14,000) eklenerek hidrofilik ilaç etken maddeler için 10ml PBS (7.2) içinde hidrofobik maddeler için 10ml PBS (7.2, %3 Tween-20 (w/v%)) her bir ilaç için altmış dakika buz banyosu veya buz akü üstünde bekletilmiştir. Bu süreç sonunda,

kapsüllenmemiş daha küçük ilaç molekülleri membrandan geçebilirken nanotaşıyıcılar torbanın içinde kalır. Dış ortam daha sonra toplanabilir ve kapsüllenmemiş ilaç miktarını belirlemek için analiz edilebilir. Lipozomlarda tutunmayan ilaç miktarı Rhodamine B ve Resveratrol için UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific) kullanılarak sırasıyla 553nm ve 304nm'de incelenmiştir. 5Fluorouracil için 265nm'de, oxaliptatin için 210nm'de HPLC-UV detektörle belirlenmiştir. İlaç miktarlarını belirleyebilmek için her bir ilaç için önceden oluşturulmuş kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplanmıştır. Çözeltideki serbest ilaç belirlenmiş ve eklenen toplam ilaç miktarından çıkarılmıştır. İlaç etken maddelerin kapsülleme verimliliği ve ilaç yükleme kapasitelerini sayısal olarak belirlemek için;

$$\text{Enkapsülasyon Verimi \%} = \frac{W_{\text{toplam}} - W_{\text{serbest}}}{W_{\text{serbest}}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3})$$

$$\text{İlaç Yükleme Kapasitesi \%} = \frac{W_{\text{toplam}} - W_{\text{serbest}}}{W_{\text{lipid}}} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 4})$$

Eşitlik 3 ve 4 kullanılmıştır.

### 3.4.1. Salım Çalışmaları

#### 3.4.1.1. Sıcaklıkla İndüklenen İlaç Salımı

Lipozom örnekleri 1ml olarak diyaliz membrana yerleştirilmiş ve 10ml pbs (7.2) salım ortamına bırakılmıştır. Salım 37-65 °C'de değerlendirilmiş ve Salım ortamının her üç saatte bir sıcaklığı yükseltilmiştir. Numuneler altmış dakika aralıklarla toplanmıştır. Numuneler 1:15 seyreltme faktörüne bağlı olarak HPLC ile analiz edilmiştir.

#### 3.4.1.2. NIR ile İndüklenen İlaç Salımı

İlaç taşıyıcı partiküllerin NIR-Tetiklemeli performansını araştırmak için çalışılmıştır. Deney için lipozom örnekleri 1ml olarak diyaliz membrana yerleştirilmiş ve 10ml PBS (7.2) 37°C'de salım ortamına bırakılmıştır. PTT'yi göstermek için, 808 nm lazer, 5 dakika boyunca 2,5 W/cm<sup>2</sup> ile her bir zaman noktasında salım ortamındaki ilaç taşıyıcı sistemin içeren diyaliz membrana ışınlanmıştır. Partiküllerin ısınması bir termal kamera kullanılarak kaydedilmiştir.

#### **3.4.1.2.1. 5-Fluorouracilin Salım Çalışmaları**

Model lipid salım çalışmaları kapsamında DPPC veziküllerin hidratlanma aşamasında hidrofilik 5-Fluoruracil kapsülleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 1 mg/ml 5-Fluorouracil çözeltisi 20:1 fosfolipit/ilaç ağırlığı oranında lipozom süspansiyonuna eklenmiştir.

- i) Belirli bir miktarı için 37 °C'de,
- ii) kalan miktarı ise altın kaplanarak 37 °C ve 55 °C'de salım başlatılmıştır.

Salım ortamı 10ml PBS (7.2) içinde gerçekleştirilmiştir. Salım ortamından 0.25, 0.5, 1,2,3,4,5,6,24,48 saatte 100µl olacak şekilde örnek alınarak HPLC-UV (Thermo Scientific) detektör ile mobil faz distile su pH (3.2)'de analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında 5-fluorouracil L2(DPPC: DSPC: chol) vezikülümüzün hidratlanma aşamasında yine 20:1 fosfolipit/ilaç ağırlığı oranında vezikül dispersiyonumuza eklenmiştir. Altın kaplayarak ve kaplanmamış veziküllerde salım çalışmaları HPLC-UV (Thermo Scientific) detektör ile analiz edilmiştir.

#### **3.4.1.2.2. Resveratrol' ün L2 Vezikülüne Enkapsüle Edilmesi Salım Çalışmaları**

Model lipid salım çalışmaları kapsamında DPPC veziküllerin hidratlanma aşamasında hidrofobik Resveratrol kapsülleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Resveratrol çözeltisi 20:1 fosfolipit/ilaç ağırlığı oranında lipozom süspansiyonuna eklenmiştir.

- i) Belirli bir miktarı için 37 °C'de,
- ii) Kalan miktarı ise altın kaplanarak 37 °C ve 55 °C'de salım başlatılmıştır.

Salım ortamı 10ml PBSPBS (7.2, %3 Tween-20 (w/v%)) içinde gerçekleştirilmiştir. Salım ortamından 0.25, 0.5, 1,2,3,4,5,6,24,48 saatte örnekler küvetlere alınarak, UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific) cihazı ile analizlenmiştir. Her analizin ardından salım ortamından alınan örnekler salım ortamına geri dökülmüştür.

Tez çalışması kapsamında Resveratrol L2(DPPC: DSPC: chol) vezikülümüzün organik çözücüde çözdürüldüğü aşamasında yine 20:1 fosfolipit/ilaç ağırlığı oranında vezikülümüze kapsüllenmesi gerçekleştirilmiştir. Altın kaplayarak ve kaplanmamış veziküllerde salım çalışmaları UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific) cihazı ile analiz edilmiştir.

### **3.4.1.2.3. 5-Fluorouracil ve Resveratrol 'ün L2 Vezikülüne Enkapsüle Edilmesi ve Salım Çalışmaları**

Model çalışma kapsamında DPPC vezikülümüz ile tez çalışmamız kapsamında L2(DPPC: DSPC: chol) vezikülümüz ile; veziküllerin organik çözücüde çözüldürüldüğü aşamada 20:1 fosfolipit/ilaç ağırlığı oranında Resveratrol lipid film aşamasında dahil edilmiştir. Daha iyi hidrate olabilmesi için 4 °C'de gece boyu bekletilmiştir. Hidratlama aşamasından önceden hazırlanmış 5-fluorouracil çözeltisinden 20:1 fosfolipit/ilaç ağırlığı oranında eklenmiş ve lipid film hidrate edilmiş ardından yedi saat boyunca sonikasyona tabi tutulmuştur. Hem 5-FU ve RES içeren lipozomlar hem de altın kaplanmış 5-FU ve RES içeren lipozomlara 37°C' ve 55°C'de salım başlatılmıştır. 5-FU HPLC-UV detektör, RES UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific) cihazları ile 0.25, 0.5, 1,2,3,4,5,6,24,48 saatte örnekler analiz edilmiştir.

### **3.4.1.2.4. Rhodamine B'nin L1 Vezikülüne Enkapsüle Edilmesi Salım Çalışmaları**

Model hidrofilik ilaç olarak lipid salım çalışmaları kapsamında; DPPC lipidi organik çözücü içinde çözüldürülmüş ve lipid film oluşturulmuştur. Önceden sentezlenmiş altın kaplı DPPC vezikülümüz (AL) ile hidratlama aşamasında Rhodamine B ile hidratlanmıştır. Bu aşamadan sonra yedi saat sonikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonikasyonun hemen ardından 6.5mg/ml glikoz 1mg/ml jelatin eklenmiş ve tekrar hidratlanmıştır. Stabilitesini koruması ve lipozomdan ilaç etken madde sızıntısı olmaması için 4 °C'de saklanmıştır.

- i) 37 °C'de,
- ii) 55 °C'de ve
- iii) 37 °C'den başlayarak 55°C, 65°C'ye kadar kademeli şekilde sıcaklık artışıyla salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific) ile 553nm'de 0.25, 0.5, 1,2,3,4,5,6,24,48 zaman noktalarında örnekler analiz edilmiştir.

### 3.4.1.2.5. Oksaliplatin' in L1 Vezikülüne Enkapsüle Edilmesi Salım Çalışmaları

Lipidlerimiz organik çözücü içinde çözündürülmüş ve lipid film oluşturulmuştur. Önceden sentezlenmiş altın kaplı vezikülümüz (AL1) ile hidratlama aşamasında oxa hidratlanmıştır. Bu aşamadan sonra yedi saat sonikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonikasyonun hemen ardından 6.5mg/ml glikoz 1mg/ml jelatin eklenmiş ve tekrar hidratlanmıştır. Stabilesini koruması ve lipozomdan ilaç etken madde sızıntısına karşılık 4 °C'de saklanmıştır I) Sıcaklığa bağlı salım (37 °C, 55 °C, 65°C) ii) NIR' la indüklenen salımlar gerçekleştirilmiştir.

HPLC-UV detektör ile %10'luk asetonitril %90 distile su mobil fazında pH 3.0'da çalışılmış ve pH'ı ayarlamak için hidroklorik asit kullanılmış olup 210nm'de 0.25, 0.5, 1,2,3,4,5,6,24,48 zaman noktalarında örnekler analiz edilmiştir. Lipozomların hidratlanma aşamasında hidrofilik oxa kapsülleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 1 mg/ml oxa çözeltisi 20:1 fosfolipit/ilaç ağırlığı oranında lipozom süspansiyonuna eklenmiştir.

- i) Belirli bir miktarı için 37 °C'de,
- ii) Kalan miktarı ise altın kaplanarak 37 °C ve 55 °C'de salım başlatılmıştır.

Salım ortamı 10ml PBS (7.2) içinde gerçekleştirilmiştir. Salım ortamından 0.25, 0.5, 1,2,3,4,5,6,24,48 saatte 100µl olacak şekilde örnek alınarak HPLC-UV detektör ile mobil faz distile su pH (3.2)'de analiz işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında oxa L2(DPPC: DSPC: chol) vezikülümüzün hidratlanma aşamasında yine 20:1 fosfolipit/ilaç ağırlığı oranında vezikül dispersiyonumuza eklenmiştir. Altın kaplayarak ve kaplanmamış veziküllerde salım çalışmaları HPLC-UV (Thermo Scientific) detektör ile analiz edilmiştir

### 3.5. İlaç Taşıyıcı Sistemin Karakterize Edilmesi

- Dinamik ışık saçılımı (DLS) kullanılarak fosfat tamponlu Salin (PBS) içinde 1:20 kat seyreltmede lipozomların boyutunu ve boyut dağılımını belirlemek için kullanılmıştır.
- Lipozomların zeta potansiyeli, deiyonize suda seyreltikten sonra ölçülmüştür.
- Lipid formülasyonları için lipozomların jelden sıvı-kristal faza geçiş sıcaklığını



(Tm) belirlemek üzere DSC kullanılmıştır. Örnekler 25 °C'den 80 °C'ye kadar 1 °C/dak hızla ısıtılmıştır.

•Altın indirgeme işlemleri ve altın kaplı lipozomların tekrar lipozom ile kaplanmasından sonra optik rezonansı UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific) ile analiz edilmiştir.

•Ayrıca lipozom, altın kaplı lipozom ve lipozom kaplanmış altın kaplı lipozomlar boyut profili ve statik değerleri de AFM ile ölçülmüştür. Örnekler cam lamel üzerinde 1:300,1:400 ve 1:600 oranlarında seyreltilmiş ve liyofilize edildikten sonra analiz edilmiştir.

•İlaç yükleme etkinliği, yükleme aşamasında lipozomlara eklenen toplam ilacın, serbest ilacın diyaliz ile uzaklaştırılmasının ardından kalan yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Nihai ilaç konsantrasyonları HPLC kullanılarak ölçülmüştür.

### **3.5.1. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)**

Yüzey topografyasının görüntülenmek istenen yüzey çeşidine bağlı olarak uygun kantilever seçimi yapılarak, yüzeyde x-y-z tarama hareketleriyle, kantilever ucundan yansıyan lazer ışını ve yüzey arasındaki sinyal değişikliklerinden yüzey topografyasının özelliklerini içeren bir görüntü oluşturur. Yüzey topoğrafyasını yanı sıra, yüzeyin sertliği, pürüzlülüğü, partiküllerin aglomerasyonu ve mekaniksel özelliklerini incelemek mümkündür. Ölçümler (PSIA Corporation, XE- 100E) noncontact modda ACTA 10M tipi Cr-Au cantilever'lar kullanılarak ve 0.30-0.40 Hz. tarama hızında gerçekleştirilmiştir.

### **3.5.2. Zeta-potansiyel ölçümleri**

Zeta Potansiyel ölçülürken lazer ışını partiküllerin arasında itme ve çekme kuvvetleri oluşturur ve içinde bulunduğu sıvıda bir kayma düzlemi meydana getirir. Bu kayma düzlemi ve partikül yüzeyi arasında aynı kuvvetlerin birbirini itmesi farklı kuvvetlerin çekmesi ile stern tabakası meydana gelir ve zeta potansiyel değeri ölçülür. Bu potansiyel değeri; Partiküllerin stabilitesini, partikülün yüzey kimyasındaki değişiklikleri belirlemek için kullanılmaktadır.

### **3.5.3. Işık Saçılım Yöntemi (LS)**

Dinamik Işık Saçılım Cihazında, farklı açılarda lazer ışığı uygulanarak, lazer ışığı şiddetinin partiküllerden saçılan ışığın şiddeti arasındaki değişimiyle boyut analiz ve dağılımının ölçümü, sayıca ve kütlece yorumu yapılabilmektedir. Ayrıca cihazla statik ışık saçılımı ölçümünde yapılarak partikül yapısı hakkında fikir edinilebilmektedir.

### **3.5.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)**

DSC termogramlarındaki sıcaklık pikleri, geçiş sıcaklıkları ve sıcaklıklardaki geniş geçiş aralıkları nanotaşıyıcı sistemlerin termal davranışı, kararlılığı, uyumluluğu, ilaç kapsüllemesi ve fiziksel özellikleri hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu bilgiler nanotaşıyıcı formülasyonların optimizasyonu için önemlidir. Ayrıca; farklı bileşenler içeren bir nanotaşıyıcı sisteminde her bir bileşendeki farklı termal geçişler ve yeni piklerin ortaya çıkması, bileşenleri arasındaki faz ayrımının varlığı sistem ve bileşenler arasındaki etkileşimin bir kanıtıdır. Daha yüksek başlangıç sıcaklığı ve geniş geçiş aralıkları da termal kararlılığının bir göstergesi olmaktadır. Termodiyagramda camsı geçiş sıcaklığı içerdiği bileşenlerin amorf yapıda olduğunun bir göstergesidir.

### **3.5.5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Bir pompa yardımıyla mobil fazı sabit faz ile dolu bir kolondan numuneler geçirilir. Dedektörden geçen analitin spesifik özellikleri önceden chromelon server programında seçilir. Buna göre önceden oluşturulmuş kalibrasyon standartlarına göre kolondan ayırma işlemi analitin tutulma zamanına göre belirlenmiş olur ve bu spesifik sürede elüsyondan sonra analit ölçümü cihaz tarafından otomatik olarak saptanır.

### **3.5.6. UV-vis spektrofotometre**

Ultraviyole-görünür (UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific) spektrofotometre elektromanyetik spektrumun ultraviyole ve görünür aralıklarında ışık absorpsiyonunu ölçmek için kullanılan bir tekniktir. Spesifik bir dalga boyunda numuneden emilen ışık miktarının ölçülmesi prensibine dayanır. UV-vis spektrofotometre (Thermo Scientific) bu prensibi kullanarak bir numunedeki analitleri absorpsiyon özelliklerine göre ölçer. Belirli zaman noktalarında alınan numunelerin yüzde ilaç salımı, tutunmayan ilaç miktarı vb. hesaplamalar için kullanılmıştır.

#### **4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA**

Bu çalışma kapsamında öncelikle lipozom eldesi gerçekleştirilmiştir. Lipozom oluşturulduğundan emin olduğunda altın nanopartiküllerin lipozom yüzeyine indirgeme işlemleri gerçekleştirilmiş ve optimizasyonu üzerinde çalışılmıştır.

Optimizasyon parametreleri altın nanopartiküllerin fototermal etkilerinin vücut sıcaklığının biraz üzerinde olan hafif hipertermi (39°–41°C) geleneksel hipertermi (42-45 °C) ve ablasyon (>50 °C) hipertermi değerleri ve lipozom yüzeyindeki stabilite ve dağılımı değerlerinin iyileştirilmesine göre belirlenmiştir. Artan altın tuzu ve indirgeyici ajan miktarı ve kaplanılan lipozom boyutu ile optik rezonans arasındaki ilişki tartışıldı ve literatürle karşılaştırıldı. Bu çalışmada daha sonra, altın kaplı lipozomlar lipozomlar ile kaplanarak pankreas kanserinde şu ana kadar en iyi terapötik etkinin görüldüğü FOLFIRINOX grubu ilaçlar ve bu ilaçların modelleriyle nanotaşıyıcı sistemden çoklu ve sıralı ilaç salım davranış ve kinetiği araştırılmıştır. Burada model ilaçlar ve 5-FU ve oxaliplatin ayrı ayrı, ikili veya üçlü ilaç grupları olarak kapsüllenmiştir. Sıcaklıkla indüklenen salım kinetiği ve hipertermi potansiyeli incelenmiştir.

#### **4.1. Lipozomların Hazırlanması**

##### **4.1.1. Lipidlerin ve Yöntemin Belirlenmesi**

Seçtiğimiz lipid bileşimleri lipozom sınıfı içerisinde sıcaklığa duyarlı kliniğe en yakın formülasyon gruplarını oluşturmaktadır. Termosensitif lipozomların ilk versiyonları, 16 karbonlu doymuş yağ asidi zincirlerine sahip bir fosfolipit olan ve 41°C'lik bir erime sıcaklığına (T<sub>m</sub>) sahip dipalmitoilfosfokolin (DPPC)'ye dayanmaktadır. Yatvin ve arkadaşları tarafından DPPC ile hafif HT aralığında terapötik özellikte lipozom oluşturan ilk kişilerdir. Daha sonra yapılan çalışmalar DPPC bazlı lipozomlar hipertermi ile kombinasyon halinde kullanıldığında tümör ekstrevasiyonunu artırıp terapötik etkinliği arttıran bir ilaç seviyesi elde edildiği görülmüştür. Termal doz ölçümlerine dayalı olarak, bu termosensitif lipozom formülasyonları, sağlıklı doku için önemli bir nekroz tehdidi oluşturan ısıtma koşulları gerektirmektedir. DPPC'nin diğer lipidlerle desteklenmesinin membranın geçirgenliğini artırabileceği düşünülmüştür. Mills ve arkadaşları ilaç salımının, çift tabakada artan ilaç çözünürlüğü nedeniyle basit bir geliştirmeden ziyade lizolipidler ile stabilize edilmiş nano gözenekler yoluyla meydana geldiğini göstermişlerdir. LTSL'de MPPC (monopalmitoilfosfotilkolin), MSPC (1-stearoyl-2-hidroksi-sngliserol-3-fosfokolin) gibi lizolipidler bu sınırlarda birikir ve

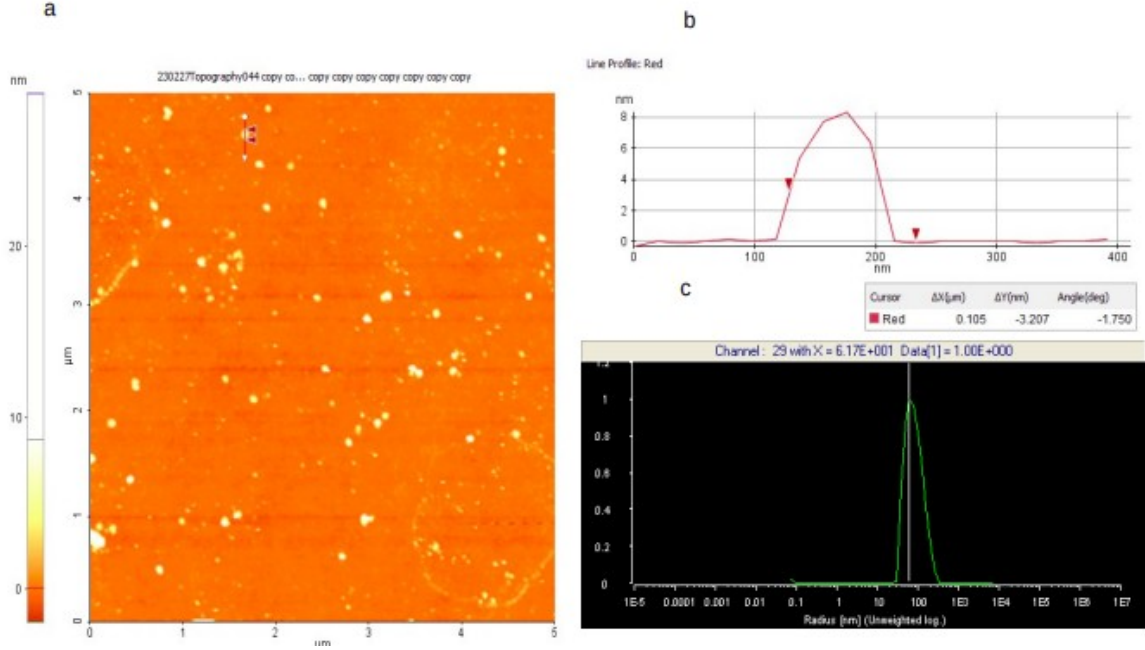
stabilize kusurlar oluşturarak ilaç salınımının artmasına neden olur. Lipid karışımlarını kullanmanın mantığı, çoklu lipid türlerinin mevcudiyetinin, bir nevi nano boyutta kusurlar oluşturarak gözenek artışına ve dolayısıyla geçirgenliğin artmasına yol açmasıdır. Dolayısıyla faz geçiş sıcaklığında membran sızıntısını kolaylaştırmak için MSPC ve kolloidal stabiliteyi artırmak için DSPE-PEG2000 dahil edilmiştir.

Kanser tedavisi için FDA onaylı nanotaşıyıcı bileşimlerin çoğu lipozomlara aittir. Özellikle kullanacağımız lipid bileşimlerinden biri olan L1 formülasyonunun hazırlama protokolü, Celsion'un ThermoDox 'unu mümkün olduğunca yakından taklit etmektedir. Bu lipid bileşimi 'PanDOX' adı altında pankreas kanseri için başlatılmış hipertermi çalışmalarını kapsamaktadır. Belki de FDA tarafından bu kadar onay almış taşıyıcı grubuna olan ilginin yetersiz kalması ve bu bileşimin Doxorubisin ilacı ile sınırlı bırakılmış olması kanser için kritik bir nokta olmuş olabilir. Sadece doxorubisin ile sınırlı kalmayarak bu bileşim ve diğer bileşimlerin daha çok çalışılması büyük önem arz etmektedir.

Literatürde ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmak üzere lipozomları hazırlamak amacıyla kullanılan çeşitli yollar mevcuttur. Bu tez çalışmasında, literatürde sıklıkla tercih edilen ince film hidrasyon yöntemiyle lipozomlar hazırlanmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi, eski ve güvenilir bir yöntem olup, lipid film oluşum aşaması ve hidratlama aşamasında ayrı ayrı hidrofobik ve hidrofilik ilaçların kapsüllenmesine olanak tanınması açısından avantajlıdır.

Çalışma kapsamında model ilaç taşıyıcı sistem sentezi olarak DPPC lipidi ile başlanmıştır. Model çalışmaya bu lipid ile başlanmasının sebebi aslında tez çalışmasında kullanılması hedeflenen MSPC, DSPC, kolesterol lipidleri ile oluşturulacak olan bileşimlere olan benzerliğinin taklididir. Tez çalışması kapsamında tercih edilen bu lipidler özellikle farmasötik ve biyomedikal uygulamalarda tercih edilen, biyouyumlu ve biyolojik ortamda parçalanabilen, FDA onaylı lipidlerdir. Lipozomlar, daha önce sıcaklığa duyarlı kontrollü salım sergilediği bir lipid bileşimi kullanılarak sentetik lipidlerden hazırlanmıştır; L1 lipozomumuz, dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), 1-stearoyl-2-hidroksi-sngliserol-3-fosfokolin (MSPC) ve dipalmitoilfosfatidiletanolamin- [N-metoksi (polietilen glikol)-2000] (DSPE-PEG2000, 86:10:4 molar oranında oluşturulmuştur. L2

lipozomumuz ise; dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), DSPC ve kolesterol lipitlerinden oluşmaktadır ve 59:39:2 M orandadır. Bu lipid bileşimlerine dayalı lipozomların sentezi, lipid kompozisyonları arasındaki erime noktası farklılığından faydalanılarak sıcaklığa duyarlı sıralı çoklu ilaç salımı yapan iç içe lipozomal bir taşıyıcı sistemin geliştirilmesi mantığına dayanır.



Şekil 4.1: DPPC vezikülün a AFM topografya görüntü b AFM çizgi profili ve c DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.

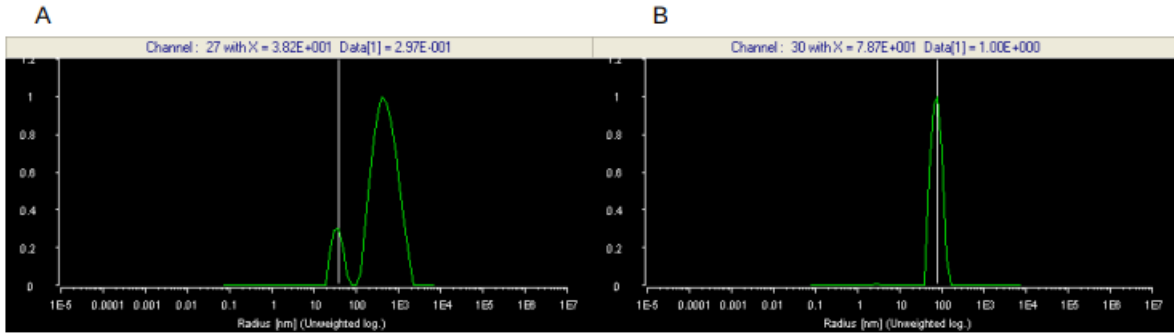
### 4.1.3. Lipozomların Karakterizasyonu

Şekil 4.1'a de görüldüğü üzere sonikasyon öncesi oluşan dispersiyon opak-bulutlu bir görünüme sahiptir. Sonikasyon (320W, 7saat) işlemi lipozom oluşumunun gerçekleşmesini sağlamıştır. DLS ile yapılan incelemede hazırlanan DPPC lipozomların hidrodinamik yarıçapları  $69.45 \pm 7.95$  olarak belirlenmiştir. Temiz bir cam yüzey üzerinde hazırlanan örneklerin AFM görüntüleri incelendiğinde ise yapıların küresel (globüler) geometrisi açık olarak görülmekle birlikte çapları  $111.4 \pm 9.5$  nm olarak belirlenmiştir. DLS'den elde edilen sonuçların hidrodinamik yarıçapın bir karşılığıdır ve her iki karakterizasyon yöntemi ile analizlenen sonuçların birbirlerini doğrular nitelikte olduğu görülmüştür.



Şekil 4.2: Lipozomların ekstrüde edilmemiş(üstteki) ve ekstrüde edilmiş(alttaki) çözelti renginin Hamilton şiringalarındaki görüntüsü.

Lipozomların hazırlanmasında sonikasyon ile enerji verilmesine ve dolayısı ile lipozomların oluşmasını sağlanmasının yanı sıra ekstrüzyon yöntemi de sıklıkla kullanılmaktadır. Ekstrüzyon yöntemi ile dar bir boyut dağılımında lipozom hazırlanabilmektedir. Şekil 4.4'te ekstrüzyon öncesi ve sonrası DPPC dispersiyonların görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 4.4: DPPC dispersiyonu DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.

Sonikasyon öncesi ve sonrası yapıların boyutları DLS ile de incelenmiştir. Sonikasyon sonrası lipozom yapıları oluşmakta ancak boyut dağılımları oldukça geniş olduğu Çizelge4.1'de görülmektedir. Ekstrüzyon işlemi sonrası ise dar bir boyut dağılımına sahip  $69.45 \pm 7.957$  nm yarı çaplı veziküllerin elde edildiği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.1: DPPC dispersiyonunun 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap değerleri.

Partikül	PDI	DLS, nm
DPPC-sonikasyon	0.49 ±0.02	40 ±6 352±107
DPPC-ekstrüzyon	0.143 ±0.035	69.5±8

#### 4.2. Lipozomların Yüzeyine Altın Nanopartiküllerin Kaplanması Altın Kaplı Lipozomların (AL) Karakterizasyonu

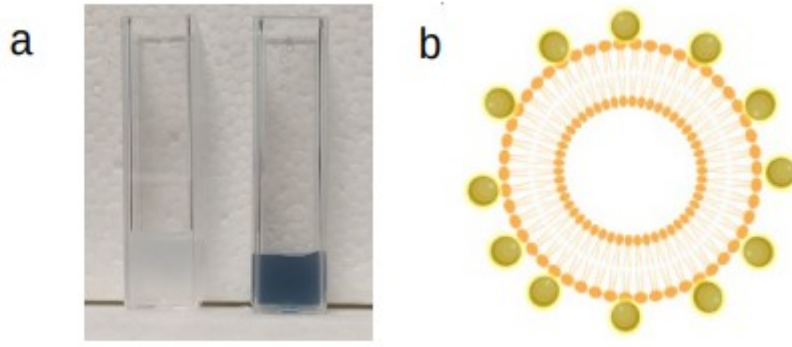
Oluşturulan unilamellar lipozom sistemi altın nanopartikül ile kaplanacaktır. Nanopartiküller, insan hastalıklarının tespiti ve tedavisi için umut vaat etse de toksisite ilaç kapsülleme ve salım kapasiteleri model çalışma olarak DPPC lipozomunun önce altın kaplanıp daha stabil ve erime noktası daha yüksek bir kompartmana dönüştürülerek tekrar DPPC lipozomuyla kaplanması ve bu erime noktası farkından yararlanılarak sıcaklığa duyarlı sıralı salım yapan çoklu iç içe bir taşıyıcı sistemin geliştirilmesi mantığına dayanır. Ayrıca fototermal terapi çalışmalarında altın nanopartikülün ayarlanabilir plazmon rezonans özelliği sayesinde etkili bir hipertermi tedavisi elde edilebilir. Tez çalışmasında kullanılması hedeflenen asıl lipidler ise farklı erime noktalarına sahip lipid kompozisyonlarının lipozomal sistemlerini içermektedir. Ardından oluşturulan bu unilamellar lipozom sistemi altın nanopartikül ile kaplanacaktır. Nanopartiküller, insan hastalıklarının tespiti ve tedavisi için umut vaat etse de toksisite potansiyel klinik çevirinin önündeki en büyük engel olmaya devam etmektedir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) insan vücuduna enjekte edilen ajanların, özellikle de teşhis ajanlarının, makul bir süre içinde tamamen temizlenmesini şart koşmuştur. Bu politika, tüm vücut klirensinin maruziyet eğrisi altındaki alanı en aza indirmesi açısından mantıklıdır. Ayrıca ajanın diğer tanı testleriyle etkileşime girme olasılığını da en aza indirir. Örneğin, nanoteknoloji literatüründe yaygın olarak kullanılan altın, kemikten bile 150 kat daha yüksek bir doğrusal zayıflama katsayısına sahiptir ve intravenöz olarak



enjekte edilen dozlarda, özellikle biriktiği karaciğer gibi organlarda, doğru bilgisayarlı tomografik (BT) taramayı muhtemelen engelleyecektir.[88] Bu arka planın karşısında nanopartiküllerin doğal stabilitesi yer almaktadır. Nitekim yakın zamanda yapılan bir çalışma, organik kaplamaya sahip kuantum noktalarının vücutta en az iki yıl boyunca tutulduğunu ve floresan kaldığını göstermektedir.[88] Klinik kullanım için önerilen birçok nanometre boyutundaki nano taşıyıcı sistemin ağır metaller içerdiği düşünüldüğünde, bu tür stabil partiküllerin onayı olası değildir ve böyle bir onay için gerekli olacak uzun vadeli toksisite çalışmaları, klinik çeviriyi caydırmaya devam edecektir. Toksikite ve vücut klirensi endişeleri göz önünde bulundurulduğunda çalışmada sentezlenmesi hedeflenen altın nanopartiküller;

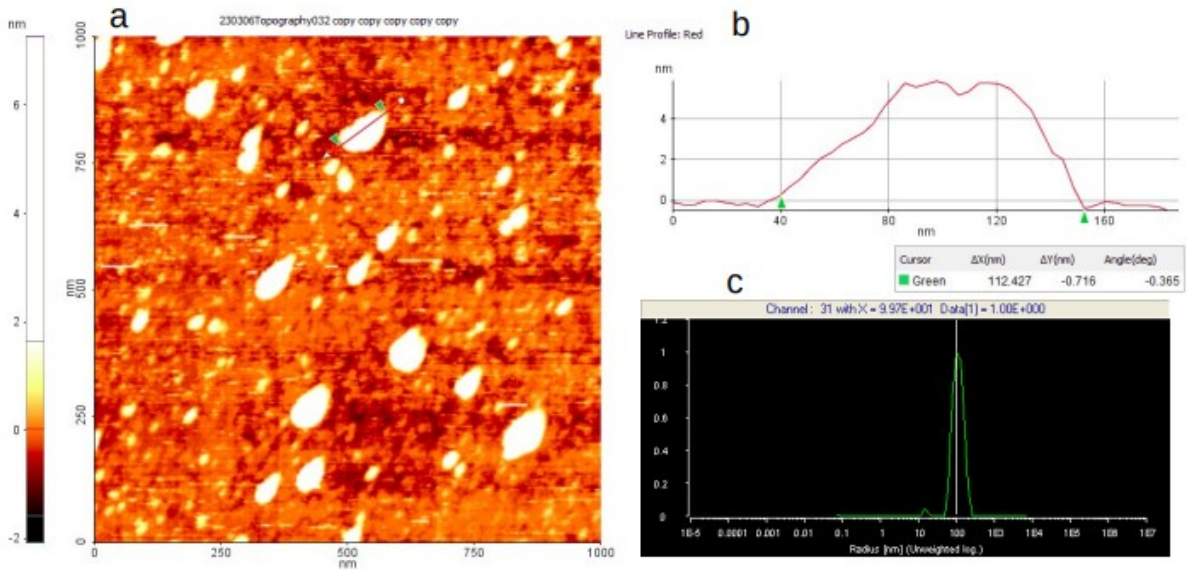
- 1) vücuttan tamamen atılmasına izin vermek için 3-5 nm boyutunda ve/veya
- 2) toksik olmayan bileşenlere sahip bir formülasyon ve/veya
- 3) temizlenebilir bileşenlere biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi özelliklere sahiptir.

Şöyle ki; sentezlenmesi planlanan lipozomal taşıyıcı sistem yüzeyinde altın nanopartiküller in situ reaksiyon yöntemiyle indirgenecektir. Bu sayede, 3-5nm boyut aralığına ve optik rezonans spektrumuna göre küresel ve 590nm'de pik vermesi beklenen bu partiküller, lipozomal yüzeye indirgendiğinde daha büyük bir altın nanopartiküler sistem gibi davranmakta ve literatüre göre kırmızı olması beklenen çözelti altın partikül çözeltisi mavi-yeşil renginde bir reaksiyon göstermektedir. Lipozomlara altın kaplama aşamasında; Altın nanopartiküllerin lipozom yüzeyine tutturulmasında iki ana yaklaşım kullanmak mümkündür. Bunlardan biri altın prekürsörlerin lipozom ile etkileşmesini sağlamak yüzeye adsorbe olan altın tuzunun eklenen indirgeyici ajan askorbik asitle indirgenmesini sağlar. Daha sonra indirgeyici ajanın eklenmesiyle yüzeyde indirgemenin gerçekleşmesi beklenmektedir. İkinci yaklaşım ise Au NP'lerin oluşturulması ve yüzeye elektrostatik hidrojen bağı, vanderwalls etkileşimleri gibi etkileşimlerle tutunması sağlanabilir. Bizim çalışmamızda bahsedilen birinci yaklaşım kullanılacaktır.



Şekil 4.5: a) DPPC lipozomu ve AL dispersiyon görüntüsü b) AL lipozomu şeması.

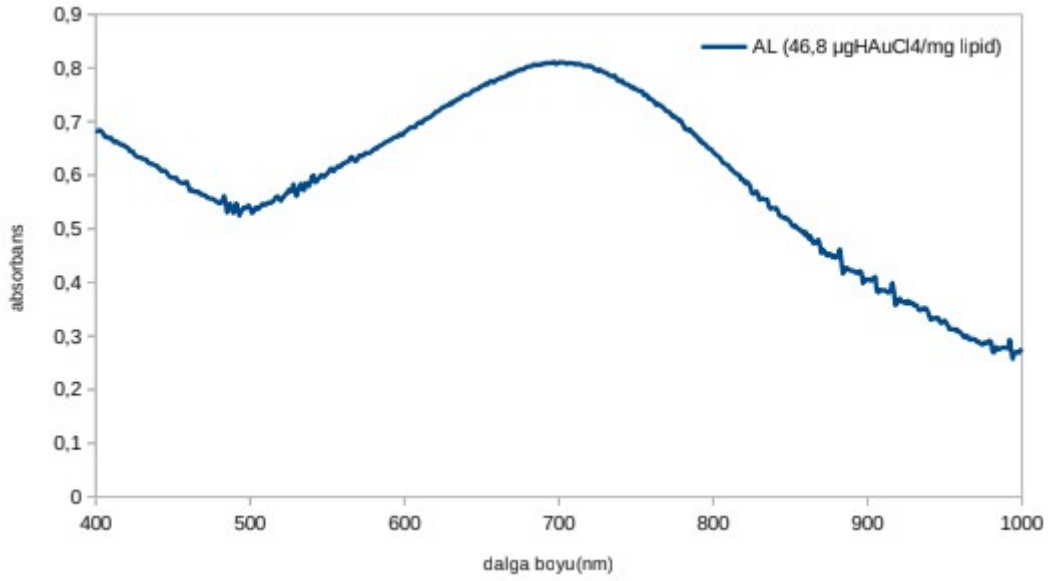
Spektral ayarlanabilirlik, altın kaplamanın katı metalik bir nano kabuk yerine destekleyici lipozomun yüzeyinde küçük metalik kümelerden oluşan bir kaplama oluşturduğunu göstermektedir. Bu nedenle, bu düzeneğin plazmon rezonansının



Şekil 4.6: AL vezikülünün a) AFM topografya görüntü b) AFM çizgi profili ve c) DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.

Lipozomal iskelenin stabilitesine bağlı olduğunu varsayıyoruz. Kendi kendini destekleyen katı metalik bir kabuk, lipozom bozulduktan sonra bile şeklini ve ilişkili optik özelliklerini koruması anlamına gelmektedir. Yapılan model çalışmalarda sadece

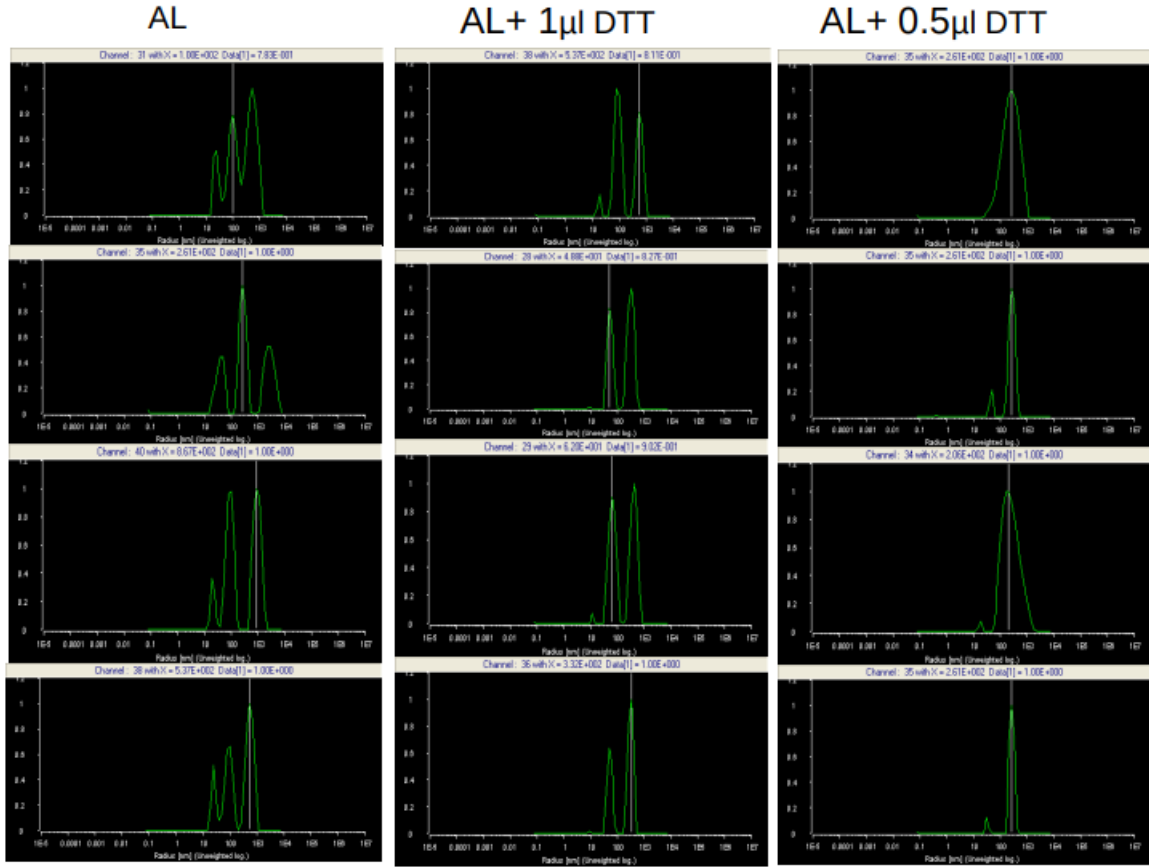
DPPC kullanılarak vezikül oluşturulmuş bu veziküllerin boyutları sonikasyonla  $39.9 \pm 5.7$ ,  $352.3 \pm 106.9$ nm ekstrüzyonla  $69.45 \pm 7.957$  civarında olduğu tespit edilmiştir. Bu veziküller  $39,04$ mg/ml altın tuzu ve  $88,06$ mg/ml indirgeyici ajan askorbik asit eklenmiş ve yüzeyde nanopartikül oluşumu takip edilmiş yapılar UV-vis spektroskopisi ve DLS ile karakterize edilmiştir. Altın kaplı lipozomların boyutları incelendiğinde ise DLS sonuçları sonikasyon yöntemiyle  $37 \pm 22.1$ ;  $366 \pm 184.6$  ekstrüzyon yöntemiyle ise  $78 \pm 32$ nm olarak belirlenmiştir. AFM analizlerinin sonuçları incelendiğinde ise lipozom boyutu  $130 \pm 33$ nm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.7: Altın kaplı lipozomların  $46,8 \mu\text{g HAuCl}_4/\text{mg lipid}$  oranında UV-vis spektrumu.

Daha sonra bu altın kaplı lipozomal taşıyıcı sistem, tiol grubu olan uygun konsantrasyonda DTT eklenerek daha stabil bir yapı halini alması beklenmektedir. Önce 1ml altın kaplı nanopartikül dispersiyonu başına  $0.5 \mu\text{l}$  ve  $1 \mu\text{l}$  DTT ile çalışılmıştır. AL çözeltisine  $0.5 \mu\text{l}$  DTT eklenmesi durumunda partiküllerin daha stabil ve monodispers boyut dağılımına sahip olduğu Şekil 4.7.'de görüldüğü üzere bu oranla çalışmalara devam edilmiştir. Çizelge 4.2'deki hidrodinamik yarıçap verilerine göre AL+ $1 \mu\text{l}$  DTT inkübesinde  $50.9833 \pm 26.544$ ;  $341 \pm 173.707$ nm aralığında partiküller elde edilmiştir.  $0.5 \mu\text{l}$  DTT eklenmesi durumunda bu boyut aralığı  $29.1 \pm 23.38$ ;  $239 \pm 44.337$ nm aralığına düşmüştür. Bu da  $1 \mu\text{l}$  DTT eklenmesi durumunda

partiküllerin aglomere olabileceğini düşündürmüştür ve bu yüzden 0.5µl DTT ile çalışmalara devam edilmiştir.



Şekil 4.8: Altın kaplı lipozomların farklı oranlarda DTT inkübesi sonucunda DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.

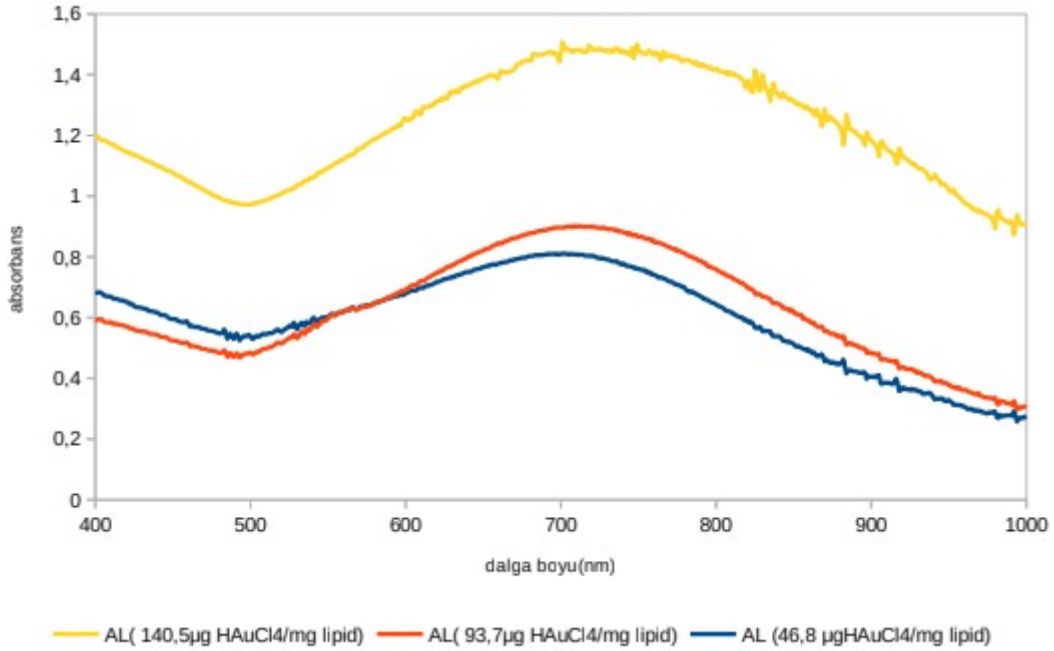
Çizelge 4.2: Altın kaplı veziküllerin farklı oranlarda DTT ile inkübe edilmiş DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçapları.

Partikül	PDI	DLS
AL	0.452 ±0.022	37 ±22.1 366 ±184.6
AL+1µl DTT	0.4718 ±0.0107	50.9833 ±26.544 341 ±173.707

AL+0.5µl DTT	0.3356 ±0.0218	29.1 ±23.38 239 ±44.337
--------------	----------------	----------------------------

#### 4.2.1. Altın Miktarının ve İndirgeyici Ajan Askorbik Asit Oranının Belirlenmesi

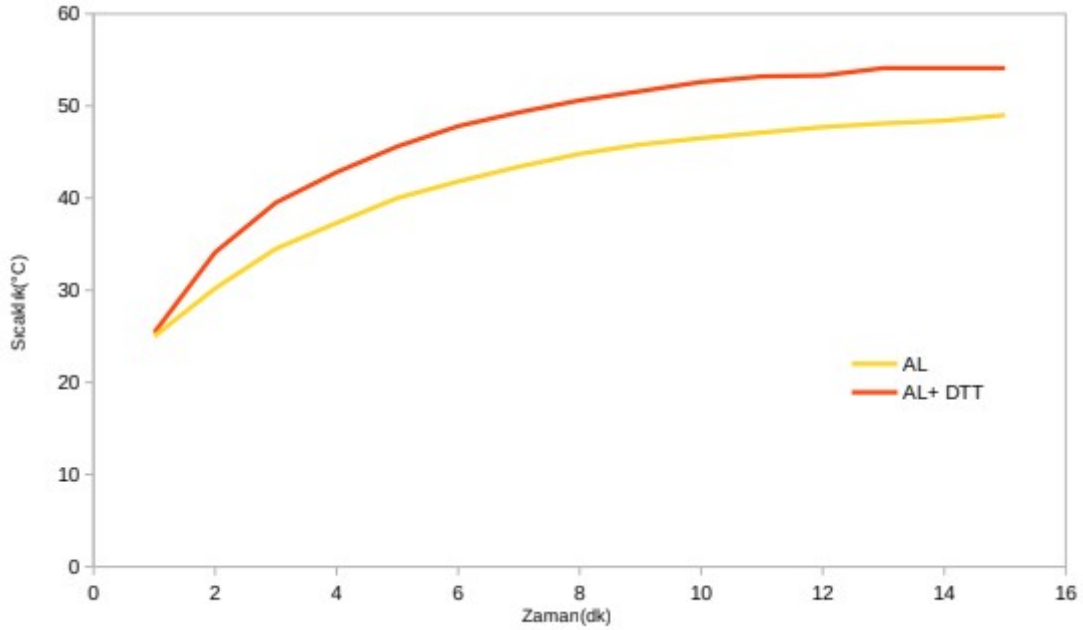
Lipozom yüzeyindeki altın nanopartiküllerin stabilizasyonunu sağladıktan sonra aurik klorür ve indirgeyici ajan askorbik asitin oranları hafif ve ablyasyon hipertermi aralığında fototermal terapi etkisi gösterebilmesi amacı ile optimize edilmeye çalışılmıştır. Bunun için öncelikle çalışmalarda farklı aurik klorür ve askorbik asit oranları ile başlanmıştır. DTT inkübesi ile fototermal etkiyi arttırdığı göz önünde bulundurulduğunda lipid başına 56.66µg/ml oranında aurik klorür ve 70.45µg/mL askorbik asit kullanılmaya karar verilmiştir. (Şekil 4.9)



Şekil 4.8: Farklı oranlarda HAuCl4/mg lipid UV-vis spektrumu.

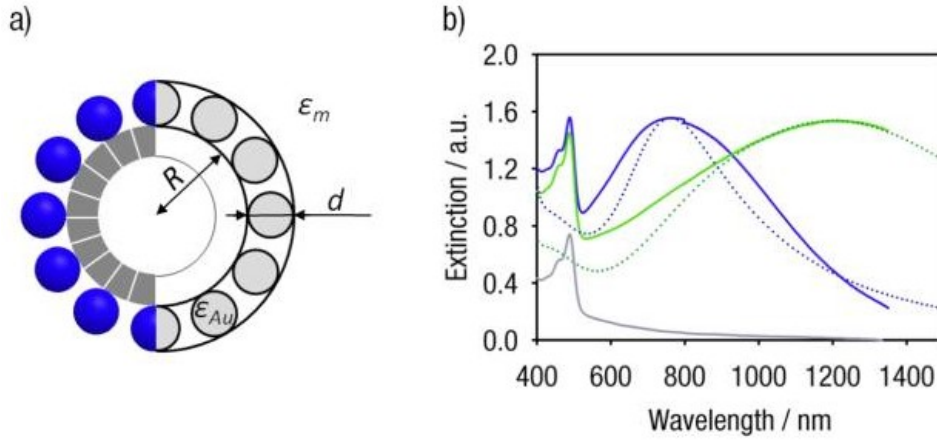
Öncelikle altın tuzu ve indirgeyici ajan askorbik asidin farklı oranlarıyla çalışılmıştır. Optik rezonans ve boyutları analizlenmiştir. UV-vis spektrofotometreleri ise en yüksek altın tuzu olan 140,5µg HAuCl4/mg lipid ise daha yüksek ve geniş bir pik ile sonuçlanmış ayrıca yapılan analizlerde piklerde beklenen yüksek dalga boylarında pikler görülmekle birlikte spektrumlarda kaymalar gözlemlenmiştir. (Şekil 4.8)

Buradaki spektrum kaymaları lipozom ve altın nanopartikül kaplama kalınlığının oranına göre değişmektedir. [88]



Şekil 4.9: Altın kaplı lipozomların (sarı eğri) ve DTT ile inkübe edilmiş altın kaplı lipozomların (kırmızı eğri) 15 dakika 1 W/cm<sup>2</sup> 808nm'de NIR uygulama ısınma grafiği.

Nano kabuklar büyüdüğünde, morötesi ve görünür aralıkta daha fazla ışık emerler. Büyümenin ilk aşamalarında nano kabuklar, ışık Emiliminde belirli bir tepe noktasına sahip çözültideki kırmızı altın partiküllere benzerler. Büyüdükçe bu tepe noktası hafifçe daha uzun dalga boylarına kayar. Büyüyen koloidal adsorbatlar birleşmeye ve nanoparçacık yüzeyinde adalar oluşturmaya başladıkça, bu tepe noktası, en boy oranları dağılımına sahip parçacıkların geniş bir omuz karakteristiğine dönüşür. Yani, rezonans piklerinin konumu ve boyutu ile emilen ve saçılan ışık arasındaki denge, nano kabuğun toplam boyutuna bağlıdır. Dolayısıyla, çekirdeğin kabuğa oranının yanı sıra, nano kabuğun gerçek boyutu da farklı dalga boylarındaki ışıkla nasıl etkileşime girdiğini etkiler. Bu aşamada, gözlemlenen ışık Emilimi, Mie ışık saçılımı teorisi ile açıklanır. (Şekil 4.10)



Şekil 4.10: A) Mie hesaplamalarında kullanılan altın kaplı lipozomların şematik modeli. B) Lipozom preparatlarının spektrumları.[135]

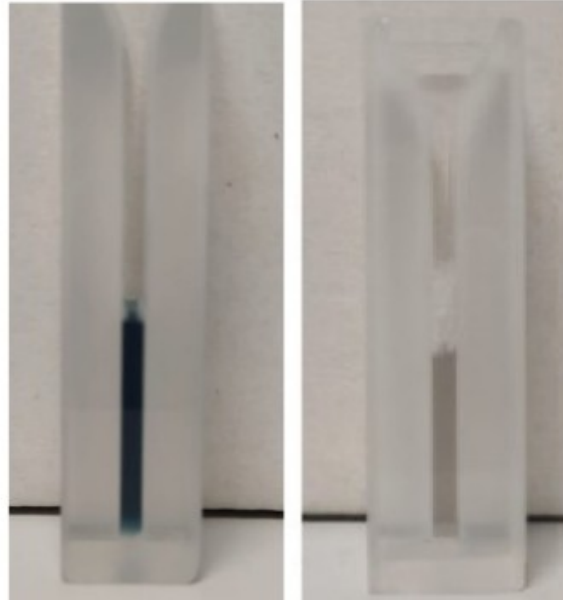
Çizelge 4.3: Farklı HAuCl<sub>4</sub> konsantrasyonlarına işleme tabi tutulan lipozomların DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçapları.

Partikül	PDI	DLS
AL (23,4µg HauCl <sub>4</sub> /mg lipid)	0.38 ±0.03	50.3 ±42.3
		359 ±96.54
AL (46,8µg HauCl <sub>4</sub> /mg lipid)	0.49 ±0.013	77 ±25
		456 ±200
AL (93,7µg HauCl <sub>4</sub> /mg lipid)	0.34 ±0.05	14.12 ±8.4
		70 ±28
		463 ±115
AL (140,5µg HauCl <sub>4</sub> /mg lipid)	0.36 ±0.06	22.5 ±5.23
		422 ±110.5

Çizelge 4.3'te görüldüğü üzere DPPC vezikül çözeltisine eklenen altın tuzu ve askorbik asit miktarı arttıkça AL vezikülünün boyut aralığı giderek artmıştır. Altın tuzu ve askorbik asit oranının artmasıyla birlikte boyut dağılımındaki ve UV-vis spektrumundaki anlamlı artış yüzeye indirgenen altın varlığını doğrular niteliktedir.

#### 4.2.2. Altın Kaplı Lipozomların Triton X-100 ile Bozulması

Lipozomu plazmon rezonant yapılar için destek olarak kullanmanın güzelliği, bozunma yetenekleridir. Bu özelliğin yararı, plazmon rezonans yapılarının in vivo kullanımını mümkün kılabilmesidir, oysa bu çekirdek yapı olmadan yakın kızılötesi aralığında rezonans oluşturmak için gerekli boyut, bunların böbrekler yoluyla vücuttan hızlı bir şekilde temizlenmesini engelleyecektir. Bu deney dizisinin amacı, altın kaplı lipozomların parçalanabileceğini doğrulamak, bu sistemdeki plazmon rezonansının lipozomun yapısıyla doğrudan bağlantılı olduğunu göstermek ve yüzeydeki altın parçacıklarının boyutuna dair kanıt sağlamaktır. Dispersiyona eklenen yüzey aktif madde, lipid çift katmanlı zarı kırar. Triton X-100, bu tür çalışmalar için yaygın olarak kullanılan iyonik olmayan yüzey aktif maddedir. Lipozomların 55°C'de 1 mL %20 Triton X-100 ile bir saatlik inkübasyonu, daha önce var olan solüsyondan optik yoğunluğun tamamen giderilmesi ile sonuçlanarak yapıların parçalandığını göstermektedir.

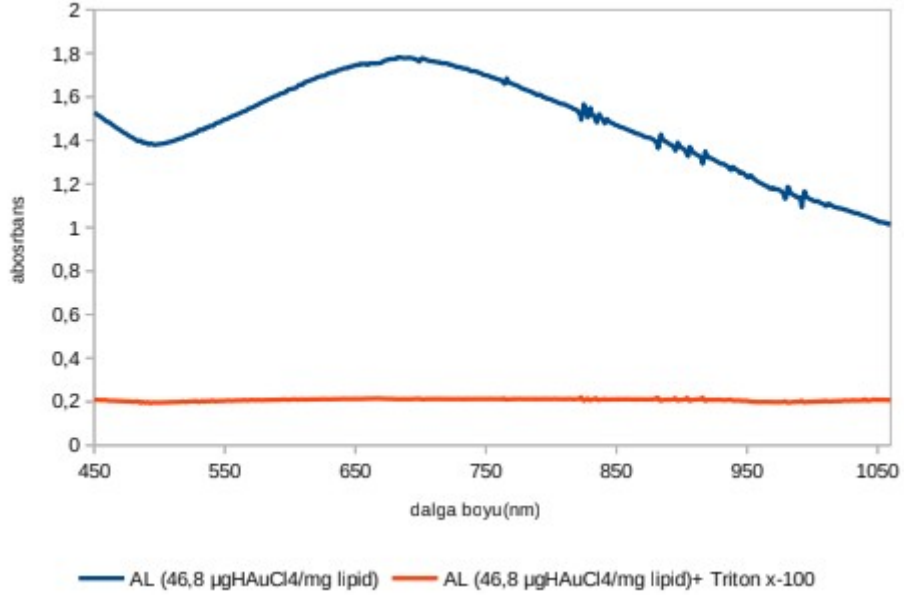


Şekil 4.10: AL (sol) ve Triton X-100 ile inkübe edilmiş AL (sağ) görüntüsü.

Altın kaplı lipozomların iyonik olmayan bir yüzey aktif madde olan Triton X-100 ile inkübasyon yoluyla çözünmesi, altın nano kabukların plazmon rezonans karakteristiğinin yanı sıra lipozomların kısa dalga boylu saçılma karakteristiğinin kaybıyla sonuçlanmıştır. (Şekil 4.11)

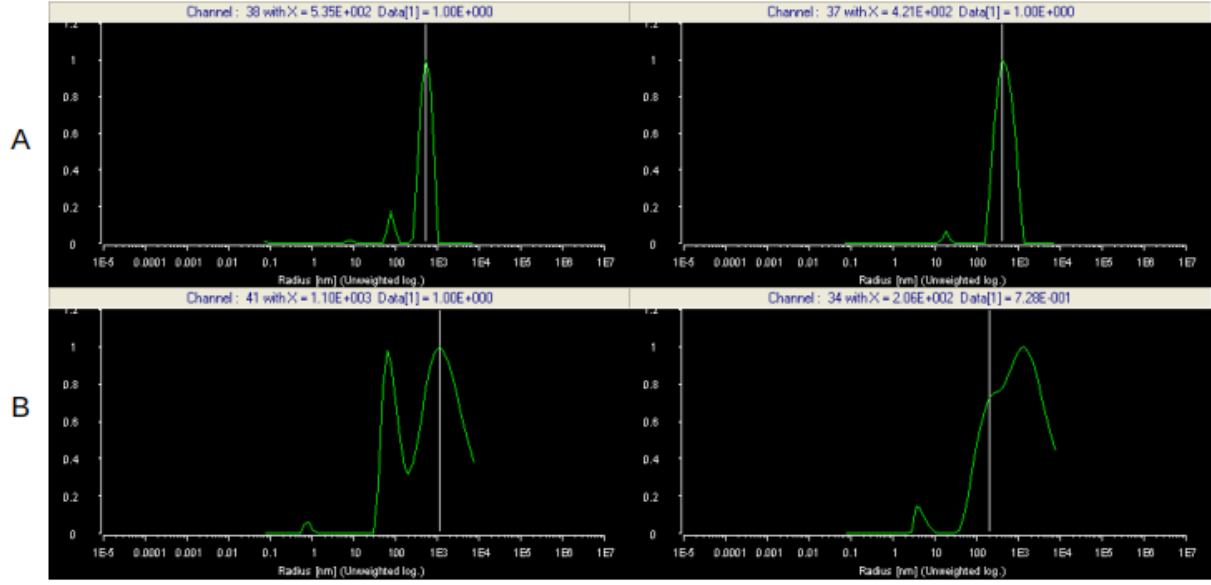


Görünür veya yakın kızılötesi aralıkta plazmon rezonansının olmaması, altının artık kabuk benzeri yapılarda organize olmadığını ve kalan altın nanoparçacıkların çapının tek nanometre mertebesinde olduğunu gösterir. (Şekil 4.11)



Şekil 4.11: Altın kaplı lipozom ve Triton X-100 ile inkübe edilmiş altın kaplı lipozomun UV-vis spektrumu.

Şekil 4.12'te Triton X-100 ile inkübe edilmiş altın kaplı lipozomların DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüleri ve Çizelge 4.4'te 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap değerleri yer almaktadır. Bu görüntüler sonuçlar incelendiğinde altın kaplı lipozomların 90°'deki hidrodinamik yarıçaplarının boyut dağılım pikleri yarıçapları daha küçük yapıların meydana geldiği görülmektedir. Bu da yapısal stabilitedeki bozulmanın bir göstergesidir.



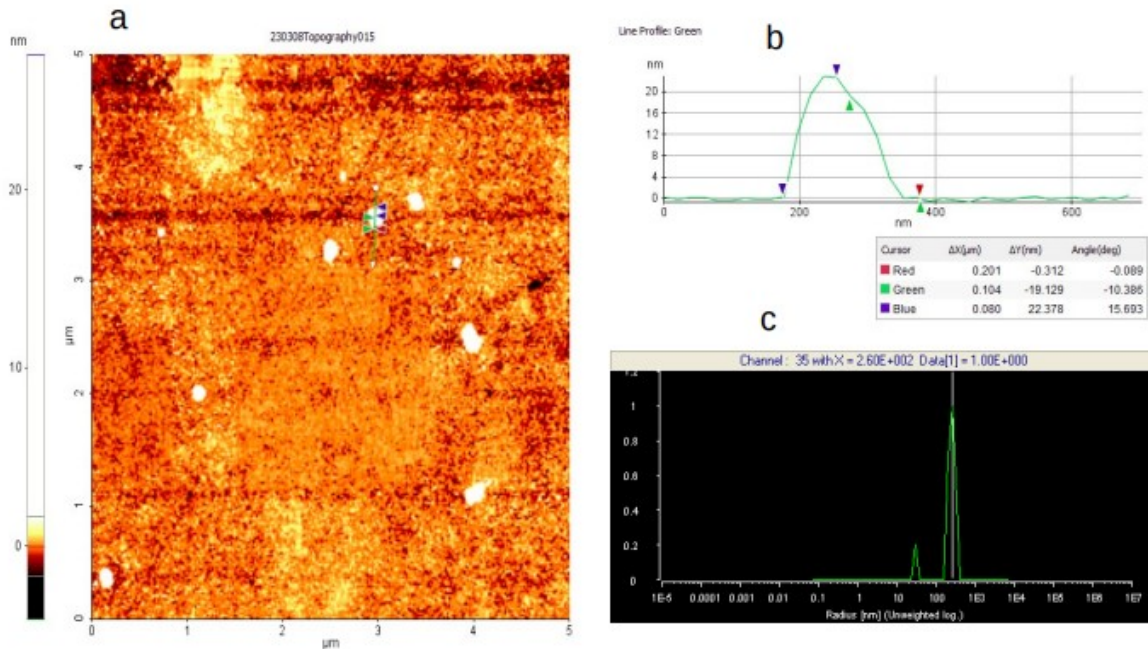
Şekil 4.12: Triton X-100 ile inkübe edilmiş altın kaplı lipozomların DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü. A) AL, B) AL+ Triton x-100

Çizelge 4.4: Altın kaplı vezikül ve Triton X-100 ile inkübe edilmiş altın kaplı lipozomların sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap tablosu

Partikül	PDI	DLS
AL (46,8µg HauCl4/mg lipid) lipozom	0.34 ±0.05	14 ±8 70 ±28 463 ±115
AL (46,8µg HauCl4/mg lipid) Triton x-100 lipozom	0.51 ±0.03	3.6± 0.5 60 ±32 203±88 805 ±203

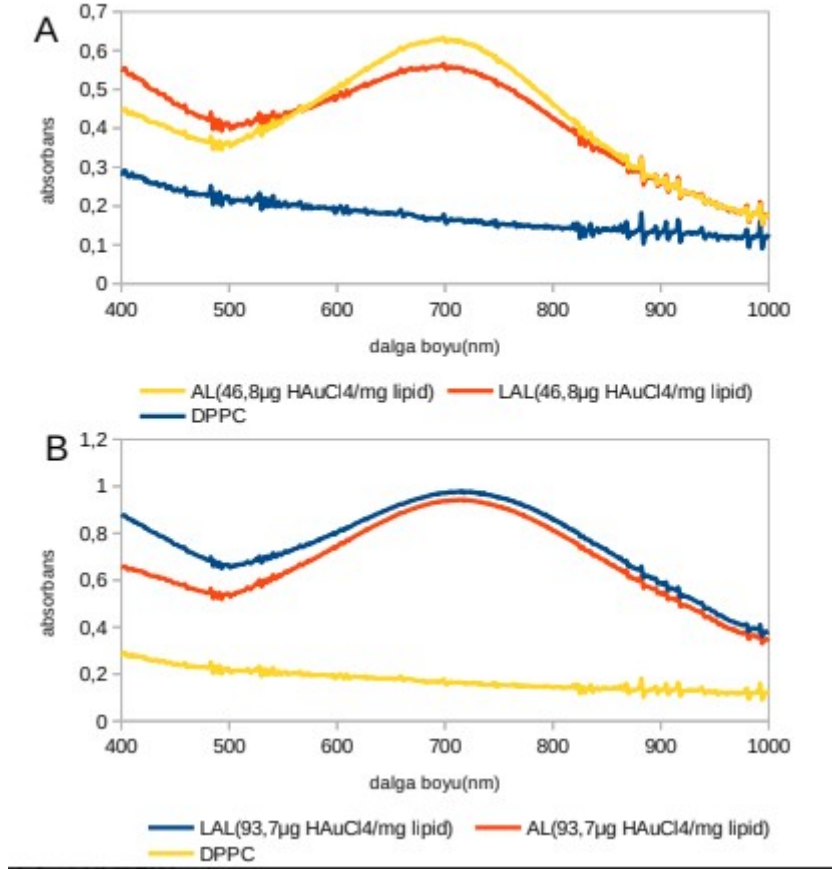
### 4.3. LAL

Model çalışma kapsamında DPPC(L) ile çalışılmıştır. Altın kaplı DPPC tekrar DPPC ile oluşan çift tabaka ile kaplanmıştır (iç içe vezikül). Tez çalışması kapsamında asıl çalışılması planlanan bileşimler ise; AL'yi tekrar çift tabaka ile kaplamanın daha stabil bir yapıya sahip olması beklenmektedir. Ayrıca Au inert ve biyouyumlu bir malzeme olarak kabul edilse de vücut sisteminde Au birikimi, kontrolsüz dağılımı önemli sağlık problemlerine yol açabilmektedir. Au NP'ler kısa dolaşım süresi nedeniyle düşük tümör hedefleme yeteneği, vücut sisteminde uzun süreli tutulma nedeniyle potansiyel toksisite ve biyolojik dağılımın invaziv olmayan değerlendirmesinin zorluğu gibi dezavantajları vardır. LAL bu yüzden de AL' den her bakımdan daha avantajlıdır.



Şekil 4.13: LAL lipozomlarının a) AFM topografya görüntüsü b) AFM çizgi profili, c) DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.

Lipozom kaplanmış altın kaplı lipozomların boyutları incelendiğinde ise DLS sonuçları ortalama  $241.7 \pm 38,2$  olarak analizlenmiştir. AFM analizlerinin sonuçları incelendiğinde ise  $216 \pm 22 \text{nm}$  olarak analizlenmiştir. DLS ve AFM ile analizlenen partikül boyut değerlerinin birbirini doğrular nitelikte olduğu görülmektedir. (Şekil 4.13)



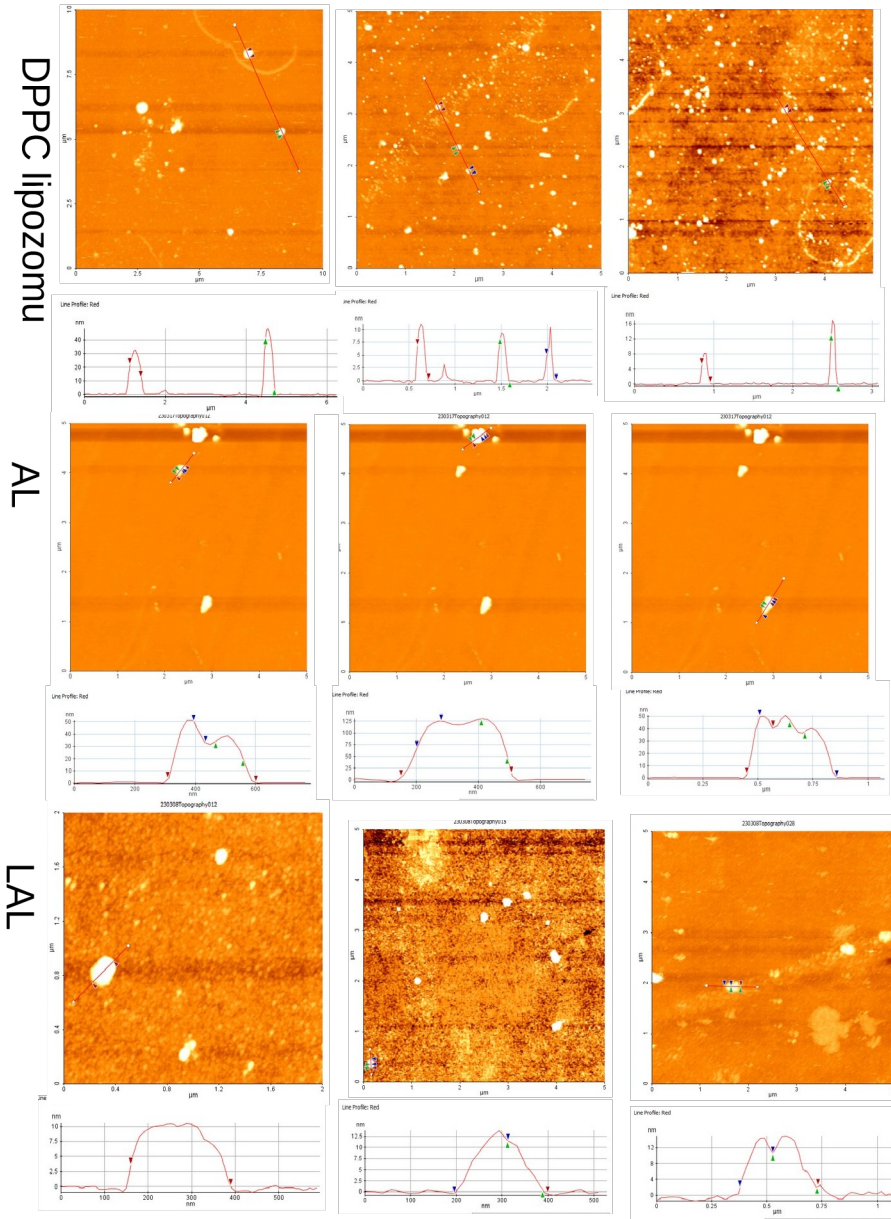
Şekil 4.14: DPPC, AL ve LAL UV-vis spektrumları A) 46,8µg HAuCl4/mg lipid B) 93,7µg HAuCl4/mg lipid

Çalışma kapsamında farklı oranlarda LAL oranlarında denenmiştir. Şekil 4.14'te DPPC, AL ve LAL UV-vis spektrumlarında da görüldüğü gibi DPPC ve LAL piki daha yüksek absorbans değerinden başladığı görülmektedir. AL 'nin daha aşağıdan başlayan piki ise lipozom yüzeyinde altın indirgenme işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğinin ayrıca LAL 'in de başarılı bir şekilde oluştuğunun bir göstergesidir.

Hazırlanan lipozomların DLS analiz sonuçları Çizelge 4.5'te sunulmuştur. Bu sonuçlarda farklı konsantrasyonlarda kloroaurik asit kullanılarak hazırlanmış AL'lerden oluşturulan LAL 'lerin 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap değerleri görülmektedir. Kullanılan Kloroaurik asit oranı arttıkça hidrodinamik yarıçap değerleri artmaktadır.

Çizelge 4.5: LAL 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap boyut değerleri.

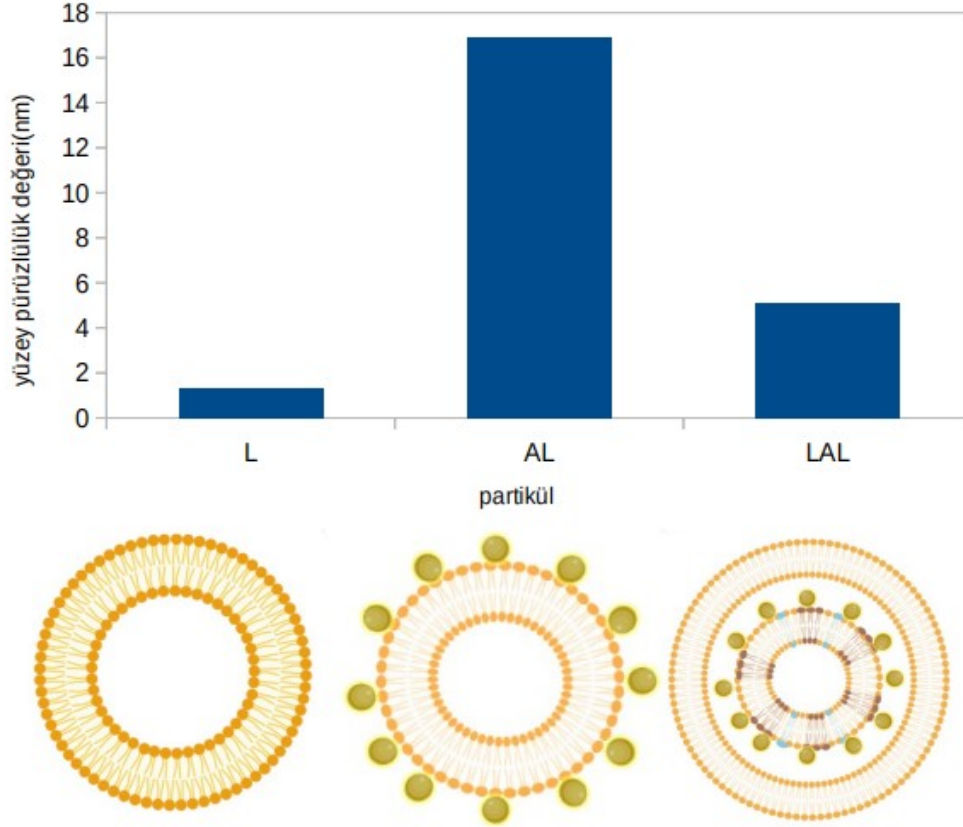
Partikül	PDI	DLS (nm)
LAL (23,4µg HauCl4/mg lipid)	0.42 ±0.023	28 ±14 251 ±30.2
LAL (46,8µg HauCl4/mg lipid)	0.51 ±0.02	81.23 ±48 537 ±342.2
LAL (140,5µg HauCl4/mg lipid)	0.5 ±0.03	20 ±12 162 ±77 776 ±183



Şekil 4.15: DPPC, AL ve LAL AFM topografya görüntüsü ve çizgi profilleri.

DPPC lipozomu, altın kaplı lipozom (AL) ve lipozom kaplanmış altın kaplı lipozomların (LAL) şekil4.15'te görülmektedir. 'Çizgi Profilleri' de şekillerin hemen ardından verilmiştir. Bu profiller arasında bir karşılaştırma yapıldığında; lipozomun ve LAL 'in profillerinin AL profillerine kıyasla daha pürüzsüz olduğu görülmektedir. AFM statik değerlerinden biri olan ve yüzey pürüzlülüğünün bir karşılığı olan Ra ortalama değerleri lipozom için  $1.3 \pm 1$ , AL için  $16.88 \pm 2.3$ , LAL için  $5.1$

$\pm 2.3$  nm aralığındadır. Bu değerler arasındaki ilişkiden de görüldüğü üzere yüzey pürüzlülüğü altın kaplı lipozomda daha fazladır. Lipozom kaplama ile de düşmektedir. Bu da bu üçlü kompartmanın oluşturulduğuna dair bir kanıt sağlamaktadır.



Şekil 4.16: DPPC lipozomunun, AL ve LAL 'in yüzey pürüzlülük bar grafiği ve şematize görüntüsü.

Altın kaplama işlemi yüklü lipozomların boyutunu veya zeta potansiyelini önemli ölçüde değiştirmemektedir. Tüm numunelerin ölçülen zeta potansiyeli oldukça düşük olup mutlak değeri 1 mV veya altındadır; DPPC vezikülü 6.51mV zeta potansiyel değerine sahiptir. AL 'de 0.69 mV' luk düşük zeta potansiyeli gözlenmiştir ki bu, çıplak Au NP'lerin- 20 ila 40 mV arasında değişen düşük zeta potansiyeline sahip olması nedeniyle lipozoma başarılı Au kaplamasının dolaylı kanıtı olabilir. (Şekil 4.16) AL bir lipozomal katman daha kapladığında, dış lipozomal katmanın zeta potansiyeli 2.12 mV' a yükselmiştir. Literatürdeki diğer potansiyel değerleriyle birlikte tekrar lipozom kaplandığını destekler niteliktedir.

#### 4.4. Stabilite Çalışmaları

AL ve LAL sentezlendikten üç ay sonra DLS ile tekrar analiz edilmiş ve sentezlendikten sonraki analiz değerleriyle karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.6: AL ve LAL üç ay sonra 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap boyut değerleri.

Partikül	PDI	DLS	Sentezden 3 ay Sonra, PDI	Sentezden 3 ay Sonra, DLS
AL (46,8µg HauCl4/mg Lipid)	0.34 ±0.05	14±8 70±28 463 ±115	0.5±0.01	29±12.14 67 ±18 183 ±72 500 ±194
LAL (46,8µg HauCl4/mg Lipid)	0.51 ±0.02	81 ±48 537 ±342	0.5±0.09	54±40.34 242±60.34 570±162

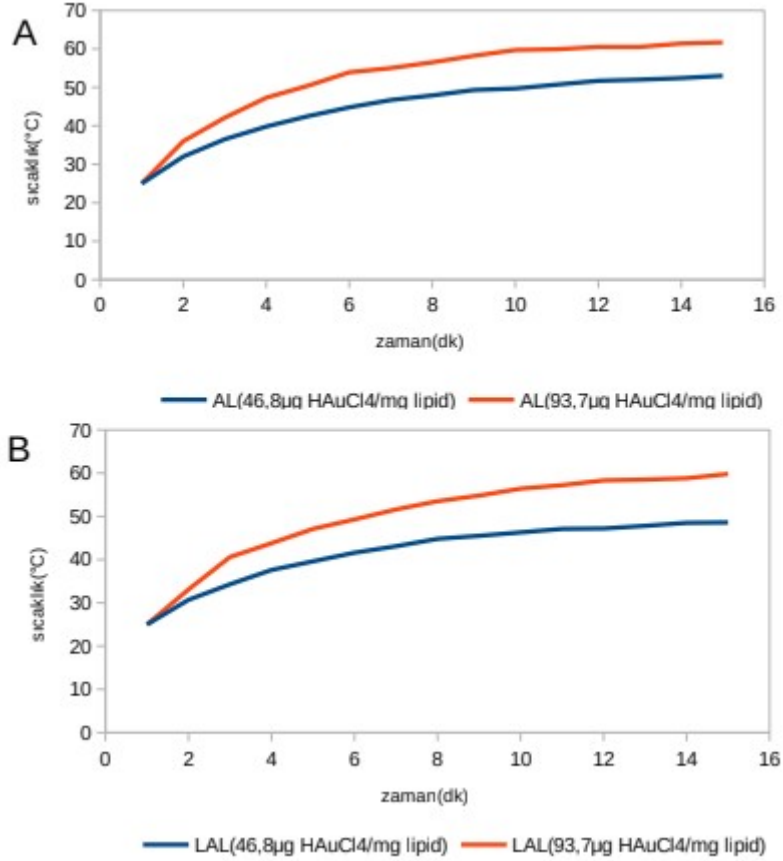
Çizelge 4.6'da verilen değerlere bakıldığında, AL için hidrodinamik yarıçapta %7,99'lik bir artış gözlemlenmiştir. LAL' de ise %5,95'lik artış hesaplanmıştır. Burada AL' de fazla artış olmasının sebebinin altın nanopartiküllerin çökme eğilimidir. Burada LAL 'de AL 'ye oranla daha düşük hidrodinamik yarıçap artışı ise altın nanopartiküllerin tekrar lipozom kaplanmasıyla birlikte daha stabil hale geldiğinin bir göstergesidir. Yapılan bir çalışmada altın kaplı lipozom stabilitelerinin eklene altın miktarına bağlı olduğu görülmüştür. Lipozom yüzeyine indirgenen altın miktarına bağlı olarak çökelmeyi hızlandırdığı düşünülmüştür. Partiküllerimizde boyut artışı ve stabilite değerlendirmesi literatürle uyumlu bulunmuştur. [88]

#### 4.5. Fototermal Etki ve Fototermal Verimliliklerinin İncelenmesi

İlaç taşıyan bir altın nanopartiküle NIR uygulamak, terapötik kargonun salınımını tetiklemek için etkili bir yol olabilir. Çalışmanın bu aşamasında farklı oranlarda AL ve LAL partiküllere fototermal terapi uygulanmış ve LS ve UV-vis spektrofotometresi ile değişiklikler takip edilmiştir.

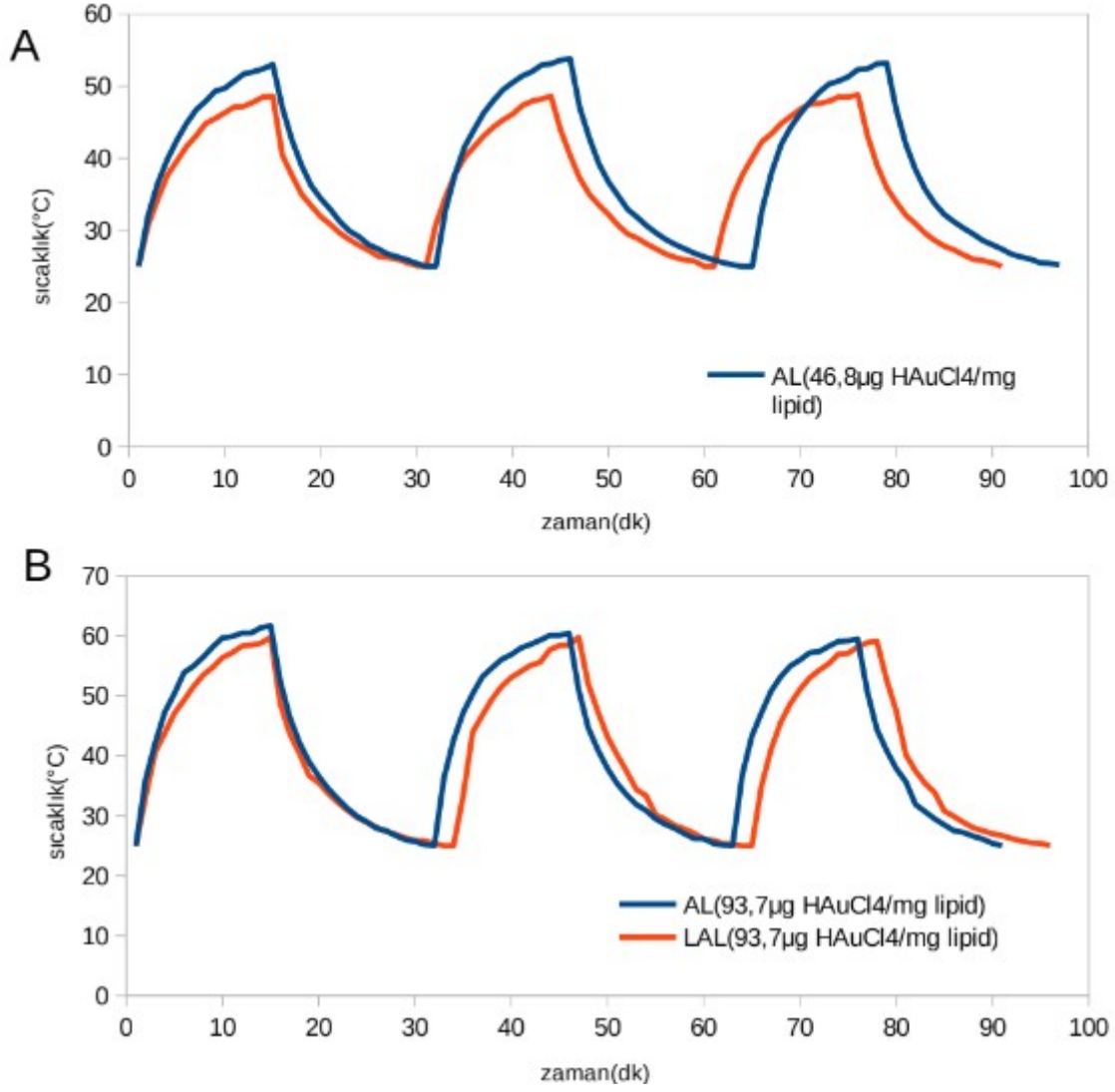


Hem AL hem de LAL 500 nm'den başlayan ve 900 nm'de pik yapan geniş bir absorbands bandına sahiptir. Şekil 17' de AL ve LAL 'in 15 dakika boyunca 1 W/cm<sup>2</sup> 808 nm lazer ışınlaması altında sıcaklık artışı etkili fototermal dönüşüm yeteneklerine sahip olduğunu göstermiştir. LAL ve AL çözeltilerinin sıcaklıkları 15 dakika boyunca sırasıyla 25 °C'den 45.6 ±4,8 °C'ye ve 53±0,8 °C'ye yükselmiştir.



Şekil 4.17: AL ve LAL 'in fototermal etkisi. 15 dakika boyunca 1 W/cm<sup>2</sup> güçte 808 nm lazer ışınımı altında AL ve LAL 'in fototermal etkisinin değerlendirilmesi. A) 46,8 µg HAuCl<sub>4</sub>/mg lipid B) 93,7 µg HAuCl<sub>4</sub>/mg lipid

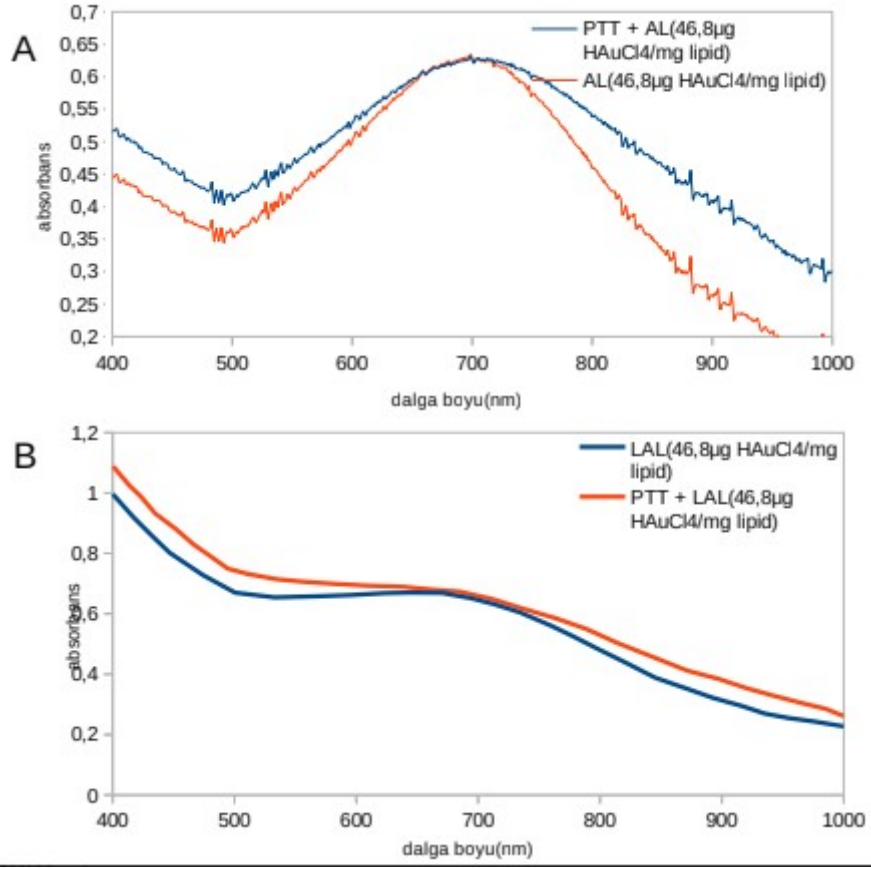
AL ve LAL fototermal dönüşümde benzer şekilde etkili olmuştur. Ayrıca fototermal etkinin LAL çözeltisindeki Au konsantrasyonu ile orantılı olarak arttığını gözlemledik. (Şekil 4.17) Hem AL hem de LAL, lazer ışınlama açma/kapama döngüsünün üç tekrarı sırasında kararlı sıcaklık artışı göstererek pratik uygulamalarda tek enjeksiyonla birden fazla PTT kürü için kullanılabilir. (Şekil 4.18)



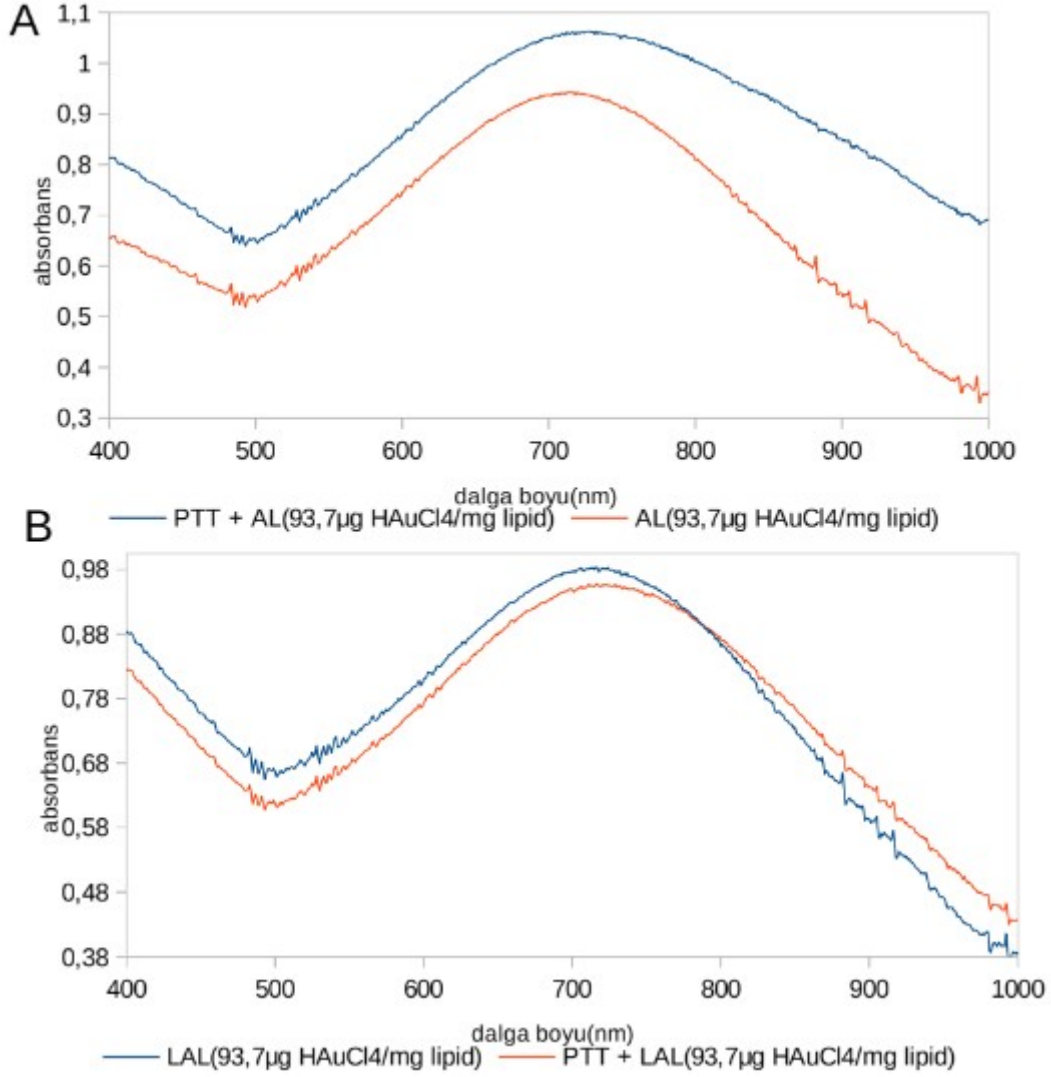
Şekil 4.18: Lazer açma/kapama döngüsünün 3 tekrarı sırasında AL ve LAL'nin termal kararlılığının doğrulanması. A) 46,8µg HAuCl4/mg lipid B) 93,7µg HAuCl4/mg lipid

Lazer ışınlamasından sonra hiperterminin nano sistem üzerindeki etkisi UV-vis spektrofotometresi, DLS ile değerlendirilmiştir. 15 dakikalık ışınlamadan sonra nano sistem, ışınlama yapılmayan nano sisteminkine kıyasla daha yüksek yoğunlukta bir NIR absorpsiyon spektrumu göstermiştir. Boyut dağılımı, ışınlamadan sonra nanoparçacık popülasyonunda bir değişiklik göstererek daha yüksek polidispersiteye sahip bir dağılım ve daha küçük boyutlarda nanoparçacık popülasyonu oluşturmuştur. UV-vis spektrofotometresi ve DLS'den elde edilen bu sonuçlar, altın nanopartiküler tabanlı bu nano sistemlerin, muhtemelen NIR aydınlatması sırasında

AuNP'nin maruz kaldığı lokalize yüksek sıcaklıkların ve fiziksel olayların etkisiyle altın nanopartikül ayrışmasına uğradığını gösterebilir. (Şekil 4.19)



Şekil 4.19: Lazer ışınlamasının 46,8µg HAuCl<sub>4</sub>/mg lipid oranına sahip AL, LAL lipozomlarında UV-vis spektrumu.



Şekil 4.20: Lazer ışınlamasının 93,7µg HAuCl4/mg lipid oranına sahip AL, LAL lipozomlarında UV-vis spektrumu etkisinin değerlendirilmesi.

Şekil4.20’de görülen mavi eğri LAL PTT öncesi ve mavi eğri ise LAL PTT sonrası lipozom dispersiyonlarına ait spektrumlardır. Absorbans değerinde artış görülmüş bunun ise lipozom üst katmanının kısmen bozunması ve dışarıya serbest altın partikülleri çıkması olarak yorumlanmıştır. Yine LS sonuçlarına da bakıldığında LAL partiküllerin PTT öncesi boyut dağılımının  $81.23 \pm 48$ ;  $537 \pm 342.2$  PTT sonrası ise  $28.41 \pm 8.216$ ;  $264.2 \pm 65.881$  boyutlarda daha küçük partiküller meydana gelmiştir bu da dış katmanın bozulduğunun diğer bir göstergesidir. Şekil 4.19 ve 4.20 karşılaştırıldığında absorbans spektrumundaki değişimin 46,8µg HAuCl4/mg lipid oranındaki lipozomda daha stabil kaldığı görülmektedir.

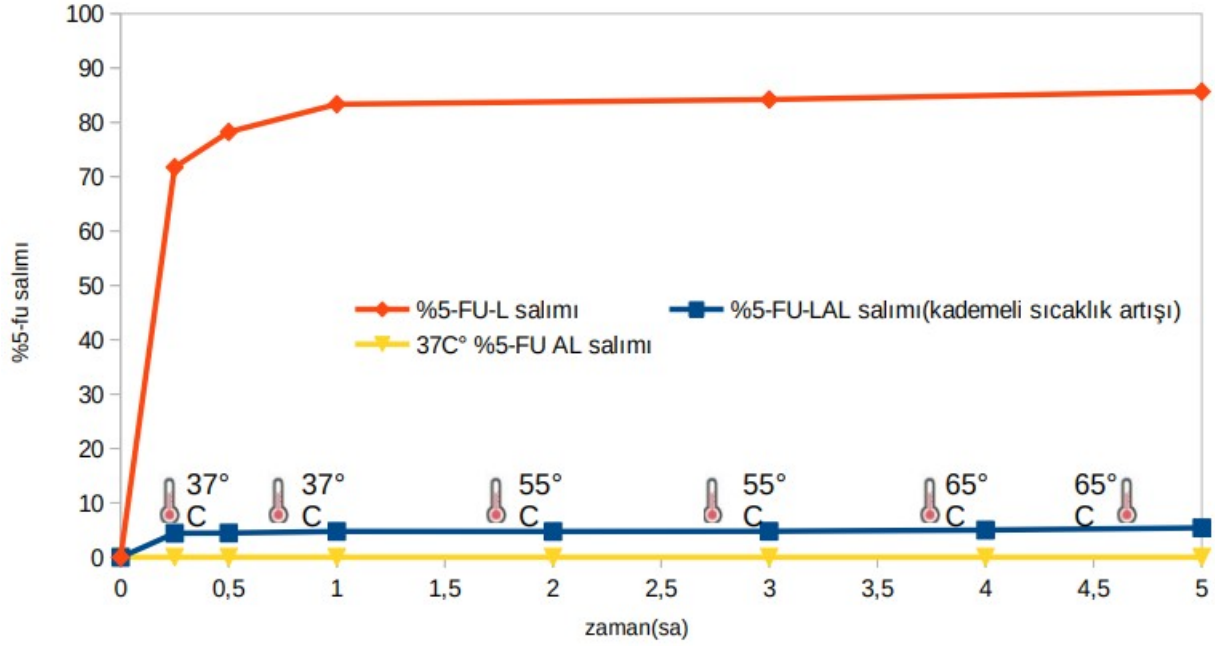
#### 4.6. Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemin Enkapsülasyon ve Salım Özelliklerinin İncelenmesi

Yüksek ilaç yüklemesi ve ilaçların kontrollü salınımı, biyoyararlanımı iyileştirdiği ve ilaçların normal dokulara toksisitesini azalttığı için ilaç yüklü nanopartiküllerin avantajlarıdır. İlaç yüklü LAL ve L1AL2 taşıyıcı sistemleri 5-Fu, oxaliptatin, Resveratrol ve Rhodamine b karakteristik absorpsiyon bantlarına sahip olduğundan, ilaçların LAL ve L1AL2'lerde başarılı bir şekilde kapsüllendiğini yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri ile doğrulanmıştır. Daha sonra ilaç enkapsülasyon verimleri incelenmiş ve sonuçlar hibrit LPNP'lerin hidrofilik ve hidrofobik ilaçların birlikte dağıtımını için etkili olduğunu, özellikle Resveratrol' ün enkapsülasyon verimliliğinin %92'ye kadar çıkabileceğini ve 5-Fu ve Oxa ve Rhodamine b'nin en yüksek enkapsülasyon verimliliklerinin sırasıyla %49, %46, %36,7 olduğunu göstermiştir. İlaç yüklü LAL ve L1AL2 boyut dağılımını DLS ile analiz edilmiştir.

- I. 5-Fu ve RES içeren AL'ler
- II. 5-Fu, RES ve Oxa içeren LAL'ler
- III. 5-Fu ve RES içeren AL2'ler
- IV. 5-Fu, RES ve Oxa içeren L1AL2'ler

İlaç taşıyıcı sistemlerin salım çalışmaları, sıcaklıkla indüklenen ve NIR'la indüklenen olarak ikiye ayrılmıştır. Sıcaklıkla indüklenen salım çalışmaları 37°C'den 65°C'ye kadar yükseltilerek 0.25, 0.5, 1,2,3,4,5,6,24,48 zaman noktalarında örnekler alınarak salım profili elde edilmiştir.

Salım çalışmalarına 5-fluorourasil ile başlanmıştır. 5-Fluorourasil LAL kompozit malzememizde ilk lipozomun hidrofilik sulu çekirdek kısmında bulunmaktadır. Kapsüllemek için DPPC lipit filmi ile hidratlanmakta daha sonra bu lipozomun yüzeyine altın nanopartiküller indirgenmektedir. 5-FU kapsüllenmiş AL lipozomu hazırlandıktan sonra tekrar DPPC lipit filmi oluşturulmakta ve bu lipit filmi 5-fu kapsüllenmiş AL dispersiyonu ile hidrate edilmektedir.



Şekil 4.21: 5-Fluorourasilin DPPC lipozomu, AL ve LAL'deki salım profilleri.

1. İlk olarak DPPC lipozomumuzun hidrofilik sulu bölümünde kapsüllenmiştir.
2. Tutunmayan ilacın hesaplanabilmesi için 4°C'de PBS (7.2) ortamında altmış dakika boyunca diyaliz edilmiştir.
3. Tutunmayan ilaç miktarı eşitlik 3'e göre %EE=37 olarak hesaplanmıştır.

DPPC vezikülümüzden yapılan salım çalışmamızın ardından 5-fu kapsüllenmiş veziküllerimizin yüzeyine altın indirgeme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 5-fu-AL taşıyıcı sisteminin hazırlığının ardından;

- 4.. 4°C'de PBS (7.2) 'de altmış dakika boyunca tutunmayan ilacın hesaplanması için diyaliz edilmiştir. (Kaplanmanın her adımında sistem bu şekilde tutunmayan ya da o anda sızıntı olabilecek herhangi bir ilaç miktarını göz önünde bulundurularak diyaliz edilerek çalışma gerçekleştirilmiştir.)

5. %EE= 29,25 hesaplanmıştır.

6. Daha sonra 1ml lik 5-fu-LAL çözeltilerimizi 37°C'de salıma tabi tuttuk. (Sarı çizgi) 5-FU-L salım profiline göre salımın yüzeye altın nanopartikül indirgeme işlemi ile yavaş hatta yok denecek kadar az olduğunu Şekil 4.21'de görülmektedir. Buradan vezikül yüzeyine altın nanopartikül indirgenmesiyle birlikte taşıyıcı sistemin erime

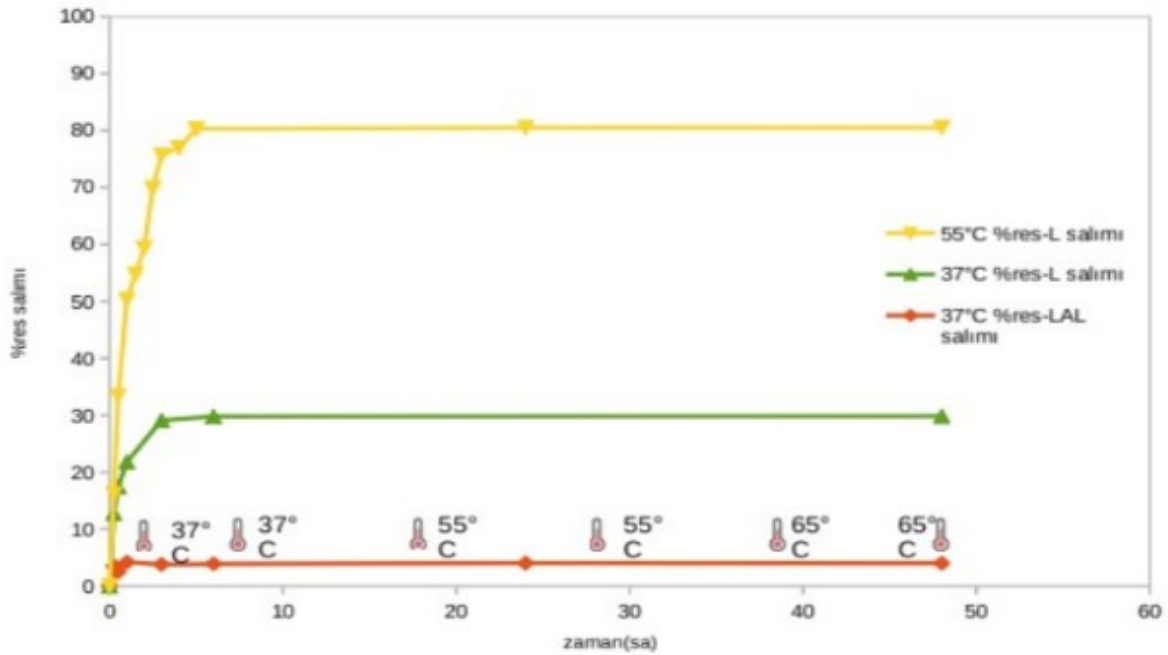
sıcaklığının yükseltebileceği düşünülmüştür. Daha sonra 5-FU-AL vezikülümüzün ile DPPC lipit filmi hidrate edilmiştir.

7. Bu çalışmalarımızın ardından salım çalışmaları için öncelikle 4°C'de PBS (7.2) 'de altmış dakika boyunca tutunmayan ilacın hesaplanması için diyaliz edilmiştir.

8. 5-FU %EE= %38,2 olarak hesaplanmıştır.

9. 1ml lik 5-FU-AL çözeltilerimizi 37°C'de salıma tabi tuttuk. Salımın 3.saatinden sonra sıcaklığı 55°C'ye yükselttik ve 37°C'de gerçekleştirilmiş 5-FU-AL salım profiline göre salımın aslında sıcaklıkla kontrol edilebileceği Şekil4.21'de salım profilinde görülmektedir.

Çalışmada kullanılan diğer moleküllerden biri resveratroidir. Resveratrol hidrofobik ilaç olarak kullandığımız model ilacımızdır.



Şekil 4.22: Resveratrol DPPC lipozomu, AL ve LAL'deki salım profilleri.

1. Resveratrol kapsülleme çalışmalarımız için öncelikle DPPC lipit filmi elde edilirken organik çözücü ile çözündürülerek lipit film oluşturulmuştur. Daha PBS (7.2) ile hidrate edilmiştir. Bu aşamadan sonra;

2. 1ml RES kapsüllenmiş DPPC vezikülümüz 4°C'ye karşı %3 tween 80 10 ml PBS (7.2) içinde diyaliz edilmiştir ve tutunmayan kısım hesaplanmıştır.

3. %EE= %86'dı.

4. Bu aşamayı takiben 37°C ve 55°C'de ayrı ayrı salımlar başlatılmıştır. 55°C'deki salım değerleri 37°C'deki salım değerlerine göre daha yüksektir. Bu da DPPC lipidinin 41-42°C arasında bulunan erime sıcaklığından ileri gelmektedir. Erime sıcaklığının üzerinde lipit zar daha geçirgen hale gelmesiyle açıklanmaktadır.

DPPC vezikülümüzden salım çalışmalarını takiben Res yüklü dppc vezikülü yüzeyine altın nanopartiküller indirgenerek bir sonraki aşama için vezikül hazırlığı aynen tekrar edilmiştir. Altın nanopartiküller yüzeye indirgendikten sonra;

5,4°C'de PBS (7.2)'de diyaliz edilmiş ve tutunmayan ilaç miktarı hesaplanmıştır. %EE=89

6. Daha sonra RES-AL vezikülümüz ile DPPC lipit filmi hidrate edilmiştir. RESLAL veziküllerimiz sentezlenmiştir.

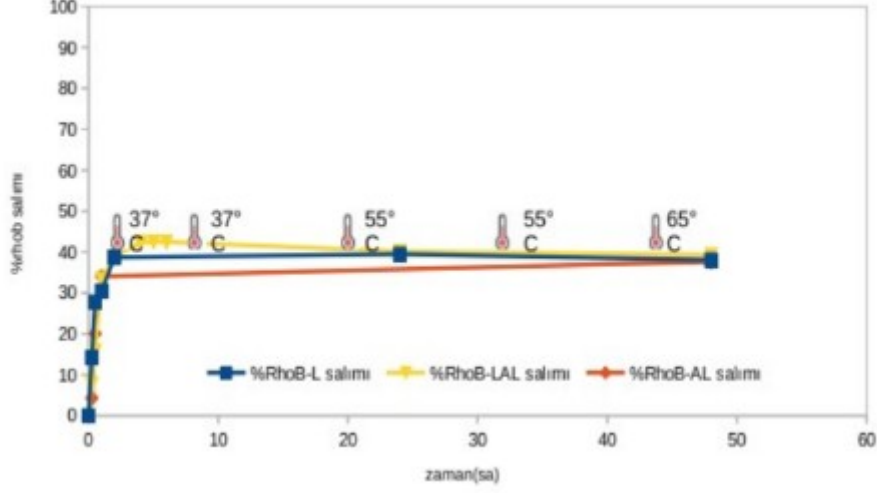
7. Tutunmayan miktarın hesaplanması için 4°C'de PBS (7.2)'de diyaliz edilmiştir. %EE=%84,4 olarak eşitlik 3'e göre hesaplanmıştır.

Şekil 4.22'de ortam sıcaklığı 37 C iken lipozom yapısı stabil olduğu için %30 luk bir salım gerçekleştirilmektedir. Sıcaklığın 55 dereceye çıkması sonucu Resveratrol' ün büyük kısmının salındığı görülmektedir. LAL yapısında 37 C Res salımı %5 civarına olduğu görülmüş, kademeli sıcaklık artışı ile (37-55°C) salınan ilaç miktarı sadece %10 olarak tespit edilmiştir. Bu durum altın nanopartikül kaplama ve ardından lipozom kaplamanın salımı kontrol altına aldığı ve bulunduğu ortama karşı stabil bir sistem elde edildiğinin bir göstergesidir.

Çoklu ilaç çalışmaları kapsamında gerçekleştirilmiş ve dış lipozomal katmanın hidrofilik kısmında olan Rhodamine b salım profilleri Şekil 4.23'te görülmektedir. Öncelikle dppc lipozomuna Rhodamine b kapsüllenmiş ve 37 derecede salım profili elde edilmiştir. Daha sonra altın kaplı lipozomda ve LAL'de aynı profillerin çalışmaları zamana bağlı değişimi takip edilmiştir. Çoklu ilaç çalışmaları kapsamında gerçekleştirilmiş ve dış lipozomal katmanın hidrofilik kısmında konumlanmış olan

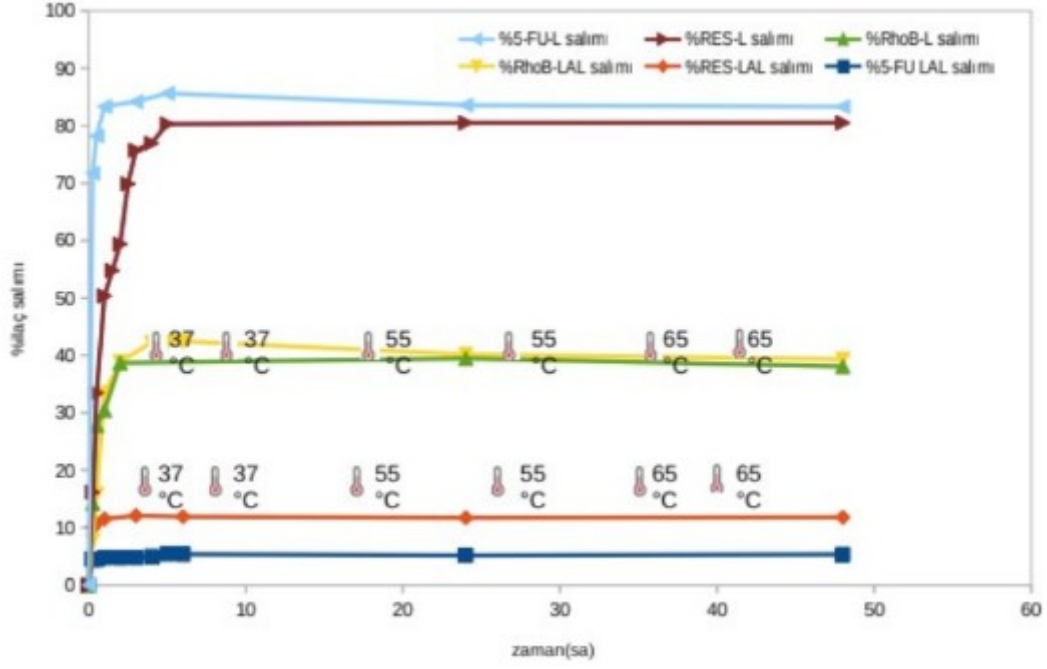


Rhodamine b salım profilleri şekil 4.22'de görülmektedir. Öncelikle dppc lipozomuna Rhodamine b kapsüllenmiş ve enkapsülasyon verimi %75 olarak hesaplanmıştır. 37°C'de L, AL ve LAL 'den salımının zamana bağlı değişimi takip edilmiştir.



Şekil 4.23: Rhodamine B DPPC lipozomu, AL ve LAL'deki salım profilleri.

Şekil 4.23 incelendiğinde DPPC lipozomundan %40 oranında rhodamin B salımı gözlenmiştir. LAL'de dış taraftaki hidrofilik tabakaya yüklenen rhodamin B nin salım profili incelendiğinde salım profillerinde herhangi bir değişme gözlenmemiştir. Çünkü; Rhodamine B'nin lipozomal taşıyıcı sistemde dış katmanın hidrofilik çekirdek bölümündedir. Bu sebeple salım profillerinde herhangi bir değişme olmamıştır. Çünkü hem dppc lipozomunda çalışması yapıldığında hem de kademeli sıcaklık artışı altında LAL' de salım ortamıyla etkileşimde olduğu bölümler aynıdır. Rhodamine B lipozomal taşıyıcı sistemin ilk katmanının hidrofilik bölümünde, içteki lipozomun hidrofobik kısmında Resveratrol, hidrofilik kısmında ise 5-FU yer almaktadır.



Şekil 4.24: DPPC lipozomu ve LAL lipozomu salımlarının karşılaştırılması.

Şekil4.24'te ili ayrı yapı olan DPPC lipozomu ve LAL salım profilleri aynı grafikte incelendiğinde aslında elde edilmek istenen çoklu ilaçlarla sıralı salım elde edilmiştir. İki gün boyunca yüklerinin yalnızca küçük bir kısmını (%20'den az) kaybetmiştir. Dolayısıyla, bu nanopartiküller dış ortamlarına karşı duyarsız görünmektedir. Altın kaplı lipozomlardaki, altın nanopartiküllerin stabiliteleri ve konumlanması küçük ilaç moleküllerinin çekirdekten serbestçe difüze olmasını önleyebilir. Hidroliz hızının azalması, lipidik çekirdeğe su penetrasyonunun azaldığını yansıtabilir, bu da nanopartiküllerden daha yavaş ilaç salınımı ile tutarlı olacaktır. Deneysel kanıtlar ve ısı dağılımının analizi, içeriği seçici olarak serbest bırakma yeteneğinin, NIR'la indükleme dikkate alınarak optimize edilebileceğini göstermektedir. Biyolojik ve tıbbi uygulamalar bağlamında, altın kaplı lipozomlar, fizyolojik olarak güvenli bir ilaç dağıtım sistemi kullanarak lipozomal taşıyıcılardan çoklu ajanların mekânsal ve zamansal olarak kontrollü salınımını sağlama potansiyeli vaat eden kompozit bir yapı sunmaktadır. Sırasıyla 5-fluorourasilin kapsüllendiği DPPC vezikül, 5-FU ve RES 'in kapsüllendiği AL vezikülü ve 5-FU, RES ve RhoB 'nin kapsüllendiği LAL taşıyıcı sistemin çizelge 4.7'de 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap değerleri verilmiştir. Burada sistemde ilaçlar sırasıyla kapsüllendikçe boyut değerleri artmaktadır. Buda

aslında kapsüllemenin arttığı ve katmanlı bir yapının oluştuğunun bir göstergesidir.

Çizelge 4.7: DPPC, AL ve LAL veziküllerinin sırasıyla 5-fu, 5-fu ve Res, 5-fu, Res ve RhoB kapsüllemiş veziküllerin DLS sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap değerleri.

Partikül	İlaç etken madde	PDI	DLS, nm
L	5-fu	0.5 ±0.07	39.3 ±14 459 ±125.1
AL	5-fu, RES	0.3 ±0.08	62 ±63 741 ±128
LAL	5-fu, RES, RhoB	0.382 ±0.0649	97±97 978

#### 4.7. L2, AL2 ve L1AL2 Lipozomlarıyla Yapılan Deneysel Çalışmalar

Tez çalışması kapsamında DPPC lipidi ile olan model çalışmalarımızı tamamladıktan sonra asıl hedeflediğimiz lipid bileşimleri ile aynı deney prosedürlerini takiben çalışma tekrarlanmıştır Burada öncelikle

L1=DPPC: MSPC: DSPE-PEG2000=86:10:4 M,

L2=DPPC: DSPC: chol= 59:39:2 M lipid bileşimleriyle lipozom sentezlenmiştir.

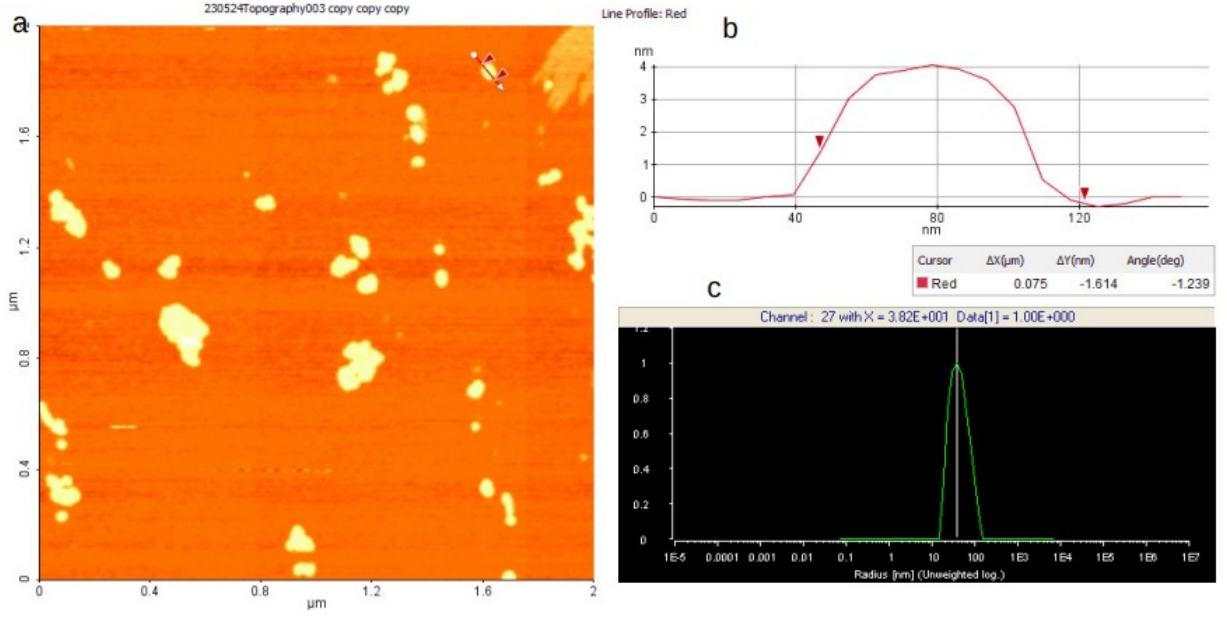
Ardından lipozomlarımızın karakterize edilmesi amacıyla önce DLS daha sonra

AFM analizleri gerçekleştirilmiştir. Burada L2 ve AL2

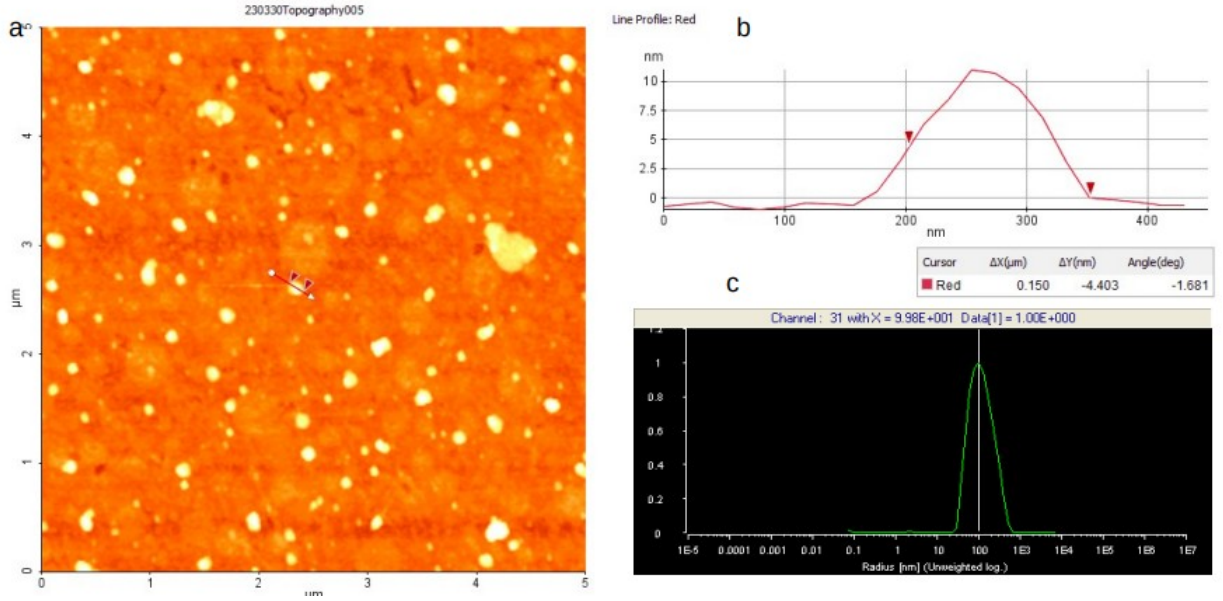
Çizelge 4.8: L2, AL2 ve L1AL2 lipozomlarının DLS sonucu 90°de elde edilen hidrodinamik yarıçap değerleri.

Partikül	PDI	DLS, nm	AFM, nm
L2(DPPC: DSPC: chol)	0.23 ±0.03	42 ±6	73±15
AL2	0.27 ±0.02	19 ±7 115 ±17	164 ±33
L1AL2	0.5±0.05	15±8 121±58 694 ±200	250 ±34

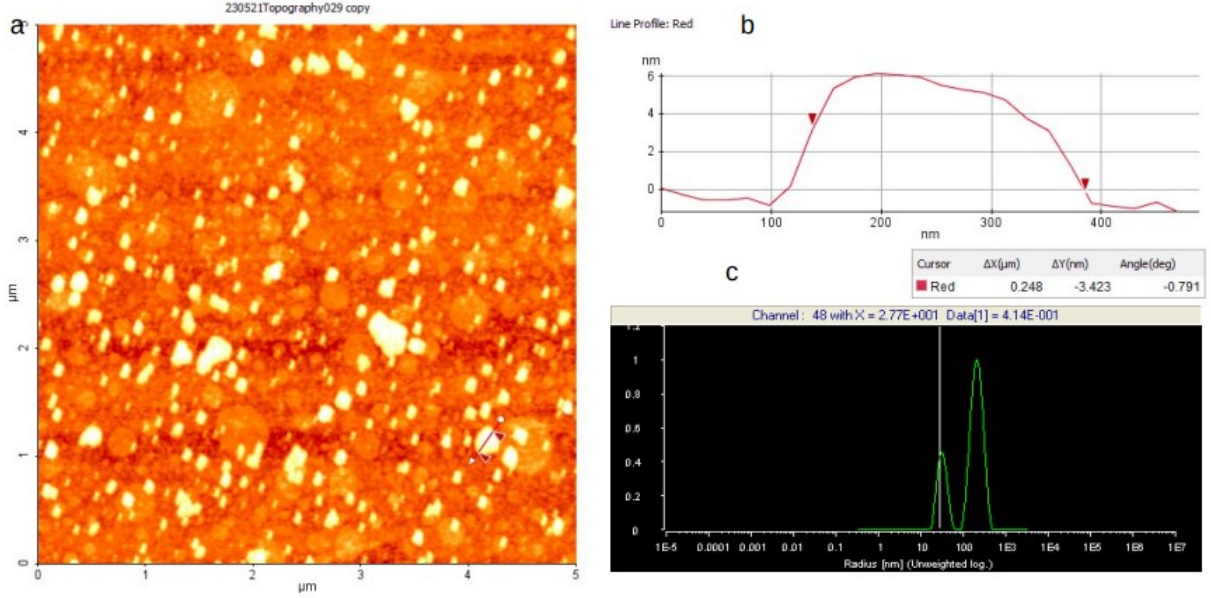
Burada L2 ve AL2 DLS ve AFM sonuçları birbirini tamamlar niteliktedir. L1AL2’de artış L1 lipozom bileşimimizde PEG varlığının hidrodinamik çap artışına sebep olduğu düşünülmektedir. DLS ölçümlerinde numune sıvı formda analiz edilmiştir. Bu nedenle, partiküllerin boyutları hidrodinamik yarıçaplarıdır. Numunelerin AFM ‘de dondurularak cam lamel üzerinde kurutulmuş halde analiz edildiğinde boyutların daha küçük değerlerde okunması beklenmektedir. Kullanılan tekniklerin farklıdır. DLS’de hidrodinamik yarıçapın su içinde hidrasyon tabakasında yanına aldığı partiküllerin difüzyonundan hesaplanan bir ölçüm tekniğidir. AFM’ de ise dondurularak cam lamel üzerinde kurutulmuş halde analiz edilmiştir. Örneğin kurutulması sebebiyle yapı üzerinde çökme gerçekleşebilir. AFM’de ise ölçüm alınacak alan AFM tip özelliği ve ayarlanmış ölçüm özellikleriyle birlikte belirli bir alanın seçimi de bu sonuçlarda etkili olmuştur. Ayrıca şekil 4.24, 25 ve 26’da AFM topografyası hidrodinamik çap görüntüleri ve çizgi profilleri de verilmiştir.



Şekil 4.24: L2 lipozomlarının a) AFM topografya görüntüsü b) AFM çizgi profili, c) DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.



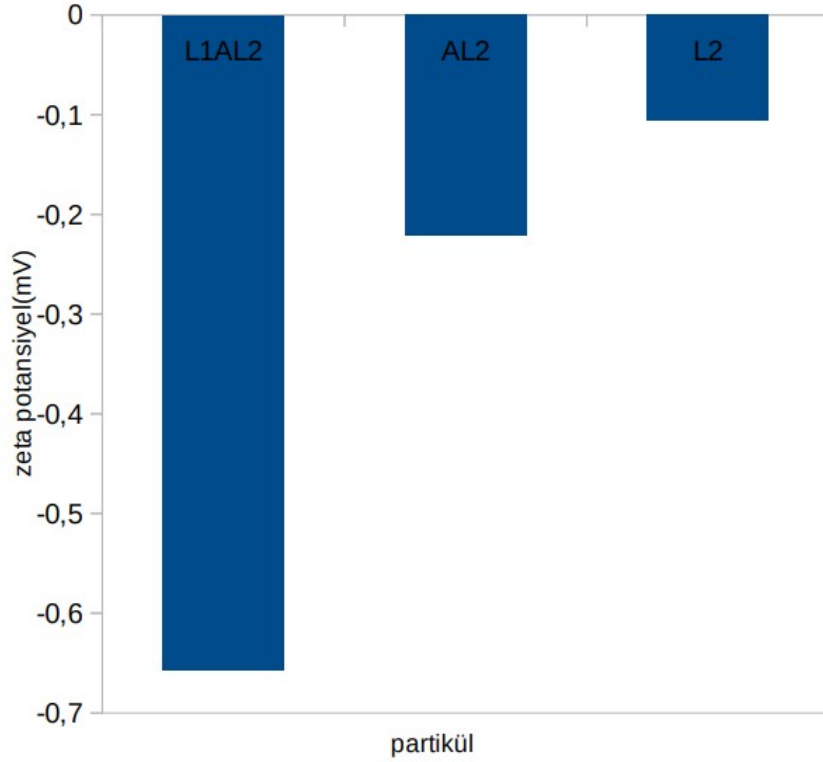
Şekil 4.25: AL2 lipozomlarının a) AFM topografya görüntüsü b) AFM çizgi profili, c) DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.



Şekil 4.26: L1AL2 lipozomlarının a) AFM topografya görüntüsü b) AFM çizgi profili, c) DLS analizi sonucu 90°'de elde edilen hidrodinamik yarıçap görüntüsü.

L2 lipozomunun yüzeyine altın nanopartiküllerin indirgenmesi ve tekrar L1 lipozomu ile kaplama çalışmalarında AFM ile görüntülerden boyut analizi yapılmış ve statik değerler olan yüzey pürüzlülük değerleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar  $250 \pm 34\text{nm}$  ve DLS cihazında çıkan  $121.3 \pm 58.4$ ;  $694 \pm 198\text{nm}$  boyutları ile koreledir.

Yüzey pürüzlülüğü olan ve lipozom yüzeyinde altın indirgemesi işlemiyle birlikte artış göstermesi gereken değer mantıklıdır. Daha sonra tekrar L1 lipozomu kaplanmasıyla birlikte daha pürüzsüz bir yüzey oluşması beklenmiş ve pürüzlülük değeri  $2.6 \pm 0.2\text{nm}$  değerleri arasına düşmüştür.

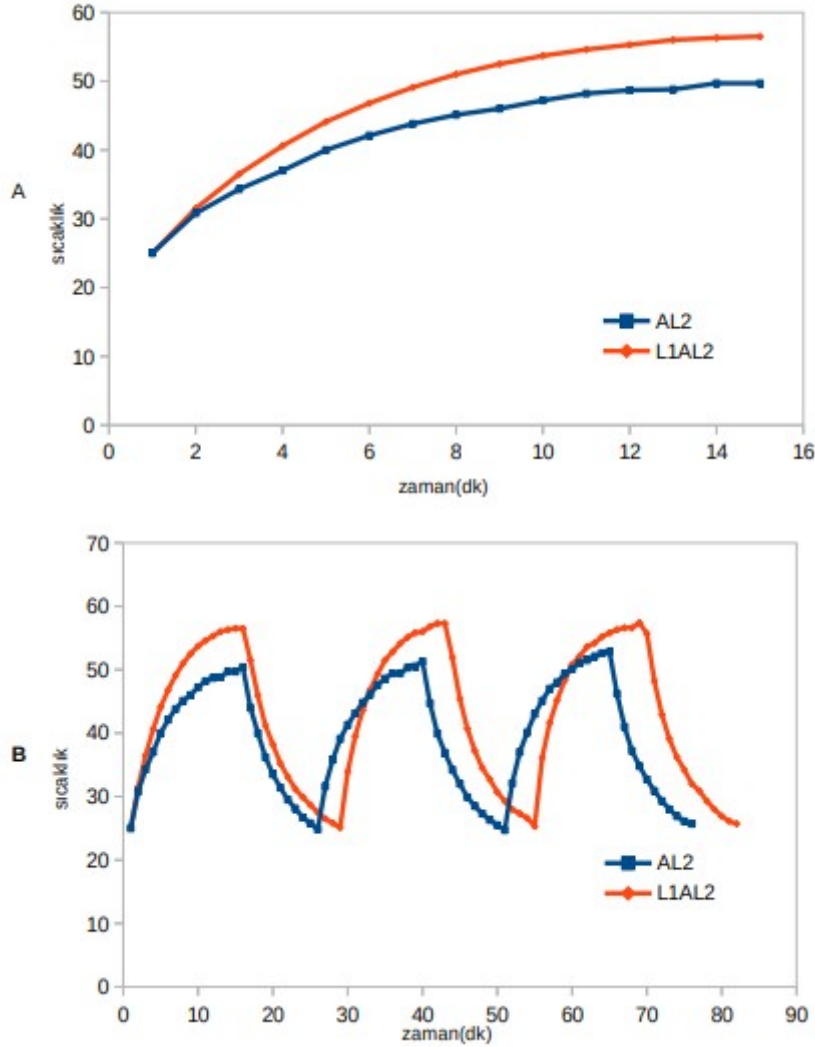


Şekil 4.27: L2, AL2 ve L1AL2'nin yüzey zeta potansiyeli değerleri

Şekil 4.27'de L2, AL2 ve L1AL2'nin yüzey zeta potansiyeli değerleri görülmektedir. L2 lipozomunun yüzeyine altın nanopartiküllerin indirgenmesiyle birlikte zeta potansiyel değeri altın nanopartiküllerin zeta potansiyeli ile uyumlu olarak düşer. AL2 lipozomunun tekrar lipozom ile kaplanmasıyla zeta potansiyeldeki düşüş görülmektedir. Zeta potansiyel değerindeki düşüşün değişen lipid bileşimi dolayısıyla kolin gruplarının oryantasyonundaki değişiminden ileri gelmesi ve eksi bir zeta değerinde davranış göstermesi ile sonuçlanmıştır ve dramatik bir farklılık söz konusu değildir.

Çalışma kapsamında altın kaplamanın ve ardından tekrar lipozom ile kaplamanın gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için UV-vis spektrofotometre ile analiz edilmiştir. [134] Nanotaşıyıcı sistemde AL2 ve L1AL2 partiküllerinin Şekil30a'da fototermal terapi etki ve verimliliği 15 dakika boyunca 1 W/cm<sup>2</sup> güçte 808 nm lazer ışınlanması analiz edilmiştir. Lazer ışınlanması Şekil30b'de görüldüğü üzere üç döngü uygulanmış ve AL2, L1AL2'nin termal kararlılığı incelenmiştir. Lazer ışınlanması altındaki sıcaklık artışları etkili fototermal dönüşüm verimliliklerine sahip olduklarının bir göstergesidir. Sırasıyla AL2 için 25 °C'den 51.3 ±3°C L1AL2 ise 57.1 ±1°C'ye

yükselmiştir. AL2 ve L1AL2'in hesaplanan fototermal verimlilik değerleri sırasıyla %35,37 ve %49,97 olup, LAL'in fototermal verimliliğinin AL 'den biraz daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, ortalama 100nm boyutundaki altın kaplanmış lipozomların diğer morfoloji ve boyutlardaki altın partiküllerle rekabet edebileceğinin bir göstergesidir ve onlara kıyasla renal filtrasyona uyumludur ve vücuttan temizlenebilirlik gibi avantajlara sahiptir.

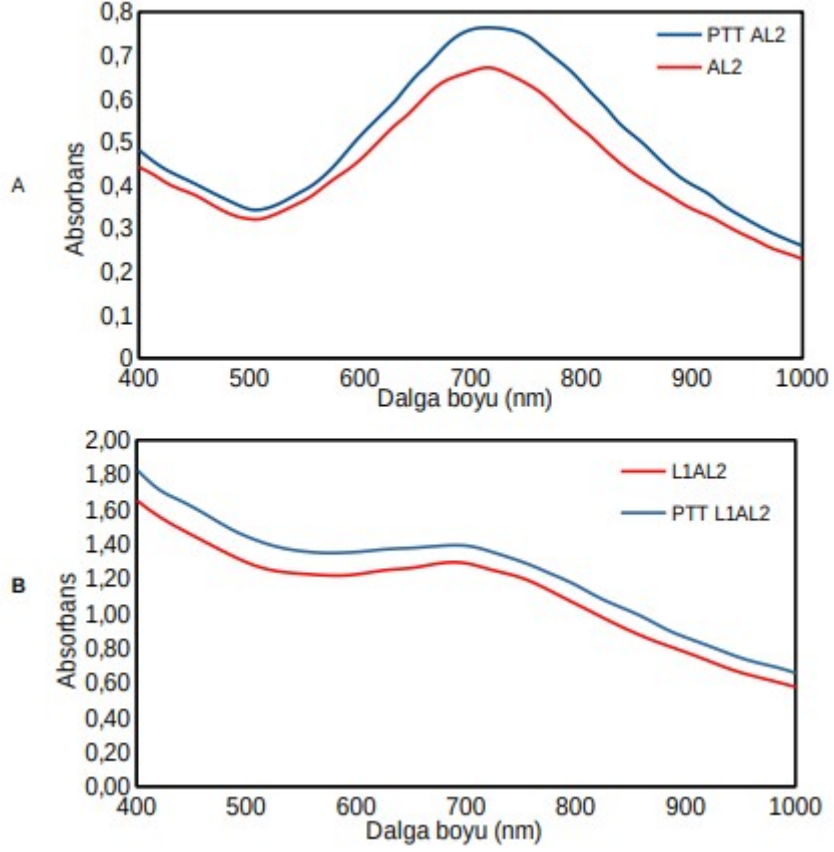


Şekil 4.28:AL2(46,8µg HAuCl<sub>4</sub>/mg lipid) ve L1AL2(46,8µg HAuCl<sub>4</sub>/mg lipid)'in fototermal etkisi. A) 15 dakika boyunca 1 W/cm<sup>2</sup> güçte 808 nm lazer ışınımı altında AL ve LAL 'in fototermal etkisinin değerlendirilmesi. B) Lazer açma/kapama döngüsünün 3 tekrarı sırasında termal kararlılığının doğrulanması.

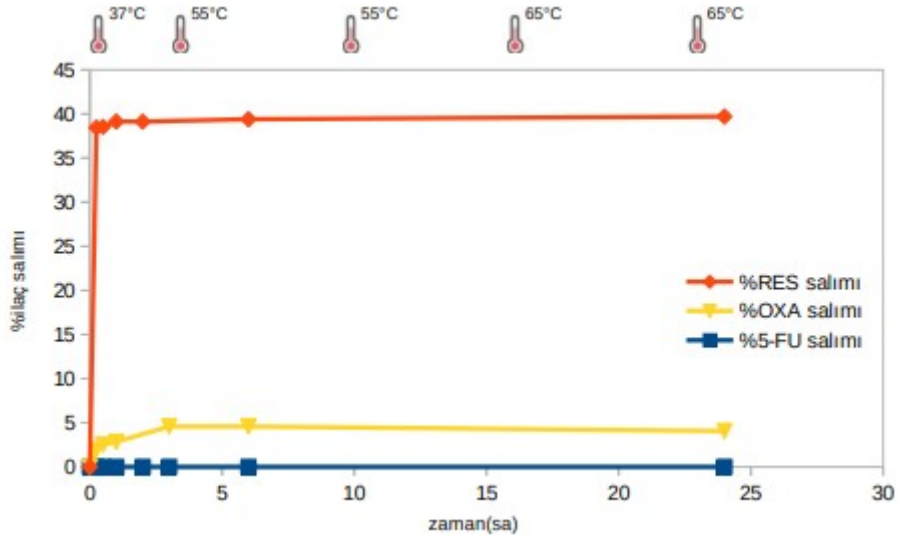
Şekil4.28'de model sisteme göre kullanılan lipid bileşimi farklılığı sebebiyle L1AL2, AL2'den daha fazla ısınmıştır. Burada PTT 'den sonra UV-vis spektrumları



incelendikten sonra absorbans değerlerindeki artış yapının kısmen bozularak altın nanopartiküllerin serbest hale geçmesi anlamına gelmektedir.

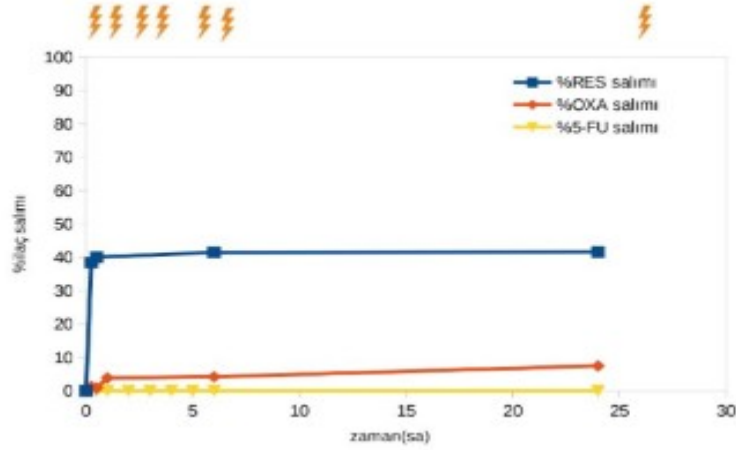


Şekil 4.29: Lazer ışınlamasının 6,8µg HAuCl<sub>4</sub>/mg lipid oranına sahip AL2, L1AL2 lipozomlarında uv-vis spektrumu etkisinin değerlendirilmesi.



Şekil 4.30: OXA, RES ve 5-FU'nun sıcaklıkla indüklenmiş salım profilleri.

Çalışma kapsamında, salımlar NIR ve kademeli sıcaklık artışı ile indüklenerek incelenmiştir. Şekil4.30'da sıcaklıkla indüklenme aşamasında 37°C'den 55°C'ye daha sonra 65°C'ye sıcaklık artışı sağlanarak incelenmiştir.



Şekil 4.31: OXA, RES ve 5-FU'nun NIR'la indüklenmiş salım profilleri.

NIR tetiklemede Şekil4.31 'de salım zaman noktalarında beşer dakika 2.5 W/cm<sup>2</sup> güçte 808nm lazer uygulanmıştır. Kullanılan ilaç taşıyıcı sistemin beş dakikada NIR tetikleme ile sıcaklık artışı 55°C'dir. Bu salımlar sistemin iç kısmındaki lipozomun erime sıcaklığı literatürdeki veriler göz önünde bulundurulduğunda 55°C civarlarında olması beklenmektedir. Bu yüzden grafiklerde NIR tetiklemeli salımlar kısmen yüksek olsa da sıcaklıkla artışta ve PTT uygulaması salım profillerinin hemen hemen aynı olduğu görülmüştür. Çünkü sıcaklıkla artış salımlarında da PTT uygulaması da hemen hemen aynı sıcaklıklarda olmaktadır. Bu da hipertermiye duyarlı bir taşıyıcı sistem olduğunu kanıtlamaktadır.

## 5. YORUM

Gerçekleştirilmiş çalışma kapsamında pankreas kanseri gibi kompleks ve zor tümörlere sahip ve çoklu ajanlarla kombine edilebilen tedavi yöntemleri ile ancak üstesinden gelebilecek ilaçlarla tedavinin sağlanması gerekmektedir. Bu tedavi standartları yüksek dozları beraberinde getirmekte bu dozlar sebebiyle de toksisitenin giderek artması sağlıklı dokuya verilen zararın artması anlamına gelmektedir. Pankreas kanserinde primer tümörün ölümcüllüğü değil pankreasın retroperitoneal bir yapıya sahip olması nedeniyle periton kanserine olan yatkınlığı ileri gelmektedir. Periton metastazıyla birlikte hastalar birçok fonksiyonlarını yerine getirememekte ve çoklu organ yetmezliğinden tedavi mortaliteyle sonuçlanmaktadır. Şu anda periton metastazı için revaçta olan yöntem HIPEC yani sıcak kemoterapidir. Bu kanser türü için uygun olabilecek hem sıcaklığın devrede olduğu hem de tetiklenebilir ve ilacı istenen bölgede tümörlü dokuya iletebilecek bir nanotaşıyıcı sistemin tasarımı ele alınmalıdır. Tüm bu sorunlar göz önünde bulundurulduğunda sinerjik terapi ajanı olarak kullanılabilen hipertermi yeteneğine sahip ve şu ana kadar pankreas kanserinde en iyi terapötik etkinin görüldüğü FOLFIRINOX grubunun kapsüllenebileceği çoklu ilaçların sıralı bir şekil salındığı model bir sistemin geliştirilmesi amaçlanmış ve bu doğrultuda yapılan çalışmaların sonuçları ve literatürdeki önemini değerlendirmekteyiz. Çalışmada öncelikle

Daha önce klinik olarak FDA tarafından onaylanmış Celsion'un ThermoDox' unu mümkün olduğunca yakından taklit eden iç içe sıcaklığa duyarlı lipozomal bir nanotaşıyıcının tasarımı gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle ilk katman sentezlenmiştir. Bu katmanın analiz edilebilmesi için zeta, LS ve UV-vis spektrofotometresi ile analiz edilmiştir. Sistemin iç içe olması sebebiyle zeta potansiyel değeri bir sonraki katmanın oluşup oluşmadığının ispatı açısından önem arz etmektedir. DPPC' nin zeta potansiyel değeri 6.51mV 'tur. Zwitteriyonik olduğu için mantıklı bir değer olduğu düşünülmüştür. Daha sonra sonikasyon yöntemiyle boyut dağılımına bakıldığında PDI değeri 0.49 ±0.02 ve hidrodinamik yarıçapın ortalama 352.3±106.9 olduğu görülmüştür. Ekstrüzyon yönteminde ise PDI değeri 0.143 ±0.035 ve hidrodinamik yarıçapın ise ortalama

69.4538  $\pm$ 7.957'dir. Burada ekstrüzyon yöntemiyle monodispers bir dağılım elde edilmiştir. UV-vis spektrofotometresi alınmış ve lipozomların kısa dalga boylu saçılma karakteristiğinin olduğu görülmüştür.

Daha sonra bir sonraki katman olan altın nanopartiküllerin lipozom yüzeyine indirgenme sentezleri gerçekleştirilmiştir. Burada altın nanopartiküller indirgenmesiyle birlikte çözelti mavi rengine kaymıştır. İndirgenen altın oranları değiştirildikçe 600-1000nm civarlarında bir optik rezonansa sahip olduğu görülmüştür. Bu absorbans spektrumu normalde kırmızı altın nanopartikül pikine ve aralığına ait olsa da lipozomun verdiği destek ile daha büyük bir altın nanopartikül gibi davranmaktadır ve lipozomun büyüklüğünden absorbans spektrumunda sağa sola doğru kaymalar gerçekleşmektedir. Ayrıca tekrar zeta potansiyel değeri ölçülmüştür. DPPC vezikülünde 6.51mV olan zeta değeri altın nanopartikül indirgenmesiyle birlikte 0.69mV değerine düşmüştür. Değerler literatürle anlamlıdır. Boyut değerleri ise 37  $\pm$ 22.1; 366  $\pm$ 184.6 ekstrüzyon yöntemiyle ise AFM analizlerinin sonuçları incelendiğinde ise 130 $\pm$ 33nm olarak analiz edilmiştir. Boyutlar bir önceki katmanın boyutuyla uyumlu ve mantıklıdır. Daha sonra altın nanopartiküllerin gerçekten yüzeye indirgenip indirgenmediğini anlayabilmek için altın kaplı lipozom %20 Triton x-100 ile bozulmuştur ve Triton destek lipozomu parçalamış ve altın nanopartikül piki kaybolmuştur. Bu da altın nanopartiküllerin aslında tek nm boyutunda olduğunun bir kanıtını sunmaktadır. Altının bu şekilde yüzeye indirgenerek oluşturulmasının renal filtrasyondan ve vücutta atılma işlemleri için uyumlu olması sebebiyle tercih edilmiştir. Çünkü Au inert ve biyouyumlu bir malzeme olarak kabul edilse de vücut sisteminde Au birikimi önemli sağlık risklerine yol açabilir. Au NP'ler kısa dolaşım süresi nedeniyle düşük tümör hedefleme yeteneği, vücut sisteminde uzun süreli tutulma nedeniyle potansiyel toksisite ve biyolojik dağılımın invaziv olmayan değerlendirmesinin zorluğu gibi dezavantajları vardır. Ayrıca altın nanopartikül vb. Metalik nanoparçacıklar kanser hastaları gibi belirli aralıklarla radyografi cihazlarında PETscan veya BT çekilmek zorunda olması açısından dezavantajlıdır. Çünkü renal filtrasyona uyumlu olmayan altın nanoparçacıklar vücuttan iki-üç ay gibi bir sürede atılmaktadır. Bu da klinik çeviri konusunda tedirginlik yaratır çünkü altın nanopartikül varlığı görüntüleme sistemlerinde yanlış teşhislere yol açabilir.

• Daha sonra altın kaplı lipozomlar tekrar lipozom kaplanmış. Çünkü hem altının direkt olarak yüzeyde bulunması plazmadaki varlığını tehlikeye atabilir. AL'yi tekrar lipozomla kaplamak daha yüksek tümör hedeflemesi, daha iyi PTT etkisi, terapötik etki, stabilite ve tümör hedefleme kabiliyetine sahip olduğu görülmüştür. LAL bu yüzden de AL 'den her bakımdan daha avantajlıdır. Bunun için tekrar zeta ve UV-vis spektrumu alınmıştır. Zeta değeri 2.12 mV değerine yükselmiştir. Çünkü altının varlığı lipozomların iç sulu çekirdeğinde kalmıştır ve zwitteriyonik DPPC lipozomunun kaplanmasıyla zeta potansiyel değeri artmıştır. LS sonuçlarına bakıldığında ise altın kaplı lipozomdan daha yüksek  $537 \pm 342.2$  ortalama hidrodinamik çapa sahiptir. Lipozom altın kaplı lipozom ve Lipozom kaplanmış altın kaplı lipozomlar arası boyutun artışı kaplandığını doğrulamaktadır. Ayrıca zeta potansiyel değerlerinde kaplandığını destekler niteliktedir. AFM görüntüleri boyut profillerine bakıldığında da yüzey pürüzlülük değerleri karşılaştırılmıştır. DPPC' nin yüzey pürüzlülüğünün AL ve LAL'e oranla düşük olması beklenmektedir ve LAL kaplanmasıyla birlikte de AL'e göre daha pürüzsüz bir çizgi profili eldesi görülmüş beklenmiştir. Yüzey pürüzlülük değerleri bu hipotezlerimizi destekler nitelikte ve Ra ortalama değerleri lipozom için  $1.2965 \pm 0.976$ , AL için  $16.88 \pm 2.248$ , LAL için  $5.0996 \pm 2.278$  nm aralığındadır.

• Fototermal etki ve verimliliğin değerlendirilmesi, AL2 ve L1AL2'in hesaplanan fototermal verimlilik değerleri sırasıyla %35,37 ve %49,97 olup, LAL'in fototermal verimliliğinin AL' den biraz daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, ortalama 100nm boyutundaki altın kaplanmış lipozomların diğer morfoloji ve boyutlardaki altın partiküllerle rekabet edebileceğinin bir göstergesidir ve onlara kıyasla renal filtrasyona uyumludur ve vücuttan temizlenebilirler. Deneysel kanıtlar ve ısı dağılımının analizi, içeriği seçici olarak serbest bırakma yeteneğinin NIR' la indükleme dikkate alınarak optimize edilebileceğini göstermektedir. Sıcaklığa duyarlı lipozomlar, ortalama normal vücut sıcaklığının birkaç derece üzerinde lokal hafif hipertermi ile kullanıldıklarında ilaç salım etkinliğini arttırmak için yararlı bir alternatif olabilmektedir. Biyolojik ve tıbbi uygulamalar bağlamında, altın kaplı lipozomlar, fizyolojik olarak güvenli bir

ilaç dağıtım sistemi kullanarak lipozomal taşıyıcılardan çoklu ajanların mekânsal ve zamansal olarak kontrollü salınımını sağlama potansiyeli vaat eden kompozit bir yapı sunmaktadır.

- Salım çalışmalarının değerlendirilmesi, lipozom altın kaplı lipozom ve lipozom kaplanmış altın kaplı lipozomda değerlendirilmiştir. Bu şekilde üç farklı kompartmanda yapılmasının sebebi son katman olan LAL 'deki salımlarla lipozom arasındaki ilaç salımlarını ilişkilendirmektir. Burada en iç katmada olan hidrofilik ilacımız 5-FU ile başlamamız gerekirse lipozomdan salımı %80 civarlarında iken AL ve LAL ile birlikte son derece yavaş bir salım gerçekleşmiş ve %5 civarlarına düşmüştür. Hidrofobik ilacımız olan Resveratrol salımımız 37-55 derece olarak %30-80 oranından %5-11 arasında düşmüştür. Rhodamine B de ise en dış katmanda olan hidrofilik ilacımız ise her zaman bu katmanda olduğu için herhangi bir salım değer değişimi olmamıştır. %40-50 aralığında seyretmiştir. Bu nanopartiküller dış ortamlarına karşı duyarsız görünmektedir. Altın kaplı lipozomlardaki, altın nanopartiküllerin stabiliteleri ve konumlanışı küçük ilaç moleküllerinin çekirdekten serbestçe difüze olmasını önleyebilir hidroliz hızının azalması, lipidik çekirdeğe su penetrasyonunun azaldığını yansıtabilir, bu da nanopartiküllerden daha yavaş ilaç salınımı ile tutarlı olacaktır. Tez çalışması kapsamında çalışmamızda kullanmayı planladığımız lipid bileşimlerimiz olan L1 ve L2 ile çalışmalara devam edilmiştir. Önce L2 lipozomu elde edilmiş altın nanopartikül yüzeyine indirgenmiştir. Model sistemin mavi olan altın kaplı lipozomuna oranla absorpsiyon değerleri ve çözeltinin görünümü mavi yeşil rengindeydi. Fototermal etki ve verimliliği AL2 L1AL2'den yüksekti. Bu da kullanılan lipid bileşimlerinin yükleriyle ilgili olabileceğini düşündürdü. Bu tarz lipid bileşimlerinden elde edilen literatürdeki çalışmalarla benzerdi ve sonuçlarımızı destekler nitelikteydi. L1 lipozomuyla kaplandığında AFM çizgi profillerinin yüzey pürüzlülüğü kaplanma verileri destekler nitelikteydi. Daha sonra zeta değerlerine bakıldı ve L1AL2 lipozomunda PEG-lipid olması sebebiyle zeta potansiyel değeri düşmüştür. Bu da gözlemlenen kolloidal stabilitenin elektrostatik itmenin aksine polietilen glikol kaplama tarafından kontrol edildiğini düşündürmektedir.

Salım değerleri model sistemdeki nano taşıyıcıya benzer şekilde salım profillerine sahiptir. Tasarımı gerçekleştirilmiş katmanlı taşıyıcı sistemdeki sırasıyla oxa, Res ,5-FU salımları sırasıyla kontrol bir şekilde sıcaklığa bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Başlatılmış bir diğer ilaç salım çalışması deneyinde ise her salım zaman noktasında beş dakika NIR uygulanmıştır. Sıcaklığa bağlı NIR tetiklemeli salımlar benzer değerlere sahiptir. Çünkü sistem 55-60 C ısınmaktadır. Sıcaklığa bağlı salımda ise 37 C'den 55 C'ye ve en sonunda 65 C deki salım kontrol edilmiştir. Bu da aynı sıcaklık zaman noktalarında hemen hemen aynı değerlere sahip olmalarına sebebiyet vermiştir fakat NIR tetiklemeli salım noktalarında salım kısmen daha yüksektir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), 10-27. <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
- [2] Bukowski, K., Kciuk, M., & Kontek, R. (2020). Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>
- [3] Wang, X., Zhang, H., & Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2(2), 141-160. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.10>
- [4] A. Carvalho, T. M., Molfetta, D. D., Greco, M. R., Koltai, T., Alfarouk, K. O., Reshkin, S. J., & Cardone, R. A. (2021). Tumor Microenvironment Features and Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Insights into Targeting Physicochemical Barriers and Metabolism as Therapeutic Approaches. *Cancers*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/cancers13236135>
- [5] Subhan, M. A., Kishan Yalamarty, S. S., Filipczak, N., Parveen, F., & Torchilin, V. P. (2021). Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment. *Journal of Personalized Medicine*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/jpm11060571>
- [6] Ho, W. J., Jaffee, E. M., & Zheng, L. (2020). The tumour microenvironment in pancreatic cancer — Clinical challenges and opportunities. *Nature reviews. Clinical oncology*, 17(9), 527. <https://doi.org/10.1038/s41571-0200363-5>
- [7] Schlick K, Magnes T, Ratzinger L, Jaud B, Weiss L, Melchardt T, Greil R, Egle A. Novel models for prediction of benefit and toxicity with FOLFIRINOX treatment of pancreatic cancer using clinically available parameters. *PLoS One*. 2018 Nov 9;13(11): e0206688. doi: 10.1371/journal.pone.0206688.
- [8] Gao, J., Logan, K., Nesbitt, H., McKaig, T., Taylor, M., Love, M., McHale, A., Griffith, D., Callan, J. 2021. "A single microbubble formulation carrying 5-fluorouridine, Irinotecan and oxaliplatin to enable FOLFIRINOX treatment of pancreatic and colon



cancer using ultrasound targeted microbubble destruction”, *Journal of Controlled Release* 338, 358–36.

- [9] Mattiuzzi, C., Lippi, G., 2019. *Current Cancer Epidemiology*. *Journal of Epidemiology and Global Health* 9,217. <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>
- [10] Li, Q., Feng, Z., Miao, R., Liu, X., Liu, C., Liu, Z., 2022. Prognosis and survival analysis of patients with pancreatic cancer: retrospective experience of a single institution. *World Journal of Surgical Oncology* 20.<https://doi.org/10.1186/s12957-021-02478-x>
- [11] Kelly, D.M. Benjamin, I.S. 1995. “Pancreatic carcinoma”, *Annals of Oncology* 6: 19-28.
- [12] Göral, V. 2014. “Pankreas Kanseri: Patogenez ve Tanı”, *Güncel Gastroenteroloji* 18/4.
- [13] Karpińska, M., & Czauderna, M. (2022). Pancreas—Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals’ Organism. *Frontiers in Physiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.807632>
- [14] Çetin, Ş. Dede, İ. 2019. “Prognostic Factors in Pancreatic Cancer”, *Med J SDU*, 26, 30-34.
- [15] Kokkinos, J. Ignacio, R. Sharbeen, G. Boyer, C. Gonzales-Aloy, E. Goldstein, D.McCarroll, J. Phillips, P. Annese, T., Tamma, R., Ruggieri, S., & Ribatti, D. (2019). Angiogenesis in Pancreatic Cancer: Pre-Clinical and Clinical Studies. *Cancers*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cancers11030381>
- [16] Murthy, S. K. (2007). Nanoparticles in modern medicine: State of the art and future challenges. *International Journal of Nanomedicine*, 2(2), 129141. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2673971/>
- [17] Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>

- [18] Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2020). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*,25(1). <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- [19] Kuzma, J., 2011. Allhoff, Fritz, Patrick Lin, and Daniel Moore. 2010. What is nanotechnology and why does it matter? From science to ethics. *Journal of Bioethical Inquiry* 8, 209–211. <https://doi.org/10.1007/s11673-011-9289-z>
- [20] Afzal, O., A. Altamimi, A. S., Nadeem, M. S., Alzarea, S. I., Almalki, W. H., Tariq, A., Mubeen, B., Murtaza, B. N., Iftikhar, S., Riaz, N., & Kazmi, I. (2022). Nanoparticles in Drug Delivery: From History to Therapeutic Applications. *Nanomaterials*, 12(24). <https://doi.org/10.3390/nano12244494>
- [21] Riehemann, K., Schneider, S. W., Luger, T. A., Godin, B., Ferrari, M., & Fuchs, H. (2009). Nanomedicine – challenge and perspectives. *Angewandte Chemie*,48(5), 872. <https://doi.org/10.1002/anie.200802585>
- [22] Tewabe, A., Abate, A., Tamrie, M., Seyfu, A., & Siraj, E. A. (2021). Targeted Drug Delivery — From Magic Bullet to Nanomedicine: Principles, Challenges, and Future Perspectives. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, 14, 1711-1724. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S313968>
- [23] Joseph, T.M., Kar Mahapatra, D., Esmaeili, A., Piszczyk, Ł., Hasan'in, M.S., Kattali,M., Haponiuk, J., Thomas, S., 2023. Nanoparticles: Taking a Unique Position in Medicine. *Nanomaterials* 13, 574. <https://doi.org/10.3390/nano13030574>
- [24] Elsharkasy, O. M., Nordin, J. Z., Hagey, D. W., de Jong, O. G., Schiffelers, R. M., Andaloussi, S. E., & Vader, P. (2020). Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 159,332-343. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.04.004>
- [25] Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Bawab, A. A., & Alshaer, W. (2022). Liposomes: Structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, 8(5). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>
- [26] Coelho, J. F., Ferreira, P. C., Alves, P., Cordeiro, R., Fonseca, A. C., Góis, J. R., & Gil, M. H. (2010). Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *The EPMA Journal*, 1(1), 164-209. <https://doi.org/10.1007/s13167-010-0001-x>

- [27] Lee, Y., & Thompson, D. H. (2017). Stimuli-Responsive Liposomes for Drug Delivery. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 9(5). <https://doi.org/10.1002/wnan.1450>
- [28] Rajput, A., Varshney, A., Bajaj, R., & Pokharkar, V. (2022). Exosomes as New Generation Vehicles for Drug Delivery: Biomedical Applications and Future Perspectives *Molecules*,27(21). <https://doi.org/10.3390/molecules27217289>
- [29] Düzgüneş, N., & Gregoriadis, G. (2005). Introduction: The Origins of Liposomes: Alec Bangham at Babraham. *Methods in Enzymology*, 391, 1-3. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)91029-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)91029-X)
- [30] Nakhaei P, Margiana R, Bokov DO, Abdelbasset WK, Jadidi Kouhbanani MA, Varma RS, Marofi F, Jarahian M, Beheshtkhoo N. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Sep 9; 9:705886. doi: 10.3389/fbioe.2021.705886.
- [31] Giri, P.M., Banerjee, A., Layek, B., 2023. A Recent Review on Cancer Nanomedicine. *Cancers* 15, 2256. <https://doi.org/10.3390/cancers15082256>
- [32] Andra, V., Pammi, S., Bhatraju, L., Ruddaraju, L. 2022. "A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents," *BioNanoScience* volume 12, pages274–291.
- [33] Wang, S., Chen, Y., Guo, J., & Huang, Q. (2023). Liposomes for Tumor Targeted Therapy: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/ijms24032643>
- [34] Cooley, M., Sarode, A., Hoore, M., Fedosov, D. A., Mitragotri, S., & Gupta, A. S. (2018). Influence of particle size and shape on their margination and wall-adhesion: Implications in drug delivery vehicle design across nano-to-micro scale. *Nanoscale*, 10(32), 15350. <https://doi.org/10.1039/c8nr04042g>
- [35] Boafu, G. F., Magar, K. T., Ekpo, M. D., Qian, W., Tan, S., & Chen, C. (2022). The Role of Cryoprotective Agents in Liposome Stabilization and Preservation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012487>

- [36] Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N., & Gambhir, S. S. (2011). Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (London, England)*, 6(4), 715. <https://doi.org/10.2217/nnm.11.19>
- [37] Abraham, S. A., Waterhouse, D. N., Mayer, L. D., Cullis, P. R., Madden, T. D., & Bally, M. B. (2005). The Liposomal Formulation of Doxorubicin. *Methods in Enzymology*, 391, 71-97. [https://doi.org/10.1016/S00766879\(05\)91004-5](https://doi.org/10.1016/S00766879(05)91004-5)
- [38] Forssen, E. A. (1997). The design and development of DaunoXome® for solid tumor targeting in vivo. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 24(2-3),133-150. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00453-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00453-X)
- [39] Swenson, C., Perkins, W., Roberts, P., & Janoff, A. (2001). Liposome technology and the development of Myocet™ (liposomal doxorubicin citrate). *The Breast*, 10, 1-7. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(01\)800011](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(01)800011)
- [40] Salehi, B., Selamoglu, Z., Mileski, K. S., Pezzani, R., Redaelli, M., Cho, W.C., Kobarfard, F., Rajabi, S., Martorell, M., Kumar, P., Martins, N., Santra, T. S., & Sharifi-Rad, J. (2019). Liposomal Cytarabine as Cancer Therapy: From Chemistry to Medicine. *Biomolecules*,9(12). <https://doi.org/10.3390/biom9120773>
- [41] Rizvi, I., Nath, S., Obaid, G., Ruhi, M. K., Moore, K., Bano, S., Kessel, D., & Hasan, T. (2019). A Combination of Visudyne and a Lipid-Anchored Liposomal Formulation of Benzoporphyrin Derivative Enhances Photodynamic Therapy Efficacy in a 3D Model for Ovarian Cancer. *Photochemistry and photobiology*,95(1), 419. <https://doi.org/10.1111/php.13066>
- [42] Adler-Moore J, Proffitt RT. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Feb;49 Suppl 1:21-30. doi: 10.1093/jac/49.suppl\_1.21. PMID: 11801577.
- [43] Huang ST, Wang YP, Chen YH, Lin CT, Li WS, Wu HC. Liposomal paclitaxel induces fewer hematopoietic and cardiovascular complications than bioequivalent doses of Taxol. *Int J Oncol.* 2018 Sep;53(3):1105-1117. doi: 10.3892/ijo.2018.4449.
- [44] Milano G, Innocenti F, Minami H. Liposomal irinotecan (Onivyde): Exemplifying the benefits of nanotherapeutic drugs. *Cancer Sci.* 2022 Jul;113(7):2224-2231. Doi:10.1111/cas.15377. Epub 2022 May 26. PMID: 35445479

- [45] Silverman, J. A., & Deitcher, S. R. (2013). Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(3), 555-564. <https://doi.org/10.1007/s00280-012-2042-4>
- [46] Jiskoot W, Teerlink T, Beuvery EC, Crommelin DJ. Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution. The effect of bilayer composition and process parameters on liposome characteristics. *Pharm Weekbl Sci*. 1986 Oct 17;8(5):259-65. doi: 10.1007/BF01960070.
- [47] Xiang, B., Cao, DY. (2018). Preparation of Drug Liposomes by Thin-Film Hydration and Homogenization. In: Lu, WL., Qi, XR. (eds) *Liposome-Based Drug Delivery Systems. Biomaterial Engineering*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-49231-4\\_2-1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-49231-4_2-1)
- [48] Duong, A., Nguyen, L., & Maeng, J. (2020). Preparation of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers for Drug Delivery and the Effects of Preparation Parameters of Solvent Injection Method. *Molecules*, 25(20). <https://doi.org/10.3390/molecules25204781>
- [49] Shi, NQ., Qi, XR. (2018). Preparation of Drug Liposomes by ReversePhase Evaporation. In: Lu, WL., Qi, XR. (Eds) *Liposome-Based Drug Delivery Systems. Biomaterial Engineering*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-49231-4\\_3-1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-49231-4_3-1)
- [50] Ahmadi, S., Rabiee, N., Bagherzadeh, M., Elmi, F., Fatahi, Y., Farjadian, F., Baheiraei, N., Nasser, B., Rabiee, M., Dastjerd, N. T., Valibeik, A., Karimi, M., & Hamblin, M. R. (2020). Stimulus-Responsive Sequential Release Systems for Drug and Gene Delivery. *Nano today*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.100914>
- [51] Franco, M. S., Gomes, E. R., Roque, M. C., & Oliveira, M. C. (2021). Triggered Drug Release From Liposomes: Exploiting the Outer and Inner Tumor Environment *Frontiers in Oncology*,11.<https://doi.org/10.3389/fonc.2021.623760>
- [52] Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>

- [53] Ta, T., Porter, T. 2013. "Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy," *Journal of Controlled Release* 169, 112–125.
- [54] Bi, H., Xue, J., Jiang, H., Gao, S., Yang, D., Fang, Y., & Shi, K. (2019). Current developments in drug delivery with thermosensitive liposomes. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(4), 365-379. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.07.006>
- [55] Kneidl, B., Peller, M., Winter, G., Lindner, L. H., & Hossann, M. (2014). Thermosensitive liposomal drug delivery systems: State of the art review. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4387-4398. <https://doi.org/10.2147/IJN.S49297>
- [56] Landon, C. D., Park, Y., Needham, D., & Dewhurst, M. W. (2011). Nanoscale Drug Delivery and Hyperthermia: The Materials Design and Preclinical and Clinical Testing of Low Temperature-Sensitive Liposomes Used in Combination with Mild Hyperthermia in the Treatment of Local Cancer. *The open nanomedicine journal*, 3, 38. <https://doi.org/10.2174/1875933501103010038>
- [57] May, J. P., Hysi, E., Wirtzfeld, L. A., Undzys, E., Li, D., & Kolios, M. C. (2016). Photoacoustic Imaging of Cancer Treatment Response: Early Detection of Therapeutic Effect from Thermosensitive Liposomes. *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165345>
- [58] Sułkowski, W., Pentak, D., Nowak, K., & Sułkowska, A. (2005). The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of Molecular Structure*, 744-747, 737-747. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.075>
- [59] Lu, T., & ten Hagen, T. L. (2017). Inhomogeneous crystal grain formation in DPPC/DSPC based thermosensitive liposomes determines content release kinetics. *Journal of Controlled Release*, 247, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.12.030>
- [60] Ramos-Cabrer, P., Campos, 2013. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. *International Journal of Nanomedicine* 951. <https://doi.org/10.2147/ijn.s30721>
- [61] Dékány, G., Csóka, I., Erös, I., 2001. Interaction Between Liposomes and Neutral Polymers: Effect of Adsorption on Drug Release. *Journal of Dispersion Science and Technology* 22, 461–472. <https://doi.org/10.1081/dis-100107855>

- [62] Cardoso dos Santos, M., Silva de Farias, B., da Costa Cabrera, D., Roberto Sant'Anna Cadaval Junior, T., Antonio de Almeida Pinto, L., Gonçalves DalBó, A., & de Lima, V. R. (2021). Physico-chemical interactions of a new rodcoil-rod polymer with liposomal system: Approaches to applications in tryptophan-related therapies. *Chemistry and Physics of Lipids*, 235, 105027. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.105027>
- [63] Christian, D. A., & Hunter, C. A. (2012). Particle-mediated delivery of cytokines for immunotherapy. *Immunotherapy*, 4(4), 425. <https://doi.org/10.2217/imt.12.26>
- [64] Willerding, L., Limmer, S., Hossann, M., Zengerle, A., Wachholz, K., ten Hagen, T.L., Koning, G. A., Sroka, R., Lindner, L. H., & Peller, M. (2016). Method of hyperthermia and tumor size influence effectiveness of doxorubicin release from thermosensitive liposomes in experimental tumors. *Journal of Controlled Release*, 222, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.12.004>
- [65] Upadhyay, R. K. (2014). Drug Delivery Systems, CNS Protection, and the Blood Brain Barrier. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/869269>
- [66] Huang, Y., Gu, B., Liu, C., Stebbing, J., Gedroyc, W., Thanou, M., & Xu, X. Y. (2019). Thermosensitive Liposome-Mediated Drug Delivery in Chemotherapy: Mathematical Modelling for Spatio-temporal Drug Distribution and Model-Based Optimisation *Pharmaceutics*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11120637>
- [67] Chang AE, Wu QV, Jenkins IC, Specht JM, Gadi VK, Gralow JR, Salazar LG, Kurland BF, Linden HM. Phase I/II Trial of Combined Pegylated Liposomal Doxorubicin and Cyclophosphamide in Metastatic Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2018 Feb;18(1): e143-e149. doi: 10.1016/j.clbc.2017.10.005.
- [68] Berkenblit A, Eder JP Jr, Ryan DP, Seiden MV, Tatsuta N, Sherman ML, Dahl TA, Dezube BJ, Supko JG. Phase I clinical trial of STA-4783 in combination with paclitaxel in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2007 Jan 15;13(2 Pt 1):584-90. doi: 10.1158/1078-0432.CCR06-0964.
- [69] Regenold M, Bannigan P, Evans JC, Waspe A, Temple MJ, Allen C. Turning down the heat: The case for mild hyperthermia and thermosensitive liposomes. *Nanomedicine*. 2022 Feb; 40:102484. Doi: 10.1016/j.nano.2021.102484.

- [70] Mayer LD, Tardi P, Louie AC. CPX-351: a nanoscale liposomal coformulation of daunorubicin and cytarabine with unique biodistribution and tumor cell uptake properties. *Int J Nanomedicine*. 2019 May 23; 14:38193830. Doi: 10.2147/IJN.S139450.
- [71] Pérez-López, A., Martín-Sabroso, C., Torres-Suárez, A. I., & AparicioBlanco, J. (2020). Timeline of Translational Formulation Technologies for Cancer Therapy: Successes, Failures, and Lessons Learned Therefrom. *Pharmaceutics*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111028>
- [72] Immordino, M. L., Dosio, F., & Cattel, L. (2006). Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, 1(3), 297–315. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2426795/>
- [73] Fukuda, T., Sumi, T., Teramae, M., Nakano, Y., Morishita, M., Terada, H., Yoshida, H., Matsumoto, Y., Yasui, T., Ishiko, O., 2013. Pegylated liposomal doxorubicin for platinum-resistant or refractory Müllerian carcinoma: A single-institutional experience. *Oncology Letters* 5, 35–38. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.971>
- [74] Kirui, D. K., Koay, E. J., Guo, X., Cristini, V., Shen, H., & Ferrari, M. (2014). Tumor vascular permeabilization using localized mild hyperthermia to improve macromolecule transport. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology, and medicine*, 10(7), 1487. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.11.001>
- [75] Hegyi, G., Szigeti, G. P., & Szász, A. (2013). Hyperthermia versus Oncothermia: Cellular Effects in Complementary Cancer Therapy. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/672873>
- [76] Âmin, M., Huang, W., & B. Seynhaeve, A. L. (2020). Hyperthermia and Temperature-Sensitive Nanomaterials for Spatiotemporal Drug Delivery to Solid Tumors. *Pharmaceutics*,12(11). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12111007>
- [77] Dunne, M., Regenold, M., & Allen, C. (2020). Hyperthermia can alter tumor physiology and improve chemo- and radio-therapy efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews*,163-164,98-124. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.007>
- [78] Zininga, T., Ramatsui, L., & Shonhai, A. (2018). Heat Shock Proteins as



Immunomodulants. *Molecules*,23(11). doi.org/10.3390/molecules23112846

[79] Cheng, Y., Weng, S., Yu, L., Zhu, N., Yang, M., & Yuan, Y. (2019). The Role of Hyperthermia in the Multidisciplinary Treatment of Malignant Tumors. *Integrative Cancer Therapies*,18. doi.org/10.1177/1534735419876345

[80] Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research*, 1(1), 13-28.https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002

[81] Huang D, Liao F, Molesa S, Redinger D, Subramanian V. 2003. Plastic-Compatible Low Resistance Printable Gold Nanoparticle Conductors for Flexible Electronics. *J. Electrochem. Soc.* 150(7): G412. http://dx.doi.org/10.1149/1.1582466

[82] Stuchinskaya T, Moreno M, Cook MJ, Edwards DR, Russell DA. 2011. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody? phthalocyanine? gold nanoparticle conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10(5):822. http://dx.doi.org/10.1039/c1pp05014a

[83] Brown SD, Nativo P, Smith J, Stirling D, Edwards PR, Venugopal B, Flint DJ, Plumb JA, Graham D, Wheate NJ. 2010. Gold Nanoparticles for the Improved Anticancer Drug Delivery of the Active Component of Oxaliplatin.*J. Am. Chem. Soc.* 132(13):46784684. http://dx.doi.org/10.1021/ja908117a 92.

[84] Ali ME, Mustafa S, Hashim U, Che Man YB, Foo KL. 2012. Nanobioprobe for the Determination of Pork Adulteration in Burger Formulations. *Journal of Nanomaterials*. 20121-7. http://dx.doi.org/10.1155/2012/83238794.

[85] Perrault SD, Chan WCW. 2010. In vivo assembly of nanoparticle components to improve targeted cancer imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(25):11194-11199.http://dx.doi.org/10.1073/pnas.100136710796.

[86] Peng G, Tisch U, Adams O, Hâkim M, Shehada N, Broza YY, Billan S, Abdah Bortnyak R, Kuten A, Haick H. 2009. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nature Nanotech.* 4(10):669-673. http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2009.235

[87] Thompson DT. 2007. Using gold nanoparticles for catalysis. *Nano Today*. 2(4):40-43. http://dx.doi.org/10.1016/s1748-0132(07)70116-099.

- [88] Leung, S. J., Kachur, X. M., Bobnick, M. C., & Romanowski, D. M. (2011). Wavelength-Selective Light-Induced Release from Plasmon Resonant Liposomes. *Advanced functional materials*, 21(6), 1113. <https://doi.org/10.1002/adfm.201002373>
- [89] Ali, M. Wu, Y. El-Sayed, M. 2019. "Gold-Nanoparticle-Assisted Plasmonic Photothermal Therapy Advances Toward Clinical Application". *J.Phys. Chem. C*, 123, 25, 15375–15393.
- [90] Bejarano, J. Rojas, A. Ramírez-Sagredo, A. L. Riveros, A. MoralesZavala, F. Yvo Flores. 2020. "Light induced release of the cardioprotective peptide angiotensin(1–9) from thermosensitive liposomes with gold nanoclusters". *Journal of Controlled Release* 328;859–872
- [91] Daruich De Souza, C., Ribeiro Nogueira, B., & Rostelato, M. E. C. (2019). Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. *Journal of Alloys and Compounds*, 798, 714-740. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.05.153>
- [92] Amina, S.J., Guo, B., 2020. A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *International Journal of Nanomedicine* Volume 15, 9823–9857. <https://doi.org/10.2147/ijn.s279094>
- [93] Elahi, N., Kamali, M., & Baghersad, M. H. (2018). Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review *Talanta*, 184, 537-556. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.088>
- [94] Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 53, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>
- [95] Zhao, P., Li, N., & Astruc, D. (2013). State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(3-4), 638665. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.002>
- [96] Lombardo, D., & Kiselev, M. A. (2022). Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and NanomedicineApplication.*Pharmaceutics*,14(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543>

- [97] Kok, H. P., Cressman, N. K., Ceelen, W., Brace, C. L., Ivkov, R., Grüll, H., Wust, P., & Crezee, J. (2020). Heating technology for malignant tumors: A review. *International journal of hyperthermia: The official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia. Group*,37(1), 711. <https://doi.org/10.1080/02656736.2020.1779357>
- [98] Han, H. D., Jeon, Y. W., Kwon, H. J., Jeon, H. N., Byeon, Y., Lee, C. O., Cho, S. H., & Shin, B. C. (2015). Therapeutic efficacy of doxorubicin delivery by a CO<sub>2</sub> generating liposomal platform in breast carcinoma. *Acta Biomaterialia*, 24, 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.019>
- [99] Tharkar, P., Varanasi, R., Wong, W. S., Jin, C. T., & Chrzanowski, W. (2019). Nano-Enhanced Drug Delivery and Therapeutic Ultrasound for Cancer Treatment and Beyond. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 494402. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00324>
- [100] Beard, P. (2011). Biomedical photoacoustic imaging. *Interface Focus*, 1(4), 602-631. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2011.0028>
- [101] Jin, X., Lu, X., Zhang, Z., & Lv, H. (2020). Indocyanine Green Parthenolide Thermosensitive Liposome Combination Treatment for Triple-Negative Breast Cancer. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 31933206. <https://doi.org/10.2147/IJN.S245289>
- [102] Dorjsuren, B., Chaurasiya, B., Ye, Z., Liu, Y., Li, W., Wang, C., Shi, D., Evans, C. E., Webster, T. J., & Shen, Y. (2020). Cetuximab-Coated Thermo-Sensitive Liposomes Loaded with Magnetic Nanoparticles and Doxorubicin for Targeted EGFR-Expressing Breast Cancer Combined Therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 8201-8215. <https://doi.org/10.2147/IJN.S261671>
- [103] Zhang, X., Liu, Y., Luo, L., Li, L., Xing, S., Yin, T., Bian, K., Zhu, R., & Gao, D. (2019). A chemo-photothermal synergetic antitumor drug delivery system: Gold nanoshell coated wedelolactone liposome. *Materials Science and Engineering: C*, 101, 505-512. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.006>
- [104] Koga, K., Tagami, T., & Ozeki, T. (2021). Gold nanoparticle-coated thermosensitive liposomes for the triggered release of doxorubicin, and photothermal

therapy using a near-infrared laser. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 626, 127038. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.127038>

[105] Kang, M. S., Lee, S. Y., Kim, K. S., & Han, D. (2020). State of the Art Biocompatible Gold Nanoparticles for Cancer Theragnosis. *Pharmaceutics*, 12(8), 701. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080701>

[106] Ta, T., Porter, T. 2013. "Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy," *Journal of Controlled Release* 169, 112–125.

[107] M. Wu, Y. El-Sayed, M. 2019. "Gold-Nanoparticle-Assisted Plasmonic Photothermal Therapy Advances Toward Clinical Application". *J. Phys. Chem. C*, 123, 25, 15375–15393.

[108] Vines, J. Yoon, J. Ryu, N. Lim, D. Park, H. 2019." Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy". *Front. Chem.*, 05 April.

[109] Alvi, S., Appidi, T., Deepak, B., Rajalakshmi P., Minhas, G., Singh, S., Begum, A., Bantal, V., Srivastava, R., Khan, N., Rengan, A. 2019. "The "nano to micro" transition of hydrophobic curcumin crystals leading to in situ adjuvant depots for Auliposome nanoparticle mediated enhanced photothermal therapy," *Biomater. Sci.*, 7, 3866–3875.

[110] Seynhaeve, A.L.B. Min, M. Haemmerich, D. Rhoon, G.C. Hagen, T.L.M. "Hyperthermia and smart drug Delivery systems for solid tumor therapy". *Advanced Drug Delivery Reviews* Volumes 163–164, Pages 125

[111] Jeon, M., Kim, G., Lee, W., Baek, S., Jung, H., Im, H. 2021. "Development of theranostic dual-layered Au-liposome for effective tumor targeting and photothermal therapy," Jeon et al. *J Nanobiotechnol* 19:262.

[112] Emamzadeh, M., Emamzadeh, M., Pasparakis, G. 2019. "Dual Controlled Delivery of Gemcitabine and Cisplatin Using Polymer-Modified Thermosensitive Liposomes for Pancreatic Cancer," *ACS Appl. Bio Mater.*, 2, 3, 1298–1309

[113] Byrne, J., Jajja, M., O'Neill, A., Schorzman, A., Keeler, A., Luft, J., Zamboni, W., DeSimone, J., Yeh, J. 2018." Impact of formulation on the iontophoretic delivery of the FOLFIRINOX regimen for the treatment of pancreatic cancer," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* volume 81, pages 991–998.

[114] Choi, H. S., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J. P., Ipe, B. I., Bawendi, M. G., & Frangioni, J. V. (2007). Renal Clearance of Nanoparticles. *Nature biotechnology*, 25(10), 1165. <https://doi.org/10.1038/nbt1340>

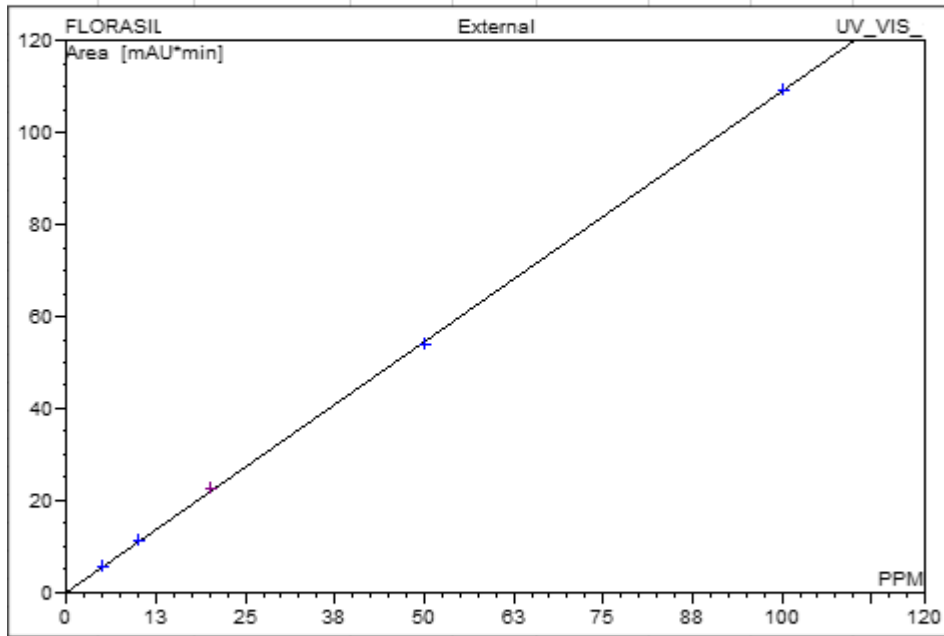
[115] James, W.D., Hirsch, L.R., West, J.L., O'Neal, P.D., Payne, J.D., 2007. Application of INAA to the build-up and clearance of gold nanoshells in clinical studies in mice. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 271, 455–459.. <https://doi.org/10.1007/s10967-007-0230-1>

[116] Cole LE, Ross RD, Tilley JM, Vargo-Gogola T, Roeder RK. Gold nanoparticles as contrast agents in x-ray imaging and computed tomography. *Nanomedicine (Lond)*. 2015 Jan;10(2):321-41. doi: 10.2217/nnm.14.171.

## 7. EKLER

### Ek 1- HPLC 5-Fluorourasil standart kalibrasyon eğrisi.

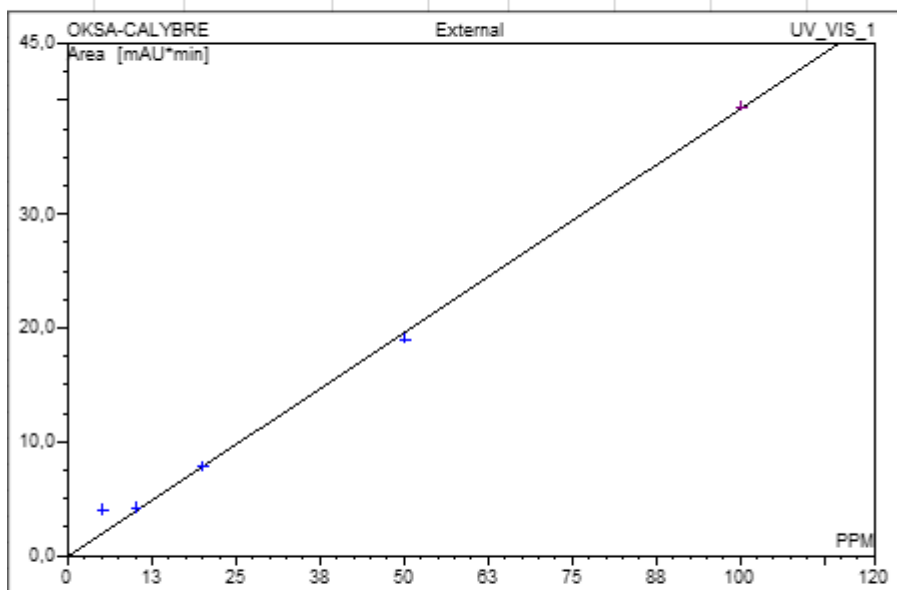
Sample Name:	flurosil20PPM	Injection Volume:	20.0
Vial Number:	GE3	Channel:	UV_VIS_1
Sample Type:	standard	Wavelength:	265
Control Program:	flurosil	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	flurosil	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	#####	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	8.00	Sample Amount:	1.0000



No.	Ret.Time min	Peak Name	Cal.Type	Points	Coeff.Det. %	Offset	Slope	Curve
1	1.23	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	2.13	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3	6.12	FLORASIL	Lin	5	99.9838	0.0000	1.0896	0.0000
<b>Average:</b>					99.9838	0.0000	1.0896	0.0000

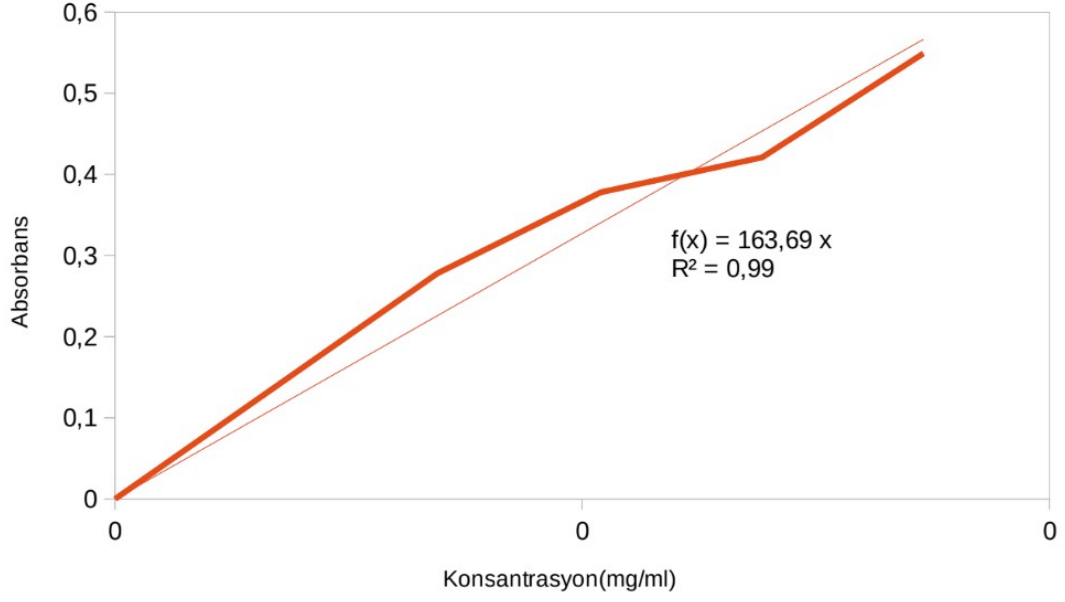
## Ek 2- HPLC Oksaliplatin standart kalibrasyon eğrisi.

Sample Name:	oksaliplatin 100ppm	Injection Volume:	20.0
Vial Number:	BC7	Channel:	UV_VIS_1
Sample Type:	standard	Wavelength:	210
Control Program:	oksaliplatin	Bandwidth:	n.a.
Quantif. Method:	oksaliplatin	Dilution Factor:	1.0000
Recording Time:	#####	Sample Weight:	1.0000
Run Time (min):	6.00	Sample Amount:	1.0000



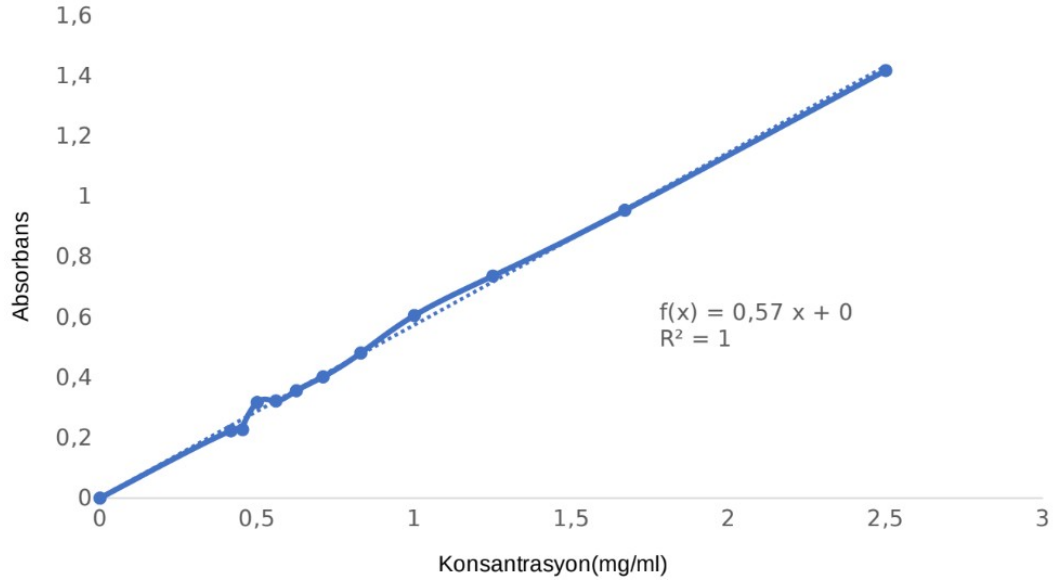
No.	Ret.Time min	Peak Name	Cal.Type	Points	Coeff.Det. %	Offset	Slope	Curve
1	1.89	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
2	2.51	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
3	2.66	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4	3.31	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5	3.37	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
6	3.53	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
7	4.02	OKSA-CALIBRI	Lin	5	99.5139	0.0000	0.3923	0.0000
<b>Average:</b>					99.5139	0.0000	0.3923	0.0000

### Ek 3- UV-vis spektrofotometre Resveratrol standart kalibrasyon denklem grafiği

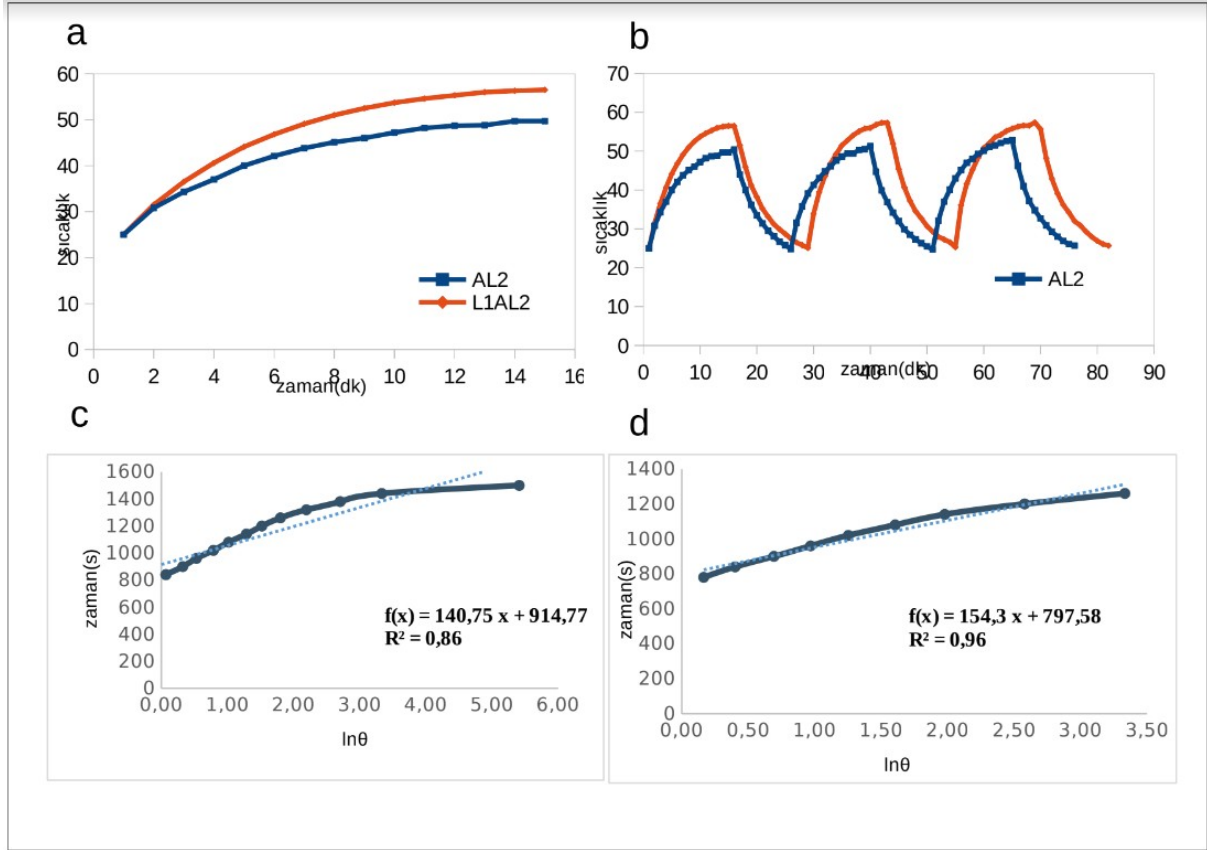




#### Ek 4- UV-vis spektrofotometre Rhodamine B standart kalibrasyon denklem grafiği



## Ek 5– AL2 ve L1AL2'nin fototermal terapi etkisinin değerlendirilmesi



a AL2 ve L1AL2'nin 15 dakika boyunca 1 W yoğunlukta 808 nm lazer ışınlaması altında sıcaklık değerlendirmesi. b Lazer açma/kapama döngüsünün 3 tekrarı sırasında AL2 ve L1AL2'nin termal stabilitesinin doğrulanması. Fototermal sistemden c L1AL2 ve d AL2 ısı transferi için zaman sabiti.

