

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOKSORUBİSİN VE ELAKRİDAR İÇEREN PLGA/SİLİKA HİBRİT  
NANOPARTİKÜLLERİN FORMÜLASYONU VE MEME KANSERİNDEKİ  
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Hayrettin TONBUL**

**Farmasötik Teknoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**ANKARA**

**2019**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOKSORUBİSİN VE ELAKRİDAR İÇEREN PLGA/SİLİKA HİBRİT  
NANOPARTİKÜLLERİN FORMÜLASYONU VE MEME KANSERİNDEKİ  
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Ecz. Hayrettin TONBUL**

**Farmasötik Teknoloji Programı**

**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN**

**ANKARA**

**2019**

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DOKSORUBİSİN VE ELAKRİDAR İÇEREN PLGA/SİLİKA HİBRİT NANOPARTİKÜLLERİN  
FORMÜLASYONU VE MEME KANSERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hayrettin Tonbul

Danışman: Prof. Dr. Yılmaz Çapan

Bu tez çalışması 04.10.2019 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Teknoloji Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Sema Çalış

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. İmran Vural

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Prof. Dr. Güneş Esendağlı

(Hacettepe Üniversitesi)

Üye:

Doç. Dr. Zeynep Şafak Teksin

(Gazi Üniversitesi)

Üye:

Doç. Dr. Yeşim Aktaş

(Erciyes Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

08 Ekim 2019

  
Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET BEYANLARI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

04 /10/2019

Hayrettin TONBUL

*“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”*

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

**ETİK BEYAN**

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Hayrettin TONBUL

## TEŞEKKÜR

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

Beni Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Ailesi'ne kabul ederek tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü imkânı sağlayan başta Anabilim Dalı Başkanları Prof. Dr. Sema Çalış ve Prof. Dr. Levent Öner olmak üzere tüm Hocalarıma,

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

Doktora çalışmalarımız boyunca birlikte çalıştığımız ve desteklerini her an hissettiğim Yük. Kim. Müh. Gözde Ultav, Ecz. Sedenay Akbaş ve Ecz. Indrit Seko'ya

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

Bu tezde yer alan çalışmaları yürütebilmem için proje desteği sağlayan TÜBİTAK'a (Proje No:216S999),

Bu günlere gelmemde büyük emekleri olan ve her zaman yanımda olup beni destekleyen Sevgili Aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Tonbul, H., Doksorubisin Ve Elakridar İçeren PLGA/Silika Hibrit Nanopartiküllerin Formülasyonu Ve Meme Kanserindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2019.** Doksorubisin kanser tedavisinde tek başına etkili olmasına rağmen, P-glikoprotein (P-gp) substratı olması etkinliğini sınırlamaktadır. Gelişen bu ilaç direncinin aşılması amacıyla çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bunlardan biri P-gp substratı antikanser ilacın, P-gp substratı olan başka bir madde ile birlikte uygulanmasıdır. Bu amaçla kullanılan inhibitörlerden olan Elakridar, BCRP (meme kanseri direnç proteini) ve P-gp'yi inhibe etmesinden dolayı üzerinde en sık araştırma yapılan inhibitörlerden biri olmuştur. Gelişen ilaç direncinin aşılmasında umut vadeden bir diğer yaklaşım ise antikanser ilacın nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler içerisine yüklenmesi ve bu sistemlerin kanser hücrelerinde bulunan reseptörlere hedeflendirilmesidir. Bu tez kapsamında mezoporlu silika nanopartiküllerine doksorubisin yüklenerek kanser hücrelerine yüksek seviyede penetre olabilen küçük boyutta (~50 nm), folik asit ile aktif olarak hedeflendirilmiş nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan bu nanopartiküller, pasif hedeflendirilme ile istenilen dokuda birikmenin sağlanması ve kanda kalış sürelerinin uzatılması amacıyla P-gp inhibitörü olan elakridar ile birlikte PLGA-PEG'den oluşan ikinci bir polimerik sisteme yüklenmiştir. Geliştirilen bu ilaç taşıyıcı sistem detaylı olarak karakterize edilmiş; sitotoksiteleri, hücre içine alımları ve mekanizmaları T47-D, ZR-75-1 ve EMT6/AR1(doksorubisine dirençli) meme kanseri hücre hatları kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen nano ilaç taşıyıcı sistem doksorubisin çözeltisine ve piyasadaki ticari nanoilaç olan Caelyx®'e göre belirgin derecede daha iyi sonuç vermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** PLGA hibrit nanopartikül, elakridar, mezoporlu silika nanopartikülleri, meme kanseri, aktif ve pasif hedeflendirme

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 216S999).



**ABSTRACT**

**Tonbul, H., Development of Doxorubicin and Elacridar Loaded PLGA/Silica Hybrid Nanoparticles and Evaluation of Activity Against Breast Cancer, Hacettepe University Graduate School Health Sciences Pharmacy Department of Pharmaceutical Technology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2019.** Although doxorubicin is efficient alone in cancer treatment, its being a substrate of P-glycoprotein (P-gp) limits its effectiveness. Various approaches have been developed to overcome the growing resistance to these drugs. One of them is the co-administration of P-gp substrate anticancer drugs with another P-gp inhibitor substance. Elacridar which is an inhibitor used for this purpose, has been one of the most studied inhibitors because of the BCRP (breast cancer resistant protein) and P-gp inhibition ability. Another promising approach about overcoming of developed drug resistance is the encapsulation of anticancer drugs into the nanoparticulate drug delivery systems and targeting these systems to the receptors found on cancer cells. In this thesis, folic acid targeted nanoparticles with small size (~50 nm) can penetrate to the cancer cells at a high level were prepared by loading doxorubicin to the mesoporous silica nanoparticles (MSN). Prepared nanoparticles and P-gp inhibitor, elacridar, were co-loaded to the second polymeric system made of PLGA-PEG to ensure the accumulation in desired tissue and extended blood residence time. Developed drug delivery systems were characterized in detail, cytotoxicity, cellular uptake and mechanism of nanoparticles were investigated on T47-D, ZR-5-1 and EMT6/AR1 breast cancer cell lines. The obtained nano-drug delivery system was significantly better than doxorubicin solution and Caelyx® which was the commercially available nano drug.

**Keywords:** PLGA hybrid nanoparticle, elacridar, mesoporous silica nanoparticles, breast cancer, active and passive targeting

This research was supported by The Scientific and Technical Research Council of Turkey (TUBITAK) [grant numbers: 216S999].

**İÇİNDEKİLER**

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET BEYANLARI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xviii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Kanser	3
2.1.1. Meme Kanseri	4
2.1.2. Doksorubisin, Direnç Gelişimi ve Caelyx®	5
2.1.3. Kanser Tedavisinde P-gp İnhibitörleri	7
2.2. Kanser Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	10
2.2.1. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme	12
2.2.2. Mezoporlu Silika Nanopartikülleri (MSN)	16
2.2.3. Hibrit Nanopartiküller	18
2.3. Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu	23
2.3.1. Partikül Büyüklüğü ve Morfolojisi	23
2.3.2. Nanopartiküllerden İlaç Salımının Belirlenmesi	25
2.3.3. Diğer Karakterizasyon Çalışmaları	26
2.4. Nanopartiküllerin Hücre Esaslı Değerlendirilmeleri	26
2.4.1. Biyouyumluluk Çalışmaları	27
2.4.2. Sitotoksosite Çalışmaları	27
2.4.3. Hücre İçine Alım Çalışmaları	28
2.4.4. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alım Mekanizmaları	29

2.4.5 Hücre İçine Alım Mekanizmalarını Belirleme Yöntemleri	34
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	35
3.1. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar	35
3.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler	36
3.3. Analitik Yöntem Validasyonları	38
3.4. Nanopartiküllerin Hazırlanması	39
3.4.1. Mezoporlu Silika Nanopartiküllerin (MSN) Hazırlanması	39
3.4.2. MSN'lere Folik Asit Konjugasyonunun Yapılması ve Doksorubisin Yüklmesi	40
3.4.3. PLGA/Silika Hibrit Nanopartiküllerin (HyNp) Elde Edilmesi	43
3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	45
3.5.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Analizi	45
3.5.2. Nanopartiküllerin Morfolojisinin İncelenmesi	45
3.5.3. Enerji Dağılımlı X-Işını (EDX) ve C,H,N Elemental Analiz	45
3.5.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi	46
3.5.5. Yüzey ve Gözenek Karakterizasyonu	46
3.5.6. X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD)	46
3.5.7. Enkapsülasyon Etkinliği	47
3.5.8. İn Vitro Salım Deneyleri	47
3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	47
3.6.1. Etkin Madde İçermeyen Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Biyouyumluluklarının Araştırılması	48
3.6.2. Etkin Madde Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksitelerinin Araştırılması	48
3.6.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi	49
3.6.4. Folat Reseptörüne Hedeflendirilmiş Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Hücre İçine Alım Mekanizmalarının İncelenmesi	50
3.7. İstatiksel Analiz	51
<b>4. BULGULAR</b>	52
4.1. Analitik Yöntem Validasyonları	52
4.2. MSN Formülasyonlarının Optimizasyonu	54
4.3. Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	56

4.3.1. Ortalama Partikül Büyüklüğü, Partikül Morfolojisi, PDI ve Zeta Potansiyeli	56
4.3.2. Enerji Dağılımlı X-Işını (EDX) ve C,H,N Elemental Analiz	60
4.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi	61
4.3.4. Yüzey ve Gözenek Karakterizasyonu	64
4.3.5. X-Işını kırınım desenleri (XRD)	64
4.3.6. Enkapsülasyon Etkinliği ve İn Vitro Salım Deneyleri	65
4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	68
4.4.1. Etkin Madde İçermeyen Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Biyouyumluluklarının Araştırılması	68
4.4.2. Etkin Madde Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksitelerinin Araştırılması	70
4.4.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi	78
4.4.4. Folat Reseptörüne Hedeflendirilmiş Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Hücre İçine Alım Mekanizmalarının İncelenmesi	87
<b>5. TARTIŞMA</b>	91
5.1. Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Optimizasyonu	91
5.2. Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Folik Asit Konjugasyonu	92
5.3 Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	98
5.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	99
5.4.1. Etkin Madde İçermeyen Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Biyouyumluluklarının Araştırılması	99
5.4.2. Etkin Madde Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksitelerinin Araştırılması	101
5.4.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi	104
5.4.4. Folat Reseptörüne Hedeflendirilmiş Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Hücre İçine Alım Mekanizmalarının İncelenmesi	106
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	107
<b>7. KAYNAKLAR</b>	109
<b>8. EKLER</b>	126
<b>EK-1:</b> Turnitin Dijital Makbuz	
<b>EK-2:</b> Tez Çalışması Orjinallik Çalışması	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>APTES</b>	3-Triethoxysilylpropylamine
<b>BCRP</b>	Meme Kanseri Direnç Proteini
<b>CTAB</b>	Setrimonyum Bromür
<b>DCM</b>	Diklorometan
<b>DLS</b>	Dinamik Işık Saçılımı
<b>DMF</b>	Dimetil Formamit
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DOX</b>	Doksorubisin
<b>EDC</b>	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide
<b>EDX</b>	Enerji Dağılımlı X-Işını
<b>EE</b>	Enkapsülasyon Etkinliği
<b>ELC</b>	Elakridar
<b>EMA</b>	Avrupa İlaç Ajansı
<b>EPR</b>	Artan Geçirgenlik ve Alıkonma
<b>FA</b>	Folik Asit
<b>FBS</b>	Fetal Sığır Serumumu
<b>FDA</b>	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>FITC</b>	Floresin İzosiyanat
<b>FTIR</b>	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre
<b>HyNp</b>	Doksorubisin ve Elakridar yüklü MSN ve PLGA Nanopartiküllerinden Oluşan Hibrit Nanopartikül Formülasyonu
<b>MFI</b>	Ortanca Floresan İntensite
<b>MSN</b>	Mezoporlu Silika Nanopartikülü
<b>MSN-FA</b>	Folik Asit Konjuge Edilmiş Mezoporlu Silika Nanopartikülü
<b>MTT</b>	Thiazolil Mavisi Tetrazolyum Bromür
<b>NHS</b>	N-Hidroksisüksinimid
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponlanmış Tuz
<b>PDI</b>	Polidispersite İndeksi

<b>PEG</b>	Polietilen Glikol
<b>PLGA</b>	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
<b>PLGA-PEG</b>	Pegile Edilmiş Poli(laktik-ko-glikolik asit)
<b>PVA</b>	Polivinil Alkol
<b>RES</b>	Retiküloendotelyal Sistem
<b>SAXRD</b>	Küçük Açılı X-Işını Difraksiyonu
<b>SDS</b>	Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SEM</b>	Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>TEM</b>	Geçirimli Elektron Mikroskobu
<b>TEOS</b>	Tetraetil Ortosilikat

## ŞEKİLLER

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b> Doksorubisinin kimyasal yapısı.	5
<b>2.2.</b> Caelyx®'in şekilsel gösterimi.	6
<b>2.3.</b> Normal ve tümörlü dokunun şematik gösterimi.	13
<b>2.4.</b> Nanopartiküllerin tümöre pasif ve aktif hedeflendirilmesinin şematik gösterimi	14
<b>2.5.</b> Folat reseptörüne hedeflendirilmiş ilaç-folik asit konjugatının folat reseptörü bağımlı endositozu	16
<b>2.6.</b> Hibrit nanopartiküller sistemlerin genel tasarımları. Hibrit nanopartiküller, bir nanopartiküler sistem diğer nanopartiküler sistemi enkapsülasyonu (A) veya yüzeye bağlanmasıyla (B) elde edilirler.	18
<b>2.7.</b> PLGA ve monomerlerinin kimyasal yapısı.	21
<b>2.8.</b> Başlıca PLGA hibrit nanopartikülleri. Kısaltmalar: PEG, polietilen glikol; RBC, red blood cells-kırmızı kan hücreleri.	22
<b>2.9.</b> Endositoz mekanizmalarının sınıflandırılması.	30
<b>2.10.</b> Hücre içine alım yollarının ve belirtilen yolak ile hücre içine alınan maddelerin hücre içindeki lokalizasyonunun şekilsel gösterimi. Kısaltmalar; ER: endoplamik retikulum, NLS: çekirdek lokalizasyon sinyali, NPC: çekirdek por kompleksi, TPP: trifenil.	32
<b>2.11.</b> Klatriin aracılı endositozun TEM görüntüsü (a-c) ve şematik gösterimi (d), kaveol aracılı endositozun TEM gösterimi (e) ve şematik gösterimi (f), makropinositozun şematik gösterimi (g)	33
<b>3.1.</b> MSN'lerin üretimi ve doksorubisin yüklenmesinin şekilsel gösterimi. MSN'ler üretilirken ilk olarak distile su içerisine CTAB eklenerek misel oluşumu sağlanmakta ve sonrasında NH <sub>4</sub> OH ile sentez ortamının pH'ı ayarlanmaktadır. Sonrasında ortama TEOS eklenerek misel yapısı içeren silika nanopartikülleri sentezlenmektedir. Bu nanopartiküllerin asidik metanol ile ekstraksiyonu yapılarak misel yapılarının çözünerek ortamdan uzaklaşması ve böylelikle gözenekli yapının oluşması sağlanarak ilaç yüklenmesine elverişli hale getirilmektedir.	42
<b>3.2.</b> MSN'lere folik asit konjugasyonu yapılmasının grafiksel gösterimi.	43

- 3.3.** Tez kapsamında geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemin elde edilmiş basamakları. A) Yaklaşık boyutu 50 nm olan silika nanopartiküllerinin (SN) sentezi, B) Silika nanopartikülleri sentezlenirken yapıya eklenerek misel oluşturan sürfaktanların asidik ekstraksiyonla uzaklaştırılması sonucu mezoporlu silika nanopartiküllerinin (MSN) eldesi, C) Elde edilen MSN'lere folik asit konjugasyonu ve sonrasında doksorubisinin yüklenmesi, D) Yaklaşık boyutu 250 nm olan, PLGA-PEG polimeri kullanılarak MSN ve elakridarın PLGA içine hapsedilerek elde edilen hibrit nanopartikül (HyNp) sistemi. 44
- 4.1.** Doksorubisin(A) ve elakridarın(B) floresan dedektör kullanılarak HPLC analiziyle elde edilen kalibrasyon eğrileri. 52
- 4.2.** Optimum formülasyon için Topsis tabanlı Taguchi dizayn ile elde edilen ana etki grafikleri. 55
- 4.3.** Elde edilen optimum MSN formülasyonunun su ortamındaki partikül büyüklüğü dağılımı (Ortalama partikül büyüklüğü: 53,2 nm, PDI:0,126) 56
- 4.4.** Gözenekler açılmadan önce SEM görüntüleri çekilen silika nanopartikülleri. 57
- 4.5.** MSN(A) ve MSN-FA(B) nanopartiküllerinin SEM görüntüleri. 57
- 4.6.** (A)MSN-FA nanopartiküllerinin TEM görüntüsü ve DLS analizi (partikül boyutu: 61,9 nm PDI:0,156), (B)PLGA nanopartiküllerinin TEM görüntüsü ve DLS analizi(partikül boyutu:253,2 PDI:0,101), (C)Hibrit nanopartiküllerin(HyNp) TEM görüntüsü ve DLS analizi(partikül boyutu:275,4 PDI:0,121). 59
- 4.7.** MSN(A) ve MSN-FA(B) nanopartiküllerinin EDX spektrumları. 60
- 4.8.** MSN, MSN-FA ve folik asitin FTIR Spektrumları. 63
- 4.9.** MSN(A), MSN-FA(B) partiküllerinin gözenek boyutu dağılımı ve yüzey alanı(C) değerleri. 64
- 4.10.** MSN(A) ve MSN-FA(B) partiküllerinin SAXRD spektrumları. 65
- 4.11.** pH 5,5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde MSN-FA ve PLGA/MSN-Fa nanopartiküllerinden doksorubisinin salım profilleri. 67
- 4.12.** pH 7.4 tampon çözeltisinde HyNp'den elakridarın salım profili. 67
- 4.13.** Etkin madde yüklenmemiş MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin 24,48 ve 72 saat L929 hücreleriyle inkübasyonu sonrası canlı hücre miktarları (A,B,C). Belirtilen nanopartikül konsantrasyonlarının normal şartlarda ne kadar doksorubisin taşıyabileceği(D). 69
- 4.14.** T-47D(A) ve ZR-75-1(B) hücre hatlarının çeşitli doksorubisin çözeltileriyle 72 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılığı. 70



- 4.15.** Belirtilen konsantrasyonlarda doksorubisin içeren formülasyonların T-47D ve ZR-5-1 hücre hatlarındaki canlı hücre miktarları. 71
- 4.16.** EMT6/AR1 hücre hattında çeşitli doksorubisin çözeltileriyle hücrelerin 72 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılığı. 73
- 4.17.** EMT6/AR1 hücre hattında 5-160 nM elakridar çözeltileriyle hücrelerin 72 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılığı. 74
- 4.18.** EMT6/AR1 hücre hattında 40-180 nM elakridar çözeltileriyle hücrelerin 72 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılığı. 75
- 4.19.** EMT6/AR1 hücre hattında 100 nM sabit elakridar konsantrasyonu ile birlikte çeşitli konsantrasyonlardaki doksorubisin çözeltilerinin birlikte uygulanarak hücrelerle 72 saat inkübasyonu sonrası canlı hücre miktarı. 76
- 4.20.** Çeşitli formülasyon ve çözelti gruplarının EMT6/AR1 hücre hattında 72 saat inkübasyon sonrası canlı hücre miktarı. (1) Elakridar konsantrasyonu elakridar eklenen her grupta 100 nM sabit konsantrasyonda. (2) Elakridar partikül içine yüklemeyen çözelti olarak uygulandı. (3) Elakridar MSN-FA ile birlikte PLGA içine yüklendiği nihai hibrit nanopartikül (HyNp) formülasyonu. 77
- 4.21.** Doksorubisin çözeltisi, Caelyx® ve doksorubisin yüklü MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin 15dk, 1sa, 4sa ve 8saat inkübasyonu sonrası T-47D, ZR-75-1 ve EMT6/AR1 hücre hatlarındaki floresan işaretli hücrelerin normalize edilmiş ortanca floresan intensitesindeki (MFI) değişimleri. 80
- 4.22.** MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin T-47D, ZR-75-1 ve EMT6/AR1 hücre hatlarında 8 saat inkübasyon sonrası akım sitometri histogramları. 81
- 4.23.** EMT6/AR1 hücre hattında doksorubisin, MSN-FA ve hibrit nanopartikül formülasyonlarının 1, 4 ve 8 saat inkübasyonu sonrası floresan işaretli hücrelerin A) normalize edilmiş ortanca floresan intensitesindeki (MFI) değişimleri ve B) akım sitometri histogramları. (1): Elakridar içermeyen hibrit nanopartikül formülasyonu, (2): Elakridarın hibrit nanopartikül içine yüklenmeyip dışardan çözelti halinde uygulandığı formülasyon, (3): Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen elakridar ve MSN-FA'ların beraber enkapsüle edildiği asıl hibrit nanopartikül formülasyonu. 82
- 4.24.** T-47D hücre hattına uygulanan formülasyonların kırmızı ve mavi kanaldaki görüntüleri ile bu görüntülerin birleştirilmiş halleri. 84
- 4.25.** ZR-75-1 Hücre hattı hücre hattına uygulanan formülasyonların kırmızı ve mavi kanaldaki görüntüleri ile bu görüntülerin birleştirilmiş halleri. 85
- 4.26.** EM6/AR1 hücre hattına uygulanan formülasyonların kırmızı ve mavi kanaldaki görüntüleri ile bu görüntülerin birleştirilmiş halleri. 86

- 4.27.** Klatrin aracılı endositoz yolağını inhibe ettiği bilinen klorpromazinin çeşitli konsantrasyonlarda EMT6/AR1 hücre hattına uygulanarak 24 saat inkübasyonu sonrası hücre ölüm miktarları. 87
- 4.28.** FITC-İnsan Transferinin 10,20,40 ve 80µg/ml konsantrasyonlarında, hücrelerle 1,5saat inkübasyon sonrasında floresan işaretli hücre popülasyonu yüzdesi. 88
- 4.29.** FITC-İnsan Transferini (A) ve doksorubisin yüklü MSN-FA nanopartiküllerinin (B) EMT6/AR1 hücrelerine alımına çeşitli konsantrasyon ve uygulama yöntemine göre klorpromazinin (CPZ) ve 450 mM sükrozun etkileri. 89
- 5.1.** MSN'lere çeşitli yüzey modifikasyonları yapılması sonrası doksorubisin yüklenecek enkapülasyon etkinlikleri karşılaştırıldığında elektrostatik etkileşimlere bağlı olarak ilaçların enkapülasyon etkinlikleri değişebilmektedir 97

**TABLolar**

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>2.1.</b>	P-gp inhibitörlerinin sınıflandırılması.	9
<b>2.2.</b>	İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan nanopartiküler sistemlerin sınıflandırılması.	11
<b>2.3.</b>	Hibrit nanopartiküler sistemlerin geliştirildiği çalışmalardan bazıları.	19
<b>3.1.</b>	Doksorubisin ve elakridarin miktar tayinlerinde kullanılan HPLC yöntem parametreleri.	38
<b>3.2.</b>	MSN'lerin hazırlanmasında kullanılan deney tasarımı değişkenleri	39
<b>3.3.</b>	Optimum formülasyonda hedeflenen durumların değerleri ve yüzdece ağırlıkları.	40
<b>4.1.</b>	Doksorubisin ve elakridarin HPLC miktar tayini yönteminde elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları.	53
<b>4.2.</b>	Geliştirilen formülasyonlardaki sentez parametreleri ve elde edilen sonuçlar.	54
<b>4.3.</b>	MSN ve MSN-FA nanopartiküllerin karakteristik özellikleri.	56
<b>4.4.</b>	MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin C,H,N elemental analiz sonucu.	61
<b>4.5.</b>	Mezoporlu silika nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinlikleri.	66

## 1. GİRİŞ

Kanser, geliştirilen tüm tedavi yöntemlerine rağmen günümüzde halen dünyada en çok ölüme sebebiyet veren hastalık türüdür. Meme kanseri kadınlarda görülen tüm kanser türlerinin %30'undan fazlasını oluşturmaktadır ve günümüzde her 7 kadından birinde meme kanseri görülmektedir. Meme kanserinin tedavisinde doksorubisin, paklitaksel, kampotesin gibi kemoterapötikler kullanılmaktadır. Ancak bu kemoterapötikler, tedavi etkinliklerinin düşük olması, hedeflenen dokuya istenen miktarda ulaştırılamamaları gibi sakıncalar taşımaktadırlar. Bu sakıncalardan kaynaklanan, tedavide yüksek doz uygulaması da hastada sistemik toksik etkilere neden olmaktadır. Meme kanseri tedavisinde kullanılan bu etkin maddelerin etkinliklerini artırmak ve yan etkilerini azaltmak üzere, etkin maddelerin nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile taşınması üzerine çalışmalar artarak devam etmektedir.

Doksorubisin birçok tümör çeşidinin tedavisinde, 20 yıldan daha fazla zamandır kullanılmaktadır. Kanser tedavisinde tek başına etkili olmasına rağmen, P-Glikoprotein (P-gp) substratı olması etkinliğini sınırlamaktadır. Başta meme kanseri hücreleri olmak üzere akciğer, rahim gibi birçok kanser hücresi aşırı P-gp eksprese etmekte ve gelişen direnç, tedavi için doz artırımını gerektirmektedir. Artan antikanser dozu da kardiyotoksisite, gastrointestinal sistemde problemler gibi istenmeyen etkileri beraberinde getirmektedir. Gelişen bu ilaç direncinin aşılması amacıyla çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bunlardan biri P-gp substratı antikanser ilacın, P-gp substratı olan başka bir madde ile birlikte uygulanmasıdır. Bu amaçla kullanılan inhibitörlerden olan Elakridar (GF-120918), BCRP (breast cancer resistance protein, meme kanseri direnç proteini) ve P-gp'yi inhibe etmesi ve diğer P-gp inhibitörlerine göre daha az hücrel toksisite göstermesiyle üzerinde en sık araştırma yapılan inhibitörlerden biri konumundadır. Ayrıca nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin aktif ve pasif hedeflendirilme yaklaşımları ile ilacın tümör dokusuna yüksek seviyede taşınabilmesi mümkün olmaktadır. Aktif hedeflendirme yaklaşımı ile nanopartiküllerin, tümör hücrelerinde aşırı eksprese olduğu bilinen transferrin, vasküler endotelial büyüme faktörü, lektin, folat ve insan epidermal

reseptörü gibi reseptörlere hedeflendirilmesi başarıyla sağlanabilmektedir. Aktif hedeflendirmede en sık kullanılan reseptörelere biri folat reseptörüdür ve folik asit bu reseptöre yüksek afinite göstermektedir. Pasif hedeflendirme yaklaşımı ise başta partikül boyutu gibi parametrelerin değiştirilmesi ile istenilen dokuya ilacın ulaşmasını öngörmektedir. Pasif hedeflendirmenin başarısız olmasındaki en kritik unsur ise nanopartiküllerin dolaşım sisteminde opsonizasyona uğraması ve sonuç olarak retikuloendotelial sistem tarafından hızla dolaşımdan uzaklaştırılmalarıdır. Bunun üstesinden gelinmesi amacıyla ise nanopartiküllerin yüzeyi PEG polimeri ile modifiye edilerek opsonizasyonun azaltılabilmekte ve bu sayede daha uzun kanda kalış süresi elde edilebilmektedir.

Bu tez kapsamında gözenekli yapısı ve hedeflendirilmeye uygun yüzey özellikleri gibi birçok avantaj sunan mezogözenekli silika nanopartiküllerine (MSN) doksorubisin yüklenerek, kanser hücrelerine yüksek seviyede penetre olabilen küçük boyutta (~50 nm), folik asit ile konjugasyonu yapılarak folat reseptörüne hedeflendirilmiş nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan bu nanopartiküller; doksorubisinin ani salımının önüne geçilmesi, pasif hedeflendirilme ile istenilen dokuda birikmenin sağlanması ve kanda kalış sürelerinin uzatılması amacıyla, FDA onaylı, biyoyumlu ve biyoparçalanır bir polimer olan pegile edilmiş Poli(Laktik-Ko-Glikolik Asit) (PLGA)'den oluşan ikinci bir polimerik sisteme P-gp inhibitörü olan elakridar ile birlikte yüklenmiştir. Hazırlanan bu ilaç taşıyıcı sistemin meme kanseri üzerindeki etkinliği detaylı hücre kültürü çalışmalarıyla incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Katı tümör, küçük bir hücre ya da bir hücre grubunda meydana gelen bir mutasyon ile başlar. Sağlıklı bir dokuda hücrelerin çoğalması, hücresel sinyallere göre ayarlanır ve bu mekanizma ile hücre bölünme sayısı kontrol altında tutulur. Eğer bu hücresel sinyaller doğru şekilde iletilmez ya da hücre bölünmesini yöneten genlerde kendiliğinden oluşan bir mutasyon söz konusu olur ise, hücreler kontrolsüz olarak çoğalmaya ve bir araya gelerek tümör denilen yapıları oluşturmaya başlar (1).

Kanser tedavisinde ana stratejiler cerrahi operasyon ve radyasyon terapisisidir. Bu tedavi stratejisi genel olarak lokal tedavi olarak adlandırılabilir (2). Ancak cerrahi operasyon zor ve hastanın normal vücut figürünü bozan bir yaklaşımdır. Diğer yandan radyasyon terapisi ise kanserli doku yakınında bulunan dokulara ve sağlıklı organlara da zarar verme riski taşımaktadır. Kanser tedavisinde üçüncü seçenek ise kan dolaşımına sitotoksik bir ajanın verilmesidir ve buna kemoterapi adı verilir. Pek çok kemoterapötik ilaç sadece aktif olarak çoğalan hücreler üzerinde, bazı ilaç grupları ise hücre döngüsünün belirli evresinde bulunan spesifik hücre tiplerine karşı etkilidir. Eğer koşullar uygunsa, kemoterapi hastalarda kanserin tamamen iyileştirilmesinde kullanılır. Eğer kanseri tamamen iyileştirmek mümkün değilse kemoterapi uygulanmasındaki amaç tümör dokusunun küçültülmesi ya da kanserin büyümesinin ve yayılmasının engellenmesi olabilir. Eğer kanser çok ileri bir evrede ise kemoterapötik ilaçlar, kanser nedeniyle oluşan semptomların azaltılmasında ve hastanın yaşam kalitesinin arttırılmasında kullanılabilir (3).

Kanser tedavisinde cerrahi operasyonun ve radyoterapinin dezavantajları varolmasına rağmen kemoterapi tedavi stratejileri içinde üçüncü sırada yer almaktadır. Bunun nedeni, oldukça etkili kemoterapötik ilaçlar olmasına karşın ilaçların etki bölgesine varmasının ve burada yeterli konsantrasyona ulaşmasının sağlanamamasıdır. Pek çok durumda uygulanan ilacın küçük bir fraksiyonu hedef bölgeye ulaşmasına karşın, kalan ilaç fraksiyonu tüm vücuda dağılmaktadır. Bu durum da kaçınılmaz olarak kemoterapötik ilaçların sağlıklı organ ve dokulara

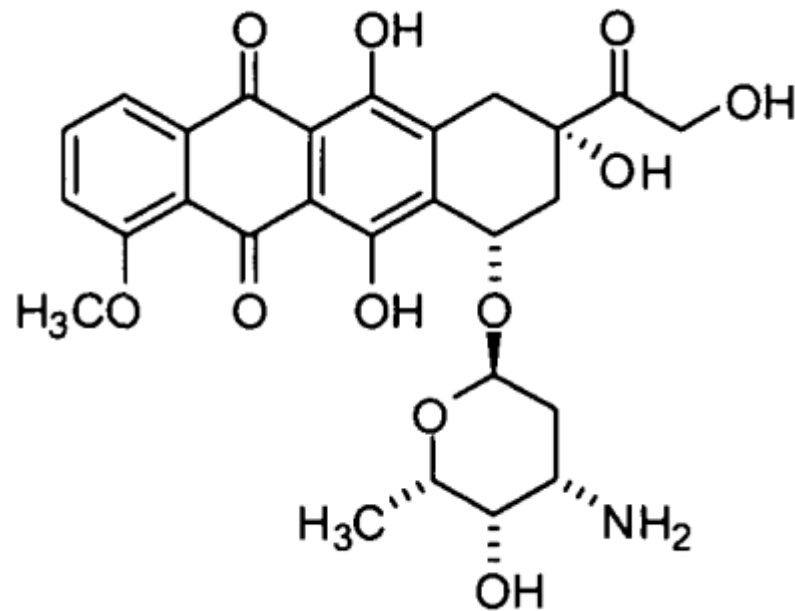
dağılmasına, immün sistemin depresyonuna neden olarak ilacın verilen dozunun azaltılmasına ve sonuç olarak da ilacın potansiyel tedavi yeteneğinin kısıtlanmasına yol açacaktır. Bu durum nanoteknoloji ürünü ilaç taşıyıcı sistemlerle aşılabılır. İlacın dolaşımında daha uzun süre kalmasını sağlayan, immün sistemden kaçabilen, hasta dokuya ulaşabilen, sağlıklı organlardan mümkün olduğunca uzak duran ve ilaç salımını kontrol eden sistemler kanser kemoterapisindeki sınırlamaları aşmayı sağlayabilirler (3).

### **2.1.1. Meme Kanseri**

Meme kanseri Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) kadınları en sık etkileyen kanserdir. ABD’de her yıl yaklaşık 210.000 yeni invaziv meme kanseri ve 50000 duktal karsinoma in situ (DCIS) tanısı konmakta ve 41000 kişi meme kanseri nedeniyle ölmektedir (4). Meme kanseri kadınlarda görülen kanserlerin %32’sini oluşturmaktadır ve yaşamları boyunca her 7 kadından birinde meme kanseri gelişmektedir. Kadınlarda kansere bağlı ölümlerin %15’ini meme kanseri oluşturmaktadır ve kansere bağlı ölüm nedenleri içinde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Erkek meme kanseri ise tüm yeni vakaların yaklaşık olarak toplam %1’ini oluşturmaktadır. Erkek meme kanserinin de evrelendirmesi ve doğal seyri kadın meme kanseriyle benzer özelliklere sahiptir. Meme kanseri insidansı yavaşça artmaya devam etmektedir; ancak 1990’lı yılların başından itibaren mortalite oranlarında azalma olmuştur. Bu azalma mamografi ile daha geniş taramaların yapılması, daha iyi cerrahi, radyoterapi ve sistemik adjuvan kemoterapi yapılmasını içeren birçok faktöre bağlıdır (5). Meme kanseri tedavisinde en çok kullanılan kemoterapötikler; doksorubisin, paklitaksel, dozetaksel, tioridazin, disülfiram, kaptopresin ve kurkumindir (6). Ancak bu kemoterapötiklerin etkinliklerinin düşük olması, hedeflenen dokuya istenen miktarda ulaştırılamaması ve bu sebeplerden kaynaklanan yüksek doz uygulaması sonucunda sistemik toksik etkilerin görülmesinden dolayı, meme kanseri tedavisinde kullanılan bu etkin maddelerin nanoteknolojik taşıyıcı sistemler ile taşınması üzerine çalışmalar sürdürülmektedir (7).

### 2.1.2. Doksorubisin, Direnç Gelişimi ve Caelyx®

Antrasiklin türevi bir antineoplastik ajan olan doksorubisin birçok farklı kanser türüne karşı güçlü aktiviteye ve geniş spektrumu sahiptir (8). 1970'li yıllarda ilk olarak klinik kullanıma girmesiyle birlikte günümüzde hematolojik ve katı tümörlerin tedavisinde en sık kullanılan ajanlardan biri haline gelmiştir (9). Diğer tüm antrasiklinler gibi DNA içine interkalasyon yapar ve kanser hücresinde nükleik asit sentezini inhibe ederek etkisini gösterir (10). Başta over kanseri olmak üzere, akciğer, meme, tiroit kanseri gibi çeşitli kanser tedavilerinde kullanıldığı gibi bazı tür yumuşak doku sarkomaları ve lösemilerin tedavisinde de kullanılmaktadır (11).



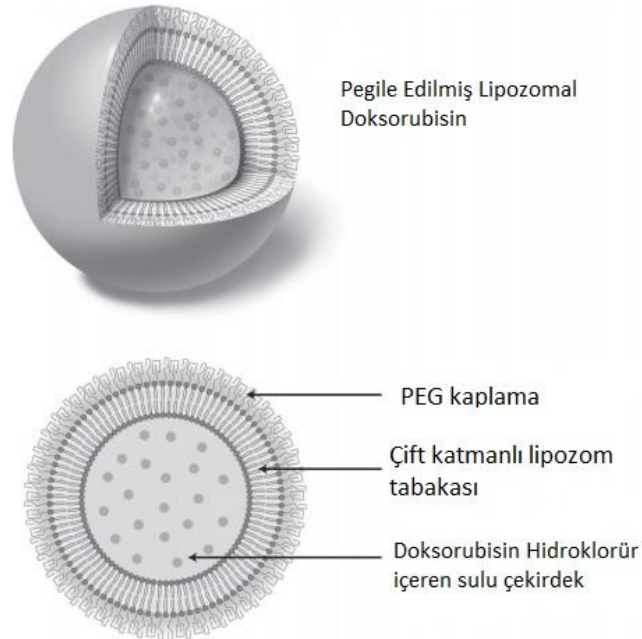
**Şekil 2.1.** Doksorubisinin kimyasal yapısı.

Doksorubisinin kalp yetmezliği ve kalp atışları düzensizliğine yol açması gibi istenmeyen birçok yan etkisi yanında renal, pulmoner, testiküler ve hematolojik birçok yan etkisinin de olmasından dolayı kullanımı sınırlıdır (12). Ayrıca doksorubisinin P-glikoprotein (P-gp) substratı olması etkinliğini sınırlandırmaktadır. Başta meme kanseri hücreleri olmak üzere akciğer, over, özafagus gibi birçok kanser hücresi aşırı P-gp eksprese etmekte ve gelişen direnç, tedavi için doz artırımını gerektirmektedir. Artan antikanser dozu da kardiyotoksisite, gastrointestinal



sistemde problemler gibi istenmeyen yan etkileri beraberinde getirmektedir. Gelişen bu ilaç direncinin aşılması amacıyla çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bunlardan biri P-gp substratı antikanser ilacın, P-gp substratı olan başka bir madde birlikte uygulanmasıdır. Bu konu P-gp inhibitörleri bölümünde detaylı bir şekilde anlatılacaktır.

Doksorubisinin yan etkilerinin üstesinden gelmek ve etkinliği artırmak amacıyla geliştirilen doksorubisinin iki farklı lipozomal formülasyonunun klinik kullanımına Avrupa Komisyonu 2000 yılında onay vermiştir. Bunlardan ilki Kanada ve Avrupada'ki ticari ismiyle Caelyx®, ABD'deki kullanım adıyla Doxil®'dir. Caelyx®/Doxil® doksorubisinin pegile edilmiş lipozomal formülasyonudur ve hidrojene soya fosfatidilkolin, kolesterol ve PEG ile modifiye edilmiş fosfatidiletanolaminden meydana gelmektedir. Onaylanan diğer lipozomal formülasyon ise Myocet®'tir. Myocet®'in yapısında ise yumurta fosfatilkolinini ve kolesterol bulunmaktadır (9).



**Şekil 2.2.** Caelyx®'in şekilsel gösterimi (13).

Caelyx®'te lipozomların ortalama partikül büyüklüğü yaklaşık 100 nm'dir. Bu sayede kalp ve gastrointestinal sistem gibi sağlıklı dokulardaki sıkı bağlantılar (tight

junction) sebebiyle bu dokulara giremeyip, tümör dokusunda bu bağlantıların bozulması sebebiyle seçici olarak tümör dokusunda birikmektedir (11). Myocet'ten farklı olarak ise yüzeyinde pegilasyon işlemi yapıldığı için dolaşım sisteminde daha uzun süre kalarak daha etkin bir tedavi sağlayabilmektedir (14). Pegilasyon işlemiyle ilgili daha detaylı bilgi ilerleyen bölümlerde verilecektir.

Tez kapsamında doksorubisin içerecek şekilde tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemin etkinliği, serbest doksorubisin çözeltisinin yanında Caelyx® ile de karşılaştırılması amaçlanmıştır.

### 2.1.3. Kanser Tedavisinde P-gp İnhibitörleri

P-gp bir ATPaz enerji bağımlı membran glikoproteinidir (15). P-gp (ABCB1/MDR1), MRP1 (ABCC1), MRP2 (ABCC2), ve göğüs kanseri direnç proteini (breast cancer resistance protein, BCRP) (ABCG2), antikanser ilaçların hücre dışına atılmalarında ve permeabilitelerinin kısıtlanmasında etkilidirler (16, 17). Akciğer, karın, özafagus, over, meme kanseri ya da lenfoma lösemi gibi durumlarında P-gp ekspresyonu hastalık süresince düşük iken, kemoterapi sonrasında tümör hücrelerinde P-gp ekspresyonu artmaktadır. P-gp'nin inhibisyonu ile kullanılan antikanser ajanın tümör hücresinden atılmasının engellenmesi, dolayısı ile daha az miktar ve daha az toksik etki ile beklenen etkinliği göstermesi sağlanmaktadır (18, 19). P-gp modülatörleri birden fazla mekanizma ile çalışabilirler. Örneğin; substrat ile yarışarak ya da allosterik olarak substrat bağlayan bölgenin bloke edilmesini sağlayabilirler, ATP hidroliz prosesini ya da hücre membran lipitlerinin bütünlüğünü değiştirerek P-gp ekspresyonunu azaltabilirler. İdeal bir P-gp inhibitörü toksik olmamalı ve kendi başına farmakolojik etki göstermemelidir (15, 18).

P-gp inhibitörleri birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyon olmak üzere üç grupta toplanabilirler (Tablo 2.1.). Birinci ve ikinci jenerasyon P-gp inhibitörlerinin, oral ilaç tedavisinde kullanımları hayal kırıklığı ile sonuçlanmıştır çünkü bu inhibitörler farmakolojik etkiye sahiptirler ve daha az etkili, selektif olmayan ve P-gp inhibitör etkisi görülebilmesi için toksik doza çıkılması gereken inhibitörlerdir (18, 20). İkinci jenerasyon inhibitörlerde de toksisite problemi görülmesi ile birlikte, Glaxo Smith

Kline firması Elakridar (GF-120918)'ı geliştirmiştir (21). Elakridar, BCRP ve P-gp'yi inhibe etmektedir. Kendi jenerasyonundaki diğer P-gp inhibitörlerine göre daha az hücrenel toksisite göstermekte, P-gp'ye daha yüksek duyarlılıkta ve CYP3A4 gibi enzim sistemlerine daha düşük afinitede olduğu için istenmeyen farmakokinetik etkilere sebep olmamaktadır (21-23).

Nanotaşıyıcılar ile P-gp modölatörlerinin kombinasyonu hazırlanarak yeni stratejiler geliştirilebilmektedir. Bu iki yapının tek bir taşıyıcıda taşınması ile birlikte sinerjik etki beklenmektedir. P-gp inhibitörlerinin, hücre içerisine giren antikanser ajanın hücreden uzaklaştırılmasını engellemesi üzerine, daha düşük doz ile tedavi sağlanabilecek ve daha az antikanser ajan kullanımına bağlı olarak daha az toksisite gözlemlenecektir (24).

Bu kapsamda tez çalışmalarında kullanılan ilaç taşıyıcı sistemde doksorubisin ile birlikte elakridarında kombine olarak verilebileceği bir nanopartiköler sistem tasarlanmıştır.

**Tablo 2.1.** P-gp inhibitörlerinin sınıflandırılması (21).

Jenerasyon	Örnekler	Özgüllük	Kısıtlayıcı Durumlar
<b>Birinci Jenerasyon</b>	Verapamil, Siklosporin A, Rezerpin, Kinidin, Yohimbin, Tamoksifen, Toremifen	Selektif olmayan, düşük bağlanma kapasitesi	Diğer taşıyıcılar ve enzim sistemlerinin substratlarıdır. Farmakolojik olarak aktiftirler. Kendileri P-gp tarafından taşınmaktadır.
<b>İkinci Jenerasyon</b>	Deksverapamil, Deksniğuldipin, Valspodar (PSC 833), Dofekuidar fumarat (MS-209)	Birinci jenerasyona göre daha fazla özgüllük göstermekte fakat diğer sistemlerle etkileşim göstermekte.	CYP 3A4 enzimi ve diğer ABC taşıyıcıları için substratlardır.
<b>Üçüncü Jenerasyon</b>	Siklopropil Dibenzosuberone zosuquidar (LY335979), Lanikuidar (R101933), Mitotan (NSC-38721), Birikodar (VX-710), <b>Elakridar (GF120918/GG918)</b> , ONT-093, tarikuidar (XR9576), HM30181	P-gp fonksiyonunu spesifik olarak ve güçlü şekilde önleyen en yüksek özgüllük.	Birinci ve ikinci nesil inhibitörlerdeki gibi bir sınırlamaları yoktur.

## 2.2. Kanser Tedavisinde Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknoloji esaslı ürünler, günümüzde sağlık alanı da dahil olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılması fikri 2000'li yılların başından beri çok yoğun bir şekilde araştırılmakta ve her geçen gün bu konu üzerinde yapılan çalışmalar artmaktadır (25).

Nanopartiküller partikül büyüklükleri 1-1000 nm arasında değişen, terapötik ilaçların adsorbe ettirildiği, içine hapsedildiği ya da kovalent bağlarla bağlandığı makro moleküllerden oluşan katı kolloidal sistemlerdir.

Nanotaşıyıcıların elde edilmiş yöntemlerine göre ilaç molekülü taşıyıcı sistem içinde hapsedilebilir, çözündürülebilir ya da nanopartikül matriksine eklenebilir.

İlaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküllerin kullanımının üstünlükleri şunlardır (26, 27);

- Nanopartiküller ilaçların biyodağılımını değiştirebildiğinden ilaçların farmakokinetik özelliklerinde iyileştirme yapabilmekte ve bu sayede yan etkileri azaltabilmektedirler.
- Küçük partikül boyutuna sahip olabilme özellikleri sayesinde tümör dokularının bir özelliği olan artan geçirgenlik ve alıkonma etkisi (enhanced permeation retention effect, EPR) ile tümör dokusunda toplanabilmekte ve bu sayede pasif olarak hedeflendirilebilmektedirler.
- İlacı degradasyondan koruma özellikleri vardır.
- Farmakolojik olarak aktif olan ajanların kontrollü ve spesifik etki bölgesinde optimum dozda salınmasını sağlar.
- Sistem pek çok yoldan (oral, nazal, parenteral, intraoküler vb.) kullanılabilir.

**Tablo 2.2.** İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan nanopartiküler sistemlerin sınıflandırılması (28).

Partikül Tipi	Yapısı/Bileşimi	Özellikleri	Kullanım Alanları
<b>Polimer</b>	PLGA, gliserol, kitosan, DNA; monomerler, kopolimerler, hidrojeller	Bazıları biyoparçalanabilirdir	İlaç taşıma, pasif salım, kontrollü salım
<b>Dendrimer</b>	PAMAM vb.	Polidisperstesi düşük, yüksek oranda ilaç yüklenebilir, biyouyumlu	İlaç taşıma
<b>Lipid</b>	Lipozom, misel	Hidrofobik molekül taşıyabilir, biyouyumlu, 50-500 nm	İlaç taşıma
<b>Kuantum Noktaları</b>	CdSe, CuInSe, CdTe vb.	Geniş eksitasyon, fotoağarma az, ayarlanabilir emisyon, 5-100 nm	Optik görüntüleme
<b>Altın</b>	Küre, çubuk, kabuk	Biyouyumlu, 5-100 nm	Hipertermi tedavisi, ilaç taşıma
<b>Silika</b>	Küre, kabuk, mezoporlu	50-500 nm, Biyouyumlu	Kontrast ajanı, ilaç taşıma
<b>Manyetik</b>	Demir oksit yada kobalt bazlı; küre, dekstran yada silika agregatlar	Süperparamanyetik, ferromanyetik, süperferromanyetik, paramanyetik	Kontrast ajanı, hipertermi tedavisi
<b>Karbon Bazlı</b>	Karbon nanotüpler, grafen	Biyouyumlu	İlaç taşıma

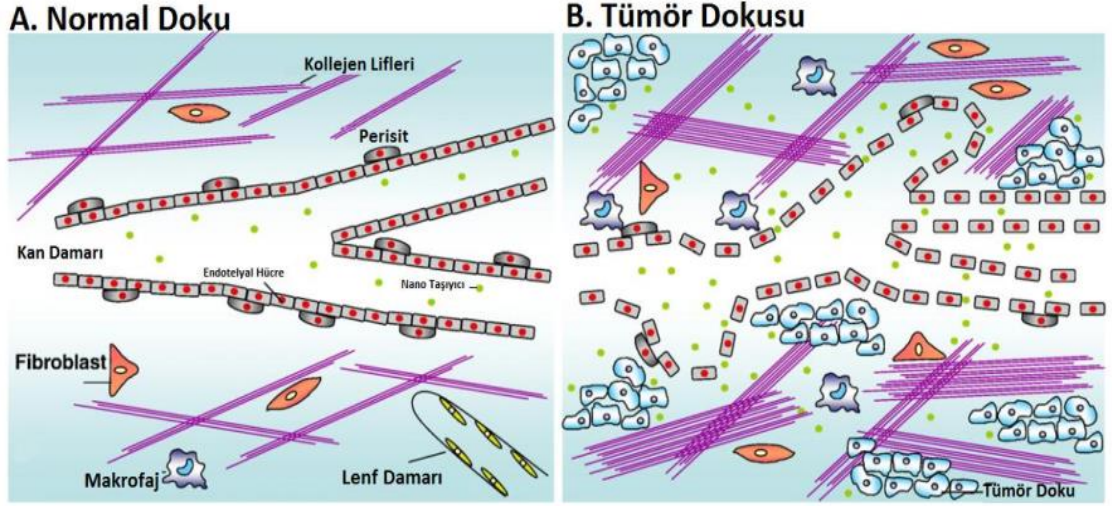
### 2.2.1. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme

Etkin bir kanser tedavisi için her zaman kanser patofizyolojisinin sağlıklı bir şekilde anlaşılması gerekmektedir. Konvansiyonel kemoterapötik ajanlar, son derece zayıf çözünürlükleri, elverişsiz farmokokinetik profilleri ve vücuttaki belirsiz biyodağılımları sebebiyle zayıf etkinlik göstermekte ve ciddi yan etkilere sebep olmaktadır (29). Tüm bu olumsuzlukların üstesinde gelebilme potansiyeli olması sebebiyle nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde hedeflendirme kanser tedavisi araştırmalarında çok geniş yer tutmaktadır. Hedeflendirmenin sağlayacağı en temel avantaj ilacın etkinliğini ve biyoyararlanımını arttırırken toksisiteyi ve yan etkiyi büyük ölçüde azaltmalarıdır (28, 30).

Nanopartiküler sistemlerde birçok farklı yaklaşım ile hedeflendirilme yapılabilir de, bu yaklaşımların tümü pasif ve aktif hedeflendirme olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilmektedir. Her iki yaklaşımda da amaç etkin maddenin kanser hücresinde hücre içi konsantrasyonu arttırarak normal dokudaki toksisiteyi azaltmaktır.

#### Pasif Hedeflendirme ve EPR (Artan Geçirgenlik ve Alıkonma) Etkisi

Nanopartiküllerin pasif olarak hedeflendirilmesi yaklaşımı 24 yıl önce pegile edilmiş lipozomal doksorubisinin(Caelyx®/Doxil®) onaylanması ile klinikte kullanılmaya başlanmıştır (31). Pasif hedeflendirme yaklaşımı başta partikülün boyut ve morfolojisindeki parametrelerin değiştirilmesi ile istenilen dokuya ilacın ulaşmasını öngörmektedir. Bunun sağlanabilmesi için ise katı tümörlerin normal dokuda olmayan karakteristik özelliklerinden faydalanılır. Tümörlü dokuda lenfatik drenaj azalmış ve damar sisteminde normal dokuda bulunmayan boşluklar meydana gelmiş durumdadır (Şekil 2.3.). Bu sebeple taşıyıcı sistemin sağlıklı doku yerine tümörlü dokuda birikmesine olanak sağlamış olmaktadır. EPR (enhanced permeability and retention-artan geçirgenlik ve alıkonma) etkisi olarak bilinen bu olay ilk olarak 1986 yılında Matsumura ve Maeda tarafından bildirilmiştir (32, 33). Bu yaklaşım etkin bir biçimde ilacın etkinliğini ve biyoyararlanımını arttırmaktadır (34, 35).



**Şekil 2.3.** Normal ve tümörlü dokunun şematik gösterimi (29).

Bu yaklaşım göz önünde bulundurularak geliştirilen belirli sayıda ilaç günümüzde klinikte kullanılmaktadır. Doxil<sup>®</sup>, Abraxane<sup>®</sup>, Marqibo<sup>®</sup>, DaunoXome<sup>®</sup> ve Onivyde<sup>®</sup> ABD’de; Caelyx<sup>®</sup>, Myocet<sup>®</sup> ve Mepact<sup>®</sup> Avrupa’da; Genexol-PM<sup>®</sup> Kore’de ve SMACS<sup>®</sup> ise Japonya’da kullanımda olan pasif hedeflendirilmesiyle ilaç taşınması yapılan sistemlerden bazılarıdır. Bunların dışında EndoTAG-1, AZD2811 ve CPX-1 isimleriyle geçen benzer şekildeki sistemlerin klinik çalışmalarda güvenliği ve/veya terapötik etkinlikleri gösterilmiş durumdadır (36-38).

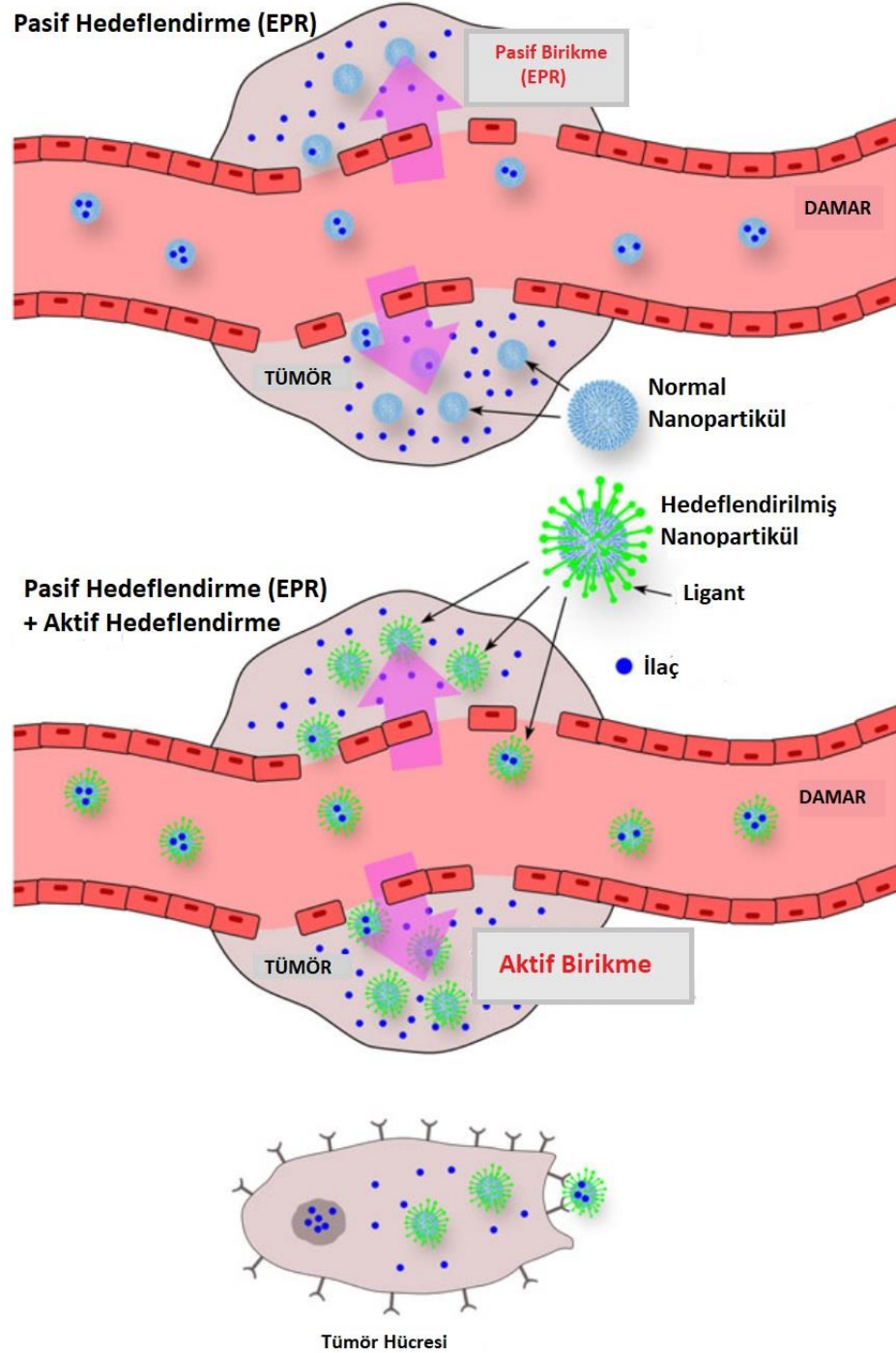
EPR etkisi nanotaşıyıcı sistemin immün sistem tarafından vücuttan uzaklaştırılmadığı ve vücuttaki dolaşım süresi uzun olduğu sürece idealdir. EPR etkisinin etkinliğinin artması için nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin boyutu doğru olacak şekilde (10-100 nm), renal eliminasyona uğramaması için nötr veya anyonik yükte ve retiküloendotelial sistem (RES) etkisinden saklanacak şekilde tasarlanmış olması gerekmektedir (25). Ancak tüm faktörler göz önünde bulundurulduğunda bile bu etki sadece tümör dokusuna spesifik bir hedeflendirme sağlayamaz. Bu sebeple pasif hedeflendirmenin yanında aktif hedeflendirme yönteminde göz önünde bulundurularak tasarlanan sistemler önem kazanmaktadır.

### **Aktif Hedeflendirme**

Temel olarak aktif hedeflendirme, taşıyıcı sistemin yüzeyini protein, glikolipit, peptit, polisakkarit, aptamer ve monoklonal antikolar gibi çeşitli ligandlarla



modifiye ederek hedeflenen bölgedeki spesifik reseptörlere bağlanmasını (Şekil 2.4.) sağlamaktır (39). Bu sistemlerin en etkin kullanıldığı durum modifiye edilen ligandın reseptörlerinin kanserli hücrede olup sağlıklı hücrede olmadığı durumdur (40).



**Şekil 2.4.** Nanopartiküllerin tümöre pasif ve aktif hedeflendirilmesinin şematik gösterimi(41).

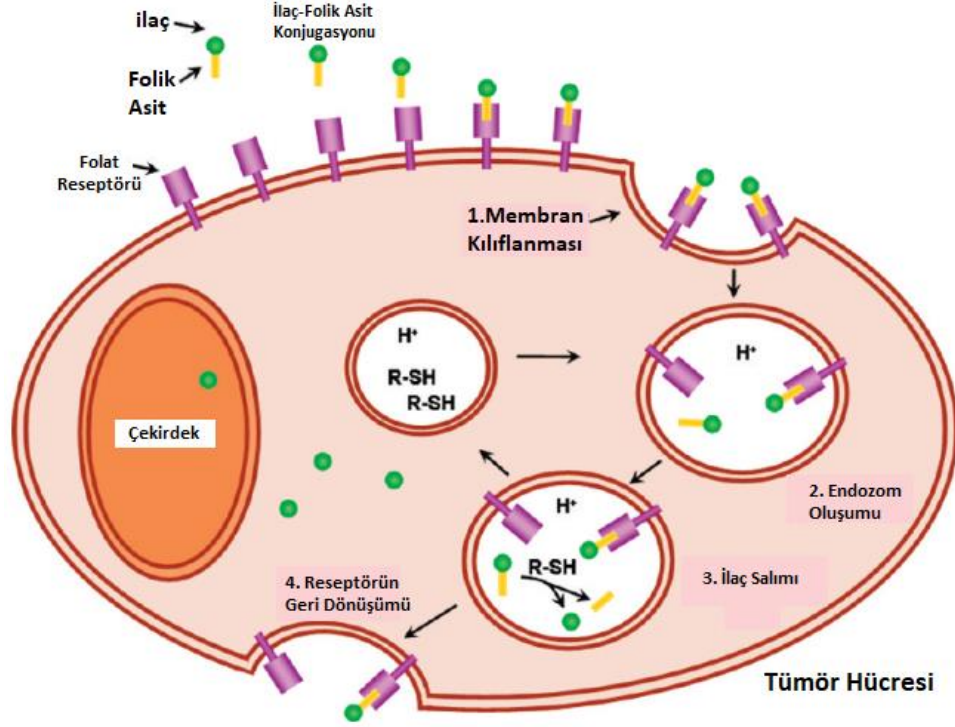
Pasif hedeflendirmeye karşılaştırıldığında, aktif hedeflendirme daha karmaşık bir yaklaşımdır ve kullanılan ligantın yoğunluğu (42, 43), nanopartikül büyüklüğü ve morfolojisi (44, 45), yüzey ve ligant yükü (46, 47), yüzey hidrofobikliği (48) gibi birçok parametre aktif hedeflendirmenin etkinliğini değiştirmektedir.

Aktif hedeflendirme yaklaşımı ile nanopartiküllerin, tümör hücrelerinde aşırı eksprese olduğu bilinen transferrin, vasküler endotelial büyüme faktörü, lektin, folat ve insan epidermal reseptörü gibi reseptörlere hedeflendirilmesi başarıyla sağlanabilmektedir (49).

Tez kapsamında pasif hedeflendirmenin yanında folik asit konjugasyonu yapılarak folat reseptörüne aktif hedeflendirme yaklaşımı kullanıldığından bu konu hakkında daha detaylı bilgi verilecektir.

### **Folik Asit İle Aktif Hedeflendirme**

Folat reseptörü; over, beyin, böbrek, akciğer ve meme kanseri gibi bir çok tümör hücresinde aşırı eksprese edilmektedir (50, 51). Reseptör aracılı endositoz ile aktif hedeflendirme, nanomateryal ile hücre yüzeyi arasında etkileşimin gerçekleşmesi ve reseptör-ligand ilişkisinin kurulması ile mümkün olmaktadır (52). Folat reseptörü, tümör hücresi yüzeyinde en çok eksprese edilen reseptörlerden biridir ve bu reseptörün ligandı olan folik asit de folat reseptörü için yüksek afiniteye sahiptir (53, 54). Sağlıklı hücrelerden farklı olarak tümör hücreleri, yüzeylerinde aşırı sayıda folat reseptörü eksprese ettikleri için, folik asit ile hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, reseptörü eksprese eden hücrelere, reseptör aracılı endositoz ile girecekler ve taşıdıkları ilacı intraselüler olarak salacaklardır (55).



**Şekil 2.5.** Folat reseptörüne hedeflendirilmiş ilaç-folik asit konjugatının folat reseptörü bağımlı endositozu (56).

Tez kapsamında geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemde nanopartiküllerin pasif hedeflendirilmesinin yanında folat reseptörüne aktif hedeflendirilmesi ile istenen etkin madde/maddelerin tümör hücresine alımlarının artması, sistemik etkilerin en aza indirilmesi ve etkili tedavinin sağlanabilmesi amaçlanmaktadır.

### 2.2.2. Mezoporlu Silika Nanopartikülleri (MSN)

Eczacılık, elektronik, kataliz, ince film substratları gibi birçok endüstriyel alanda araştırılmakta olan silika nanopartikülleri kolay hazırlanabilmelerinin de yardımıyla her geçen gün daha dikkat çekici bir platform haline gelmektedirler (57).

Silika nanopartikülleri Stöber, Fink ve Bohn adlı üç araştırmacının daha sonra Stöber metodu olarak anılacak olan bir metot ile 1968 yılında literatüre girmiştir. Stöber metodunda silika alkoksitlerinin hidroliz reaksiyonu sonucunda, hidroliz olan siloksan grupları oluşturup daha sonra bu grupların yoğunlaşması ile birbirine yakın büyüklükte küresel ve mikron/submikron boyutlarında silikaların üretimini oldukça basit bir şekilde önermektedir. Bahsedilen bu sentez yönteminde reaksiyon pH 7-11

arasında gerçekleşirken, elektrostatik itme kuvveti sayesinde monomerler oluşmaktadır. Bu sayede topaklaşma engellenmekte ve sol-jel içerisinde çözünmeyen parçacıklar elde edilmektedir. Silika nanopartiküllerinin sentezinde genel itibari ile sıvı bir sentez ortamı, silika kaynağı ve katalizör bulunmaktadır. Sentez ortamı olarak genellikle su/alkol sistemleri, silika kaynağı olarak tetraetil ortosilikat (TEOS) ve katalizör olarak amonyum hidroksit veya amonyak kullanılmaktadır (58).

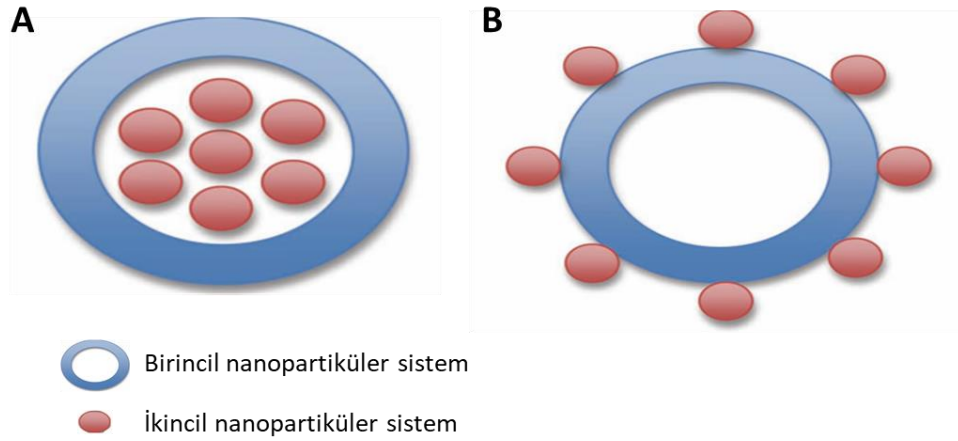
Mezoporlu silika nanopartikülleri (MSN) ise isminden de anlaşılacağı gibi silikanın gözenekli halidir ve sentez sırasında ortama sürfaktan eklenerek önce miseller bir sistem oluşturulup, sentezin bu yapı üstünde gerçekleşmesi sonrasında misel sistemin uzaklaştırılmasıyla elde edilirler (59). 1992 yılında keşfedilmelerinden sonra adsorpsiyon, ayırma, kataliz ve ilaç taşıyıcı sistem olarak yoğun bir şekilde araştırılmaktadır(60). MSN'lerin genel özellikler ve diğer taşıyıcı sistemlere göre başlıca üstünlükleri şu şekilde sıralanabilir;

- Partikülün boyutu (30-500 nm) ve şekli (küre, çubuk, elips vb.) kolayca ayarlanabilmektedir.
- Esnek bir sentez platformuna ve sentez sonrası fonksiyonelleştirmeye uygun olduklarından hedeflendirilme ve kontrollü salım özelliklerine sahiptirler.
- Partikül yüzeyinin çok geniş bir yelpazede modifikasyona olanak sağlaması sayesinde, istenmeyen biyolojik etkileşimlerin önlenmesi, hücre içine alımın ve biyoyararlanımın arttırılması, taşıyıcı sistemin immün sistemden gizlenebilmesi gibi birçok avantaj sağlayabilmektedir.

Belirtilen tüm bu özellikler göz önünde bulundurulduğunda, MSN'lerin kullanımı ile farmakokinetik salım profilinin istenildiği gibi ayarlanabilmesi, biyoyararlanımın artması, hedeflendirilmiş taşıma ve bu sayede terapötik etkinin arttırılmasının önü açılmaktadır (61).

### 2.2.3. Hibrit Nanopartiküller

İki ajanın birlikte tek bir taşıyıcı içerisinde tümör hücresine ulaştırılması, sinerjik etkinin ortaya çıkabilmesi için gerekli bir uygulamadır. İki ajanın beraber taşınması için, son yıllarda önem kazanan bir teknoloji olan hibrit partiküller göze çarpmaktadır. Hibrit partiküllerde, iki yapının bir arada kullanılarak yeni ve daha fonksiyonel başka bir sistemin oluşturulması esastır. Kullanılan yapılar kendi özelliklerini korumaya devam ederlerken, bu yapıların tek bir sistem içinde kullanılarak daha avantajlı bir sistem elde edilmesi söz konusu olabilmektedir (62). Hibrit nanopartiküler sistemlerde genellikle biri ana yapısal kısmı diğeri fonksiyonel kısmı oluşturan iki yapı bir araya gelmektedir. Hibrit sistemi, ikincil nanopartiküler sistemin birincil nanopartiküler sistem içine enkapsüle olduğu (Şekil 2.6A.) veya yüzeyine bağlandığı (Şekil 2.6B.) şekilde elde etmek mümkündür.



**Şekil 2.6.** Hibrit nanopartiküller sistemlerin genel tasarımları. Hibrit nanopartiküller, bir nanopartiküler sistemin diğeri nanopartiküler sistemi enkapsülasyonu (A) veya yüzeye bağlanmasıyla (B) elde edilirler.

Antikanser amaçlı olarak tanı ve tedavide kullanılması için lipozom, misel, PLGA, silika, altın gibi nanopartiküller sistemleri kullanılarak elde edilen hibrit sistemler literatürde bulunmaktadır (Tablo 2.3.).

**Tablo 2.3.** Hibrit nanopartiküler sistemlerin geliştirildiği çalışmalardan bazıları. (Sailor ve ark.'nın yayınında (63) yer alan liste esas alınarak düzenlenmiştir.)

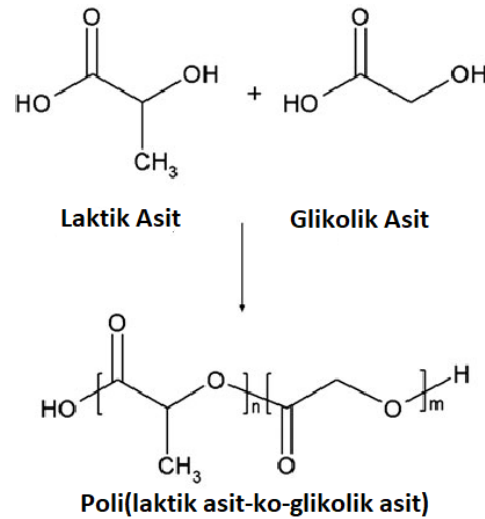
Birincil Nanopartiküler Sistem	İkincil Nanopartiküler Sistem	Hibrit Nanopartiküllerin Elde Edilme Şekli	Sistemin Etkinliğinin Değerlendirildiği Hücre Hattı	Referans
<b>Lipozomal Hibrit Sistemler</b>				
Fosfolipit lipozom	Kuantum Noktaları	Yüzeye Bağlama	A549 insan epitel akciğer kanseri	(64)
Fosfolipit lipozom	Manyetik Nanokristal	Enkapsülasyon	MMTV-PyMT insan meme kanseri	(65)
Fosfolipit lipozom	Altın Nanopartikül	Enkapsülasyon	Belirtilmemiş	(66)
<b>Misel Hibrit Sistemler</b>				
PCL-b-PGMA Misel	Manyetik Nanokristal	Yüzeye Bağlama	Belirtilmemiş	(67)
PEG-PAsp(DIP)-CA Misel	Kuantum Noktaları	Yüzeye Bağlama	Bel-7402 insan hepaselüler karsinoma	(68)
PEG-fosfolipit Misel	Manyetik Nanokristal	Enkapsülasyon	MDA-MB-435 insan meme kanseri	(69)
<b>Gözenekli Silika Hibrit Sistemler</b>				
Gözenekli Silika	Manyetik Nanokristal	Yüzeye Bağlama	MCF-7 insan meme kanseri	(70)
Gözenekli Silika	Altın Nanoçubuk	Belirtilmemiş	MDA-MB-231 insan meme kanseri	(71)
Gözenekli Silika	Altın Nanokabuk	Yüzeye Bağlama	HepG2 insan hepataselüler karsinoma	(72)

Polimerik Hibrit Sistemler				
PLGA	Altın Nanokaplama	Yüzeye Bağlama	A431 insan epidermoit karsinoma	(73)
Polisteren ve PLGA	Kuantum Noktaları	Yüzeye Bağlama	LNCAp insan prostat kanseri	(74)
PLGA	Manyetik Nanokristal	Enkapsülasyon	NH3T6.7 fibroblast hücreleri	(75)
Viral Hibrit Sistemler				
Adenovirüs	Manyetik Nanokristal	Yüzeye Bağlama	U251N hücreleri	(76)
Cowpea mozaik virüs	C <sub>60</sub> Karbon Nanopartikülleri	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	(77)
M13 Bakteriyofaj	Karbon Nanotüp	Belirtilmemiş	LNCAp İnsan Prostat Adenokarsinoma	(78)
Altın-Bazlı Hibrit Sistemler				
Altın Nanoçubuk	Manyetik Nanokristal	Yüzeye Bağlama	SKBR3 Meme Kanseri	(79)
Altın Nanokabuk	Manyetik Nanokristal	Enkapsülasyon	SKBR3 Meme kanseri	(80)
Altın Nanokabuk	Manyetik Nanokristal	Yüzeye Bağlama	KB insan epidermoid Karsinoma	(81)
Karbon Nanotüp Bazlı Hibrit Sistemler				
Çok Duvarlı Karbon Nanotüp	Manyetik Nanokristal	Enkapsülasyon	Fare Renal Karsinoma	(82)
Tek Duvarlı Karbon Nanoüp	Kuantum Noktaları	Yüzeye Bağlama	Baş ve Boyun Skuamöz Karsinoma	(83)
Çok Duvarlı Karbon Nanotüp	Manyetik Nanokristal	Enkapsülasyon	BxPC-3 İnsan Pankreas Hücresi	(84)

Tez kapsamında PLGA/Silika hibrit nanopartiküler sistemin elde edilmesi amaçlandığı için bu tip hibrit sistemler hakkında daha geniş bilgi verilecektir.

### PLGA/Silika Hibrit Nanopartikülleri

PLGA, FDA onaylı olup, vücutta laktik asit ve glikolik asit monomerlerine kolayca degrade olabilen ve degradasyonu sırasında herhangi bir sistemik toksisite göstermeyen, biyoyumlu ve biyoparçalanabilir bir polimerdir (Şekil 2.7.). PLGA ile hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlerde, partikül boyutunun küçültülebilmesi, yapısal olarak dayanıklılık, ayarlanabilir yüzey özellikleri, kontrollü salım sağlanabilmesi gibi üstünlükleri gözlenirken; ilaç yükleme kapasitesinin düşük olması, ani salım gerçekleştirilmesi, agregasyon problemi gibi sakıncaları da bulunmaktadır (85). Tüm bunlar göz önüne alındığında, PLGA nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin değiştirilmesi, bu kısıtlamaları ortadan kaldırmak için uygun bir strateji gibi görünürken, PLGA hibrit partiküllerin tasarlanması (Şekil 2.8.) ile yeni sistemlerin ortaya çıkışı da kaçınılmaz olmuştur (62).

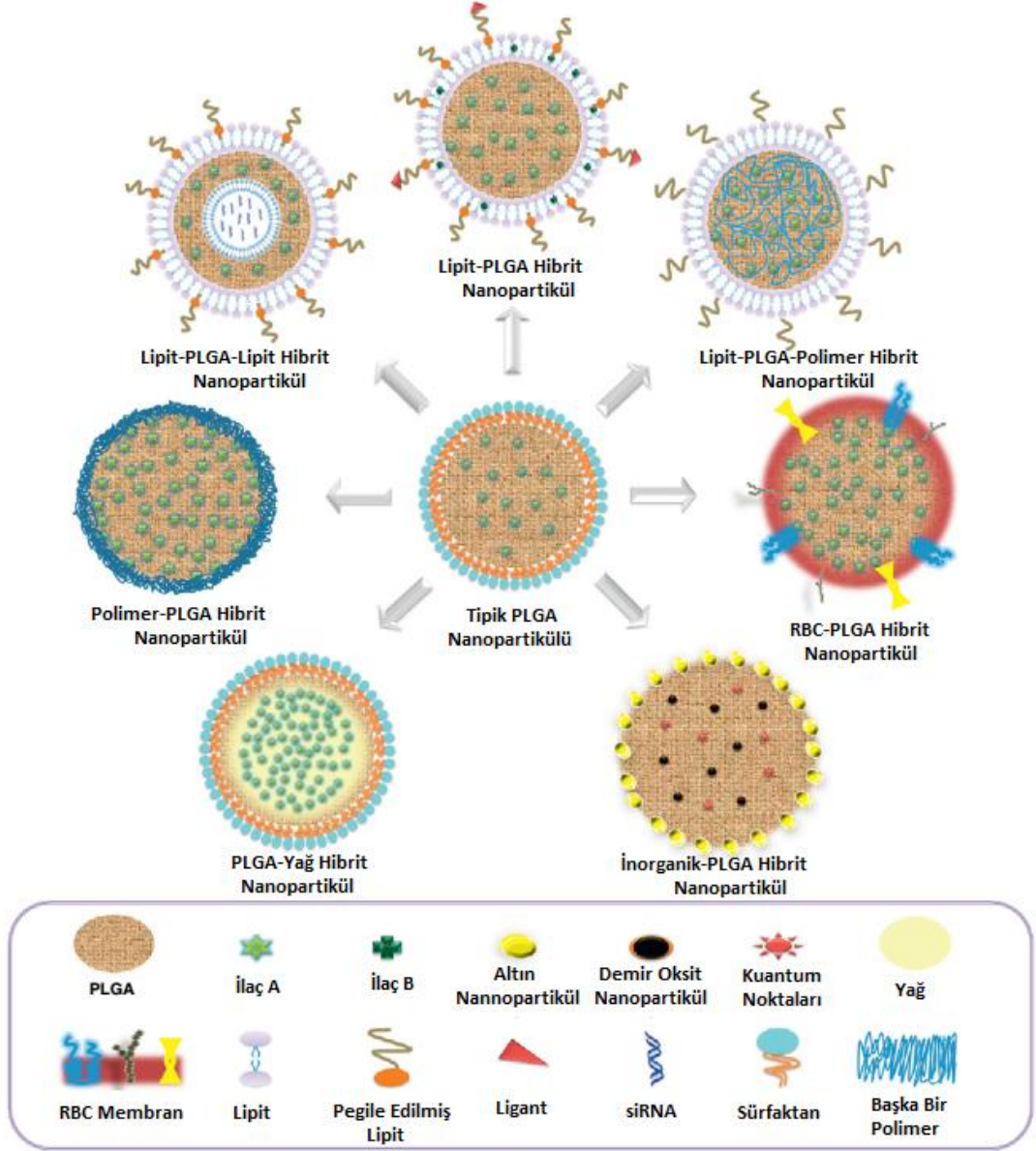


**Şekil 2.7.** PLGA ve monomerlerinin kimyasal yapısı (86).

Tez kapsamında, MSN'lere yüklenen doksorubisinin ani salımının önüne geçilmesi ve nanopartiküler sistemin kanda kalış süresinin uzatılması amacıyla pegile edilmiş PLGA polimeri kullanılarak PLGA/Silika hibrit nanopartikülleri (HyNP) tasarlanmıştır. Bu sistem sayesinde ayrıca MSN'ler ile birlikte elakridarda PLGA



nanopartikülleri içine yüklenmiş bu sayede dokсорubisin ile farklı bölgelere ilaç yüklendiği için dokсорubisinin yükleme kapasitesindeki olası azalışın önüne geçilmesi hedeflenmiştir.



**Şekil 2.8.** Başlıca PLGA hibrit nanopartikülleri. Kısaltmalar: PEG, polietilen glikol; RBC, red blood cells-kırmızı kan hücreleri (87).

Nanopartiküllerin yüzey yükü hücreler ile etkileşimleri ve hücreler tarafından alımları açısından oldukça önemlidir (85). Katyonik yüzey yükünün nanopartiküllerin hücreler ile etkileşimini artırdığı ve hücrel alım hızını ve oranını artırdığı bilinmektedir (88). PLGA nanopartikülleri negatif yüzey yüküne sahip olmalarına

rağmen yükleri PEG modifikasyonu ya da kitosan ile kaplama ile nötral ya da pozitif yüke dönüştürülebilmektedir (85).

### **Opsonizasyon ve Pegilasyon**

Retiküloendotelyal sistem (RES) vücuda giren yabancı partiküllerin vücuttan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. İlaç taşıyıcı sistem olan nanopartiküllerin bu şekilde dolaşımdan uzaklaştırılması özellikle kanser tedavisinin etkin bir şekilde sağlanmasında oldukça önemli olan ilaç konsantrasyonunun hedef dokudan uzaklaşmasına neden olmaktadır. Bu şekilde partiküllerin dolaşımda uzaklaştırılmasının ilk basamağını partiküllerin yüzeyinin opsonin adı verilen proteinlerin kaplaması oluşturmaktadır (opsonizasyon). Bu nedenle partiküllerin opsoninler tarafından kaplanmasının engellenmesi uygulanan nanopartiküler sistemlerin RES tarafından dolaşımdan temizlenmesini engelleyecektir. Yapılan çalışmalarda nanopartiküler sistemlerin PEG polimeri ile kaplanması (pegilasyon) sonrasında yüzeydeki opsonin kaplanmasının azaldığı ve bu nedenle dolaşımda kalış süresinin arttığı pek çok farklı çalışma ile gösterilmiştir (89). Bu nedenle nanopartiküllerin yüzeylerinin PEG ile modifikasyonu önem taşımaktadır. Bu bağlamda, tez çalışmasında PEG ile modifiye edilmiş PLGA-PEG polimeri kullanılmıştır.

### **2.3. Nanopartiküllerin İn Vitro Karakterizasyonu**

Nanopartiküllerin karakterize etmek için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Genel pratikte kullanılan in vitro karakterizasyon yöntemleri aşağıda başlıklar halinde belirtilmiştir.

#### **2.3.1. Partikül Büyüklüğü ve Morfolojisi**

Nanopartiküllerin hücrelerle etkileşimi, biyodağılımı ve hedef dokuya ulaşmasında en kritik parametrelerden biri nanopartiküllerin partikül büyüklüğüdür (90). Nanopartiküllerin partikül boyutunun belirlenmesinde dinamik ışık saçılımı (DLS) ve mikroskopik yöntemler en sık kullanılan yöntemlerdir.

DLS metodunda nanopartiküllerin Brownian hareketi ve bunun hızla ilişkisi ölçülmektedir. Bu sayede süspansiyon içerisindeki nanopartiküllerin hidrodinamik yarıçaplarından yola çıkılarak partikül boyutunu belirlemek mümkündür. Bu metotla elde edilen partikül boyutu ortalama partikül boyutu, partikül boyutunun dağılımı da polidispersite indeksi (PDI) olarak rapor edilir. Bazı farklı görüşler olmakla birlikte literatürün büyük çoğunluğu PDI değerinin 0,3'ten küçük olması durumunda partikül boyutu dağılımının dar bir aralıkta (monodispers) olduğunu, 0,5'ten büyük olması durumunda ise geniş bir partikül büyüklüğü dağılımı (polidispers) olduğunu belirtmektedir (91). DLS metodunun basit ve hızlı bir partikül boyutu ölçme yöntemi olmasının yanında bu metodun bazı sınırlama ve dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlardan biri, partikül büyüklüğü ölçümü yapılan numunede örneğin 20 ve 100 nm çapında büyüklüğe sahip iki farklı partikül yapısı varsa, küçük partiküllerin ölçüm sırasında sinyali kaybolabilmektedir (92-94). Ayrıca DLS yönteminde partikülün şekli hakkında bir bilgi edinilememektedir.

Mikroskobik yöntemlerle nanopartikülün şeklinin belirlenmesinin yanında, partikül büyüklüğü dağılımının belirlenmesinde de daha doğru sonuçlar alınabilmektedir(94). Fakat mikroskobik yöntemlerde değişken olan özel örnek hazırlama süreçleri, örneğin özelliklerini değiştirebilmekte ve özellikle örneği kurutma işleminde agregasyonlara sebep olma gibi birçok probleme yol açabilmektedir. Bunun yanında sınırlı hacim ve görüntü alanı nedeniyle partikül büyüklüğü dağılımının belirlenmesi zorlaşmaktadır (94, 95).

Partikül büyüklüğünün ölçülmesinde en sık kullanılan yöntemler, tez çalışmalarında da kullanılan DLS ve mikroskobik yöntemler olmakla birlikte nanopartikül izleme analizi ve disk santrifüjü gibi yöntemlerde bulunmaktadır(91). Tüm bu teknikler farklı fiziksel prensiplere dayanıp, farklı numune hazırlama metotları içerdiği için aynı numune için farklı sonuçlar alınabilmektedir. Örneğin, Mahl ve ark. (94) yaptığı bir çalışmada TEM ve SEM analizleri sonucunda büyüklüklerinin sırasıyla 70 ve 15 nm olduğu belirlenen gümüş ve altın nanopartiküllerinin, DLS ile yapılan ölçümlerde partikül büyüklüğü dağılımının

sırasıyla 40-124 nm ve 11-52 nm olduğunu bildirilmişlerdir. Bunların yanında ölçümler numunelerin içinde buldukları ortamlar da göz önüne alınarak değerlendirilmelidir. DLS yönteminde partiküller sıvı içerisindeyken ölçümleri yapıldığından nanopartiküllerin büyüklüğü hidrasyon tabakası nedeniyle genelde olduğundan daha büyük ölçülmektedir. Örneğin Möller ve ark. (96) mezoporlu silika nanopartikülleriyle yaptığı bir çalışmada TEM analizlerinde sırasıyla 55-70 nm ve 90-100 nm aralığında ölçülen partiküllerin DLS analizinde ortalama partikül büyüklüğünün 140 ve 160 nm olarak ölçüldüğünü bildirmişlerdir. Tüm bu faktörler ve partikül morfolojisinin tespit edilmesi amacıyla DLS ile yapılan ölçümlerin görüntülü analizlerle desteklenmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

Tez kapsamında da öncelikli olarak DLS ile yapılan partikül büyüklüğü ölçümleri SEM ve TEM analizleriyle desteklenmiştir.

### **2.3.2 Nanopartiküllerden İlaç Salımının Belirlenmesi**

Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımı literatüre girdiğinden beri nanopartiküllerden ilaç salımının değerlendirilmesi nanopartiküllerin değerlendirilmesinde en kritik parametrelerden biri olmuştur. Nanopartiküllerden ilaç salım miktarı ve hızının belirlenmesi, istenilen bölgeye ulaşıncaya kadar nanopartiküllerin ilacı salıp salmadıklarının ve nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin bir diğer kullanım amacı olan kontrollü salım sistem amacına ulaşip ulaşılmadığının belirlenmesinde en kritik parametrelerden biridir (97). Nanopartiküllerden ilaç salımının belirlenmesinde; örnek alma ve ayırma, diyaliz membrandan difüzyon ve in situ analitik teknik olmak üzere başlıca üç yöntem kullanılmaktadır (91).

Tez çalışmalarında kullanılan örnek alma ve ayırma metodunda, nanopartikülden salınan serbest ilaç santrifüjle nanopartikülden uzaklaştırıldıktan sonra miktarın belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Belirlenen zaman noktasında belirlenen miktarda örnek alımı yapıldıktan sonra aynı miktarda ortama taze salım ortamı eklenerek nanopartiküller bir sonraki zaman noktasına kadar inkübe edilmektedirler.

### 2.3.3 Diğer Karakterizasyon alışmaları

İlaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanan nanopartiküler sistemlerde partikül boyutu, morfolojisi ve nanopartiküllerden ilaç salımı en temel karakterizasyon çalışmaları olmakla birlikte bu çalışmaların yanında, hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin özelliğine göre farklı karakterizasyon çalışmalarının yapılmasına da ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan tez çalışmasında da yukarda belirtilen karakterizasyon çalışmalarına ek olarak Enerji Dağılımlı X-Işını (EDX), C-H-N elemental analizi, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FTIR), yüzey ve gözenek karakterizasyonu (BET) ve X-Işını kırınım yöntemi (XRD) analizleri yapılmıştır. Bu yöntemlerle ilgili genel bilgiler ve tez kapsamındaki kullanım amaçları metot bölümünde kendi başlıkları altında verilmiştir.

### 2.4.Nanopartiküllerin Hücre Esaslı Değerlendirilmeleri

Hücre kültürü, bir hayvandan ya da bitkiden elde edilen hücrelerin büyümelerinin sağlanabileceği yapay bir ortamda yetiştirilmesi işlemidir. Bu hücreler dokulardan doğrudan alınmış ve enzimatik ya da mekanik yollarla ayrıştırılarak büyütölmüş, ya da halihazırda bulunan hücre hattı ya da hücre soyundan elde edilmiş olabilir (98). Nanopartiküllerin karakterizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra biyolojik etkinlikleri in vivo uygulamalardan önce çeşitli hücre kültürü çalışmaları ile test edilebilmektedir.

Meme kanseri araştırmalarında kullanılan birçok farklı hücre hattı bulunmaktadır. Tez kapsamında ZR-75-1, T-47D ve EMT6/AR1 meme kanseri hücre hatları kullanılarak, geliştirilen nanopartikül formölasyonunun meme kanserindeki etkinliği araştırılmıştır.

ZR-75-1 hücre hattı sağ göğsünde duktal karsinoması bulunan 63 yaşındaki beyaz bir kadından izole edilen bir meme kanseri hücre hattıdır (99). ZR-75-1 hücre hattı folat ve östrojen reseptörü pozitif özelliktedir ve meme kanseri çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (100).

T-47D hücre hattı da ZR-75-1 hücre hattı gibi folat reseptörü pozitif özelliğindedir ve 54 yaşındaki duktal karsinoması olan bir kadından izole edilmiştir (101).

EMT6/AR1 hücre hattı ise fare meme hücre hattı olan EMT6/P hücre hattının 8 haftalık süre boyunca artan miktarlarda doksorubisine maruz bırakılmasıyla geliştirilen dirençli bir hücre hattıdır. Bu hücre hattı doksorubisine 40 kat daha fazla direnç göstermektedir. EMT6/AR1 hücre hattı folat reseptörü pozitifdir ve yüksek miktarda P-gp ekspresyonu göstermektedir (102, 103).

#### **2.4.1. Biyouyumluluk Çalışmaları**

Nanomalzemelerin biyouyumluluğunun değerlendirilmesi amacıyla in vivo hayvan deneyleri öncesinde çeşitli hücre hatları kullanılarak toksisite hakkında bilgi edinmek mümkündür. Tez kapsamında kullanılan L929 fare fibroblast hücre hattı Uluslararası Standardizasyon örgütü (ISO) tarafından in vitro biyouyumluluk testi için önerilmektedir (104).

PLGA polimerinin, FDA tarafından biyouyumlu kabul edilmesine rağmen, PLGA polimerlerine göre oldukça yeni sistemler olan mezoporlu silika nanopartiküllerinin henüz resmi otoritelerce verilmiş böyle bir onayı bulunmamaktadır. Bu sebeple, tez kapsamında sentezlenen mezoporlu silika nanopartiküllerinin folik asit konjugasyonu yapılmış ve yapılmamış hallerinin biyouyumluluk testleri L929 hücre hattında yapılan hücre kültürü çalışmalarıyla değerlendirilmiştir.

#### **2.4.2. Sitotoksikite Çalışmaları**

Kanser tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliklerinin değerlendirilmesinde hedef kanser hücreindeki hücre hatlarının kullanılarak sitotoksikite çalışmalarının yapılması büyük önem taşımaktadır. Sitotoksikite çalışmalarının yapılmasında kullanılan temel iki yöntem bulunmaktadır. Bunlardan ilki hücrelerin metabolik aktivitesinin değerlendirilmesidir. Bu yöntemde MTT, XTT ve MTS gibi kimyasallar kullanılarak canlı hücredeki mitokondriyal aktivite

ile birlikte oluşan tetrazolyum tuzlarını renkli formazan kristallerine dönüştürmesi sonucu oluşan rengin eliza plak okuyucular ile analiz edilmesine dayanmaktadır (105). Sitotoksosite çalışmalarında kullanılan diğer yöntem ise hücre membranının bütünlüğünden yola çıkarak hücrenin canlılığının belirlenmesine dayanmaktadır. Akım sitometri cihazı ile yapılan bu yöntemde tripan mavisi, propidyum iyodür gibi boyalar sayesinde ölü hücrelerin işaretlenmesi sağlanarak ölü ve canlı hücreler analiz edilebilmektedir (106).

Tez kapsamında yapılan tüm sitotoksosite çalışmalarında metabolitik aktivitenin belirlenmesi temeline dayanan MTT testleri kullanılmıştır.

### **2.4.3. Hücre İçine Alım Çalışmaları**

Floresan mikroskop analizleri ile akım sitometri cihazı nanopartiküllerin hücre içine alınımının belirlenmesinde en sık kullanılan iki yöntemdir (107-109). Bu metotlarda nanopartiküllerin uygun bir floresan madde ile işaretlenmesi gerekmektedir. Bu işaretleme floresan özellikteki maddelerin nanopartiküllerin içerisine yüklenmesi veya floresan madde ile nanopartikülün kovalent bağlanmasıyla sağlanabilmektedir. Lipofilik boyaların bu amaçlı kullanımı birçok avantaj sağlamasına rağmen, nanopartikülün lipofilik maddeler ile teması sonucu boyanın bu maddelere sızmasına sebep olabilmektedir (110). Kovalent bağlamayla boyanın konjugasyon işleminde ise konjugasyon stabilitesinin hücre kültürü ortamında test edilmesi gerekliliği vardır. Eğer hem taşıyıcı sistemin hem ilacın takip edilmesi hedefleniyorsa her ikisinin de yapılarak ilacın ve nanopartikülün ayrı ayrı işaretlenmesi en doğru değerlendirmeyi sağlamaktadır (91, 111). Mikroskopi yöntemleri ile yapılan hücre içine alım çalışmalarında nanopartiküllerin hücre içi lokasyonlarının belirlenmesi sağlanıyor olsa da, mikroskopi yöntemleriyle sadece belirli sayıda hücre değerlendirilebildiği için nanopartiküllerin kantitatif analizlerinin yapılabilmesi için akım sitometriye ihtiyaç duyulmaktadır. Akım sitometri hücre süspansiyonun lazer ışığına maruz kaldığı noktadan geçişi sonrasında floresan ışımaya veren yüzde hücre sayısı ve toplam floresan intensitenin ölçülmesine dayanmaktadır (112).

Tez çalışması kapsamında yapılan hücre içine alım çalışmalarında öncelikli olarak akım sitometri ile kantitatif analizler yapılmış sonrasında sonuçlar floresan mikroskop görüntüleriyle desteklenmiştir.

#### **2.4.4 Nanopartiküllerin Hücre İçine Alım Mekanizmaları**

Nanopartiküller hücre dışında buldukları zaman hücre zarı ile etkileşimde olurlar ve bu süreç endositoz olarak adlandırılan nanopartiküllerin hücre içine girişine yol açar. Endositoz süreci Şekil 2.9'da belirtildiği gibi farklı mekanizmalar ile gerçekleşmektedir.

Fagositoz, epitel hücreleri, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri, spesifik fagositik hücreler (monosit, makrofaj ve nötrofiller), inflamasyon mediatörü üreten hücreler (bazofiller, eozinofiller ve mast hücreleri) ve doğal öldürücü hücreler tarafından sergilenen bir endositoz yöntemidir (113). Memeli organizmalarda fagositoz, hem doğal hem de adaptif immün yanıtın bir parçası olarak opsonize olmuş partikülleri, yaşlanmış hücreleri ve bulaşıcı mikroorganizmaları (bakteri ve virüsler) hücre içine almak için kullanılır (114).

Pinositoz ise kltrin bağımlı, kaveole aracılı, kaveol ve kltrin bağımsız ve makropinositoz olmak üzere alt başlıklara ayrılmaktadır.





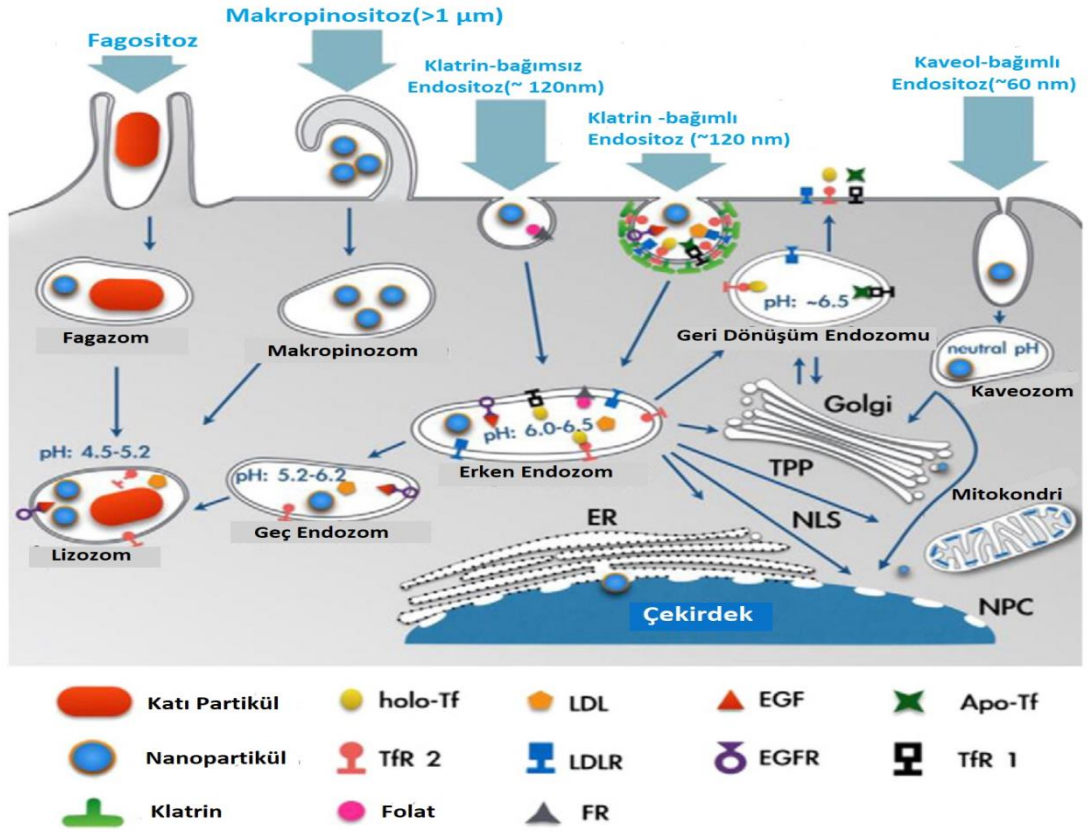
**Şekil 2.9.** Endositoz mekanizmalarının sınıflandırılması. (Şekil Sahay ve ark.'nın makalesinden (115) modifikasyonla hazırlanmıştır.)

Klatrin (reseptör) aracılı endositoz bütün memeli hücrelerinde bulunur ve hücre içine alımda en iyi bilinen alım yollarından biridir. Tüm ökaryotik hücrelerde besinleri hücre içine almak ve maddeleri yıkmak veya geri dönüştürmek için kullanılan bu yolak, molekülleri spesifik reseptörler yoluyla seçici olarak alması rolüyle iyi bilinmektedir (116). Klatrin bağımlı endositoz, ligandıyla birleşmiş olan reseptörün kaplanmış bir veziküle alınarak hücre içine taşınmasıyla meydana gelir. Plazma membranında oluşan bu vezikül küçük bir GTPaz olan dinamin ile membrandan ayrılır. Daha sonra bu vezikül sitoplazma içinde kaybolur ve hızlıca erken endozomla birleşir. Erken endozomlar endositozun ana istasyonları arasında bulunmaktadır. Asidik iç ortamda (pH 5.9-6.0) reseptör ve ligand serbest kalır. Reseptör, plazma membranıyla geri birleşmek üzere yüzeye geri dönebilir. Taşınan

madde eğer erken endozomdan kaçamazsa multiveziküler cisimler aracılığıyla geç endozomlara taşınır ve son olarak lizozomlar tarafından sindirilir (117).

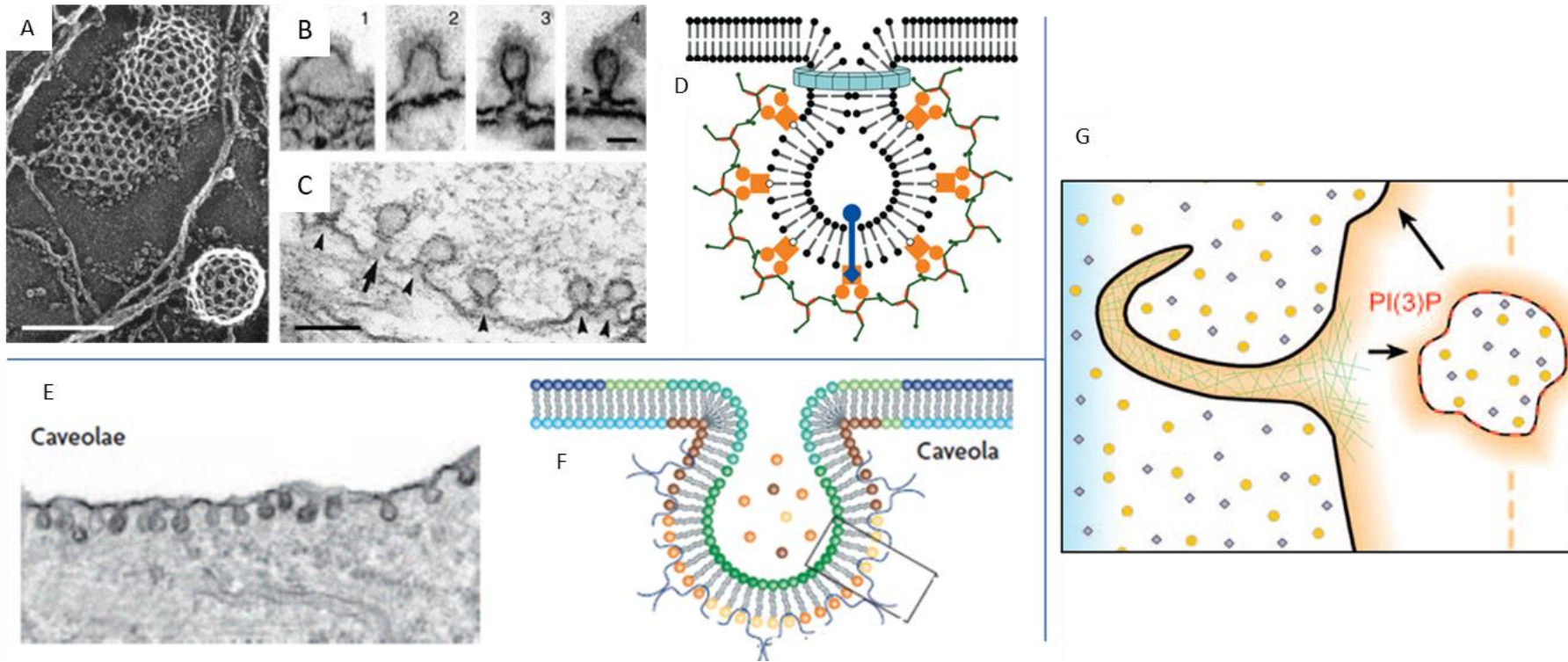
Kaveol aracılı endositozu sağlayan kaveoller; kolesterol homeostazi, proteinlerin endositozu ve sinyal transdüksiyonu başta olmak üzere farklı hücresel işlemlere katılan, plazma membranlarının balon benzeri (60-80nm) kılıflardır. Kaveoller; fibroblastlar, düz kas, adiposit ve endotel hücreleri gibi çeşitli hücrelerde bol miktarda bulunmakla birlikte, nöronlarda ve lökositlerde bulunmamaktadır (118). Kaveol aracılı endositozda, kaveoller ile hücre içine alınan maddelerin hücre içi yolculuğunun nasıl olduğu literatürde tartışmalı bir durum olmakla birlikte, kaveollerin nötral pH'larından dolayı lizozomlardan kaçabilecekleri düşünülmektedir (119). Dolayısıyla virüs ve bakteri gibi bazı mikroorganizmaların lizozomal yıkımı önlemek için bu yolağı kullanabilmektedir. Fakat aynı faktörden dolayı kaveol aracılı endositozun DNA ve proteinin hücreye taşınmasında faydalı olabileceği düşünülmektedir (115). Negatif yüzey yükünün kaveol aracılı endositozu tetiklediği literatürde belirtilmektedir (115).

Klatrin ve kaveol bağımsız endositoz yolu başlangıçta bir dizi bakteri toksini ve hücre yüzeyi proteini için bir endositoz yolağı olarak bildirilmekle beraber günümüzde plazma membran onarımı, hücresel polarizasyon, hücresel yayılma ve hücre içine sinyalleşme içinde kullanıldığı belirtilmektedir (120).



**Şekil 2.10.** Hücre içine alım yollarının ve belirtilen yolak ile hücre içine alınan maddelerin hücre içindeki lokalizasyonunun şekilsel gösterimi. Kısaltmalar; ER: endoplazmik retikulum, NLS: çekirdek lokalizasyon sinyali, NPC: çekirdek por kompleksi, TPP: trifenilfosfonyum katyon (119).

Makropinositoz ise hücrelerin makropinosom olarak bilinen büyük veziküllerin (0.5-10 µm) büyük miktarda hücre dışı sıvıyı içselleştirdiği, aktin kaynaklı endostatik bir süreçtir. Bu yolak, apoptotik hücre fragmanlarının (121), virüslerin (122) ve bakterilerin (123) alınması için tipik bir yoldur ve nanopartiküllerinde hücre içine alımında da rol aldığı gösterilmiştir (115).



**Şekil 2.11.** Klatrin aracılı endositozun TEM görüntüsü (A-C) ve şematik gösterimi (D), kaveol aracılı endositozun TEM görüntüsü (E) ve şematik gösterimi (F), makropinositozun şematik gösterimi (G) (124-127).

#### 2.4.5 Hücre İçine Alım Mekanizmalarını Belirleme Yöntemleri

Nanopartiküler sistemlerin hücre içine alım miktarları belirlendikten sonra, hücre içine alım yollarının belirlenmesi için temel olarak iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan ilki, genetik mutasyonla endositoz yollarını inhibe edilmesi veya bu yolların aşırı aktive olduğu hücrelerin kullanılmasıdır. Diğer ise çeşitli farmakolojik inhibitörler kullanılarak endositoz yollarının inhibe edilmesidir.

Tez çalışmaları kapsamında çeşitli farmakolojik inhibitörler kullanılarak folat reseptörüne hedeflendirilmiş nanopartiküllerin reseptör aracılı endositoz yolunu kullanıp kullanmadığı araştırılmıştır.

##### ***Farmakolojik İnhibitörler***

Öncelikli olarak hücrelere çeşitli spesifik inhibitörler uygulanarak belirli bir süre inkübasyon sonrası yolağın inhibe edilmesi sağlanabilmektedir. Daha sonra nanopartiküller hücrelere uygulanarak nanopartiküllerin hücre içine alımındaki azalma belirlenerek hangi yolağı daha fazla kullandığı değerlendirilebilir (128).

##### ***Klatrin Aracılı Endositoz İnhibitörleri***

Başta klorpromazin olmak üzere çeşitli amfifilik ilaçların kullanımının klatrin aracılı endositozu engellediği belirtilmektedir. Bunun yanında sükrozun da bu yolağın inhibe edilmesinde kullanıldığı çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Klorpromazin kullanımının avantajı ise, kaveol aracılı endositozu inhibe etmeden klatrin aracılı endositozu inhibe etmesidir (129-132).

Tez kapsamında hem klorpromazin hem sükroz kullanılarak folat reseptörüne hedeflendirilmiş mezoporlu silika nanopartiküllerin klatrin yolağını kullanıp kullanmadığı araştırılmıştır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar

Cihaz	Marka
Akım sitometri cihazı	Becton-Dickinson, ABD
Çok noktalı manyetik karıştırıcı	Variomag Telesystem, Almanya
Eliza Okuyucu	Molecular Devices, ABD
Floresan mikroskop	Leica, Germany
FTIR cihazı	Bruker, ABD
Transmisyon elektron mikroskobu (TEM)	FEI Company, Hollanda
Hassas Terazı	Mettler Toledo, İsviçre
HPLC sistemi	Shimadzu, Japonya
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	IKA, Almanya
İnkübatör	Sanyo, Japonya
Laminar hava akımlı kültür kabini	Faster, İtalya
Liyoflizatör	Labconco, ABD
Mikropipetler	Eppendorf, Almanya
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçüm cihazı	Malvern Instruments, İngiltere
Santrifüj aleti	Hettich, İngiltere
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	FEI Company, Hollanda

Termostatlı yatay çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Ultra saf su sistemi	Milipore, ABD
Vorteks	IKA, Almanya
X-Işını difraktometresi (XRD)	Rigaku, Japonya
Yüzey alanı ölçüm cihazı (BET)	Quantachrome Corporation, ABD

Yazılım	Program Adı
Çizim yazılımı	SketchUP2017
İstatistik ve analiz yazılımları	Minitab 16, Graphpad Prism 7, Microsoft Excel 2010
Resim düzenleme yazılımları	ImageJ, Adobe Photoshop CS3

### 3.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler

Madde	Marka
APTS	Sigma Aldrich, ABD
Asetonitril	Sigma Aldrich, ABD
CTAB	Sigma Aldrich, ABD
DAPI	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich, ABD
Dokсорubisin	Koçak Farma tarafından bağışlanmıştır

EDC	Sigma Aldrich, ABD
Elakridar	Sigma Aldrich, ABD
EMT6/AR1 Hücre Hattı	ECACC, İngiltere
Etanol	Isolab, Almanya
Folik Asit	İlko ilaç tarafından bağışlanmıştır
FPS	Lonza, İsviçre
L929 Hücre Hattı	ATCC, ABD
L-glutamin	Lonza, İsviçre
Metanol	Isolab, Almanya
MTT	Sigma Aldrich, ABD
NHS	Sigma Aldrich, ABD
Penisilin-Streptomisin	Lonza, İsviçre
PLGA-PEG	Sigma Aldrich, ABD
PVA	Sigma Aldrich, ABD
RPMI-1640	Biowest, Fransa
SDS	Sigma Aldrich, ABD
T47-D Hücre Hattı	ATCC, ABD
TEOS	Sigma Aldrich, ABD
ZR-75-1 Hücre Hattı	ATCC, ABD



### 3.3. Analitik Yöntem Validasyonları

Dokso rubisin ve Elakridarın miktar tayini analizleri yüksek performans sıvı kromatografisi (high pressure liquid chromatography, HPLC) ile floresan detektör kullanılarak yapılmıştır. Dokso rubisin ve elakridar için HPLC yöntem parametreleri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** Dokso rubisin ve elakridarın miktar tayinlerinde kullanılan HPLC yöntem parametreleri.

Mobil Faz	Asetonitril:Su(38:62) pH:2.6
Analitik Kolon	C 18 (250m x 4,6 mm, 5 µm)
Enjeksiyon Hacmi	50 µL
Akış Hızı	0,5 mL/dk
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Detektör	Eksitasyon:475 nm Emisyon:555 nm (Dokso rubisin) Eksitasyon:265 nm Emisyon:485 nm (Elakridar)

Dokso rubisin ve elakridarın miktar tayini için geliştirilen yöntemin validasyonu, yöntemin amaçlanan uygulamalara uygulanlığını göstermek üzere yapılmış ve aşağıda belirtilen parametreler incelenmiştir.

Doğrusallık ve aralık parametrelerinin incelenebilmesi için her iki madde içinde kullanılan yöntemde çalışılan konsantrasyon sınırları dokso rubisin için 6,25-150 µg/mL, elakridar için 0,1-20 µg/mL olarak belirlenmiş ve bu aralıkta 6 konsantrasyon noktası seçilerek doğrusallık çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalar 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen kromatogramlardaki maddeye ait cevap piklerinin alanı ile madde konsantrasyonu arasında regresyon analizi yapılmıştır.

In vitro salım ortamından PLGA polimeri gelebileceğinden ve etkin maddelerinin birbiriyle girişim yapıp yapmadığının kontrolü için dokso rubisin, elakridar ve PLGA birlikte ve etkin maddeler tek tek HPLC ile analiz edilmiş ve alınan

sonuçlar ile maddelerin bir biri ile girişim yapıp yapmadığı araştırılarak özgülük parametresine bakılmıştır.

Geliştirilen analitik yöntem ile elde edilen değerlerinin, gerçek değere ne kadar yakın sonuç verdiğini ve elde edilen değerlerin tekrarlanabilirliğini test edebilmek için konsantrasyon aralığı içinde bulunan üç ayrı konsantrasyondaki çözeltiler üçer defa hazırlanarak analiz edilmiştir. Günler arasındaki değişkenliği belirleyebilmek amacıyla aynı prosedür üç gün tekrarlanmıştır. Validasyon sonuçlarında doğruluk için (%) geri kazanım, kesinlik için ise bağlı standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanmıştır.

### 3.4. Nanopartiküllerin Hazırlanması

#### 3.4.1. Mezoporlu Silika Nanopartiküllerin (MSN) Hazırlanması

MSN'lerin hazırlanmasında modifiye Stöber yöntemi kullanılmıştır. Yöntemde CTAB (setrimonyum bromür) yüzey aktif madde, TEOS (tetraetil ortosilikat) silika kaynağı ve NH<sub>4</sub>OH (amonyum hidroksit) pH ayarlayıcı ajan olarak kullanılmıştır. Farklı miktarlarda TEOS, CTAB, NH<sub>4</sub>OH ve farklı sıcaklık değerleri denenerek optimum formülasyonun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Optimum formülasyona karar verilirken partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (PDI) değerlerinin olabilecek en düşük değer olması hedeflenirken, sentez veriminin en yüksek olması amaçlanmıştır. Bu amaçla L<sub>9</sub> faktöriyel TOPSİS tabanlı Taguchi deney tasarımı Minitab 16 yazılımı ile geliştirilmiştir. Tasarımda üst ve alt limitler önceki deney tecrübeleri ve literatür bilgileri göz önüne alınarak Tablo 3.2.'de belirtildiği şekilde belirlenmiştir.

**Tablo 3.2.** MSN'lerin hazırlanmasında kullanılan deney tasarımı değişkenleri

Bağımsız Değişkenler	Kullanılan Seviyeler		
NH <sub>4</sub> OH miktarı (µL)	150	275	400
TEOS miktarı (µL)	125	200	275
CTAB miktarı (mg)	75	150	225
Sıcaklık (°C)	30	45	60

Optimum formülasyon belirlenirken partikül boyutu, PDI değeri ve sentez veriminin üçünde aynı değişken değerlerinde optimum değeri veremeyecekleri için bu üç faktör için, optimum formülasyonda hangi faktörün daha fazla önem arz ettiğine göre yüzdece ağırlıklar atanmıştır. PLGA içine enkapsüle olabilecek ve aktif hedeflendirmenin yanında pasif hedeflendirmeye de doku içerisine birikebilmesi hedeflenen bir ilaç taşıyıcı sistem tasarlandığı için partikül boyutunun optimum formülasyondaki yüzdece ağırlığı en yüksek olarak atanırken, Modifiye Stöber yöntemiyle elde edilen MSN sentezlerinde genel itibari ile monodispers partikül boyutu dağılımı gözlemlendiği için PDI değerinin yüzdece ağırlığı en düşük olacak şekilde belirlenmiştir (Tablo 3.3.).

**Tablo 3.3.** Optimum formülasyonda hedeflenen durumların değerleri ve yüzdece ağırlıkları.

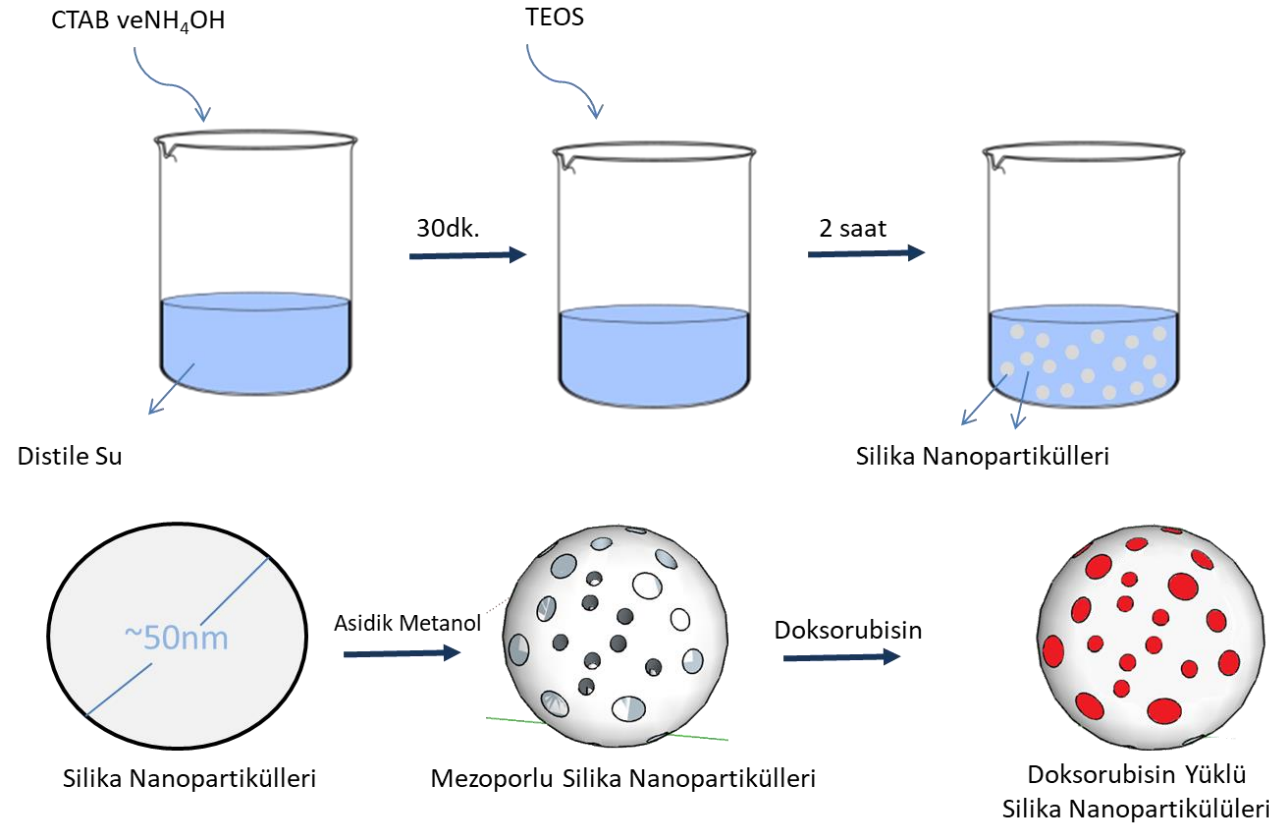
Hedeflenen Durum	Hedef Değer	Ağırlık (%)
<b>Partikül Boyutu</b>	En küçük en iyi	40
<b>PDI</b>	En küçük en iyi	25
<b>Sentez Verimi</b>	En büyük en iyi	35

Yukarıda belirtilen durumlar göz önünde bulundurularak elde edilen optimum formülasyonda, 75 mg CTAB 30 mL distile su içinde 45°C sıcaklıkta çözüldürülmüştür ve üzerine 275 µL NH<sub>4</sub>OH eklenmiştir. Aynı sıcaklıkta üzerine 125 µL TEOS eklenerek 2 saat boyunca 270 rpm'de karıştırılmıştır. Daha sonra santrifüj edilerek silika nanopartiküller (SN) elde edilmiştir. Elde edilen SN'ler %1'lik asidik metanol çözeltisinde 4 saat boyunca 60°C'de ekstrakte edilerek gözeneklerin açılması sağlanmıştır. 4 saatin sonunda partiküller santrifüj edilip metanol ile yıkanmış ve MSN'ler elde edilmiştir.

#### **3.4.2. MSN'lere Folik Asit Konjugasyonunun Yapılması ve Doksorubisin Yüklmesi**

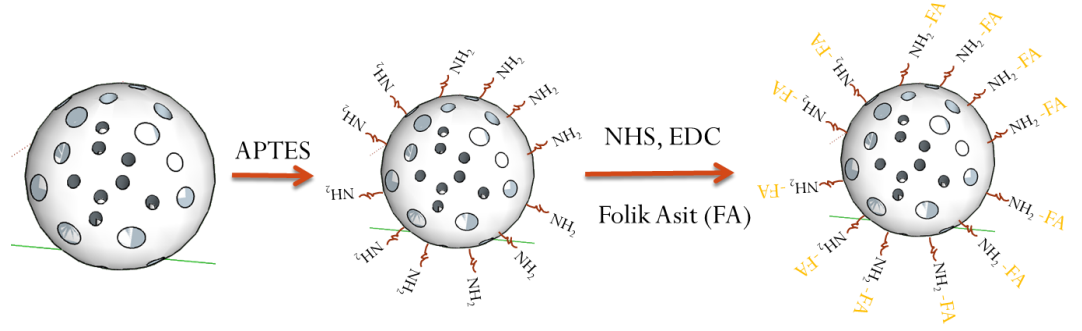
Mezoporlu silika nanopartikülleri ile folik asit (FA) NHS/EDC(N-Hidroksisüksinimid/N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide) kimyası

kullanılarak konjuge edilmiştir. Bunun için, 20 mg MSN 50 µl APTES (3-Triethoxysilylpropylamine) içeren 4 mL etanolün içine alınarak gece boyu karıştırılmış ve yüzeyinin amin fonksiyonlaştırılması sağlanmıştır. Aynı anda, DMF/DMSO (Dimetil formamit/ Dimetil Sülfoksit) (2,7 ml, 3:1v/v) karışımı içerisine 30 mg FA, 9,3 mg EDC ve 7,7 mg NHS eklenerek gece boyu karanlık ortamda karıştırılmış ve folik asitin aktifleştirilmesi sağlanmıştır. Daha sonra amin fonksiyonlaştırılmış silika nanopartikülleri ile aktifleştirilmiş folik asit çözeltisi bir araya getirilmiş 24 saat boyunca karanlık ortamda karıştırılarak konjugasyon işlemi yapılmıştır. Konjuge olmayan folik asitin ve konjugasyon ajanlarının uzaklaştırılması için nanopartiküller sırasıyla distile su ve etanol ile yıkanmış ve folik asit bağlı silika nanopartikülleri (MSN-FA) elde edilmiştir (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.1.** MSN'lerin üretimi ve doksorubisin yüklenmesinin şekilsel gösterimi. MSN'ler üretilirken ilk olarak distile su içerisine CTAB eklenerek misel oluşumu sağlanmakta ve sonrasında  $\text{NH}_4\text{OH}$  ile sentez ortamının pH'ı ayarlanmaktadır. Sonrasında ortama TEOS eklenerek misel yapısı içeren silika nanopartikülleri sentezlenmektedir. Bu nanopartiküllerin asidik metanol ile ekstraksiyonu yapılarak misel yapılarının çözünerek ortamdan uzaklaşması sağlanmaktadır. Böylelikle gözenekli yapı elde edilmekte ilaç yüklenmesine elverişli hale getirilmektedir.

Folik asit konjugasyonu yapılmış olan MSN'lere dokсорubisin yüklenmesi için dokсорubisin fosfat tamponlu tuz (PBS) içerisindeki çözeltisine nanopartiküller eklenerek etkin maddenin partiküllere yüklenmesi sağlanmıştır. Bunun için 20 mg nanopartikül, 500 µg/mL dokсорubisin konsantrasyonundaki 20 ml PBS çözeltisine eklenerek gece boyunca karanlıkta karıştırılmıştır. Ertesi gün partiküller santrifüjlenip yıkanarak dokсорubisin yüklü mezoporlu silika nanopartikülleri ve folik asit bağlı mezoporlu silika nanopartikülleri elde edilmiştir.

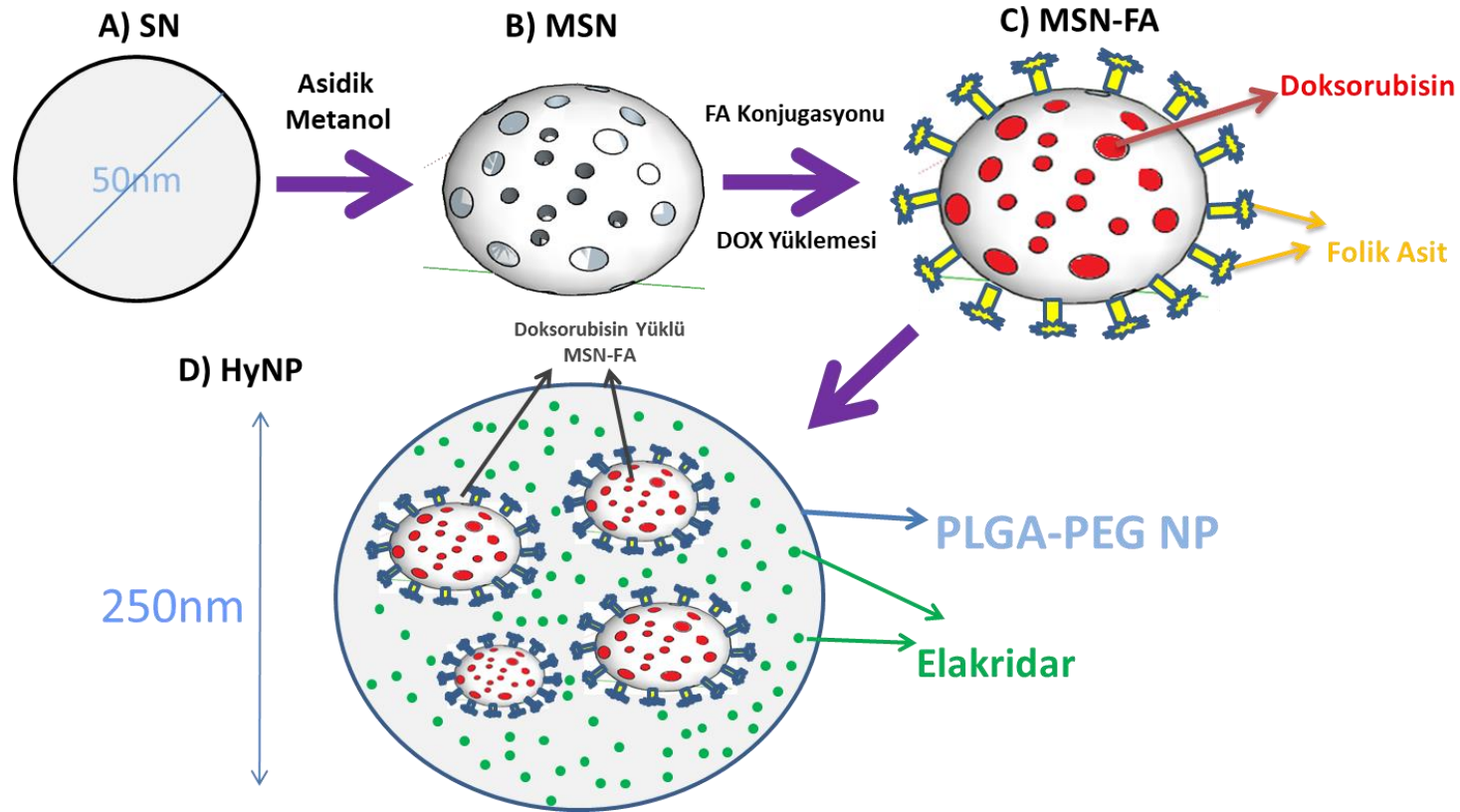


**Şekil 3.2.** MSN'lere folik asit konjugasyonu yapılmasının grafiksel gösterimi.

### 3.4.3. PLGA/Silika Hibrit Nanopartiküllerin (HyNp) Elde Edilmesi

Hibrit nanopartiküller (HyNp) ikili emülsiyon S/Y/S çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Bunun için 50mg PLGA-PEG ve 7,5mg MSN 1 ml DCM (Diklorometan) içinde dağıtılmıştır. Bu karışıma 200 µL distile su eklenerek 30 saniye boyunca sonike edilmiştir. Elde edilen bu ilk emülsiyon sistemi 4 mL %1 PVA çözeltisine eklenerek 60 saniye boyunca tekrar sonike edilmiştir. Elde edilen bu ikili emülsiyon sistemi 20 mL % 0,3 PVA çözeltisine eklenerek gece boyu karıştırılmıştır. Organik fazın uçmasından sonra partiküller santrifüjlenerek 2 kez distile su ile yıkanmıştır.

Elakridar yüklü PLGA/Silika HyNp'ler hazırlanırken de aynı yöntem kullanılmış olup elakridar da PLGA-PEG ve MSN ile birlikte DCM içerisine eklenmiştir (Şekil 3.3.).



**Şekil 3.3.** Tez kapsamında geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemin elde ediliş basamakları. A) Yaklaşık boyutu 50 nm olan silika nanopartiküllerinin (SN) sentezi, B) Silika nanopartikülleri sentezlenirken yapıya eklenerek misel oluşturan sürfaktanların asidik ekstraksiyonla uzaklaştırılması sonucu mezoporlu silika nanopartiküllerinin (MSN) eldesi, C) Elde edilen MSN'lere folik asit konjugasyonu ve sonrasında doksorubisinin yüklenmesi, D) Yaklaşık boyutu 250 nm olan, PLGA-PEG polimeri kullanılarak MSN ve elakridarın PLGA içine hapsedilerek elde edilen hibrit nanopartikül (HyNp) sistemi.

### **3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu**

#### **3.5.1. Nanopartiküllerin Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Analizi**

Nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri ultra saf su içerisinde Zetasizer Nanoseries-ZS (Malvern Ins., İngiltere) cihazı ile yapılmıştır. Her formülasyon için arka arkaya üç ölçüm yapılmış, ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C olacak şekilde ayarlanmıştır.

#### **3.5.2. Nanopartiküllerin Morfolojisinin İncelenmesi**

Partiküllerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve/veya transmisyon elektron mikroskopu (TEM) ile incelenmiştir. SEM analizleri için süspansiyon haldeki numuneler vitroz karbon parçalar üzerine konarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra palladyum-platin tabakasıyla kaplanmıştır. Kaplaması yapılan numuneler Quanta 400F Field Emission cihazı ile incelenmiştir. TEM analizleri için süspansiyon haldeki numuneler grid üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Organik yapı içermeyen MSN'ler Jem Jeol 2100F 200kV HRTEM cihazında, organik yapı içeren PLGA ve MSN-FA partikülleri FEI Tecnai G<sup>2</sup> Spirit Biotwin 120 kV CTEM cihazında incelenmiştir. Analizler Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarı'nda, cihazdan sorumlu uzman tarafından gerçekleştirilmiştir.

#### **3.5.3. Enerji Dağılımlı X-Işını (EDX) ve C,H,N Elemental Analiz**

SEM analizleri yapılırken elde edilen nanopartiküllerin EDX analizinde yapılarak elementlerin enerjilerinden faydalanarak yapıda hangi elementlerin var olduğu analiz edilmiştir. C,H,N elemental analizi ise LECO CHNS-932 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki analiz ile elde edilen nanopartiküller içindeki elementler analiz edilerek MSN yapısındaki silisyum ve oksijen elementine ek olarak MSN-FA nanopartiküllerinde yapıya karbon, azot ve hidrojen elementlerinin eklenip eklenmediği incelenmiş, bu sayede konjugasyonun başarıyla yapılabildiği araştırılmıştır. Analizler ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda, cihazdan sorumlu uzman tarafından gerçekleştirilmiştir.



### 3.5.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi

Silika nanopartiküllerin mezogözenekli yapıda sentezlenmesi için kullanılan bir yüzey aktif madde olan CTAB, gözenek içinde kaldığında yüzey alanını azaltır ve sitotoksiktir. Bu nedenlerle, CTAB asidik metanol ekstraksiyonuyla ortamdaki uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. CTAB'in ortamdaki uzaklaşmış ve uzaklaşmadığının anlaşılması amacıyla, elde edilen silika nanopartiküllerinin FTIR spektrumunu alınmıştır. Ayrıca folik asit konjugasyonunun başarılı bir şekilde yapıldığı yapılmadığının araştırılması amacıyla folik asit ve folik asit bağlı silika nanopartiküllerinde FTIR analizleri yapılmıştır. Analizler ALPHA FTIR (Bruker; Massachusetts, ABD) spektrometre ile yapılmış olup 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  aralığında dalga sayısı taranmıştır.

### 3.5.5. Yüzey ve Gözenek Karakterizasyonu

Elde edilen mezoporlu silika partiküllerin gözenek durumunun ve toplam iç hacimlerinin belirlenmesi amacıyla azot adsorpsiyon desorpsiyon yöntemi kullanılarak yüzey karakterizasyon cihazı (BET) ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler 120°C'de 6 saat boyunca degaze edildikten sonra AUTOSORB-6B (Quantachrome Corporation, ABD) cihazı ile analizler yapılmıştır. Analizler ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda, cihazdan sorumlu uzman tarafından gerçekleştirilmiştir.

### 3.5.6. X-Işını Kırınım Yöntemi (XRD)

Mezogözenekli yapıların hekzagonal düzlemde gözenek boyutunun ve yerleşiminin saptanması ve malzemenin kristal özelliklerinin belirlenmesi açısından XRD analizleri yapılmaktadır.

Tez kapsamında elde edilen mezoporlu silikaların ve folik asit konjugasyonu yapılmış partiküllerin XRD analizleri hem yukarıda belirtilen amaçlar için hem de folik asit konjugasyonunun yapıyı nasıl etkilediğinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Hekzagonal gözenekli yapıların pikleri 0-10  $2\theta$  açısı arasında gözlemlendiğinden cihaz bu aralıkta 0,02 adım aralığıyla çalıştırılarak Rigaku Ultima-IV X-Işını Kırınım Cihazı kullanılarak yapılmıştır. Analizler ODTÜ Merkez Laboratuvarında, cihazdan sorumlu uzman tarafından gerçekleştirilmiştir.

### 3.5.7. Enkapsülasyon Etkinliği

Partiküllere doksorubisin ve elakridar yükleme kapasitesi HPLC ile belirlenmiştir. Enkapsülasyon etkinliğinin (EE) belirlenmesinde indirekt metot kullanılmıştır; yani etkin maddenin partiküllere yüklenmesi sonrasında, partiküller santrifüjle ayrılarak süpernatanttaki etkin madde miktarı HPLC ile tayin edilmiştir. Enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$EE(\%) = \frac{\text{Kullanılan toplam etkin madde miktarı}(mg) - \text{Süpernatantdaki etkin madde miktarı}(mg)}{\text{Kullanılan toplam etkin madde miktarı}(mg)} \times 100$$

İlaç yükleme kapasitesi (drug loading, DL) ise nanopartiküllere yüklenen ilaç kütlesinin toplam nanopartikül kütlesine oranını belirtmektedir. Yani taşıyıcı sistemin ne kadar etkin madde taşıyabildiğinin bir göstergesidir. İlaç yükleme kapasitesinin hesaplanmasında ise aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır.

$$DL(\%) = \frac{\text{Nanopartikülün içinde yüklü olan etkin madde miktarı}(mg)}{\text{Nanopartikülün toplam ağırlığı}(mg)} \times 100$$

### 3.5.8. İn Vitro Salım Deneyleri

Nanopartiküllerin in vitro ortamdaki salım profillerinin incelenmesi için yapılan salım deneyleri, 37 °C'de, ısıtıcı yatay çalkalayıcı su banyosunda 72 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Doksorubisinin salım ortamı olarak pH 7.4 ve pH 5.5 PBS çözeltisi kullanılmıştır. Salım ortamındaki nanopartiküllerden 0,5., 1,5., 3., 6., 9., 12., 24., 48. ve 72. saatler sonunda 600 µL hacminde örnekler alınarak santrifüjlenmiştir. Dipte kalan nanopartiküller 600 µL taze PBS çözeltisi içinde dağıtılarak tekrar salım ortamına eklenmiştir. Süpernatantlar ise etkin madde miktarı tayini için HPLC cihazında analiz edilmiştir.

### 3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

ZR-75-1, T-47D hücreleriyle yapılan çalışmalarda besi yeri olarak , %10 fetal siğir serumu (FBS), %1 penisilin ve %1 streptomisin; EMT6/AR1 hücre hattında ise diğer iki hücre hattındaki içeriklere ek olarak doksorubisin (1 µg/mL) ve non-esansiyel amino asit (%1) eklenerek hazırlanan RPMI 1640 besi yeri kullanılmıştır. L929 hücreleriyle yapılan çalışmalarda ise %10 fetal siğir serumu (FBS), %1 penisilin

ve %1 streptomisin eklenerek hazırlanan DMEM besi yeri kullanılmıştır. Hücreler 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmişlerdir.

### **3.6.1. Etkin Madde İçermeyen Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Biyouyumluluklarının Araştırılması**

Etkin madde içermeyen silika nanopartiküllerin sitotoksiteleri L929 hücre hattı kullanılarak incelenmiştir. L929 hücreleri flask yüzeyinin %80'ini kapladıkları duruma (konfluent halde) geldiklerinde Tripsin-EDTA 10X çözeltisi kullanılarak flask yüzeyinden kaldırılıp taze besi yeri ortamıyla süspande edilmişlerdir. Hücreler öncelikli olarak tripan mavisini kullanılarak mikroskop yardımıyla sayılmış ve kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara 50 µL besi yeri ortamında ekilerek gece boyu inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrası besi yeri ortamında çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan etkin madde içermeyen nanopartiküller kuyucukların son hacmi 100 µL olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. Nanopartiküllerin uygulanmasından sonra hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 5 mg/ml konsantrasyonda PBS içinde hazırlanan MTT çözeltisinden her kuyucuğa 25 µL eklenmiştir. 4 saat inkübasyon sonrasında mikroskop yardımıyla kuyucuklarda formazan kristallerinin oluşumu teyit edildikten sonra her kuyucuğa 80 µL SDS-DMF (45:55 dimetilformamid:su içinde çözülmüş 200 g sodyum dodesil sülfat) çözeltisi eklenerek plakalar gece boyu inkübe edilmiştir. Son olarak plakalar 570 nm'de, mikropalak okuyucuda absorbanları ölçülmüştür. Plakalarda sadece hücre kültürü ortamıyla inkübe edilen hücreler kontrol grubu olarak belirlenmiş olup, bu grubun hücre canlılığı % 100 olarak değerlendirilmiştir. Kültür ortamındaki her bir grup için besi yeri ve partiküllerden gelebilecek oto floresan değeri çıkarılmıştır.

### **3.6.2. Etkin Madde Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksitelerinin Araştırılması**

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının meme kanseri üzerindeki etkinliklerinin araştırılması amacıyla folat reseptörü aşırı eksprese olduğu bilinen ZR-75-1, T-47D (insan meme kanseri hücre hatları) ve EMT6/AR1 (doksorubisine dirençli fare meme kanseri hücre hattı) kullanılarak araştırılmıştır. Bu amaçla öncelikli olarak

çözelti halindeki doksorubisin ve elakridarin kullanılan hücre hatlarındaki IC50 (inhibe edici özelliği olduğu bilinen maddenin tam inhibisyonu sağlayacak konsantrasyonun yarı değeri) değerleri hesaplanmış daha sonra uygun konsantrasyonlarda etkin madde içeren nanopartikül formülasyonları hücrelere uygulanmıştır.

Hücreler deney için ZR-75-1 ve T-47D hücreleri için 60000/50 µl, EMT6/AR1 için 30000/50 µl olacak şekilde ekilmiş ve bir gece inkübasyon sonrasında etkin madde çözeltileri veya nanopartikül formülasyonları kuyucuklara uygulanmıştır. Uygulama sonrası hücreler 24, 48 ve 72 saat inkübe edildikten sonra her bir kuyucuğa 25 µL 5 mg/mL konsantrasyonda MTT çözeltisi eklenmiştir. 96 kuyucuklu plakalar inkübatörde 4 saat süreyle bekletildikten sonra 80 µL SDS-DMF (45:55 dimetilformamid:su içinde çözünmüş 200 g sodyum dodesil sülfat) çözeltisi eklenerek gece boyu bekletilmiştir. Son olarak plakalar mikropilaka okuyucuda 570 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Kontrol grubu olarak formülasyonlarla aynı oranda su içeren besi yeri ortamı ve sadece besi yeri ortamı kullanılmıştır. Sonuçlar hesaplanırken kontrol grubunun hücre canlılığı %100 kabul edilmiş, besi yeri ve partiküllerden gelebilecek oto floresan değerleri çıkarılmıştır.

### **3.6.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi**

Hücre içine alım çalışmalarında, doksorubisinin kendisinin floresan özelliği olduğu için nanopartiküllere ayrıca farklı bir boya yüklenmesine gerek kalmamıştır. Doksorubisin yüklü nanopartiküller kullanarak partiküllerin hücre içine alımları önce akım sitometri cihazı ile daha sonra floresan mikroskobu kullanarak incelenmiştir.

Akım sitometri çalışmalarında 24 kuyucuklu plakalar kullanılarak ZR-75-1 ve T-47D hücreleri için kuyucuk başına 400.000 hücre, EMT6/AR1 için 200.000 hücre olacak şekilde plakalara ekilmiştir. Belirli sürelerde nanopartiküller ve hücreler PBS ortamında inkübe edildikten sonra hücreler toplanmış, akım sitometri ile floresan işaretli hücre yüzdesi ve bu hücrelerin ortanca floresan yoğunluğu (MFI) ölçülmüştür.

Floresan mikroskobu çalışmaları için ise 12 kuyucuklu plakalar kullanılarak ZR-75-1 ve T-47D hücreleri için kuyucuk başına 800.000 hücre, EMT6/AR1 için 400.00 hücre olacak şekilde plakalara ekilmiştir. Hücreler inkübatörde gece boyu bekletildikten sonra nanopartikül formülasyonları PBS içerisinde hücrelere uygulanmış ve 8 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrası hücreler kaldırılmış ve sitospin yöntemi ile hücrelerin görüntüleri çekilmiştir. Hücreler görüntülenmeden önce çekirdeğin işaretlenmesi amacıyla DAPI çözeltisiyle boyanmıştır. Doksorubisin ve DAPI için iki farklı kanaldan alınan görüntüler Image J programı kullanılarak birleştirilmiştir.

#### **3.6.4 Folat Reseptörüne Hedeflendirilmiş Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Hücre İçine Alım Mekanizmalarının İncelenmesi**

Folik asit konjuge edilmiş mezoporlu silika nanopartiküllerin doksorubisine dirençli EMT6/AR1 hücre hattında kltrin aracılı endositoz yolağını kullanıp kullanmadığının araştırılması amacıyla farmakolojik inhibitör olarak klorpromazin ve sükroz kullanılmış ve akım sitometri cihazıyla analizler yapılmıştır.

Klorpromazinin hücreye hangi konsantrasyonda uygulanacağıyla ilgili literatürde farklı değerler (133-136) kullanıldığı için öncelikli olarak klorpromazinin belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri (11,25-22,5-45-90-180  $\mu\text{M}$ ) hücrelere uygulanarak 24 saat inkübasyon sonrası hücreler bir canlılık boyası olan propidyum iyodür ile boyanmış ve hücrelerin canlılığı akım sitometri ile değerlendirilmiştir. Sükroz için literatürde genellikle 450 mM konsantrasyon sabit olarak kullanıldığı için (132, 137, 138) öncelikli olarak hücreler bu konsantrasyonda uygulanarak yolağın inkübe edilmesi denenmiş ve başarılı sonuç alındığı için doz titrasyonu yapılmasına ihtiyaç duyulmamıştır.

Literatürde, inhibitörler hücreye uygulandıktan sonra belirli bir süre inkübasyon sonrası atılarak inhibitör içermeyen taze ortam ile birlikte partiküllerin uygulandığı çalışmalar olmakla birlikte inhibitörlerin tek başına belirli bir süre inkübe edildikten sonra partiküllerin uygulanması sonrasında birlikte inkübe edilmeye devam edildiği çalışmalarda bulunduğu için her iki yöntemde denenmiştir.

Bir gün önceden 12'li hücre kültürü plaklarına hücreler ekilerek gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün besi ortamları atılarak, hücrelere 45 µM, 60µM klorpromazin ve 450 mM sükröz çözeltisi uygulanarak 1.5 saat inkübe edilmesi sağlanmış daha sonra inhibitör çözeltileri atılarak nanopartikül süspansiyonu ve yolağın inhibe edilip edilmediğini doğrulamak amacıyla pozitif kontrol olarak FITC-İnsan Transferini kullanılmıştır. Ayrıca 45 µM klorpromazin çözeltisi için inhibitörü ortamdan uzaklaştırmadan partikül ve pozitif kontrol ile birlikte inkübe edilerek de veriler elde edilmiştir. FITC-İnsan Transferini için öncelikli olarak çeşitli konsantrasyonlar (10-20-40-80 µg/mL) denenerek uygun doz belirlenmiştir. FITC-İnsan Transferinin hücre içine alımı değerlendirilirken hücre ile etkileşimleri sonrasında yüzeye yapışan moleküllerin hücre içine alınanlardan ayırılması için hücre yüzeyinden kaynaklanan floresanların söndürülmesi (quenching) işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 150 µL PBS içinde süspand edilen hücreler akım sitometri cihazıyla direk analizlerinin yapılması yerine hücre süspansiyonuna öncelikli olarak 150 µL %0,4'lük tripan mavisi eklenip daha sonra analiz gerçekleştirilmiştir.

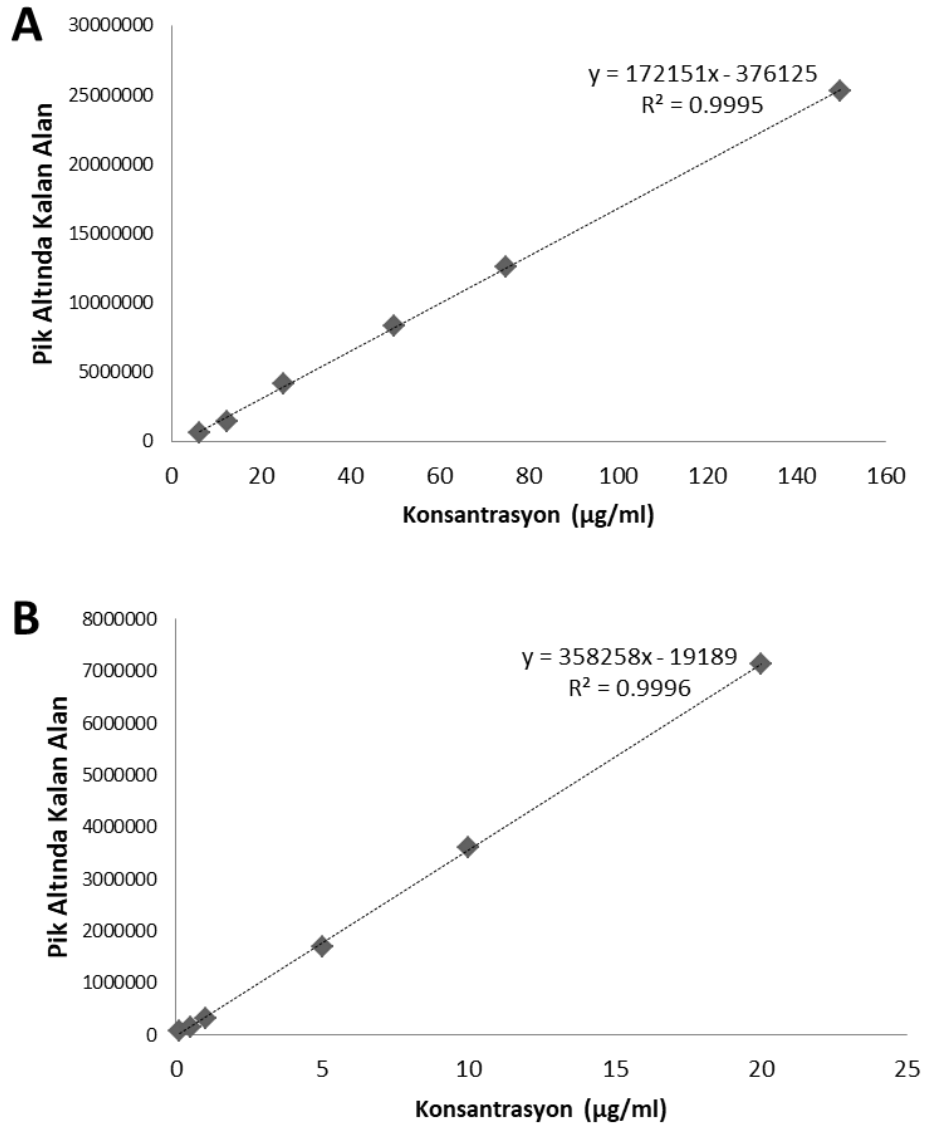
### 3.7. İstatiksel Analiz

Aksi belirtilmedikçe tüm deneyler üçer kez tekrarlanmıştır. Bulgular üç bağımsız deneyin ortalama  $\pm$  standart sapması şeklinde sunulmuştur. İstatiksel analizler Minitab 16 programı ile gerçekleştirilmiştir. İki grubun karşılaştırılmasında t testi, ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında ANOVA'yı takiben Tukey's post hoc testi kullanılmıştır.  $p < 0,05$  istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiş \* işareti ile gösterilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Analitik Yöntem Validasyonları

Doksozobisine ait kalibrasyon doğrusu 6,25, 12,5, 25, 50, 75, 150 µg/mL konsantrasyonlarda, elakridara ait kalibrasyon eğrisi ise 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 µg/mL konsantrasyondaki çözeltiler hazırlanarak doksozobisin ve elakridar için sırasıyla 475 nm eksitasyon, 555 nm emisyon ve 265 nm eksitasyon, 485 nm emisyon değerlerinde ölçülmüştür. Çalışmalar 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 4.1.** Doksozobisin (A) ve elakridarın (B) floresan dedektör kullanılarak HPLC analiziyle elde edilen kalibrasyon eğrileri.

Standart çözeltiler HPLC sistemine enjekte edildikten sonra elde edilen cevap piklerinin alanı, konsantrasyona karşı grafiklenmiş ve Şekil 4.1.'de verilen doğrular elde edilmiştir. Yapılan lineer regresyon analizi sonucunda bulunan korelasyon katsayılarının yüksekliği yöntemin son derece doğrusal olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte varyasyon katsayıları da %2'nin altında bulunmuştur.

Kullanılan analitik yöntemde in vitro salım çalışmalarında ortamda olması beklenen ve hibrit partiküllerin elde edilmesinde kullanılan PLGA polimerinin HPLC yöntemindeki eksitasyon, emisyon değerlerinde doksorubisin ve elakridar ile ve etkin maddelerin birbirleri ile girişim yapıp yapmadığının gösterilmesi için polimerin ve etkin maddelerin karışımı halindeki çözelti ve ayrı ayrı etkin madde çözeltileri HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde doksorubisin, elakridar ve PLGA'nin cevap piklerinin birbirleri ile çakışmadığı gözlemlenmiştir.

**Tablo 4.1.** Doksorubisin ve elakridarın HPLC miktar tayini yönteminde elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik bulguları.

Dokсорubisin Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Gün İçi			Günler Arası		
	Ortalama (µg/mL)	Geri Elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)	Ortalama (µg/ml)	Geri Elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
25	24,61	98,44	1,18	24,83	99,32	1,14
50	50,09	100,18	0,65	49,55	99,1	0,98
75	75,82	101,09	1,21	75,56	100,75	1,83

Elakridar Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Gün İçi			Günler Arası		
	Ortalama (µg/mL)	Geri Elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)	Ortalama (µg/ml)	Geri Elde (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
1	1,01	101,58	1,53	1,01	101,15	1,65
5	4,95	99,04	1,12	4,94	98,89	0,98
10	10,09	100,91	0,98	10,13	101,32	1,21



Keskinlik ve doğruluğun gösterilebilmesi için yapılan deneylerde elde edilen sonuçlar Tablo 4.1.'de verilmiştir. Elde edilen bulgular incelendiğinde varyasyon katsayılarının %2'nin altında olduğu, geri kazanım değerlerindeki %98-102 aralığında değiştiği gözlemlenmiştir.

#### 4.2. MSN Formülasyonlarının Optimizasyonu

İstenen özelliklerde MSN'lerin elde edilmesi amacıyla Minitab programı ile TOPSIS tabanlı Taguchi dizayn uygulanarak farklı miktarlarda TEOS (tetraetil ortosilikat), CTAB (setrimonyum bromür), NH<sub>4</sub>OH (amonyum hidroksit) ve farklı sıcaklık değerlerine sahip formülasyonlar hazırlanmıştır. Formülasyon çalışmaları sonucunda elde edilen mezoporlu silika nanopartiküllerinin ortalama partikül boyutu, PDI ve sentez verimine ait değerler Tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

**Tablo 4.2.** Geliştirilen formülasyonlardaki sentez parametreleri ve elde edilen sonuçlar.

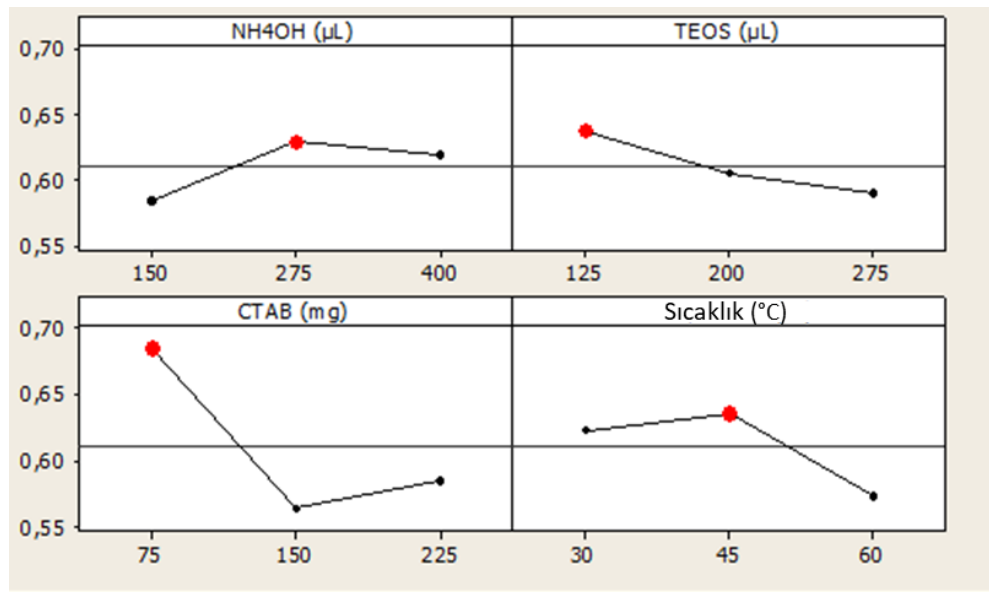
Form. No	NH <sub>4</sub> OH (μl)	TEOS (μl)	CTAB (mg)	Sıcaklık (°C)	P. Boyutu (nm)	PDI	Verim (%)
1	150	125	75	30	39,2±4,3	0,122±0,016	42±3
2	150	200	150	45	33,9±3,2	0,189±0,011	35±2
3	150	275	225	60	30,8±5,4	0,352±0,03	28±3
4	275	125	150	60	42,5±4,8	0,295±0,009	36±4
5	275	200	225	30	66,65±3,2	0,188±0,014	72±2
6	275	275	175	45	50,13±5,1	0,140±0,007	59±3
7	400	125	225	45	62,6±4,4	0,182±0,015	90±2
8	400	200	75	60	77,3±2,2	0,160±0,057	96±1
9	400	275	150	30	133,1±3,7	0,142±0,004	95±2

Hazırlanan formülasyonlarda ortalama partikül boyutunun 30,8 nm ile 133,1 nm arasında değiştiği gözlemlenmiştir.

PDI değerlerinin ise tüm formülasyonlarda 0,4'ün altında olduğu ve tüm şartlarda monodispers bir dağılım elde edildiği gözlemlenmiştir.

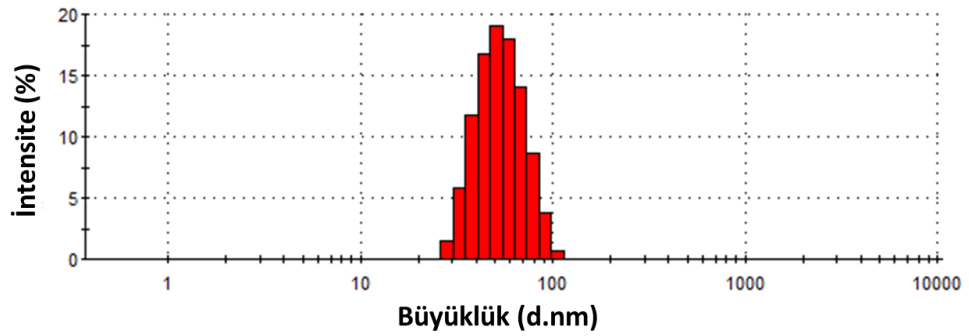
Eklene silika kaynağından (TEOS) yüzdece ne kadarının silika nanopartikülü elde edildiğinin tespit edilmesi amacıyla hesaplanan sentez verimi verilerinde ise, değerlerin %28 ile %96 arasında değiştiği görülmüştür. Bunun yanında genel itibari ile partikül boyutunun küçüldükçe sentez veriminin de azaldığı tespit edilmiştir.

Metot bölümünde belirtildiği üzere ortalama partikül boyutu, PDI ve sentez veriminin elde edilmesi hedeflenen optimum formülasyonda ağırlıklarının sırasıyla yüzdece 40, 25 ve 35 olarak belirlenmiş ve yapılan hesaplamalar sonrası Minitab programı ile yapılan analizde belirtilen şartlardaki optimum formülasyon için  $\text{NH}_4\text{OH}$  değerinin 275  $\mu\text{l}$ , TEOS'un 125  $\mu\text{l}$ , CTAB'in 75mg sentez sıcaklığının ise 45°C olması gerektiği saptanmıştır (Şekil 4.2.).



**Şekil 4.2.** Optimum formülasyon için Topsis tabanlı Taguchi dizayn ile elde edilen ana etki grafikleri.

Belirtilen bu değerler kullanılarak sentezlenen nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün 53,2 nm, PDI değerinin 0,126 sentez veriminin ise %84 olduğu tespit edilmiş (Şekil 4.3.) ve bu formülasyon kullanılarak çalışmalara devam edilmiştir.



**Şekil 4.3.** Elde edilen optimum MSN formülasyonun su ortamındaki partikül büyüklüğü dağılımı (Ortalama partikül büyüklüğü: 53,2 nm, PDI:0,126)

### 4.3. Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

#### 4.3.1. Ortalama Partikül Büyüklüğü, Partikül Morfolojisi, PDI ve Zeta Potansiyeli

Optimize edilen MSN'ler ile birlikte MSN-FA (folik asit konjugasyonu yapılmış mezoporlu silika) nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelleri Zetasizer Nanoseries-ZS ile ölçülerek konjugasyon işlemi sonrasında ne gibi değişimler olduğu saptanmıştır. Yapılan ölçümlere göre MSN'lerin ortalama partikül büyüklüğü  $53,2 \pm 5,3$  nm olduğu saptanırken MSN-FA nanopartiküllerinde hafif bir yükselişle  $61,9 \pm 4,5$  nm'ye ulaştığı saptanmıştır. PDI verilerinde de benzer şekilde bir artış gözlemlenmiş ve PDI  $0,126 \pm 0,012$ 'den  $0,156 \pm 0,022$ 'ye çıkmıştır. Zeta potansiyelinde ise dramatik bir değişim olmuş ve zeta potansiyelin negatif değerden ( $-8,9 \pm 2,8$ ) pozitif değere ( $+21 \pm 3,1$ ) geçtiği saptanmıştır (Tablo 4.3.).

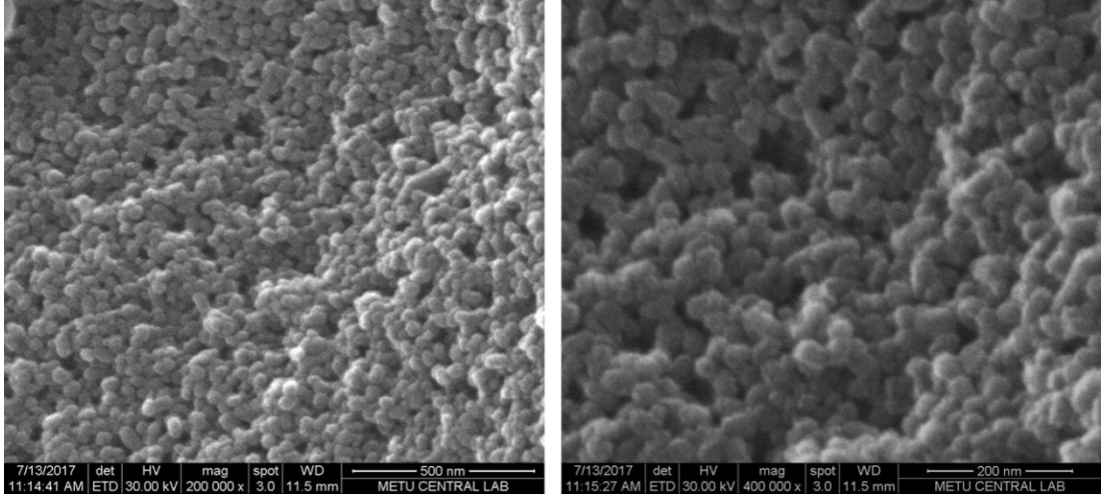
**Tablo 4.3.** MSN ve MSN-FA nanopartiküllerin karakteristik özellikleri.

	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
<b>MSN</b>	$53,2 \pm 5,3$	$0,126 \pm 0,012$	$-8,9 \pm 2,8$
<b>MSN-FA</b>	$61,9 \pm 4,5$	$0,156 \pm 0,022$	$+21 \pm 3,1$

MSN ve MSN-FA'ların başarılı bir şekilde elde edilmesinden sonra silika nanopartikülleri PLGA içine ikili emülsiyon S/Y/S çözücü buharlaştırma yöntemi ile

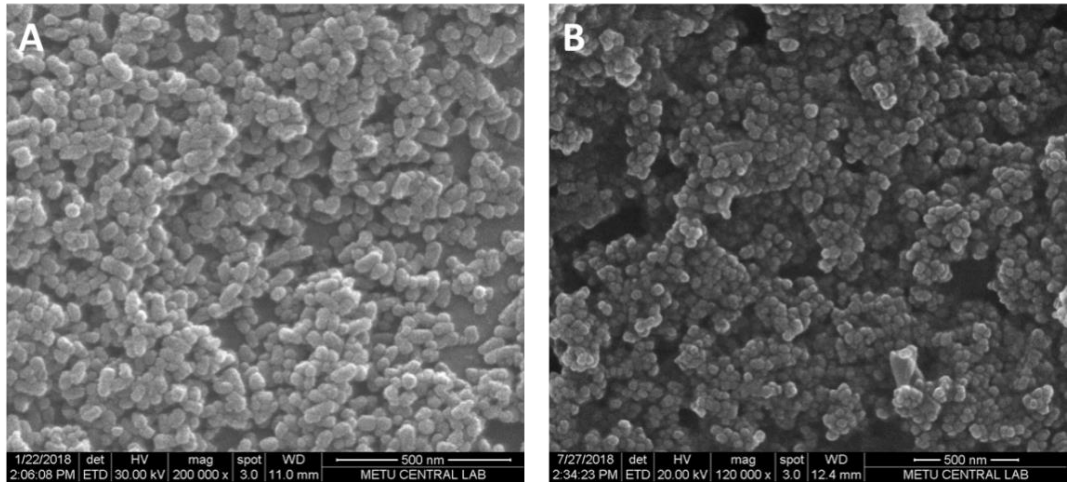
hapsedilerek PLGA/MSN-FA hibrit nanopartikülleri (HyNp) elde edilmiştir. HyNp grubunda ortalama partikül boyutu  $275,4 \pm 15,2$  nm bulunurken PDI değeri ise  $0,121 \pm 0,042$  olduğu saptanmıştır.

Elde edilen nanopartiküllerin morfolojilerinin incelenmesi için çeşitli SEM ve TEM analizleri yapılmıştır.



**Şekil 4.4.** Gözenekler açılmadan önce SEM görüntüleri çekilen silika nanopartikülleri.

Şekil 4.4.'de gözenekler açılmadan önce elde edilen silika nanopartiküllerinin SEM görüntüleri görünmektedir. Partiküllerde, uzaklaştırıldığında gözeneklerin oluşmasını sağlayacak olan CTAB'in ortamdaki henüz uzaklaştırılmamasından dolayı net olmayan görüntüler çekilmiştir.

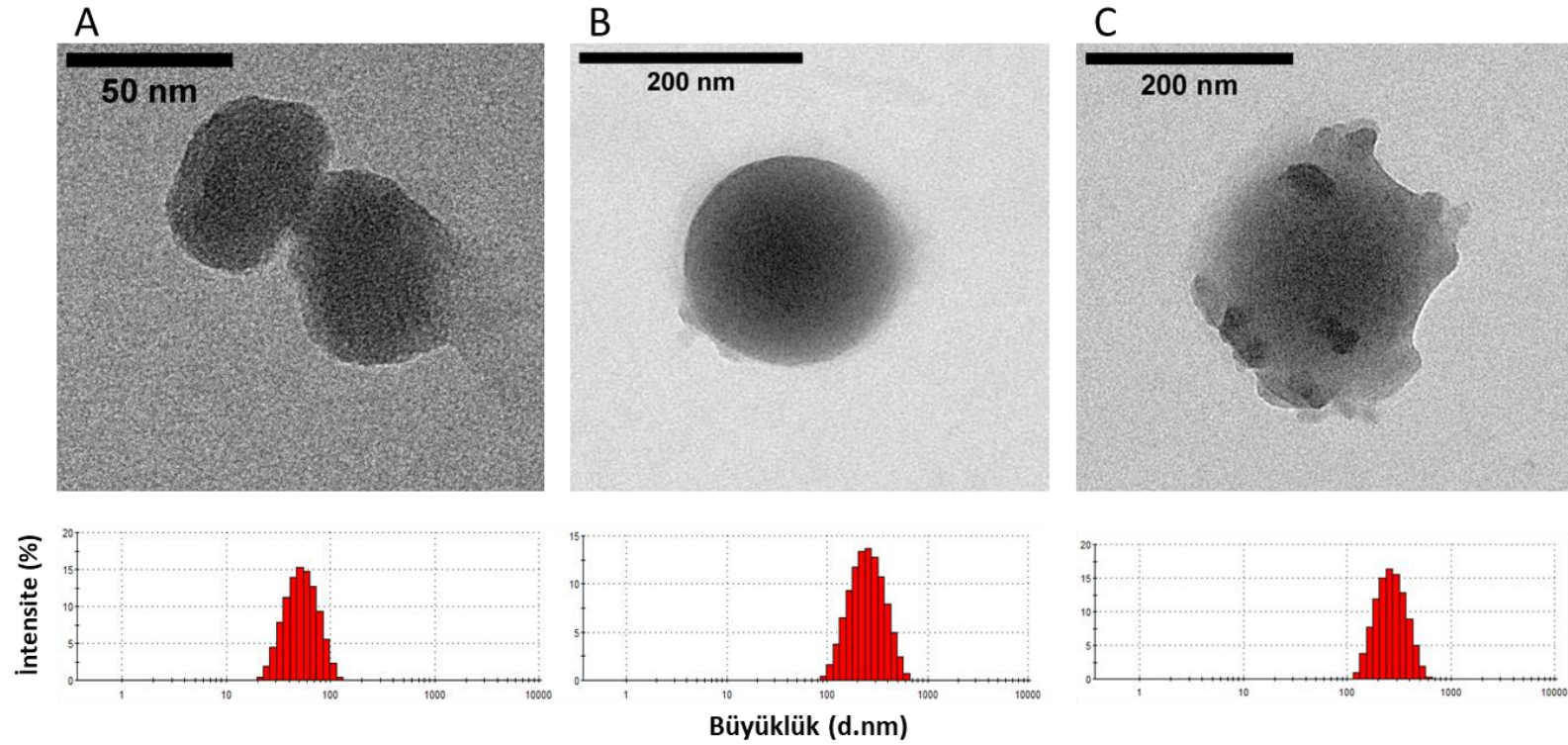


**Şekil 4.5.** MSN (A) ve MSN-FA (B) nanopartiküllerinin SEM görüntüleri.

CTAB'in uzaklaştırılmasından sonra elde edilen, etkin madde yüklenmesine ve konjugasyon işlemine hazır halde olan MSN'lerin SEM görüntüleri Şekil 4.5A.'da görülmektedir. Bu partiküllerin monodispers şekilde dağıldığı ve şekillerinin küresele yakın olduğu gözlemlenmektedir. Bunun yanında, partikül büyüklüklerinin DLS ile ölçülen partikül büyüklüklerine göre daha küçük olduğu görülmüştür. DLS ile yaklaşık 50 nm civarında ölçülen partiküllerin SEM fotoğraflarında boyutların genelde 35 nm civarında olduğu saptanmıştır.

Folik asitli bağlı silika nanopartiküllerinin SEM (Şekil 4.5B.) ve TEM (Şekil 4.6A.) fotoğraflarından görüldüğü gibi konjugasyon sonrasında partikül boyutlarında belirgin bir değişim gözükmezken partiküllerin şeklinin de korunduğu gözlemlenmiştir.

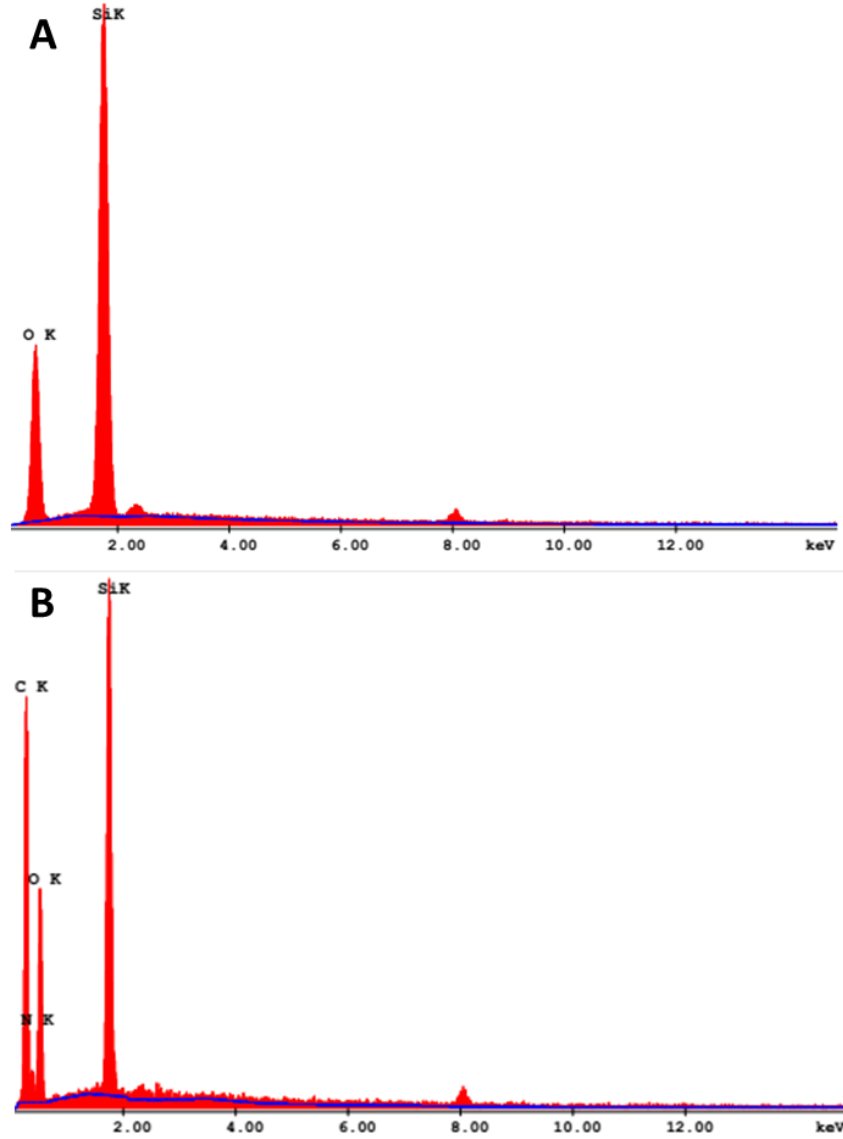
MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin SEM ve TEM analizleri yapıldıktan sonra elde edilen hibrit partiküllerinde TEM görüntüleri çekilmiştir. Alınan görüntülerde, silika nanopartiküllerinin küresel şekilli PLGA nanopartikülleri içine enkapsüle olduğu ve boyutlarının DLS ölçümlerine benzer şekilde ve 280 nm civarlarında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6B., Şekil 4.6C.).



**Şekil 4.6.** A) MSN-FA nanopartiküllerinin TEM görüntüsü ve DLS analizi (partikül boyutu: 61,9 nm PDI:0,156). B) PLGA nanopartiküllerinin TEM görüntüsü ve DLS analizi (partikül boyutu:253,2 PDI:0,101), C) Hibrit nanopartiküllerin (HyNp) TEM görüntüsü ve DLS analizi (partikül boyutu:275,4 PDI:0,121).

### 4.3.2. Enerji Dağılımlı X-Işını (EDX) ve C,H,N Elemental Analiz

Elektron mikroskopta görüntü elde etmek için elektron demeti kullanılmaktadır. Elektron demeti numuneye çarptığında içerdiği elementlerden karakteristik X-ışınları ortaya çıkmaktadır. Eğer elektron mikroskobu ile analiz yapılırken cihazda spektrofotometre var ise elementlerin kalitatif veya yarı kantitatif kimyasal analizleri de yapılabilmektedir.



**Şekil 4.7.** MSN(A) ve MSN-FA(B) nanopartiküllerinin EDX spektrumları.

Tez kapsamında hazırlanan nanopartiküllerin SEM analizleriyle birlikte EDX spektrumları çekilmiştir. Şekil 4.7.'de görüldüğü üzere MSN'lerin spektrumunda

yapıda sadece silisyum ve oksijen elementlerinin piki saptanırken MSN-FA nanopartiküllerinin spekturumunda bu elementlere ek olarak karbon ve azot elementlerinin pikleri de tayin edilebilmiştir.

C,H,N elemental analizi ise elementlerin analiz edilmesinde EDX'e göre daha hassas ölçümlerin yapılmasına olanak sağlamakta ve bu yöntemde kantitatif analiz yapılabilmektedir.

**Tablo 4.4.** MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin C,H,N elemental analiz sonucu.

Numune Adı	%C	%H	%N
MSN	6.99	2.23	-
MSN-FA	28.74	4.84	11.80

Tabla 4.4'de MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin C,H,N elemental analiz sonuçları verilmiştir. Elemental analiz, EDX analizine göre daha hassas bir analiz olduğundan dolayı MSN'lerin EDX analizinde saptanmayan karbon ve hidrojen elementleri az miktarda da olsa bu analizde tespit edilmiştir. MSN-FA nanopartiküllerinde ise karbon ve hidrojen elementlerinde belirgin bir artış gözlemlenirken yapıda azotun varlığı da saptanmıştır.

#### 4.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi

Silika nanopartiküllerinin mezogözenekli yapıda sentezlenmesi için kullanılan bir yüzey aktif madde olan CTAB, gözenek içinde kaldığında yüzey alanını azaltır ve sitotoksiktir. Bu nedenlerle, CTAB asidik metanol ekstraksiyonuyla ortamdaki uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. CTAB'in ortamdaki uzaklaşım uzaklaşmadığının anlaşılması amacıyla, elde edilen silika nanopartiküllerinin FTIR spekturumu alınmıştır. Ayrıca folik asit konjugasyonunun başarılı bir şekilde yapıldığı yapılmadığının araştırılması amacıyla folik asit ve folik asit bağlı silika nanopartiküllerinde FTIR analizleri yapılmıştır.

Şekil 4.8'de görülen içi boş mezogözenekli silikaya ait FTIR spekturumunda, 1080 cm<sup>-1</sup> dolayında, Si-O-Si gerilme titreşiminden kaynaklanan absorpsiyon piki görülmektedir. Folik asit bağlı mezoporlu silika nanopartiküllerinin FTIR



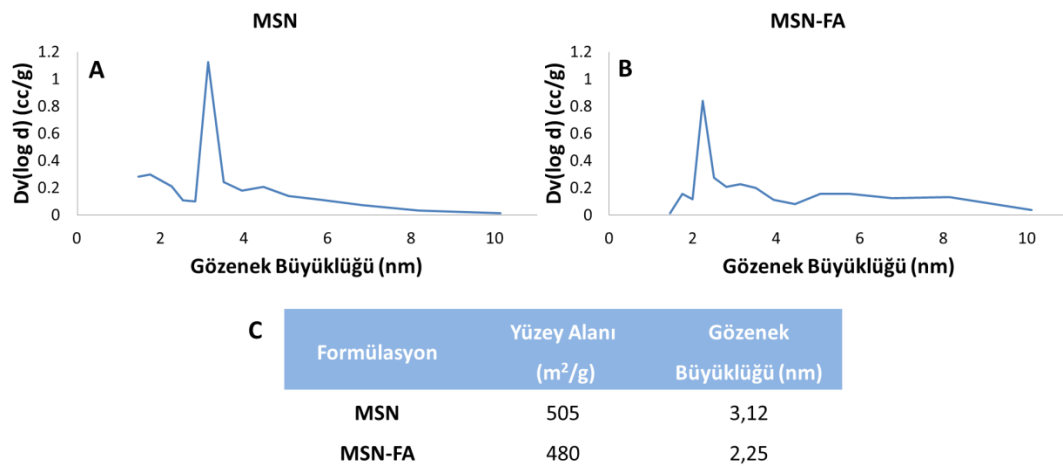
spektrumunda ise MSN spektrumundakilerin haricinde 1490, 1550 ve 1650 dolaylarında 3 farklı pik daha saptanmıştır.



Şekil 4.8. MSN, MSN-FA ve folik asitin FTIR Spektrumları.

#### 4.3.4. Yüzey ve Gözenek Karakterizasyonu

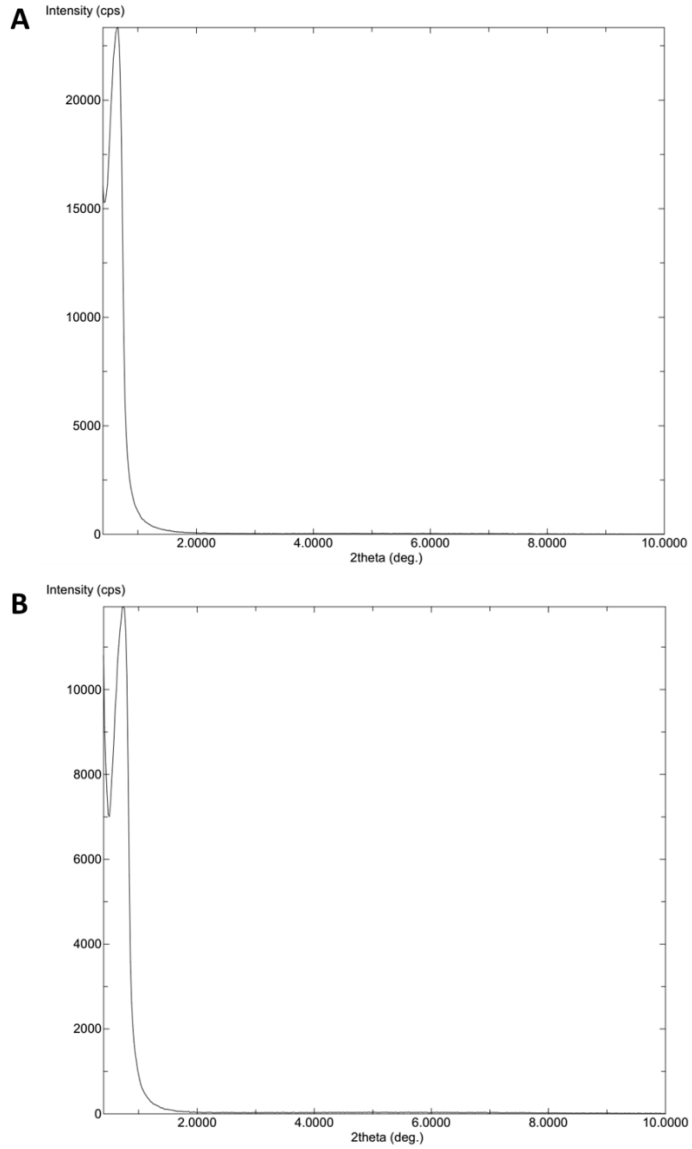
Elde edilen mezoporlu silika nanopartiküllerinin ortalama gözenek büyüklüğünün ve yüzey alanının hesaplanması amacıyla yapılan BET analizinin sonuçları Şekil 4.9.'da özetlenmiştir. MSN'lerin 505 m<sup>2</sup>/g olan yüzey alanı folik asit konjugasyonu ile MSN-FA nanopartiküllerinde 480 m<sup>2</sup>/g a gerilemiş, ortalama por büyüklüğü ise 3,12 nm'den 2,25 nm'ye düşmüştür.



**Şekil 4.9.** MSN (A), MSN-FA (B) partiküllerinin gözenek boyutu dağılımı ve yüzey alanı (C) değerleri.

#### 4.3.5. X-Işını kırınım desenleri (XRD)

İçi boş mezogözenekli silika nanopartiküllerinin kristal özelliğinin anlaşılması, mezogözenekli yapının gözlenmesi ve folik asit konjugasyonunun yapıyı bozup bozmadığının kontrolü amacıyla elde edilen MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin küçük açılı X-ışını difraksiyonu (SAXRD) alınmıştır. SAXRD spektrumları Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



**Şekil 4.10.** MSN (A) ve MSN-FA (B) partiküllerinin SAXRD spektrumları.

MSN spektrumunda  $2\theta$  açısı 1 dolaylarında keskin bir pik gözlemlenmiştir. MSN-FA'nın spektrumunda da her ne kadar pik şiddeti azalsa da pikin varlığı korunmuştur.

#### 4.3.6. Enkapsülasyon Etkinliği ve İn Vitro Salım Deneyleri

Konjugasyon işlemi yapılacak mezoporlu silika nanopartiküllerine etkin madde yüklenmesi işlemi konjugasyondan önce yapılabileceği gibi konjugasyondan sonrada gerçekleştirilebilmektedir. Konjugasyon işleminden sonra etkin madde yüklenmesi gerçekleştirildiğinde, maddenin porlardan içeri dolması

zorlaşabilmektedir. Fakat öncelikli olarak etkin madde yüklenip daha sonra konjugasyon işlemi yapıldığında ise konjugasyon basamakları sırasında etkin maddenin bir kısmı kaybedilebilmektedir ve daha önemlisi ne kadarlık bir kaybın olduğu net bir şekilde hesaplanamayabilmektedir.

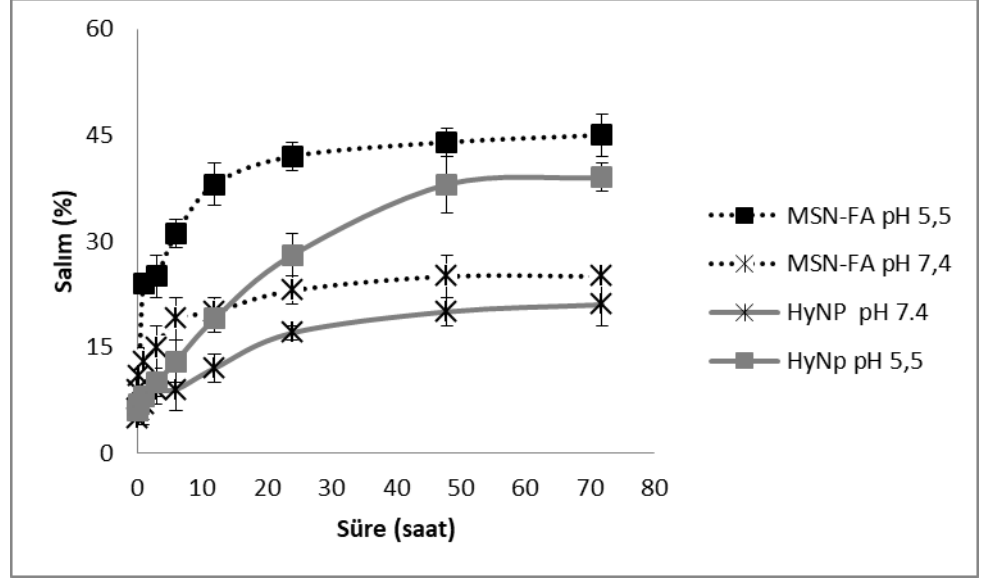
Tez kapsamında doksorubisinin mezoporlu silika nanopartiküllerine yüklenmesi için öncelikle yukarıda bahsedilen yaklaşımlardan ikincisi denenmiştir ve öncelikli olarak konjugasyon işlemi gerçekleştirilip daha sonra etkin madde yüklemesi yapılmıştır.

**Tablo 4.5.** Mezoporlu silika nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinlikleri.

Formülasyon	Doksorubisin	Doksorubisin İlaç
	Enkapsülasyon Etkinliği (%)	Yükleme Kapasitesi (%)
<b>MSN</b>	71,1±6,1	26,1±3,3
<b>MSN-FA</b>	68,3±5,3	25,1±1,9

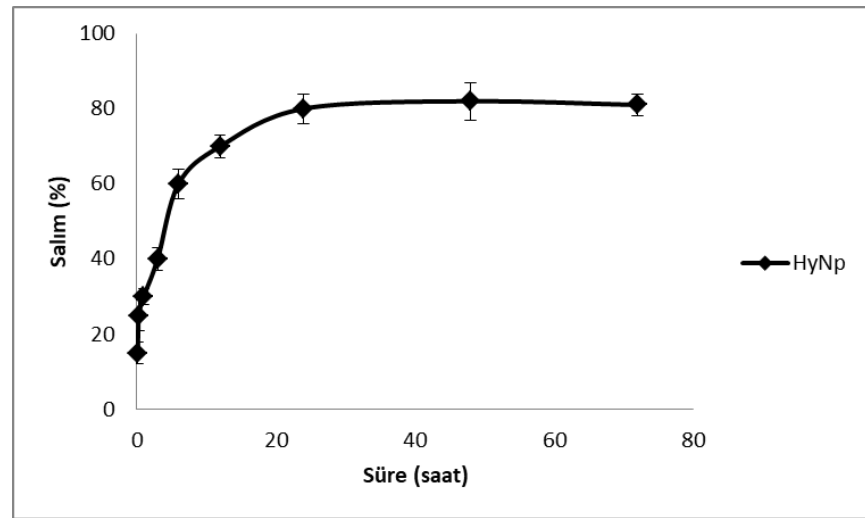
Tablo 4.5.'de görüldüğü üzere MSN'lerin enkapsülasyon etkinliği yüzde 71,1±6,1 bulunurken MSN-FA için bu değer 68,3±5,3 bulunmuştur. Bu sonuçlar folik asit konjugasyonunun enkapsülasyonu etkilemediğini ve konjugasyon işleminden sonra etkin madde yüklenmesinin daha uygun bir yol olduğunu göstermektedir. Elakridarın PLGA nanopartiküllerindeki enkapsülasyon değeri ise %68,3±4,3 olarak hesaplanmıştır.

Doksorubisinin ilaç yükleme etkinliği ise MSN için %26,1 ve MSN-FA için %25,1 olarak hesaplanmıştır.



**Şekil 4.11.** pH 5,5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerinde MSN-FA ve hibrit nanopartikül (HyNp) gruplarından dokсорubisinin salım profilleri.

Şekil 4.11'de görüldüğü üzere dokсорubisinin pH'a duyarlı olarak salımının arttığı gözükmemektedir. pH 7,4 salım ortamında bulunan MSN-FA nanopartiküllerden 72 saat sonunda yüzde 25 dolaylarında bir salım olduğu gözlemlenirken bu oranın pH 5,5 salım ortamında yüzde 45 dolaylarına çıktığı gözükmemektedir. MSN-FA nanopartiküllerinin PLGA içine hapsedildiği hibrit nanopartikül gruplarında ise salımın gecikmeli olarak başlayıp daha yavaş bir salım hızı sonrası 72. saatte MSN-FA grubundaki yüzdece salım değerlerine yaklaştığı görülmektedir



**Şekil 4.12.** pH 7.4 tampon çözeltilisinde HyNp'den elakridarın salım profili.

Elakridarın hibrit nanopartiküllerden (HyNp) salımına bakıldığında ise ilk 6 saatte ani ilaç salımı ile elakridarın %60'nın salınmasını takiben kontrollü salımın takip etmesi ve 24.saat sonunda plato düzeyine ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.12.).

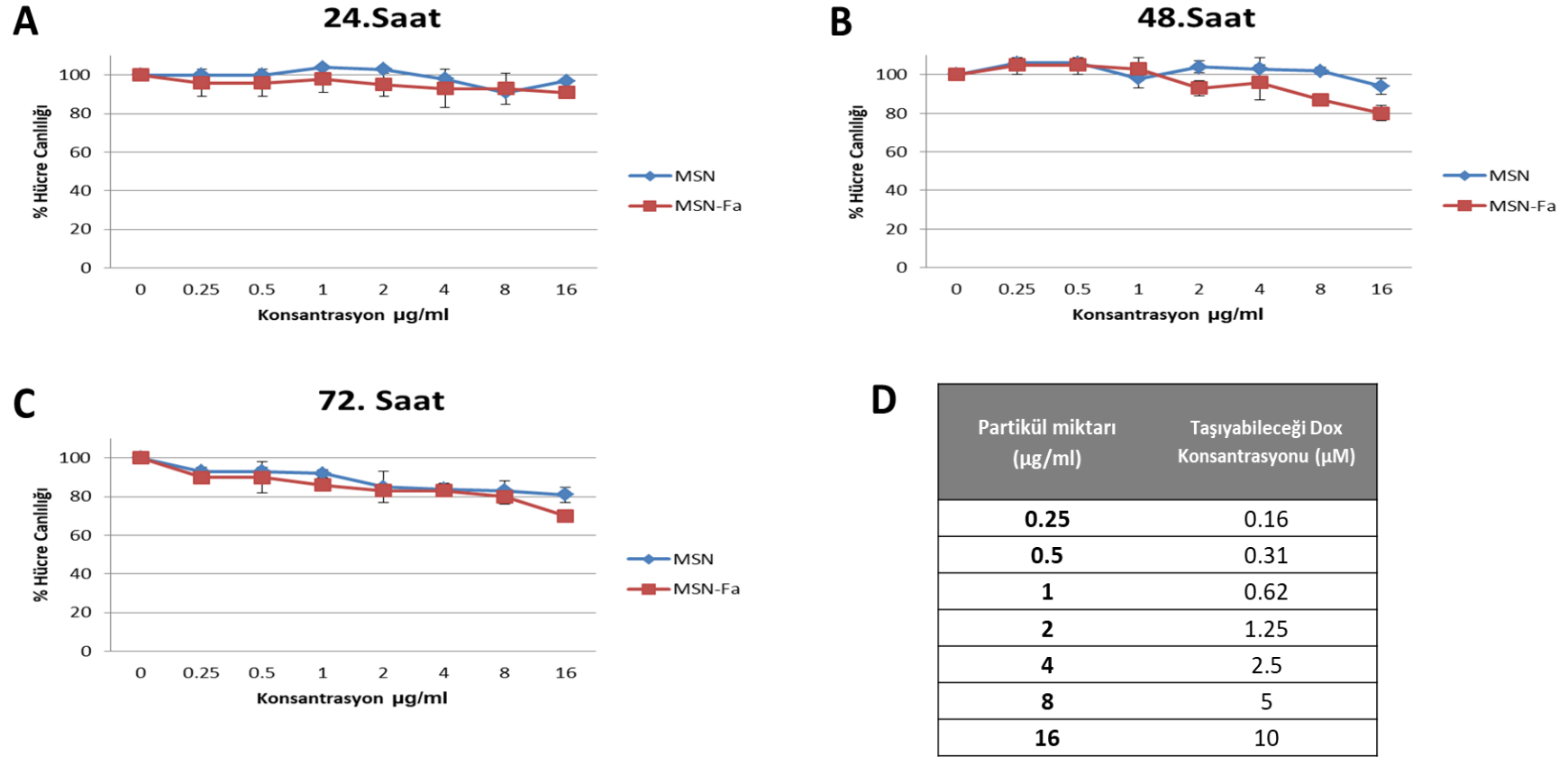
#### **4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları**

##### **4.4.1. Etkin Madde İçermeyen Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Biyouyumluluklarının Araştırılması**

PLGA polimeri FDA ve EMA tarafından biyouyumlu (85) bir polimer olarak gösterilmesine rağmen mezoporlu silika partiküllerinin biyouyumluluk belgesi henüz bulunmamaktadır. Fakat mezoporlu silika nanopartikülleri ile; partikül büyüklüğü, gözenek boyutu, yüzey fonksiyonel grupları, morfolojisi gibi çeşitli etkenlere bağlı olmak üzere, biyouyumlu ilaç taşıyıcı sistemlerin elde edilmesinin mümkün olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (139-144).

Tez kapsamında sentezlenen MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin biyouyumluluğunu değerlendirmek için L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak MTT analizi ile hücre canlılıkları incelenmiştir. Nanopartiküllerin hücrelerle 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonu sonucu elde edilen hücre canlılığı sonuçları Şekil 4.13.'de verilmiştir.

24 saatlik inkübasyon sonrasında en yüksek partikül konsantrasyonunda dahi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin bir farklılık bulunmamıştır. 48 saat ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda ise doza bağımlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu gözlemlenmiştir. MSN-FA grubunun 72 saatlik inkübasyon yapılan en yüksek konsantrasyonu dışında hiçbir grupta hücre canlılığının %80'in altına inmediği görülmüştür. Şekil 4.13D.'de etkin madde yüklü olmayan partiküllerin doksorubisin ile yüklendiklerinde kaç  $\mu\text{M}$  doksorubisin taşıyacağı gösterilmiştir. Partiküllerin kanser hücre hatlarında etkinlikleri değerlendirilirken en yüksek  $3,2 \mu\text{M}$  doksorubisin içeren partikül konsantrasyonu ( $5,12 \mu\text{g/mL}$ ) kullanılmıştır. Bu gruba en yakın partikül konsantrasyonu olan  $8 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda dahi canlı hücre miktarı %80'in üzerinde bulunmuştur. MSN-FA formülasyonlarının MSN formülasyonlarına göre hafif miktarda daha sitotoksik olduğu tespit edilmiştir.



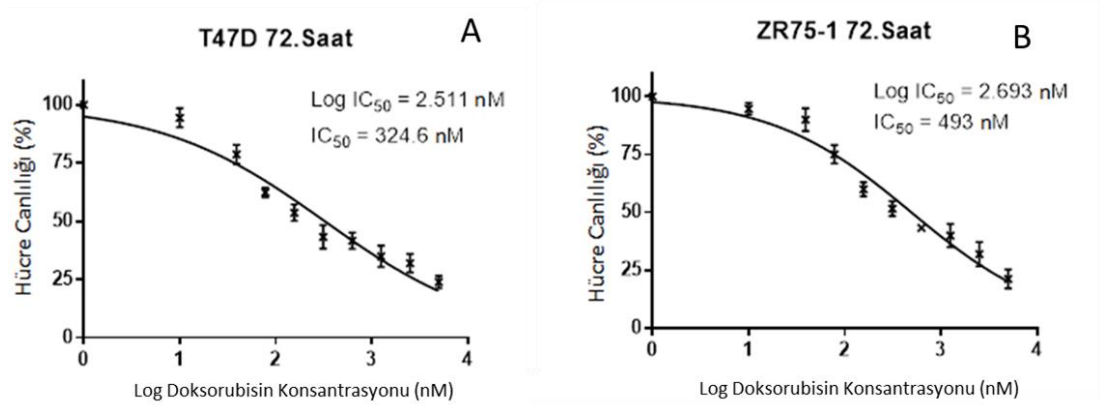
**Şekil 4.13.** Etkin madde yüklenmemiş MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin 24,48 ve 72 saat L929 hücreleriyle inkübasyonu sonrası canlı hücre miktarları (A,B,C). Belirtilen nanopartikül konsantrasyonlarının doksorubisin yüklenmesi durumunda ne kadar etkin madde taşıyabileceği(D).



#### 4.4.2. Etkin Madde Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksitesinin Araştırılması

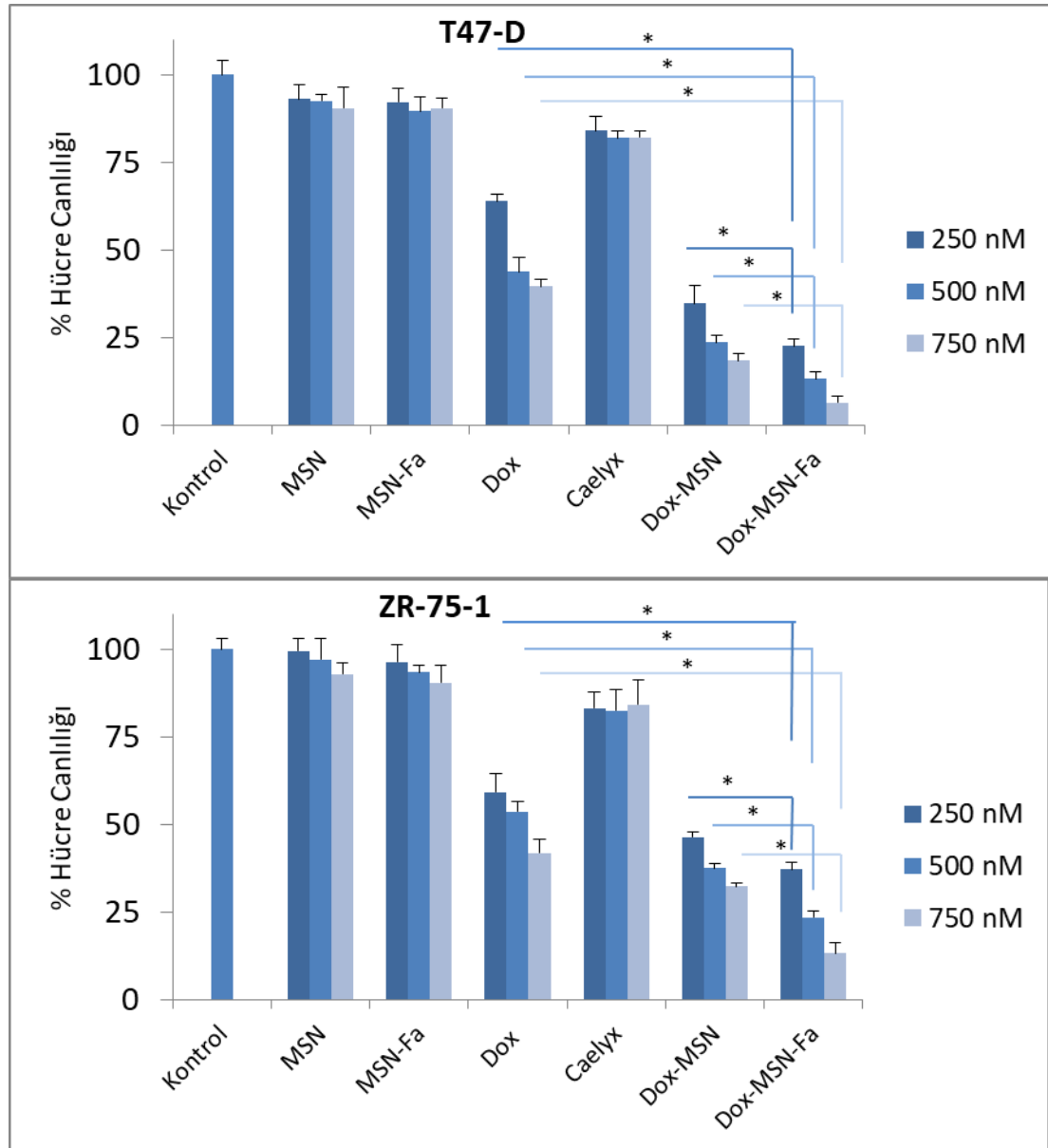
Tez kapsamında hazırlanan nanopartiküllerin sitotoksitesi ve meme kanserindeki etkinliği araştırılırken hem folik asit ile aktif hedeflendirmenin hem de ilaç direncinin üstesinden gelinmesi için elakridar kullanımının ne kadar etkin olduğunun araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda folik asitle hedeflendirmenin etkinliğinin araştırılması amacıyla folat reseptörü aşırı eksprese olduğu bilinen ZR-75-1 ve T-47D hücre hatları kullanılırken elakridarın etkinliğinin test edilmesi amacıyla ise folat reseptörü aşırı eksprese olmasının yanında doksorubisine dirençli olan EMT6/AR1 hücre hattı kullanılmıştır.

Kullanılacak olan hücre hatlarında elde edilen formülasyonların sitotoksitesinin belirlenmesi için öncelikli olarak T-47D ve ZR-75-1 hücre hatlarında 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156, 78, 39, 19 nM konsantrasyonundaki serbest doksorubisin çözeltileri bu hücre hatlarına uygulanarak 24, 48 ve 72. saatlerdeki doksorubisin IC50 değerleri bulunmuştur. Her iki hücre hattında da 24 ve 48. saatte en yüksek konsantrasyonda dahi hücrelerdeki canlı hücre miktarı oranı %45'in yukarısında olduğu için 72. saatteki IC50 değerleri formülasyonların sitotoksitesini belirlemek amacıyla seçilmiştir.



**Şekil 4.14.** T-47D (A) ve ZR-75-1 (B) hücre hatlarının çeşitli doksorubisin çözeltileriyle 72 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılığı.

Şekil 4.14.'te görüldüğü üzere T-47D hücre hattı için doksorubisin çözeltisinin IC50 değeri 324 nM bulunurken ZR-75-1 hücre hattı için bu değer 493 nM olarak hesaplanmıştır. Her iki hücre hattının IC50 değerleri göz önünde bulundurularak her iki hücre hattının IC50 değerlerini içine alacak şekilde 250, 500 ve 750 nM doksorubisin içeren formülasyonlar hücrelere uygulanarak 72 saat inkübasyon sonrası sitotoksitelerine bakılmıştır.



**Şekil 4.15.** Belirtilen konsantrasyonlarda doksorubisin içeren formülasyonların T-47D ve ZR-5-1 hücre hatlarındaki canlı hücre miktarları.

Şekil 4.15.'te belirtildiği üzere T-47D hücre hattında her üç konsantrasyonda da doksorubisin yüklü MSN-FA ve MSN-FA nanopartikülleri hem kontrol, hem doksorubisin çözeltisi hemde Caelyx®'e göre daha etkin bir hücre ölümü gerçekleştirdiği açıkça görülmektedir. Doksorubisin yüklü MSN formülasyonlarında canlı hücre miktarı %20 ile %41 aralığında değişirken doksorubisin yüklü MSN-FA formülasyonlarında canlı hücre miktarı %9 ile %22 aralığında değişmektedir. Her iki grup arasında aynı miktarda doksorubisin içeren formülasyonlar karşılaştırıldığında MSN-FA grubunda sitotoksitenin istatistiksel olarak daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Cealyx grubunda ise doza bağlı olarak sitotoksitede istatistiksel olarak anlamlı derecede bir farklılık olmazken ( $p>0,05$ ) kontrol grubuna göre her üç grupta da daha etkin bir sitotoksitate göstermiştir. Caelyx®'in doksorubisin çözeltisine göre ise sitotoksitesinin daha az olduğu gözlemlenmiştir.

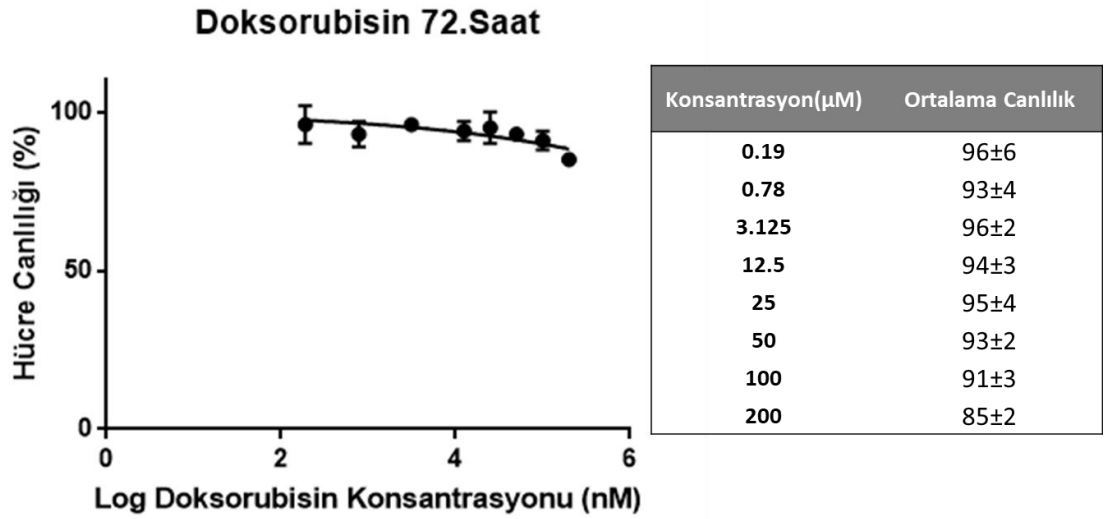
ZR-75-1 hücre hattındaki sonuçlarda genel itibari ile T-47D hücre hattının sonuçları ile örtüştüğü görülmektedir. Bu hücre hattında doksorubisin yüklü MSN formülasyonlarının hücre canlılığı %32 ile %46 arasında değişirken MSN-FA formülasyonlarında ise canlılığın %14 ile %37 arasında olduğu görülmektedir. Bu hücre hattında da MSN ve MSN-FA formülasyonlarının aynı miktarda doksorubisin taşıyan grupları karşılaştırıldığında folik asit konjugasyonu yapılan tüm grupların folik asit konjugasyonu yapılmayan tüm gruplara göre istatistiksel olarak daha etkin sitotoksitate gösterdiği bulunmuştur. Bu hücre hattında da Caelyx® formülasyonları konsantrasyondan bağımsız olarak kontrole göre daha sitotoksik olduğu gözlemlenirken doksorubisin çözeltisine göre ise sitotoksitesinin daha düşük olduğu görülmüştür. Doksorubisin içermeyen boş nanopartikül formülasyonlarının hücre canlılığı ise %92 ile %99 arasında değiştiği gözlemlenmiştir.

Bu iki hücre hattı karşılaştırıldığında ise ZR-75-1 hücre hattındaki canlı hücre miktarları T-47D hücre hattındaki aynı formülasyonların aynı konsantrasyon gruplarındaki canlılığa göre bir miktar daha yüksek bulunmuştur.

T-47D ve ZR-75-1 hücre hatlarındaki sitotoksitate çalışmaları yapıp folik asit ile hedeflendirmenin etkinliği başarılı bir şekilde gösterildikten sonra EMT6/AR1

hücre hattındaki sitotoksosite çalışmalarına geçilmiştir. İki farklı hücre hattında folik asit hedeflendirilmesinin etkinliği gösterildiği için ve EMT6/AR1 hücre hattı kullanılmasındaki asıl amacın elakridarın etkinliğinin araştırılması olduğundan bu hücre hattında kullanılan tüm mezoporlu silika nanopartikülü formülasyonları için MSN-FA grubu kullanılmış olup konjugasyon yapılmamış olan MSN formülasyonları çalışmalara dahil edilmemiştir.

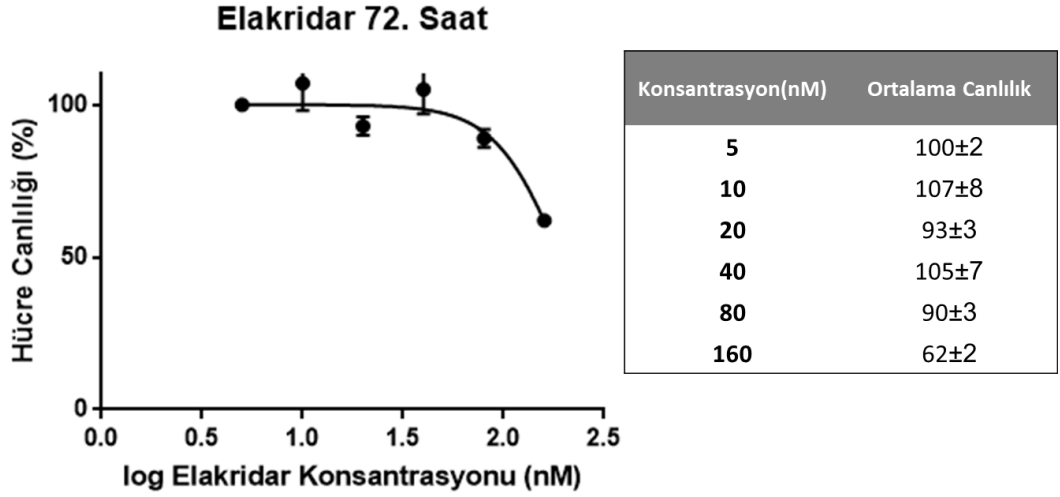
EMT6/AR1 hücre hattı için öncelikli olarak hem serbest doksorubisin çözeltisinin hem de elakridar çözeltisinin sitotoksitesine bakılmıştır. Doksorubisin için 200-100-50-25-12,5-3,12-0,78 ve 0,19  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak hücrelere uygulanmış ve hücreler 72 saat inkübe edildikten sonra grupların sitotoksiteleri değerlendirilmiştir.



**Şekil 4.16.** EMT6/AR1 hücre hattında çeşitli doksorubisin çözeltileriyle hücrelerin 72 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılığı.

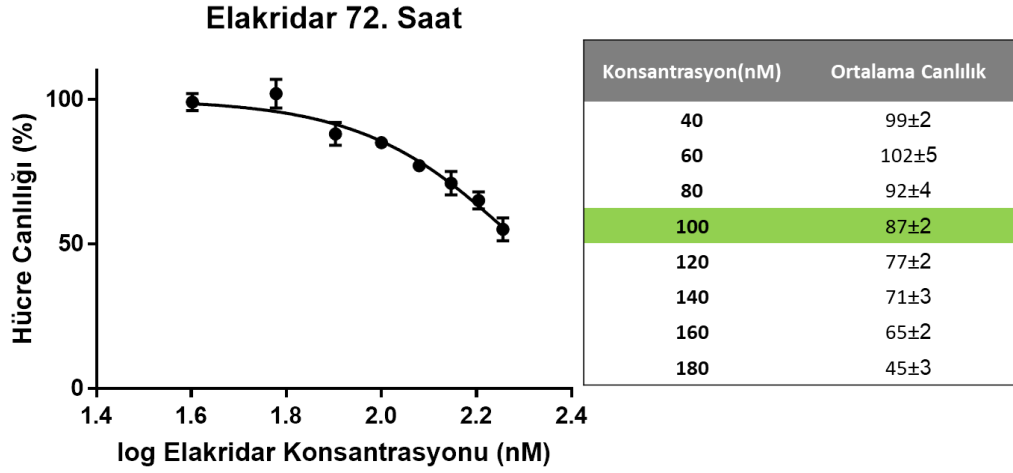
Şekil 4.16'da görüldüğü üzere en yüksek grup olan 200  $\mu\text{M}$  doksorubisin konsantrasyonunda dahi hücre canlılığının %85'ten aşağıya inmediği görülmüştür.

Elakridar çözeltisi için ise öncelikli olarak 5-160 nm arasında değişen konsantrasyonlarda elakridar çözeltisi uygulanıp 72 saat inkübasyon sonrası toksisitelere bakılmıştır.



**Şekil 4.17.** EMT6/AR1 hücre hattında 5-160 nM elakridar çözeltileriyle hücrelerin 72 saat inkübasyonu sonrası hücre canlılığı.

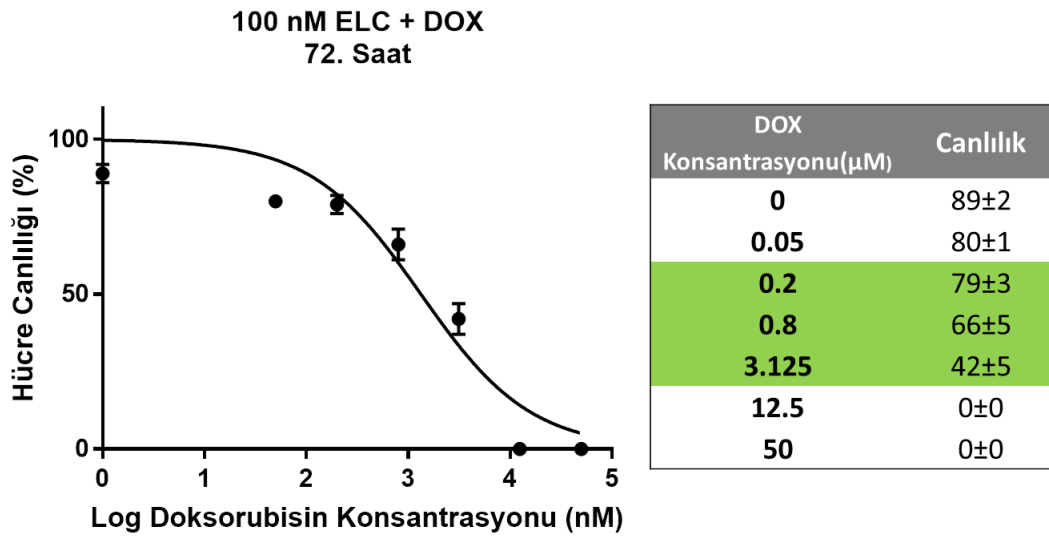
Şekil 4.17.'de görüldüğü üzere 40 nM konsantrasyona kadar elakridar çözeltisinin bir toksisitesi gözlemlenmezken 80 nM konsantrasyonda canlı hücre miktarı %90'a gerilemiş olup daha sonra 160 nM konsantrasyonda ani bir düşüşle %62 seviyesine gerilemiştir. Bu sonuç sonrasında elakridarın toksisitesinin daha iyi tayin edilip uygun dozun daha doğru seçilebilmesi amacıyla 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 ve 180 nM konsantrasyonlarda ikinci bir elakridar konsantrasyonu serisi hazırlanıp hücrelere uygulanarak 72 saat inkübe edilmiştir.



**Şekil 4.18.** EMT6/AR1 hücre hattında 40-180 nM elakridar çözeltileriyle hücrelerin 72 saat inkübsasyonu sonrası hücre canlılığı.

40-180 nM arasındaki konsantrasyonlarda elakridar çözeltisiyle yapılan 72 saatlik inkübasyon sonrası canlı hücre miktarlarının %45 ile %102 arasında değiştiği gözlemlenmiş olup bu sonuç sonrasında toksik olmayan en yüksek doz (%80 üstü hücre canlılığı) olan 100 nM elakridar konsantrasyonunun formülasyonlarda kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.18.).

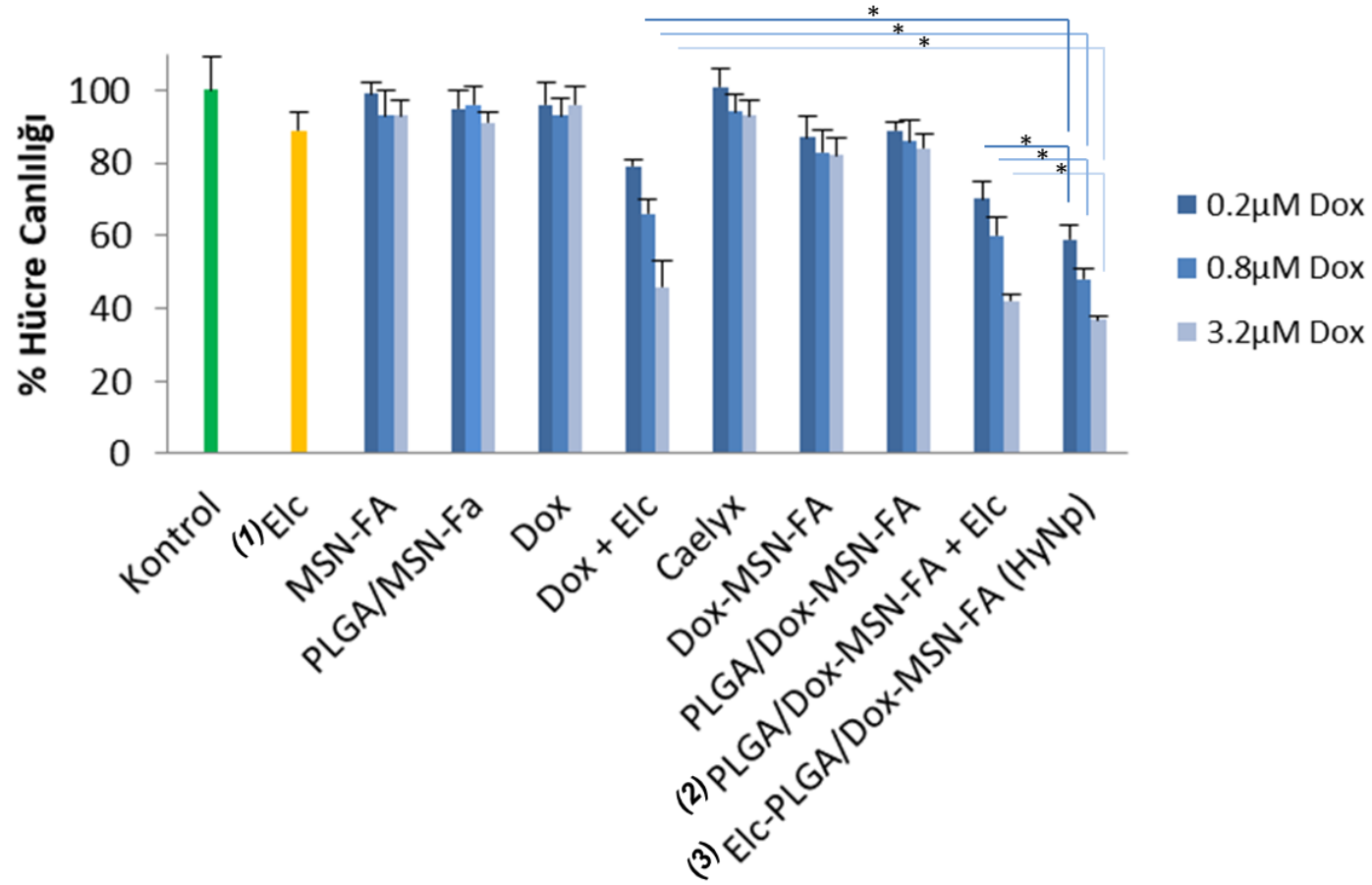
Doksorubisin ve elakridar çözeltileriyle yapılan bu doz titrasyonları sonrasında 100 nM sabit elakridar ile birlikte nanopartikül formülasyonlarında ne kadar konsantrasyonda doksorubisin içereceğinin belirlenmesi amacıyla her bir çözelti grubu son hacimde 100 nM elakridar içerecek şekilde 0-0,05-0,2-0,8-3,125-12,5 ve 50  $\mu$ M doksorubisin çözeltileriyle hücreler 72 saat inkübe edilmiştir.



**Şekil 4.19.** EMT6/AR1 hücre hattında 100 nM sabit elakridar konsantrasyonu ile birlikte çeşitli konsantrasyonlardaki doksorubisin çözeltilerinin birlikte uygulanarak hücrelerle 72 saat inkübasyonu sonrası canlı hücre miktarları.

Son hacimlerinde 100 nM elakridar çözeltisi ile birlikte 0-50  $\mu\text{M}$  aralığındaki çeşitli konsantrasyonlarda doksorubisin içeren çözeltilerin EMT6/AR1 hücrelerine uygulanarak 72 saat inkübasyon sonrası canlı hücre miktarları Şekil 4.19.'da verilmiştir. En yüksek miktarda doksorubisin içeren gruplar olan 50 ve 12.5 $\mu\text{M}$  doksorubisin konsantrasyonlarında tüm hücre popülasyonunun öldüğü görülmektedir. Hiç doksorubisin içermeyip sadece 100 nM elakridar içeren grupta ise önceki sonuçlara paralel olarak hücre canlılığının %90 dolaylarında olduğu görülmektedir. 0,2-0,8 ve 3,125  $\mu\text{M}$  doksorubisin içeren gruplarda ise hücre canlılığı sırasıyla % 79 $\pm$ 3, 66 $\pm$ 5 ve 42 $\pm$ 5 olarak bulunmuştur ve bu 3 konsantrasyon, nanopartikül formülasyonlarının sitotoksitelerinin değerlendirilmesi için seçilmiştir.

Elakridar ve doksorubisin çözeltileriyle yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda her birinde 100 nM elakridar ile birlikte 0,2-0,8 ve 3,125  $\mu\text{M}$  doksorubisin içeren formülasyonlar hazırlanmış ve EMT6/AR1 hücrelerine uygulanarak 72 saat inkübe edilmişlerdir.



**Şekil 4.20.** Çeşitli formülasyon ve çözelti gruplarının EMT6/AR1 hücre hattında 72 saat inkübasyon sonrası canlı hücre miktarları. (1) Elakridar konsantrasyonu elakridar eklenen her grupta 100 nM sabit konsantrasyonda. (2) Elakridar partikül içine yüklemeyen çözelti olarak uygulandı. (3) Elakridar MSN-FA ile birlikte PLGA içine yüklendiği nihai hibrit nanopartikül (HyNp) formülasyonu.

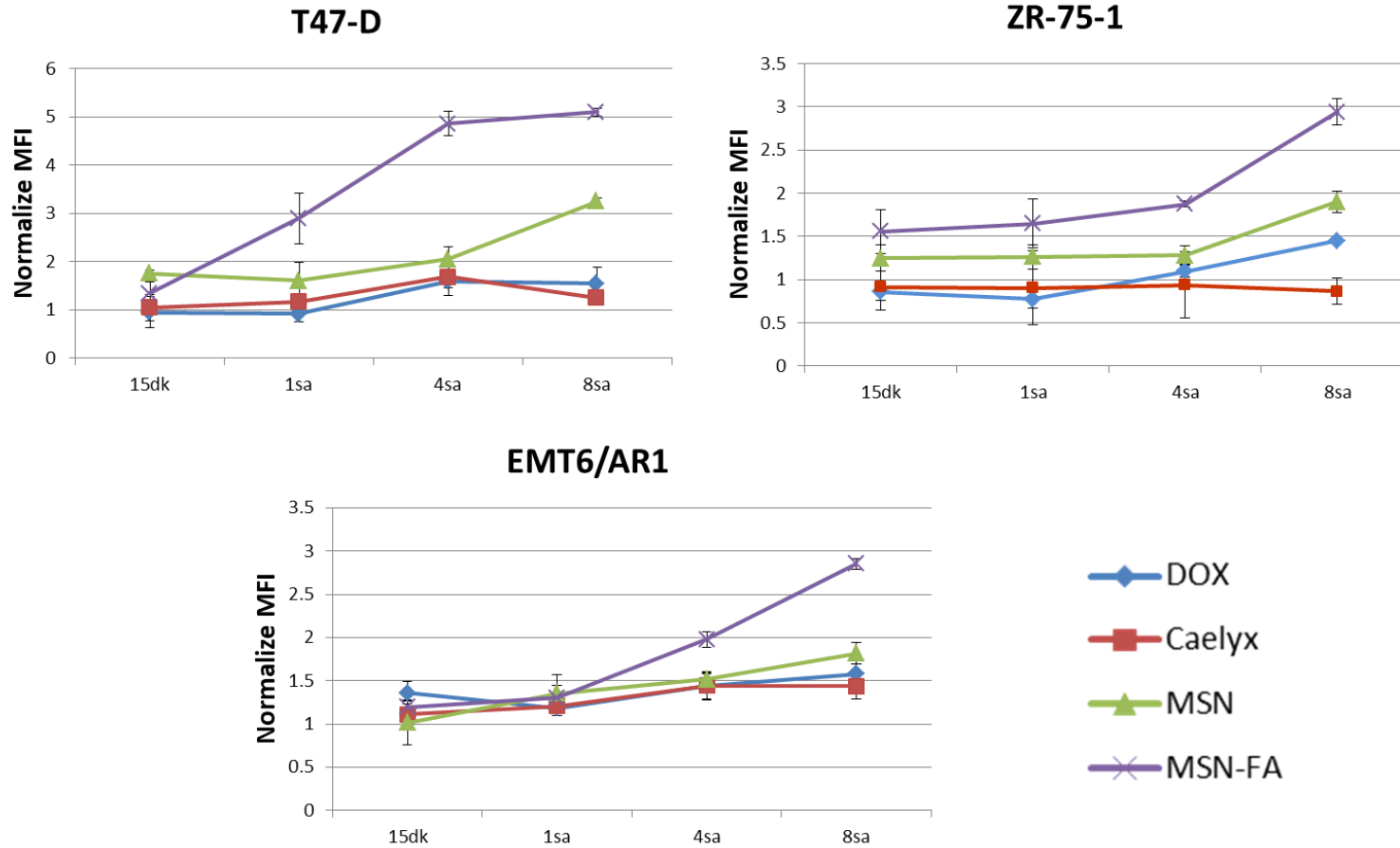


Çeşitli çözelti ve nanopartikül formülasyonlarının EMT6/AR1 hücre hattında 72 saat inkübasyon sonrası canlı hücre miktarları Şekil 4.20.'de verilmiştir. 100 nM elakridar içeren çözelti grubunda canlılığın önceki sonuçlardaki gibi % 85 dolaylarında olduğu görülmüştür. Herhangi bir etkin madde içermeyen boş MSN-FA, PLGA/MSN-FA ve Caelyx® gruplarında ise canlı hücre miktarı %95'in üzerinde bulunmuştur. Tek başına doksorubisin ve 100 nM elakridar ile birlikte doksorubisin çözeltilerinin uygulandıkları gruplarda ise önceki çalışmalara paralel sonuçlar bulunmuştur. Tek başına doksorubisin çözeltilerinin uygulandığı grupların hepsinde canlı hücre miktarı % 95 dolaylarında iken 100 nM elakridar çözeltisiyle birlikte bu doksorubisin konsantrasyonları uygulandığında ise canlı hücre miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmalar görülmüş ve canlı hücre miktarının 0,2 µM doksorubisin içeren grupta %78, 0,8 µM doksorubisin içeren grupta %63 ve 3,2 µM doksorubisin içeren grupta ise %45'e gerilediği görülmüştür. Doksorubisin içeren MSN-FA grubunda canlı hücre miktarları %82 ile %87 arasında değişirken PLGA partikülleri içine hapsedilmiş MSN-FA grubunda ise canlı hücre miktarlarının benzer şekilde %84 - %89 aralığında değiştiği görülmüştür. Doksorubisin yüklü MSN-FA nanopartiküllerinin PLGA partikülleri içine yükleyip, elakridarın hibrit partikül içine yüklenmeyip çözelti olarak uygulandığı grupta (PLGA/Dox-MSN-FA+Elc) canlı hücre miktarı %42 ile %72 arasında değişirken; elakridarın, doksorubisin yüklü MSN-FA nanopartikülleriyle birlikte PLGA nanopartikülleri içine hapsedildiği nihai formülasyon olan hibrit nanopartikül (HyNp) grubunda ise canlı hücre miktarı %37 ile %59 arasında değiştiği görülmüştür. HyNp grubundaki canlı hücre miktarının hem doksorubisin ve elakridar içeren çözelti grubuna göre hemde PLGA/Dox-MSN-FA+Elc grubuna göre istatistiksel olarak daha düşük olduğu görülmüştür.

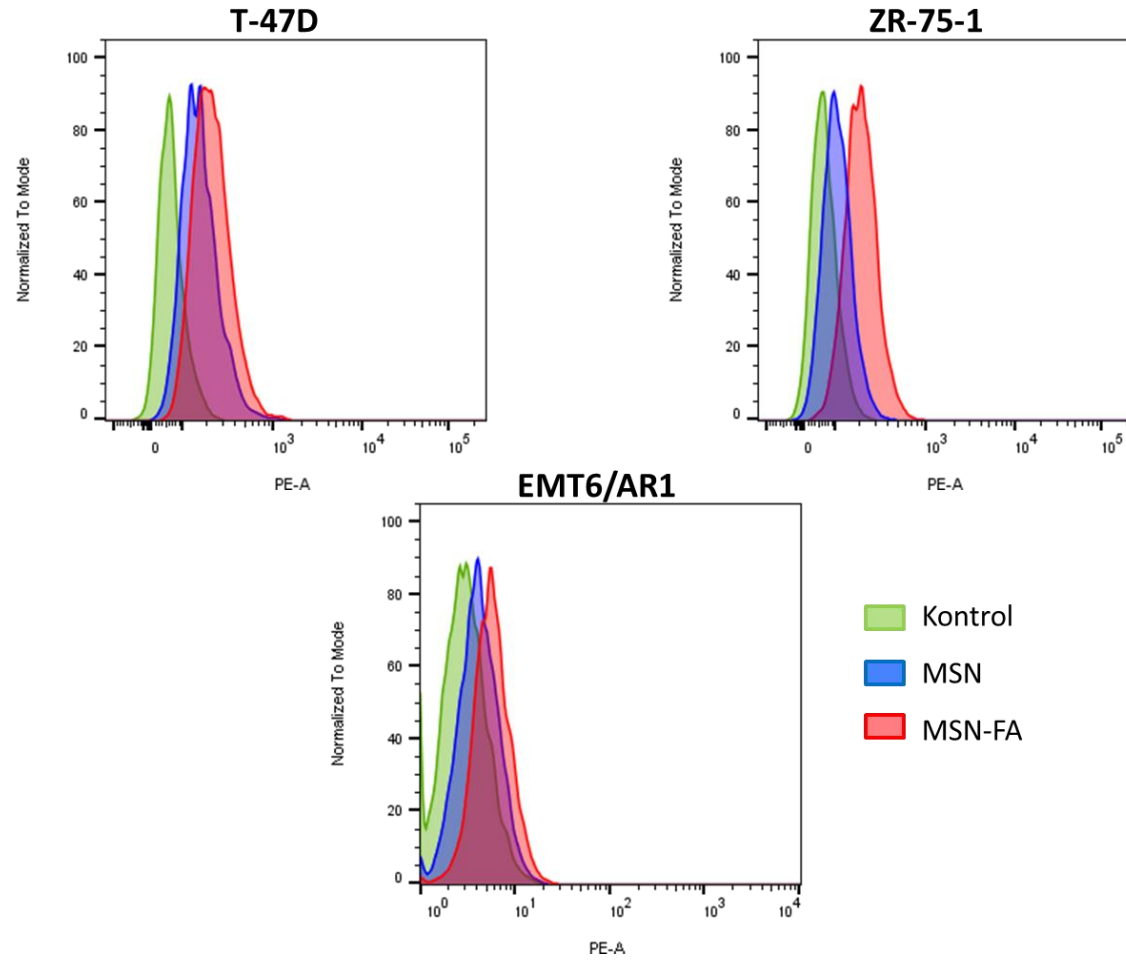
#### **4.4.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi**

Doksorubisin yüklü nanopartikül formülasyonlarının hücre içine alımları hem akım sitometri hemde floresan mikroskop kullanılarak T-47D, ZR-75-1 ve EMT6/AR1 hücre hatlarında incelenmiştir. Doksorubisinin floresan özelliği olduğu için her iki çalışmada da doksorubisinin bu özelliğinden faydalanılmış ve ayrıca bir floresan boya kullanılmasına ihtiyaç duyulmamıştır.

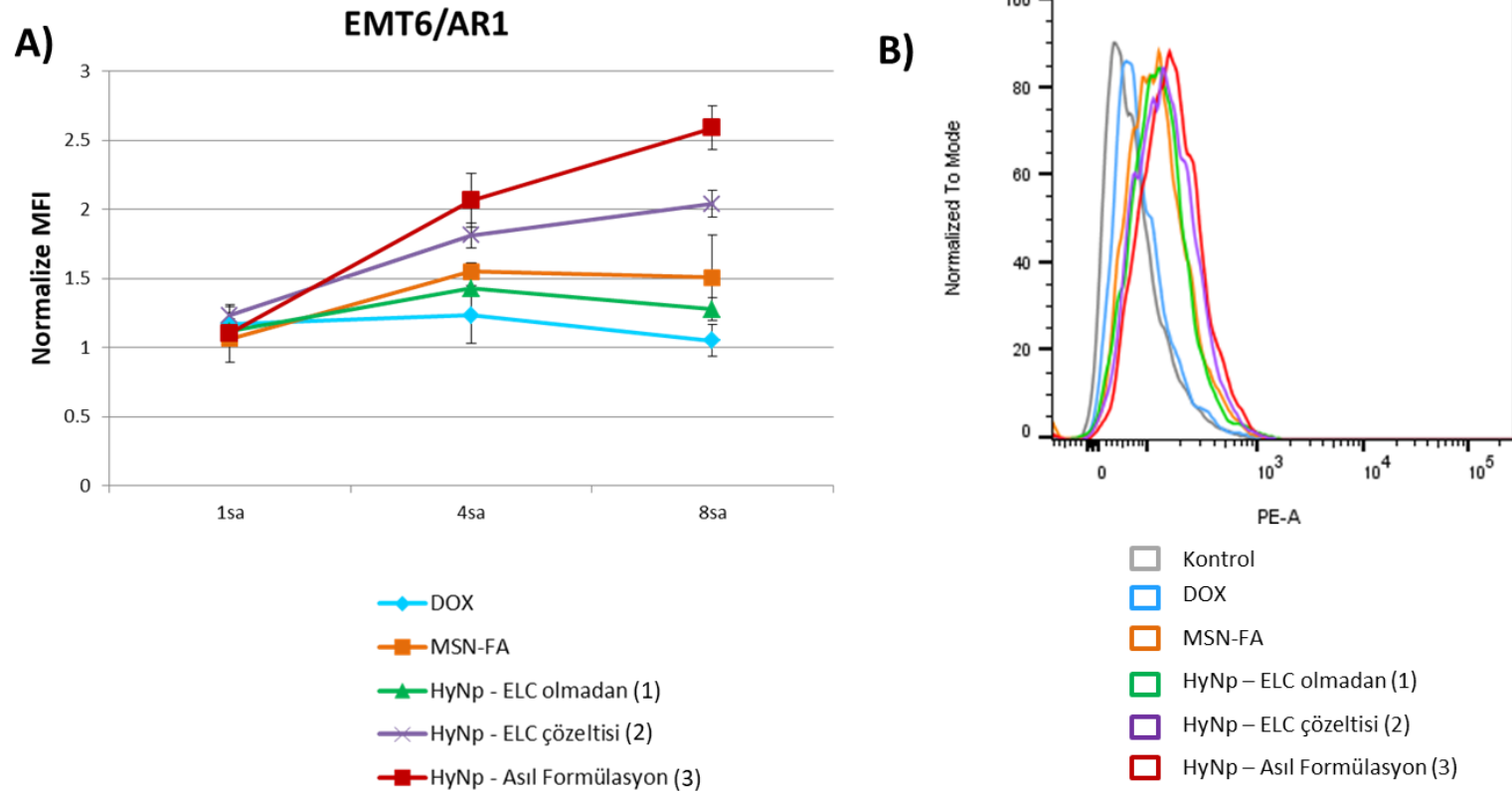
Hücre içine alım çalışmaları için öncelikli olarak akım sitometri çalışmaları gerçekleştirilmiş ve formülasyonların 15 dk ile 1,2 ve 8 saat inkübasyon sonrası nicel olarak hücre içine alım miktarları tespit edilmiştir. Alım miktarları karşılaştırılırken hücrelerin ortanca floresan yoğunluğu (MFI) ölçülmüştür.



**Şekil 4. 21.** Dokсорubisin çözeltisi, Caelyx® ve dokсорubisin yüklü MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin 15dk, 1sa, 4sa ve 8saat inkübasyonu sonrası T-47D, ZR-75-1 ve EMT6/AR1 hücre hatlarındaki floresan işaretli hücrelerin normalize edilmiş ortanca floresan intensitesindeki (MFI) değişimleri.



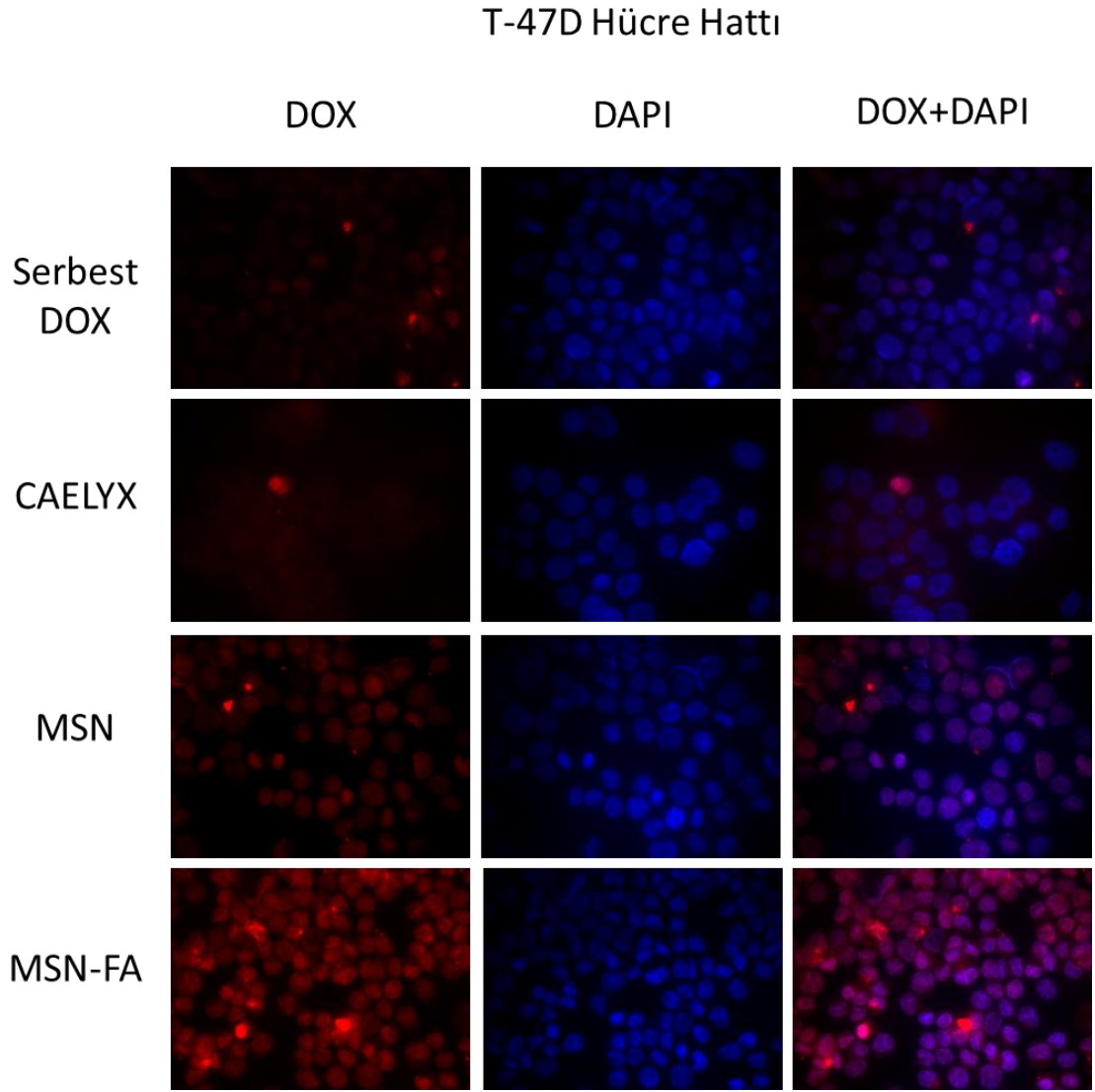
**Şekil 4.22.** MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin T-47D, ZR-75-1 ve EMT6/AR1 hücre hatlarında 8 saat inkübasyon sonrası akım sitometri histogramları.



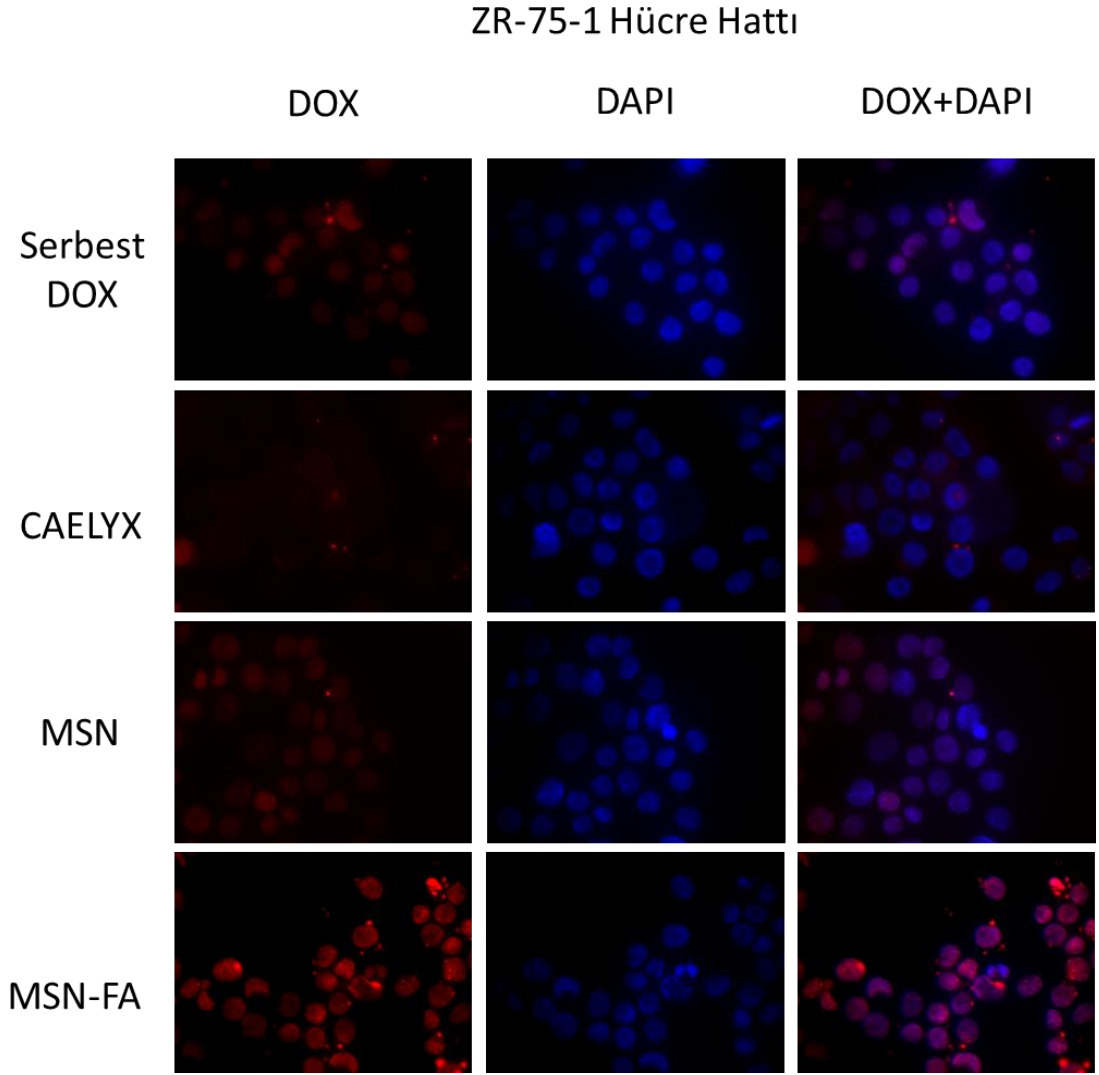
**Şekil 4. 23.** EMT6/AR1 hücre hattında dokсорubisin, MSN-FA ve hibrit nanopartikül formülasyonlarının 1, 4 ve 8 saat inkübasyonu sonrası floresan işaretli hücrelerin A) normalize edilmiş ortanca floresan intensitesindeki (MFI) değişimleri ve B) akım sitometri histogramları. (1): Elakridar içermeyen hibrit nanopartikül formülasyonu, (2): Elakridarın hibrit nanopartikül içine yüklenmeyip dışardan çözelti halinde uygulandığı formülasyon, (3): Tez çalışmaları kapsamında geliştirilen elakridar ve MSN-FA'ların beraber enkapsüle edildiği asıl hibrit nanopartikül formülasyonu.

Şekil 4.21.'de görüldüğü üzere 15 dk ve 1 saatlik inkübasyonlar sonucunda gruplar arasında belirgin bir fark gözlemlenmezken 4. saat itibari ile MSN-FA formülasyonunun serbest doksorubisin, Caelyx® ve MSN gruplarına göre hücre içine alımının daha fazla olduğu gözlemlenmeye başlanmıştır. T-47D hücre hattında MSN-FA grubunun floresan intensitesi 4.saat sonunda maksimum seviyeye ulaşmış ve daha sonra belirgin bir artış gözlemlenmezken, ZR-75-1 ve EMT6/AR1 hücre hatlarında MSN-FA formülasyonunun en yüksek floresan intensiteye 8. saatte ulaştığı görülmüştür. Folik asit konjugasyonunun silika nanopartiküllerin hücre içine alımlarını nasıl değiştirdiği analiz edildikten sonra Hibrit nanopartikül (HyNp)'ün ve elakridarin hücre içine alımı nasıl değiştirildiği araştırılmıştır. Şekil 4.23.'te görüldüğü gibi MSN-FA ile karşılaştırıldığında HyNp formülasyonu grubunda hücre içine alım artmaktadır. Ayrıca elakridarin hibrit nanopartikül içine yüklenmeden dışardan çözelti olarak verildiği durumda HyNp formülasyonuna göre hücre içine alım azalmıştır.

Formülasyonların akım sitometri ile nicel olarak hücre içine alım miktarları tespit edildikten sonra, bu sonuçlar göz önünde bulundurularak formülasyonların 8 saat inkübe edilerek floresan mikroskobu ile görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Nanopartiküllerin hücrenin hangi bölgesinde lokalize olduğunun belirlenmesi amacıyla hücre çekirdekleri DAPI ile boyanmıştır. Görüntüler incelendiğinde akım sitometri sonuçlarına paralel şekilde MSN-FA formülasyonu ile doksorubisinin hücre içine daha yoğun bir şekilde taşındığı gözlemlenmiştir. Hücrelerin çekirdeklerinin DAPI boyası ile boyanması ile doksorubisinin çoğunlukla hücrelerin çekirdeğinde lokalize oldukları da tespit edilmiştir (Şekil 4.24. ve Şekil 4.25.) Floresan mikroskopi çalışmalarında son olarak EMT6/AR1 hücre hattında görüntüleme çalışmaları yapılmış ve bu hücre hattında HyNp ve MSN-FA formülasyonları karşılaştırılmıştır. Şekil 4.26.'teki görüntüler incelendiğinde HyNp formülasyonunda doksorubisinden gelen floresan ışımalarının arttığı ve bu ışımaların genellikle hücrenin sitoplazmasında olduğu tespit edilmiştir.

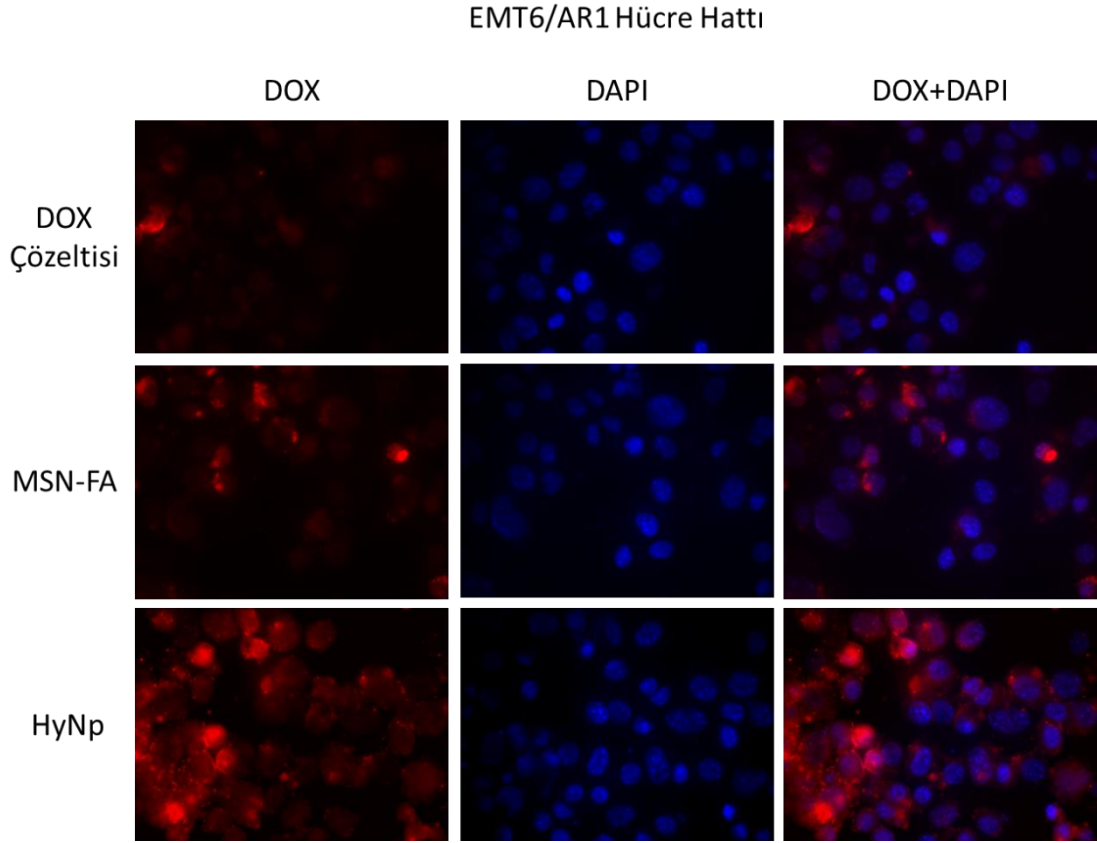


**Şekil 4.24.** T-47D hücre hattına uygulanan formülasyonların kırmızı ve mavi kanaldaki görüntüleri ile bu görüntülerin birleştirilmiş halleri.



**Şekil 4.25.** ZR-75-1 Hücre hattı hücre hattına uygulanan formülasyonların kırmızı ve mavi kanaldaki görüntüleri ile bu görüntülerin birleştirilmiş halleri.

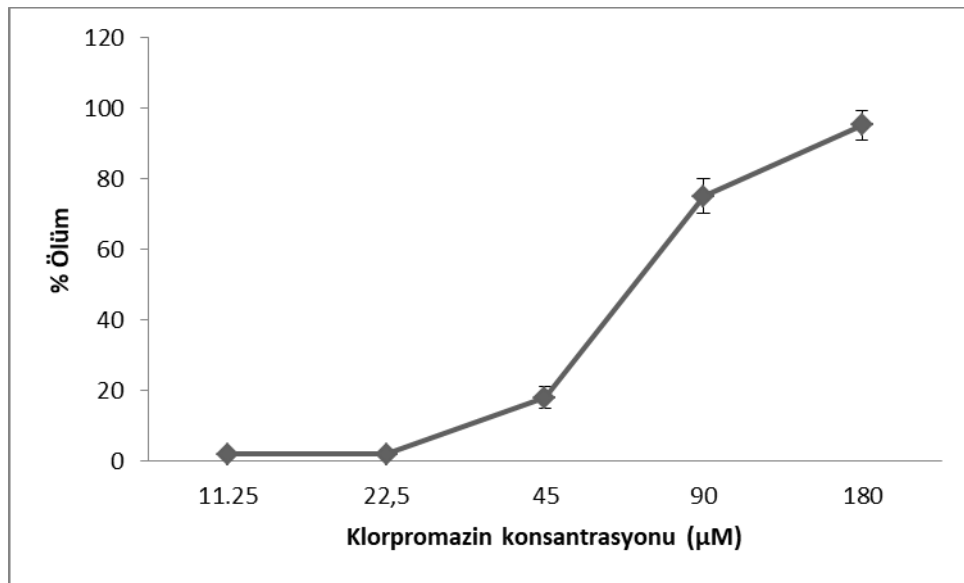




**Şekil 4.26.** EMT6/AR1 hücre hattına uygulanan formülasyonların kırmızı ve mavi kanaldaki görüntüleri ile bu görüntülerin birleştirilmiş halleri.

#### 4.4.4. Folat Reseptörüne Hedeflendirilmiş Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Hücre İçine Alım Mekanizmalarının İncelenmesi

MSN-FA nanopartiküllerinin kltrin (reseptör) aracılı endositoz yolağını kullanıp kullanmadığının belirlenmesinde bu yolağı inhibe ettiği bilinen klorpromazin ve sükroz inhibitörleri kullanılarak EMT6/AR1 hücre hattında analizler yapılmıştır. Klorpromazinin hücreye hangi konsantrasyonda uygulanacağıyla ilgili literatürde farklı değerler (133-136) kullanıldığı için öncelikli olarak klorpromazinin belirli konsantrasyonlardaki çözeltisi (11,25-22,5-45-90-180  $\mu\text{M}$ ) hücrelere uygulanarak 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre miktarlarına bakılmış ve toksik olmayan en yüksek dozun kullanılması amaçlanmıştır. Sükrozun kltrin aracılı endositozu inhibe etmede literatürde sabit olarak 450 mM kullanıldığı (132, 137, 138) için bu dozun kullanılmasına karar verilmiştir.

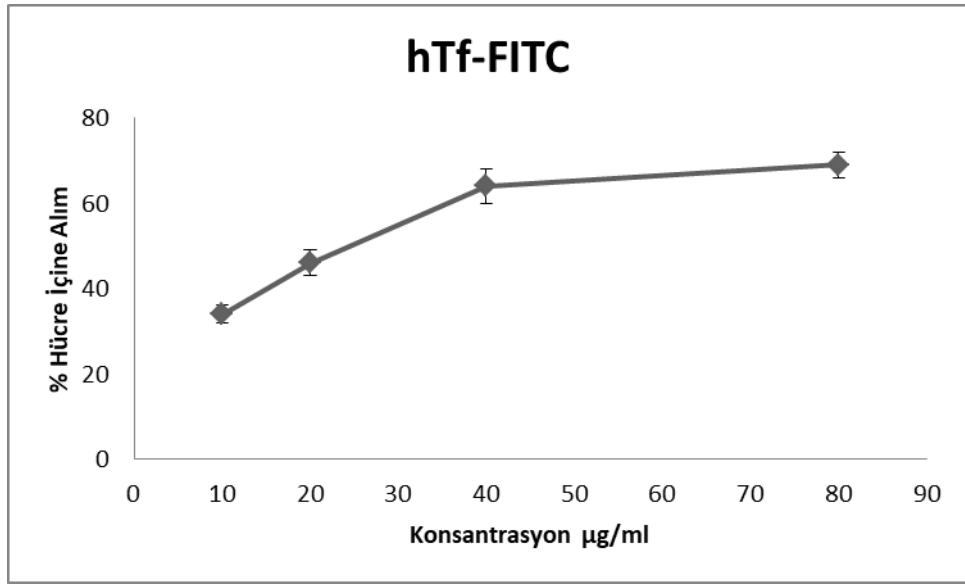


**Şekil 4.27.** Kltrin aracılı endositoz yolağını inhibe ettiği bilinen klorpromazinin çeşitli konsantrasyonlarda EMT6/AR1 hücre hattına uygulanarak 24 saat inkübasyonu sonrası hücre ölüm miktarları.

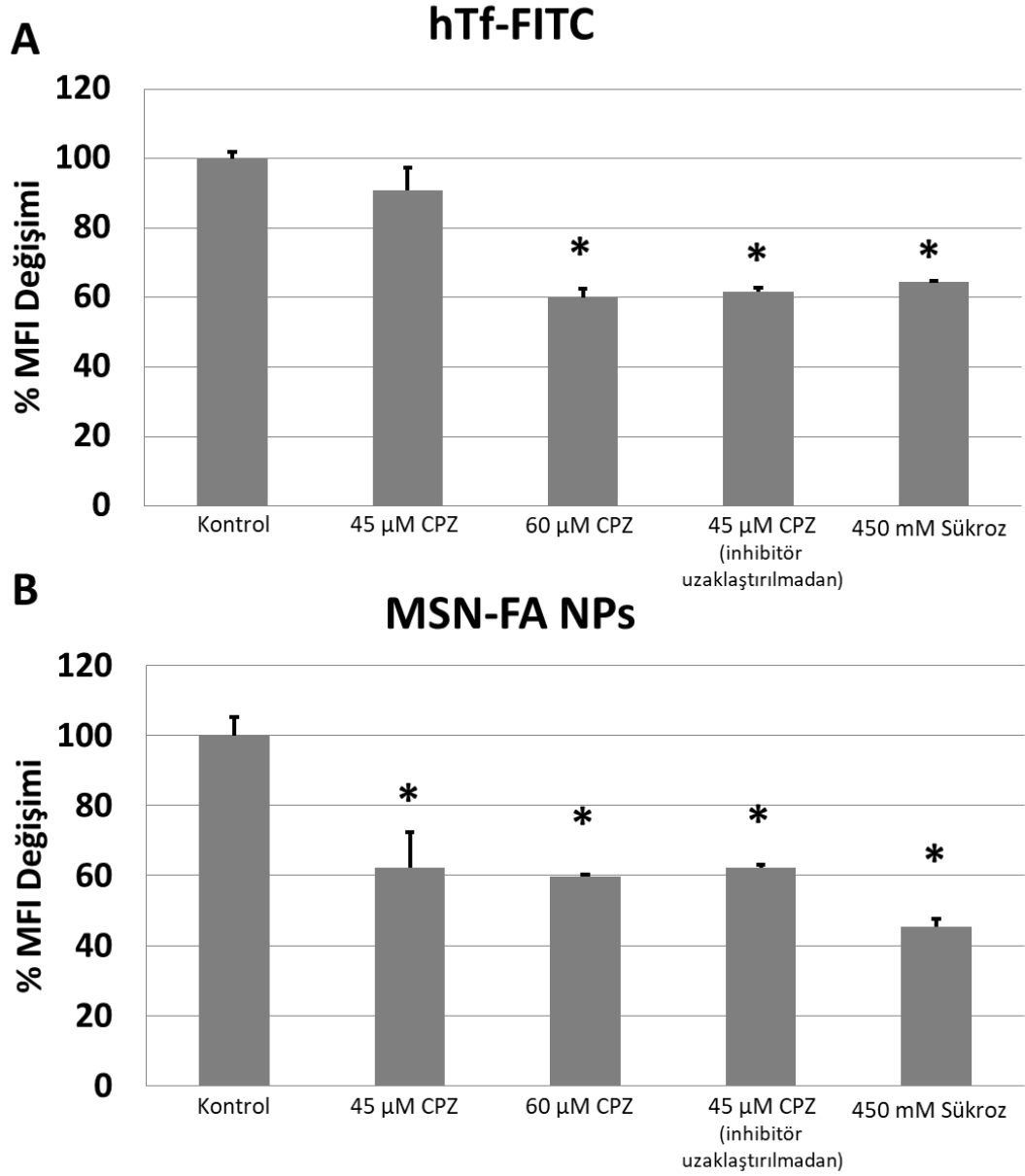
Klorpromazinin toksisite verilerinden yola çıkarak, kltrin aracılı yolağı inhibe etmesi amacıyla, 24 saat inkübasyon sonrası belirgin bir toksisite göstermeyen 45  $\mu\text{M}$  klorpromazin konsantrasyonunun kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.27.). Yolağın inhibe edilip edilmediğinin doğrulanması amacıyla kullanılan pozitif kontrol (FITC-İnsan Transferin)'ün 45  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda yolağı inhibe etmediği

görüldükten sonra 60  $\mu$ M konsantrasyonda klorpromazininde hücrelerde toksisite göstermediği teyit edildikten sonra yolağı inhibe etmek amacıyla ayrıca denenmiştir.

FITC-İnsan Transferinin hücelere hangi konsantrasyonda uygulanacağına karar verilmesi amacıyla, literatür verileri göz önünde bulundurularak 10-80  $\mu$ g/ml konsantrasyonlarda doz titrasyonu yapılmıştır ve 40  $\mu$ g/mL değerinde hücre içine alım miktarı plato düzeyine ulaştığı görüldüğü için (Şekil 4.28.) bu konsantrasyonda çalışmalara devam edilmesine karar verilmiştir.



**Şekil 4.28.** FITC-İnsan Transferinin 10, 20, 40 ve 80  $\mu$ g/ml konsantrasyonlarında, hücrelerle 1,5saat inkübasyon sonrasında floresan işaretli hücre popülasyonu yüzdesi.



**Şekil 4.29.** FITC-İnsan Transferini (A) ve doksorubisin yüklü MSN-FA nanopartiküllerinin (B) EMT6/AR1 hücrelerine alınımına çeşitli konsantrasyon ve uygulama yöntemine göre klorpromazinin (CPZ) ve 450 mM sükrozun etkileri.

60 µM klorpromazinin, 45 µM klorpromazinin hücre kültürü ortamından uzaklaştırılmayıp FITC-İnsan Transferini ile birlikte inkübe edilmeye devam ettirildiği ve 450 mM sükroz grupları incelendiğinde, bu şartlardaki klorpromazin ve sükrozun kltrin aracılı endositozu inhibe ettiği pozitif kontrol ajanı sayesinde görülebilmektedir (Şekil 4.29A). Klorpromazin ve sükrozla kltrin aracılı endositozun inhibe edilebildiğinin gösterilmesi sonrasında MSN-FA nanopartikülleri ile yapılan

çalışmada da folat reseptörüne hedeflendirilmiş bu nanopartiküllerin kltrin aracılı endositoz yolağının inhibe edilmesi sonrasında hücre içine alımının istatiksel olarak anlamlı bir seviyede azaldığı görülmüştür (şekil 4.29B).

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Optimizasyonu

Tez kapsamında sentezlenen mezoporlu silika nanopartiküllerinin (MSN) üretiminde Modifiye Stöber yöntemi kullanılmıştır. Silika nanopartiküllerinin sentezlenmesinde kullanılan stöber yönteminde ortama sürfaktan eklenmesiyle gözenekli bir yapının elde edilmesi mümkün olmaktadır. Bu yöntem çok geniş bir aralıkta (30-500 nm) farklı partikül boyutuna sahip MSN'lerin sentezlenmesine olanak sağlamaktadır. Bu yöntem ile farklı sürfaktanlar, silika kaynakları ve pH ayarlayıcı ajanlar kullanılarak nanopartiküller sentezlenebilmektedir. Tez kapsamında kullanılan yöntemde sürfaktan olarak CTAB (setrimonyum bromür), silika kaynağı olarak TEOS (tetraetil ortosilikat) ve sentez ortamının pH'ını ayarlamak amacıyla  $\text{NH}_4\text{OH}$  (amonyum hidroksit) kullanılmıştır. Sentez bileşenlerinin elde edilen partikülün parametrelerini nasıl etkilediğini görmek ve gerekli olan optimum formülasyonu elde etmek amacıyla deney tasarımı olarak TOPSIS tabanlı Taguchi dizayn kullanılmıştır. Deney tasarımında incelenen değişkenler CTAB, TEOS ve  $\text{NH}_4\text{OH}$  miktarı ile sıcaklık değeri olmuş ve cevap değerleri olarak partikül büyüklüğü, PDI değeri ve sentezin verimine bakılmıştır. Cevap değerlerine bakıldığında ortalama partikül büyüklüğünün 30,8 ile 133,1 nm, PDI değerinin 0,122 ve 0,352, sentez veriminin ise %28 ile %96 arasında değiştiği gözlemlenmiştir (Tablo 4.2.). Tez kapsamında elde edilecek MSN'lerin daha sonra PLGA nanopartiküllerine yüklenmesi amaçlandığı için partikül boyutunun 100 nm'den olabildiğince daha düşük olması hedeflenmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü aralığına bakıldığında değişken oranlarının oldukça başarılı bir şekilde belirlendiği görülmüştür. PDI değerleride tüm formülasyonlarda 0,4'ün altında olduğu görülürken sentez veriminde ise verimin % 100'e yakın formülasyonların var olduğu gözlemlenmiştir. Cevap değerleri incelendiğinde genel itibari ile partikül büyüklüğü küçüldükçe sentez veriminin de azaldığı, PDI değerinin ise yükseldiği görülmüştür. Tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurularak partikül boyutu, PDI değeri ve sentez veriminin optimum formülasyon elde edilirkenki ağırlıkları sırasıyla yüzde 40, 25 ve 35 olarak belirlenmiş ve Minitab programı ile yapılan analizde belirtilen şartlardaki

optimum formülasyon için  $\text{NH}_4\text{OH}$  değerinin 275  $\mu\text{L}$ , TEOS'un 125  $\mu\text{L}$ , CTAB'in 75 mg sentez sıcaklığının ise 45°C olması gerektiği görülmüştür. Bu formülasyon ile nanopartikül sentezi yapıldığında elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün 53,2 nm, PDI değerinin 0,126 sentez veriminin ise % 84 olduğu tespit edilmiştir. Bu değerlerinde elde edilen MSN'lerin oldukça yüksek bir sentez verimine sahip ve monodispers bir dağılım göstermesi yanında pasif hedeflendirme ve PLGA nanopartikülleri içine yüklenmeye olanak sağlayacak küçüklükte olduğunu göstermektedir.

## **5.2. Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Üretimi, Karakterizasyonu ve Folik Asit Konjugasyonu**

Tez kapsamında amaca yönelik optimum formülasyonun elde edilmesi sonrasında öncelikli olarak elde edilen bu formülasyonun karakterizasyon işlemi yapılmış daha sonra folik asit konjugasyonu yapılarak konjugasyonun uygun bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğiyle ilgili karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

### ***Partikül Büyüklüğü, Morfolojisi ve Zeta Potansiyeli***

Optimizasyon çalışmaları sırasında DLS analizi ile ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımı tespit edilen nanopartiküllerin folik asit konjugasyonu sonrasında bu özelliklerinin nasıl değiştiğini görmek amacıyla folik asit konjugasyonu yapılan mezoporlu silika nanopartiküllerine (MSN-FA) tekrar DLS analizleri yapılmıştır. Konjugasyon öncesi partikül boyut 53,2 nm ve PDI değeri 0,126 olan MSN nanopartiküllerinin konjugasyon sonrası boyutu 64,9 nm ve PDI değerinin 0,156'ya çıktığı görülmüştür. Partikül boyutundaki bu artış öncelikli olarak yüzeyde konjuge olan folik asit tabakasının varlığına işaret olarak gösterilebilir (145). Fakat PDI değerinde de hafif de olsa bir artış olması bir miktar agregasyonun göstergesi olarak da yorumlanabilir. DLS analizleri sonrası MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin SEM analizleri yapılmış daha sonra MSN-FA nanopartiküllerinin TEM analizi yapılarak partikül boyutu ve şekli konusunda veriler elde edilmiştir. Yapılan SEM ve TEM analizlerinde partikül morfolojisinin küresele yakın ve partikül boyutlarının DLS

sonuçlarına göre bir miktar daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu durumun sebebi araştırıldığında, literatürde de benzer verilerin olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin de, silika yapısı gereği hidrofilik bir malzeme olduğu için, etrafında oluşan su tabakasının DLS ölçümlerini yanılttığı düşünülmektedir (96, 146, 147). MSN-FA nanopartikülleri içinde benzer durumun geçerli olduğu görülmektedir. MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin SEM görüntüleri (Şekil 4.5.) karşılaştırıldığında da nanopartiküllerinin yapısını koruduğu ve konjugasyon işleminin agregasyon veya fiziksel yapısının bozulması gibi herhangi bir olumsuz etkiye sebebiyet vermediği görülmüştür. MSN-FA nanopartiküllerinin TEM görüntülerinde (Şekil 4.6A.) ise folik asit tabakası yüzünden her ne kadar gözeneklerin tespit edilmesi zorlaşsa da gözeneklerin varlığı tayin edilebilmektedir. MSN nanopartiküllerinin doğası gereği negatif yüklü zeta potansiyeli değerinin de folik asit konjugasyonundan sonra pozitif değere döndüğü gözlemlenmektedir (Tablo 4.3.). Zeta potansiyelindeki bu değişim konjugasyonun başarıyla gerçekleştiğinin göstergelerinden biri olarak görülmektedir.

#### ***Enerji Dağılımlı X-Işını (EDX) ve C,H,N Elemental Analiz***

EDX ve CHN elemental analizleri ile MSN nanopartiküllerine folik asit konjugasyonunun doğrulanması için yapılmıştır. MSN'nin EDX analizi incelendiğine silika nanopartiküllerinin yapısı gereği ( $\text{SiO}_2$ ) yapıda beklenildiği üzere sadece silisyum ve oksijen elementlerinin varlığı saptanmıştır. MSN-FA nanopartiküllerinde ise yapıya karbon, oksijen ve azotun girdiği görülmüştür (Şekil 4.7.). Bu elementlerin spektrumda görülmesi, folik asit konjugasyonunun başarılı bir şekilde yapıldığını göstermektedir (148).

EDX analizi ile yarı kantitatif analizler yapılırken CHN elemental analizi ile kantitatif analiz yapmak mümkündür. Dolayısıyla elemental analizi sonucu incelendiğinde, MSN'nin EDX spekturumunda gözlemlenmeyen karbon ve hidrojen elementlerinin yapıda az da olsa var olduğu bu analiz ile görülmüştür. Bunun sebebi ise CTAB'in yüzde yüz yapıdan uzaklaştırılmayıp minör miktarda da olsa kalmasından dolayıdır. MSN-FA'nın elemental analizi incelendiğinde ise karbon ve hidrojenin belirgin şekilde artmasının yanında yapıya azotunda eklendiği



görülmüştür (Tablo 4.4.). Bu sonuçta yapıda folik asit varlığına işaret etmektedir ve konjugasyonun başarılı bir şekilde yapıldığını doğrulamaktadır (149).

#### ***Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektrofotometre (FTIR) Analizi***

Partikül büyüklüğü ve morfolojisi ile ilgili çalışmalar yapıldıktan sonra MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin FTIR analizleri yapılmıştır. FTIR analizi hem MSN'lerin istenilen özelliklerde üretilip üretilmediğinin hemde folik asit konjugasyonunun doğrulanması için kritik bir öneme sahiptir. FTIR analizinde kritik üç parametreye bakılmıştır. Bunlardan ilki literatür verilerinden bilindiği üzere, silika nanopartikülleri için karakteristik olan ve Si-O-Si gerilme titreşiminden kaynaklanan adsorpsiyon piki 1000-1100  $\text{cm}^{-1}$  dolaylarında gözükmektedir. Bakılması gereken diğer bir kritik parametre ise; gözeneklerin oluşması için gerekli CTAB'ın 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  dolaylarında  $-\text{CH}_2$  grubuna ait C-H titreşimlerinin MSN'nin FTIR spektrumunda bulunup bulunmamasıdır (150-152). Tez kapsamında elde edilen MSN'lerin FTIR spektrumları incelendiğinde (Şekil 4.8.), 1080  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısında Si-O-Si'den kaynaklı pikin varlığı net bir şekilde tespit edilmiştir. Ayrıca 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısı aralığında da belirgin bir pik tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar, MSN nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermesinin yanında ilaç yükleme kapasitesini düşürebilecek ve hücreler için toksik olan CTAB'in ekstraksiyon yöntemiyle başarılı şekilde uzaklaştırıldığını da göstermektedir. FTIR analizinde bakılan son kritik parametre ise folik asit konjugasyonunun başarılı bir şekilde yapıp yapılmadığının araştırılmasıdır. MSN-FA nanopartiküllerinin FTIR spektrumu incelendiğinde MSN nanopartiküllerinin spektrumunda mevcut olmayan 1450, 1550 ve 1650  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayılarında üç pik gözlemlenmiştir. Literatüre bakıldığında, 1550 ve 1650  $\text{cm}^{-1}$  dolaylarında görünen piklerin folik asit içindeki amit I ve amit II bağlarından geldiğini ve folik asit ile amin fonksiyonlaştırılmış silika nanopartikülleri arasında oluştuğu görülmüştür. 1450  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısının ise folik asitin karakteristik piki olduğu tayin edilmiştir (153-156). Tüm bu FTIR verileri ışığında öncelikli olarak MSN nanopartiküllerinin başarılı bir şekilde üretildiğini ve sonrasında folik asit konjugasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini söylemek mümkündür.

### ***Yüzey ve Gözenek Karakterizasyonu (BET)***

Tez kapsamında yapılan diğer bir karakterizasyon çalışması ise yüzey ve gözenek karakterizasyonu için BET analizinin yapılması olmuştur. Hem MSN hem MSN-FA nanopartikülleri için yapılan BET analizleri sonucunda MSN'lerin  $505 \text{ m}^2/\text{g}$  olan yüzey alanı folik asit konjugasyonuyla MSN-FA nanopartiküllerinde  $480 \text{ m}^2/\text{g}$  a gerilemiş, ortalama por büyüklüğü ise  $3,12 \text{ nm}$ 'den  $2,25 \text{ nm}$ 'ye düşmüştür (Şekil 4.9.). Tez çalışmalarında olduğu gibi standart bir sentez yöntemiyle elde edilen MSN'lerin yüzey alanı değeri incelendiğinde bu değer genellikle  $600\text{-}1000 \text{ m}^2/\text{g}$  aralığında olduğu belirtilmektedir (61, 157, 158). Fakat yüzey alanının  $300 \text{ m}^2/\text{g}$  'ın altında olduğu MSN'lerinde sentezlendiği literatürde görülmektedir (159). Tez kapsamında elde edilen MSN'lerin yüzey alanında her ne kadar beklenenden bir miktar daha düşük olsada literatürde belirtilen sınırlar içinde olduğu görülmektedir ve bu değerlerde bile oldukça yüksek bir yükleme alanı sunmaktadır. Sentez aşaması sırasında bazı gözenek büyütücü maddeler konarak gözenek boyutu  $30 \text{ nm}$ 'nin üzerinde MSN'lerin elde edilmesi mümkün olsa da tez çalışmaları kapsamında elde edildiği üzere standart bir MSN'nin gözenek boyutu büyüklüğünün  $2\text{-}5 \text{ nm}$  arasında olduğu bilinmektedir (141, 160). MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin kendi aralarında BET analizleri karşılaştırıldığında ise hem yüzey alanının hemde por büyüklüğünün yüzeye konjuge olan folik asit varlığından dolayı beklendiği üzere bir miktar düştüğü gözlemlenmiştir (161).

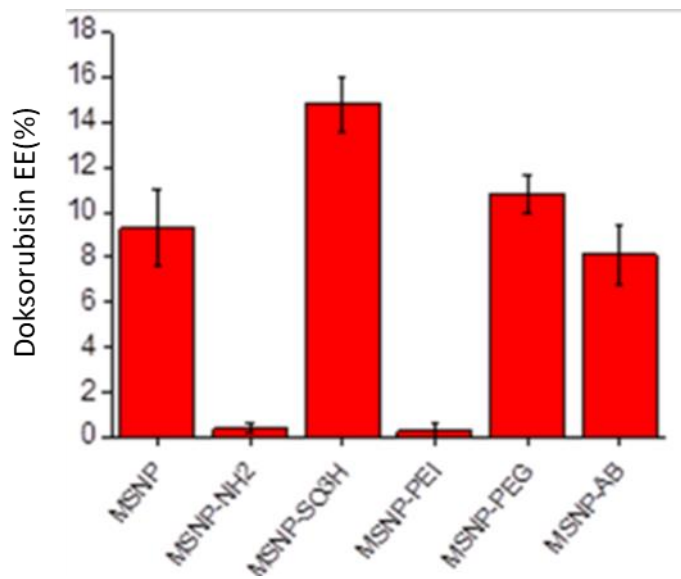
### ***X-Işını kırınım desenleri (XRD) Analizi***

İçi boş mezogözenekli silika nanopartiküllerinin kristal özelliğinin anlaşılması, mezogözenekli yapının gözlenmesi ve folik asit konjugasyonunun yapıyı nasıl etkilediğinin araştırılması amacıyla elde edilen nanopartiküllerin küçük açılı X-ışını difraksiyonu (SAXRD) alınmıştır. MSN nanopartikülleri gözenekli yapılarından dolayı XRD analizlerinde genellikle  $0,5\text{-}2$  aralığında  $2\theta$  açısında karakteristik bir pik vermektedir (162-164). Tez çalışmalarında yapılan XRD analizlerinde de MSN için  $1$  dolaylarında bu pikin geldiği görülmektedir (Şekil 4.10A.). MSN-FA nanopartiküllerinin XRD analizinde ise pikin şiddeti azalmış olsa da varlığını

korumuştur (Şekil 4.11B.). Buda folik asit konjugasyonunun gözenekli yapıyı bozmadığını ve yapının korunduğunu işaret etmektedir (165, 166).

### ***Enkapsülasyon Etkinliği ve İn Vitro Salım***

Yüzey modifikasyonları yapılan MSN'lere etkin madde yükleme işlemi iki farklı şekilde yapılabilmektedir. Bunlardan ilki MSN'lerin sentezlenmesinden sonra etkin maddenin yüklenmesi ve sonrasında yüzey modifikasyonunun gerçekleştirilmesidir. Diğer yöntem ise MSN'lerin sentezlenip yüzey modifikasyonunun yapılması ve en son ilaç yükleme işleminin yapılmasıdır. Etkin madde yüklenmesi, modifikasyondan önce yapılması durumunda modifikasyon basamakları sırasında etkin maddenin bir kısmının salınması riski bulunmaktadır. Modifikasyon sonra yapılması durumunda ise etkin madde yükleme kapasitesinde azalma görülebilmektedir. Shahabi ve ark.'nın (161) yaptığı bir çalışmada sentezlenen MSN'lere amin, sülfonat, polietilamin ve polietilen glikol ile yüzey modifikasyonları yapılarak sonrasında doksorubisinin enkapsülasyon etkinlikleri karşılaştırmış ve en yüksek enkapsülasyon etkinliği yüzeye sülfonat bağlanan grupta bulunurken yüzey modifikasyonu yapılmayan grupta ortalama bir enkapsülasyon etkinliği bulunmuş, amin ve polietilamin bağlı gruplarda ise en düşük değerler elde edilmiştir (Şekil 5.1.).



**Şekil 5.1.** MSN'lere çeşitli yüzey modifikasyonları yapılması sonrası doksorubisin yüklenerek enkapsülasyon etkinlikleri karşılaştırıldığında elektrostatik etkileşimlere bağlı olarak ilaçların enkapsülasyon etkinlikleri değişebilmektedir (161).

Tez çalışması kapsamında da doksorubisinin folik asitle konjugasyon işleminden öncesinde mi yoksa sonrasında mı yapılacağına karar verilirken öncelikli olarak konjugasyon sonrası ilacın yüklenmesi denenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda MSN'lerin enkapsülasyon etkinliği %71 bulunurken MSN-FA grubunda bu değer %68 bulunmuş ve iki grup arasında istatistiksel bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Bunun sonucunda doksorubisinin partiküllere konjugasyon işlemi sonrasında yüklenmesine karar verilmiş, bu sayede konjugasyon işlemi sırasında etkin madde kaybının önüne geçilmiştir. İlaç yükleme kapasitesi ise her iki grupta %25 dolaylarında bulunmuştur (Tablo 4.5.). MSN'lere ilaç yükleme kapasitesinin diğer nanotaşıyıcılarla karşılaştırılması amacıyla literatürdeki çalışmalar incelenmiştir. Pieper ve ark.'nın (167), PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan tekli emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma, nanopresipitasyon ve ikili emülsiyon yöntemlerinde doksorubisinin yükleme etkinliği için %15 ile %5 arasında değerler bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise doksorubisinin poli(etilen glikol)-b-poli( $\epsilon$ -karbolakton) (PEG-b-PCL) ve poli(etilen glikol)-b-poly( $\gamma$ -benzil- $\epsilon$ -karbolakton) polimerlerini kullanarak elde edilen misel sistemlerinde doksorubisinin yükleme etkinlikleri sırasıyla %6,74 ve %8,88 bulunmuştur (168). Görüldüğü üzere tez kapsamında hazırlanan MSN'lere doksorubisinin yükleme etkinliği özellikle polimerik nanotaşıyıcı sistemlerle karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir değer olduğu anlaşılmaktadır.

Doksorubisinin pH 5.5 ve pH 7.4 tamponlarında salım profilleri incelendiğinde (Şekil 4.11.) pH'ya duyarlı bir salım olduğu görülmektedir. Düşük pH'da belirgin bir şekilde daha yüksek ve daha hızlı bir salımın olduğu gözükmektedir. pH 7.4'te 72 saat sonunda %25 civarında doksorubisin salımına ulaşılırken, pH 5.5'te bu değer %45'e çıktığı görülmüştür. Doksorubisinin silika nanopartiküllerinden pH'ya bağımlı salımıyla ilgili literatür taraması yapıldığında benzer sonuçlar görülmüştür. Jiang ve ark.'ları (169) düşük pH'da yüksek

doksorubisin salımının, protein-duyarlı bir mekanizmadan kaynaklı olabileceğini belirtmiş ve doksorubisinin asidik pH'da çözünürlüğü artmasından dolayı salımın hızlanmasına sebebiyet vermiş olabileceğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada ise pH'ın düşmesi bağ enerjilerinin ve elektrostatik adsorpsiyon kuvvetlerinin zayıflamasından dolayı doksorubisinin daha hızlı salınmış olabileceğine bağlanmıştır (170). Tez kapsamında yapılan salım çalışmalarında, pH'ın artmasıyla her ne kadar salınan doksorubisin miktarı artmış olsada 72 saat inkübasyon sonrası ilacın ancak %50'ye yakın bir miktarının salındığı görülmektedir. Shen ve ark.'ları (171) MSN'den doksorubisinin salımını inceledikleri bir çalışmada, her ne kadar 48 saat süre sonunda yükledikleri doksorubisinin sadece %25'nin salındığını görmüş olsalarda, MSN'lerin yüksek ilaç yükleme kapasitelerinden dolayı bu oranın µg/mL bazında oldukça yüksek bir doksorubisin miktarına denk geldiğini işaret etmişler ve bu miktarın çalışmalarındaki kanser hücrelerini etkili bir şekilde öldürmek için yeterli olduğunu belirtmişlerdir.

### **5.3 Hibrit Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu**

Mezoporlu silika nanopartikülleri konjugasyon ve ilaç yükleme işlemleri yapıp gerekli karakterizasyon işlemleri tamamlandıktan sonra amaçlanan hibrit sistemin hazırlanması için MSN'lerin elakridar ile birlikte PLGA nanopartikülleri içine yüklenmesi işlemine geçilmiştir. PLGA nanopartiküllerini hazırlama yöntemi olarak ikili emülsiyon S/Y/S çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmış ve PLGA-PEG polimeri kullanılmıştır. Tez kapsamında pegile edilmiş PLGA polimeri kullanılması ile hazırlanan nanopartiküllerin opsonizasyonunun azaltılması ile RES sistemi tarafından vücuttan uzaklaştırılması engellenerek kanda kalış süresinin uzatılması hedeflenmiştir (172). MSN'leri PLGA nanopartikülleri içine yükleyerek hibrit nanopartikül elde edilmesindeki hedefler ise şu şekilde sıralanabilir; doksorubisinin MSN'lerden ani salımının engellenmesi, elakridarın silika dışında farklı bir bölüme yükleyerek doksorubisinin ilaç yükleme kapasitesinin azalmasına engel olmak, silika nanopartiküllerini pegile edilmiş bir sistem içine hapsederek kanda kalış süresini uzatmak ve son olarak, tasarlanan ilaç taşıyıcısı sistemde elakridar doksorubisine göre daha çabuk salınacağı için hücreler ile daha çabuk temasa geçip P-gp

inhibisyonunu sağlayarak dokсорubisinin hücre içine alımını arttırmak şeklinde özetlenebilir.

Elde edilen hibrit partiküllerden dokсорubisinin salım profillerine bakıldığında (Şekil 4.11.), MSN-FA nanopartiküllerine göre salımın gecikmeli olarak başladığı ve daha yavaş bir salımın olduğu gözlenirken, 72 saat sonunda dokсорubisinin yaklaşık %40'ını salarak MSN-FA'ya yakın bir dokсорubisin salımının gerçekleştiği görülmüştür. Bu sonuçlarda dokсорubisinin ani salımının engellendiğini ve MSN'lerin PLGA nanopartiküllerine yüklenmesindeki amaçlardan birine ulaşıldığını göstermiştir.

Hibrit partiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve morfolojisinin değerlendirilmesi için DLS ve TEM analizleri yapılmıştır. Her iki analizde de partikül büyüklüğünün 280 nm civarında olduğu tespit edilmiştir. TEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.6A. ve Şekil 4.6B.), PLGA nanopartiküllerinin şekillerinin küresel olduğu görülmüştür. TEM analizi ile PLGA'nin içyapısı görülemeyeceğinden elde edilen hibrit partiküllerin TEM görüntüsü alınırken MSN'lerin tespit edilebilmesi beklenmemesine rağmen alınan görüntüler incelendiğinde PLGA'nin yüzeye yakın bölümlerinde bir kısmı PLGA içinde kalmış geri kalan kısmı ise PLGA dışına taşmış MSN'lerin varlığı net bir şekilde görülebilmektedir. Buda MSN'lerin PLGA içine enkapsüle olduğunu ve hibrit partiküllerin başarılı bir şekilde elde edildiğini göstermektedir.

#### **5.4. Hücre Kültürü Çalışmaları**

##### **5.4.1. Etkin Madde İçermeyen Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Biyouyumluluklarının Araştırılması**

Silika bazlı malzemeler günümüzde FDA tarafından "genel olarak güvenli kabul edilir" sınıfında olduğu belirtilmektedir (60) ve 2000'li yılların başından beri ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımları yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (173). Mezoporlu silika nanopartikülü olarak klinik araştırmalarda kullanılmak üzere henüz onay alan bir çalışma olmasada, "C-Dots" olarak adlandırılan ve gözeneksiz silika nanopartiküllerinin tanı amaçlı olarak kullanılmasının amaçlandığı FDA onaylı bir çalışmanın klinik faz çalışmaları devam etmektedir. Bu çalışmada şu ana kadar alınan

sonuçların ümit vadecici olduğu belirtilmektedir ve buda MSN'lerin biyoyumlu malzemeler olarak resmi otoritelerce klinik çalışmalar için onay almasında önünü açacak bir faktör olarak düşünülmektedir (141). MSN'lerin biyoyumlulukları sentezlenen partiküllerin; partikül boyutu ve morfolojisi, gözenek durumu ve boyutu, yüzey özellikleri ve kristal yapısı gibi birçok faktöre göre değişiklik göstermektedir (139, 174). Belirtilen bu özellikler göz önünde bulundurularak optimize edilmiş bir yapı ve doğru doz ile toksik etki göstermeyen ve etkinliği yapılan çalışmalarla gösterilmiş MSN'lerle ilgili birçok çalışma literatürde bulunmaktadır (157, 175-177).

Tez çalışmaları kapsamında, sentezlenen MSN'lerin biyoyumluluklarının araştırılması için L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılarak sentezlenen partiküllerin toksisitesi araştırılmış ayrıca folik asit konjugasyonu ile yüzeyi fonksiyonelleştirmenin yapının toksisitesini nasıl etkilediğini görmek amacıyla MSN-FA grubunda biyoyumluluk çalışmalarına dahil edilmiştir. MSN ve MSN-FA gruplarının çeşitli konsantrasyonlarda, hücreler ile 24, 48, 72 saat süre ile inkübasyonu sonrası MTT analizi ile yapılan canlılık testleri sonuçlarına göre 24 saatlik inkübasyon sonrası uygulanan en yüksek konsantrasyonda dahi her iki grupta canlı hücre miktarı %95 üzeri bulunmuş ve kontrol grubuyla istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir. 72 saatlik inkübasyon süresi sonrasında ise en yüksek doz olan 16 µg/mL konsantrasyonda MSN ve MSN-FA gruplarında canlı hücre miktarları sırasıyla %81 ve %70 bulunmuştur. MSN-FA grubunda canlı hücre miktarı her ne kadar %80'nin altına düştüğü görülsede partiküllerin kanser hücre hatlarında etkinlikleri değerlendirilirken en yüksek 3,2 µM doksorubisin içeren partikül konsantrasyonu (5,12 µg/mL) kullanılmış ve bu gruba en yakın partikül konsantrasyonu olan 8 µg/mL konsantrasyonda dahi canlı hücre miktarı her iki grupta %80'in üzerinde bulunmuştur (Şekil 4.13.). Bu sonuçlar beklenildiği üzere MSN'lerin doz bağımlı olarak bir toksisite gösterdiğini fakat doksorubisinin taşınması için gerekli konsantrasyonlarda belirgin bir toksisiteye maruziyet vermediğini göstermiştir. MSN ve MSN-FA gruplarının toksisiteleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise MSN-FA'nın MSN'ye göre bir miktar daha toksik olduğu göze çarpmıştır. Bunun sebebinin

ise folik asit konjugasyonu sonrası partiküllerin hücre içine alımı artacağından, buna bağlı olarak toksisitenin artmış olabileceği sonucuna varılmıştır.

#### **5.4.2. Etkin Madde Yüklü Nanopartiküllerin Sitotoksisiteilerinin Araştırılması**

Tez çalışmaları kapsamında elde edilen nanopartiküllerin etkinlikleri araştırılırken öncelikli olarak folik asit konjugasyonu ile aktif hedeflendirmenin etkinliği analiz edilmiştir. Bu amaçla doksorubisin yüklü MSN ve MSN-FA nanopartikülleri kullanılarak folat reseptörü aşırı eksprese olduğu bilinen T-47D ve ZR-75-1 hücre hatları kullanılmış ve bu partiküllerin doksorubisin çözeltisi ve Caelyx®'e karşı etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Nanopartiküllerin etkinlikleri karşılaştırılırken doksorubisinin hangi konsantrasyonda uygulanacağına karar verebilmek için öncelikli olarak belirtilen hücre hatlarında doksorubisin çözeltisinin IC50 değerleri bulunmuş ve her iki hücre hattının IC50 değerlerini içine alacak şekilde üç konsantrasyon seçilerek bu konsantrasyonlarda doksorubisin içeren formülasyonlar hücrelere uygulanmıştır. Formülasyonların hücreler ile ne kadar süre inkübe edileceğinin belirlenmesi için ise IC50 değerleri saptanırken doksorubisin çözelti konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı zaman süresince hücrelerle inkübe edilmiş 24 ve 48. saat sonunda canlı hücre miktarı %50 değerinin altına inmediğinden bu zaman noktalarında IC50 değerleri hesaplanamamış ve 72.saat inkübasyon süresi ile çalışmaları devam edilmesine karar verilmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonrasında T47-D hücre hattı için IC50 değeri 324 nM bulunurken, ZR-75-1 için bu değer 493 nM bulunmuştur (Şekil 4.14.) Hücre hatlarıyla yapılan bu ön çalışmalar sonrasında formülasyonların sitotoksisite çalışmalarına başlanmıştır. L929 hücre hattında yapılan biyoyumluluk çalışmaları göz önüne alındığında beklenildiği üzere etkin madde yüklü olmayan nanopartiküllerin hücrelerde herhangi bir toksik etki göstermediği görülmüştür. MSN ve MSN-FA nanopartikülleri ise her iki hücre hattı ve her üç konsantrasyonda da doksorubisin çözeltisine göre istatistiksel olarak daha fazla hücre ölümüne sebebiyet verdiği saptanmıştır. MSN ve MSN-FA nanopartikülleri kendi arasında karşılaştırıldığında ise folat reseptörüne hedeflendirilmiş partiküllerin hedeflendirilmemiş partiküllere göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha



etkin bir hücre ölümüne sebebiyet verdiği bulunmuştur. Caleyx'in ise hem çözelti gurubu hemde MSN ve MSN-FA'ya göre daha az hücre ölümüne sebebiyet verdiği görülmüştür (Şekil 4.15.). Bunun sebebi ise, Caleyx depo bir formülasyon olmasından dolayı 3-4 haftada bir hastaya uygulanmaktadır (13). Dolayısıyla 72 saat inkübasyon yapılan hücre kültürü testinde sınırlı miktarda doksorubisin lipozomlardan salınmış olabileceğinden etkin bir hücre ölümü göstermemiş olabileceği düşünülmektedir. T-47D ve ZR-75-1 hücre hatlarında yapılan bu çalışmalar ile MSN'lerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasının doksorubisinin etkinliğini artırması yanında folat reseptörüne aktif hedeflendirme ile bu etkinliğinin daha da artırılabilceği gösterilmiştir.

Folik asit konjugasyonu yapılmış MSN'lere çeşitli antikanser ajanlar yüklenerek kanser tedavisinde etkinliklerinin araştırıldığı bazı benzer çalışmalar literatürde de bulunmaktadır. Bu çalışmalarda her ne kadar tez kapsamında sentezlenen MSN'lere göre daha büyük boyutta MSN sentezleri (100-300 nm arası) yapılmış olsada bu çalışmalarda da olumlu sonuçlar alınmıştır (153, 165, 178, 179). Mezoporlu silika nanopartikülleri ve folik asit konjugasyonu ile ilgili tez kapsamında elde edilen veriler ile birlikte literatürdeki bu olumlu sonuçlarda göz önünde bulundurulduğunda, folik asit konjugasyonu yapılmış mezoporlu silika nanopartiküllerinin kanser tedavisinde umut vadeci bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

Folik asit konjugasyonu ile aktif hedeflendirmenin etkinliği yapılan çalışmalarla başarılı bir şekilde gösterildikten sonra ilaç direncinin üstesinden gelebilmek için elakridar ve hibrit partikül kullanımının nasıl bir etki göstereceğini görmek amacıyla doksorubisine dirençli hücre hattı olan EMT6/AR1 ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu hücre hattında da öncelikli olarak doksorubisinin IC50 değeri ve elakridar'ın toksik olmayan en yüksek dozunun (%80 canlılık) belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu veriler tespit edilirken önceki hücre hatlarındaki veriler göz önünde bulundurularak çözelti konsantrasyonları sadece 72 saat süreyle hücrelerle inkübe edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda doksorubisinin oldukça yüksek

dozlarda dahi hücrelerde belirgin bir toksisite göstermediği görülmüştür (200 µM doksorubisin konsantrasyonunda %85 canlılık) (Şekil4.16.). Bu sonuçta, sırasıyla 324 nM ve 493 nM doksorubisin konsantrasyonlarında canlılığın yüzde 50'ye düştüğü T-47D ve ZR-75-1 hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında EMT/AR1 hücre hattında ilaç direnç mekanizmasının etkin bir şekilde işlediğini göstermektedir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda doksorubisinin IC50 değeri saptanamadığından dolayı elakridarın toksik olmayan en yüksek dozu olan 100 nM elakridar konsantrasyonu (Şekil 4.18.) ile doksorubisinin 0,05-0,2-0,8-3,125-12,5 ve 50 µM doksorubisin dozları kombine edilerek hücreler uygulanmış ve canlı hücre miktarlarının 0,2-0,8-3,125 µM doksorubisin konsantrasyonunda sırasıyla %79, %66 ve %42 olduğu bulunmuştur (Şekil 4.19.). Elde edilen bu veriler ışığında doksorubisinin belirtilen bu 3 konsantrasyonu ile 100 nM elakridar içerecek şekilde formülasyonlar hazırlanarak hücrelere uygulanmıştır. Sentezlendikten sonra doksorubisin yüklenen MSN-FA nanopartiküllerinin elakridar ile birlikte pegile edilmiş PLGA polimeri kullanarak hazırlanan hibrit nanopartikül (HyNP) grubundaki canlılık her üç konsantrasyonda da hem tek başına uygulanan MSN-FA grubuna göre hemde doksorubisin ve elakridarı bir arada içeren çözelti grubuna göre hücre canlılığını istatistiksel olarak daha fazla azalttığı görülmüştür. Bunun yanında MSN-FA nanopartiküllerinin elakridar içermeyecek şekilde PLGA nanopartiküllerine hapsedilip elakridar çözeltisinin dışardan çözelti şeklinde verildiği bir grupta (MSN-FA/PLGA+ELC) hazırlanarak hücrelere uygulanmış bu grupta HyNP grubuyla karşılaştırılmıştır. Bu sayede elakridarın çözelti olarak değilde tasarlanan ilaç taşıyıcı sisteme yüklenmesinin bir avantajının olup olmadığı analiz edilmeye çalışılmıştır. MSN-FA/PLGA+ELC grubu her ne kadar her üç konsantrasyonda da doksorubisin ve elakridar içeren çözelti grubuna göre hücre canlılığını daha fazla azaltmış olsada HyNP grubuna göre canlı hücre miktarı daha yüksek kalmıştır (Şekil 4.20.). Bu sonuçlarda elakridarın çözelti olarak değilde hibrit nanopartikül sistemine yüklemenin antikanser etkinliği arttırdığını göstermektedir. Bunun sebebinin de elakridar suda çözünürlüğü zayıf bir madde olduğu için besi yeri ortamında presipite olma ihtimalinden ve/veya nanopartiküller

sistem içinde çözeltiye göre elakridarın daha etkin şekilde hücre içine taşınmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde çeşitli nanopartiküler sistemler kullanılarak elakridarın ilaç direncinin üstesinden gelinebilmesi için kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (180-184). Bu çalışmalarda genel itibari ile elakridarın ilaç direnç mekanizmasının üstesinden gelinmesi için uygun bir aday olduğu göze çarpmaktadır. Yapılan tez çalışması kapsamında da daha önce literatürde karşılaşılmayan bir nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem tasarlanarak elakridar ve doksorubisinin taşınması sağlanmış ve literatür verileriyle örtüşür şekilde sinerjik bir etki elde edilmiştir.

#### **5.4.3. Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımlarının İncelenmesi**

Nanopartiküllerin hücre içine alımları belirlenirken tez çalışmalarında kullanılan her üç meme kanseri hücre hattında kullanılarak nanopartiküllerin hücre içine alımları floresan mikroskop ve akım sitometri çalışmalarıyla araştırılmıştır. Aktif hedeflendirmenin etkinliğinin araştırılması için öncelikli olarak her üç hücre hattı kullanılarak akım sitometri cihazı ile serbest doksorubisin çözeltisi, Caelyx®, MSN ve MSN-FA gruplarının sayısal olarak hücre içine alım oranları karşılaştırılmıştır. Her üç hücre hattı da folik asit reseptörü overeksprese olduğu bilindiğinden dolayı folik asit konjugasyonu yapılmış formülasyonun (MSN-FA) hücre içine daha fazla miktarda girmesi beklenmektedir. Çalışma için 15dk, 1,4 ve 8saat olmak üzere 4 farklı zaman süresince hücrelerle inkübe edilen formülasyonlar için, 8 saat inkübasyon süresinde her 4 formülasyon grubunda kendi içinde en yüksek hücre alım miktarına ulaşmıştır. MSN ve MSN-FA grupları her üç hücre hattında da diğer gruplara göre belirgin şekilde daha yüksek oranda hücre içine girerek doksorubisinin daha fazla hücre içine ulaşmasını ve hücreleri floresan işaretlenmesini sağlamıştır. Bu iki grup kendi arasında karşılaştırıldığında ise MSN-FA formülasyonunun MSN grubuna göre hücre içine alımının daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.21.). Bu sonuçlarda silika nanopartiküllerinin doksorubisinin hücre içine alımını arttırdığını, folat reseptörüne aktif hedeflendirmeye bu alımın dahada fazla arttırabileceğini göstermektedir. Literatürde, tez çalışmasında kullanılan hücre hatları dışında da folat

reseptörüne hedeflendirme ile silika nanopartiküllerini hücre içine alımını arttırılabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (185, 186). Aynı konsantrasyonda doksorubisin içeren formülasyonlar uygulandığında hangi hücre hattında hücre içine alımın daha fazla olduğunu görmek için ise hücrelerin normalize edilmiş MFI değerleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda T-47D hücre hattındaki MFI değerleri en yüksek çıkarken EMT6/AR1 hücre hattında en düşük çıkmıştır. Bu sonuçlarda T-47D hücre hattındaki doksorubisinin IC50 değerinin ZR-75-1 hücre hattındaki IC50 değerinden düşük olmasını ve EMT6/AR1 hücre hattı ile diğer iki hücre hattındaki aynı doksorubisin konsantrasyonları karşılaştırıldığında daha az hücre ölümü görülmesini destekler durumdadır.

Formülasyonların doksorubisini hücrenin hangi bölgesini taşıdığını görmek ve akım sitometri çalışmalarını desteklemek amacıyla formülasyonların 8 saat inkübasyon sonrası floresan mikroskopuyla görüntüleri de alınmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda akım sitometrideki sonuçlara paralel sonuçlar bulunmuş, ayrıca doksorubisinin genel itibari ile çekirdekte lokalize olduğu tespit edilmiştir. Sadece Caelyx® uygulanan hücrelerde çekirdekte değil daha çok sitoplazmada kırmızı floresan ışımalarının varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.24. ve Şekil 4.25.). Bu sonuç da, lipozomal bir formülasyon olan Caelyx®'te 8 saatlik inkübasyon süresinde doksorubisinin lipozom içinden çok az miktarda veya hiç salınmayıp lipozomal formda sitoplazmada biriktiğini düşündürmektedir. Bu veri de Caelyx®'in sitotoksitesite değerlerinin neden düşük çıktığını açıklayıcı bir durumdur. Hibrit partikülün ise hücre içine alımının tayin edilebilmesi için MSN-FA grubu ile HyNP grubu EMT6/AR1 hücre hattına uygulanmıştır. Bu hücre hattında MSN-FA grubunda floresan intensite her ne kadar doksorubisin çözeltisine göre daha yüksek gözükse de HyNP grubu ile karşılaştırıldığında tasarlanan hibrit partikül sisteminde floresan intensite belirgin şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.26.). HyNp formülasyonunda da Caelyx®'teki duruma benzer şekilde doksorubisinin varlığı hem sitoplazmada hem çekirdekte saptanmıştır. HyNp için doksorubisinin salım profili göz önünde bulundurulduğunda, salımın MSN-FA'ya göre daha yavaş olduğu bilinmektedir (Şekil 4.11.). Dolayısıyla 8 saat inkübasyon süresinde doksorubisinin

bir miktarı salınıp çekirdeğe ulaşmış olsada bir kısmının hibrit nanopartiküler içinden henüz salınmayıp sitoplazmada taşıyıcı sistem içinde olduğu düşünülmektedir. Hücre içine alım ile ilgili yapılan tüm bu çalışmalar sitotoksitate verilerini destekleyici şekilde olup hem folat reseptörüne aktif hedeflendirmenin hem de elakridar içeren hibrit nanopartiküler sistemin etkinliğini kanıtlayıcı niteliktedir.

#### **5.4.4. Folat Reseptörüne Hedeflendirilmiş Mezoporlu Silika Nanopartiküllerinin Hücre İçine Alım Mekanizmalarının İncelenmesi**

Hücrelerde nanopartiküller genellikle klattrin (reseptör) aracılı, kaveole aracılı, kaveol ve klattrin bağımsız ve makropinositoz yollarından birini kullanarak endositoz ile hücre içine alınmaktadır. Tez kapsamında MSN-FA nanopartiküllerinin klattrin aracılı endositoz yolağını kullanıp kullanmadığının araştırılması için bu yolağı inhibe ettiği bilinen sükroz ve klorpromazin hücrelere uygulanarak EMT6/AR1 hücre hattındaki MFI'ın değişimi analiz edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde hem sükroz hem klorpromazinin hücreler uygulanması sonucunda hem pozitif kontrol amaçlı kullanılan FITC-İnsan Transferinin'de hemde MSN-FA nanopartiküllerinde hücre içine alımını azalttığı görülmüştür (Şekil 4.29.). Bu sonuçlar uygun dozda uygulanmaları koşulunda hem sükrozun hem de klorpromazinin klattrin aracılı endositozu inhibe etmede kullanılabileceğini göstermesi yanında tez kapsamında hazırlanan MSN-FA nanopartiküllerinin klattrin aracılı endositoz yolunu kullanarak hücre içine alındığını göstermektedir. Nanopartiküler sistemlerde hücrelerdeki belirli bir reseptörü aktif hedeflendirme yapılması durumunda nanopartiküllerin klattrin aracılı endositozu kullandığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (133). Tez kapsamında alınan sonuçlardan bu bağlamda literatür ile uyuşmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında yapılan çalışmalar derlendiğinde;

- Mezoporlu silika nanopartiküllerin (MSN) modifiye stöber yöntemiyle sentezlenebileceği ve formülasyon parametreleri değiştirilerek farklı partikül boyutu, PDI ve sentez verimine sahip partiküllerin elde edilebileceği,
- Sentez verimi yüksek, düşük PDI'ya sahip, ortalama partikül büyüklüğü 50 nm'den küçük MSN'lerin elde edilerek optimize edilebileceği,
- Çalışmalarda kullanılacak MSN için optimum formülasyon belirlendikten sonra bu formülasyon kullanılarak NHS-EDC kimyası kullanılarak folik asit konjugasyonunun yapılabileceği,
- Elde edilen MSN ve MSN-FA nanopartiküllerinin karakterizasyonu için DLS, Zete Potansiyeli, TEM, SEM, EDX, BET, XRD, C-H-N Elemental Analiz, in vitro ilaç salımı analizleri yapılarak ve tüm karakterizasyon çalışmaları sonucunda literatür ile örtüşür sonuçların bulunduğu,
- Karakterizasyon çalışmaları yapılan MSN ve MSN-FA nanopartiküllerin biyouyumluluklarının araştırılması için L929 hattında sitotoksosite analizleri yapılarak ve toksik olmayan dozların konsantrasyonları,
- MSN ve MSN-FA nanopartikülleri T-47D ve ZR-75-1 olmak üzere iki farklı hücre hattında hücre içine alım ve sitotoksosite çalışmaları yapılarak, MSN'lerin doksorubisin çözeltisi ve Caelyx®'e göre daha etkin olduğu sonuçların bulunduğu ve folik asit konjugasyonu ile bu etkinliğin dahada fazla artırıldığı,
- Karakterizasyonu yapılan MSN-FA nanopartikülleri ile pegile edilmiş PLGA polimeri kullanılarak MSN/PLGA hibrit nanopartiküler sistemin geliştirilebileceği,
- Geliştirilen bu hibrit sistemin DLS ve TEM analizleri ile karakterizasyon çalışmalarının yapılması sonucunda hibrit sistemin başarılı bir şekilde geliştirildiği,

- Doksorubisine dirençli olan EMT6/AR1 hücre hattında tek başına doksorubisin çözeltisinin belirgin bir toksisitesi yokken elakridar çözeltisiyle beraber uygulandığında direnç mekanizmasının üstesinden gelinerek yüksek oranda hücre ölümünün gerçekleştirilebileceği,
- Geliştirilen hibrit nanopartiküler sistemde MSN-FA ile birlikte elakridarın enkapsüle edilmesi sonucu doksorubisin ve elakridar kombinasyonu içeren çözelti grubuna göre daha etkin bir hücre ölümünün gerçekleştiği ve MSN-FA grubuna göre hücre içine alımının arttığı,
- Klatrin aracılı endositozun sükröz ve klorpromazin kullanılarak inhibe edilebileceği ve bu inhibitörlerin varlığında MSN-FA nanopartiküllerinin hücre içine alımının azalmasından dolayı klatrin aracılı endositoz yolağını kullandığı gösterilmiştir.

Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde pasif ve aktif hedeflendirilmesi yapılan mezoporlu silika nanopartiküllerinin elakridar içeren pegile edilmiş PLGA polimeri ile birlikte hibrit nanopartikül şeklinde tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemin meme kanseri tedavisi için umut vadeci bir tedavi şekli olabileceği sonucuna varılmıştır.

İleriye dönük çalışmalarda, geliştirilen ilaç taşıyıcısı sistemin Caelyx® ile kıyaslanması için meme kanseri tümör modeli geliştirilmesi sonrası in vivo hayvan çalışmaları yapılarak geliştirilen sistemin etkinliğinin bir sonraki aşamada daha iyi değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmalarla birlikte tez kapsamında yapılan in vitro hücre kültürü çalışmalarında olumlu sonuçlar alınan hibrit nanopartiküler sistemin in vivo farmakokinetik çalışmalarının da yapılması ile taşıyıcı sistemin etkinliğinin daha net analiz edilebileceği ön görülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004;10(8):789-99.
2. Brizel DM, Albers ME, Fisher SR, Scher RL, Richtsmeier WJ, Hars V, et al. Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *New Engl J Med.* 1998;338(25):1798-804.
3. Estanqueiro M, Amaral MH, Conceicao J, Lobo JMS. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. *Colloid Surface B.* 2015;126:631-48.
4. Bray F, McCarron P, Parkin DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. *Breast Cancer Res.* 2004;6(6):229-39.
5. Lacey JV, Devesa SS, Brinton LA. Recent trends in breast cancer incidence and mortality. *Environ Mol Mutagen.* 2002;39(2-3):82-8.
6. Nunez C, Capelo JL, Igrejas G, Alfonso A, Botana LM, Lodeiro C. An overview of the effective combination therapies for the treatment of breast cancer. *Biomaterials.* 2016;97:34-50.
7. Jabir NR, Tabrez S, Ashraf GM, Shakil S, Damanhoury GA, Kamal MA. Nanotechnology-based approaches in anticancer research. *Int J Nanomed.* 2012;7:4391-408.
8. Katzung BG. *Basic & clinical pharmacology.* 9th ed. New York: Lange Medical Books/McGraw Hill; 2004. xiv, 1202 p. p.
9. Abraham SA, Waterhouse DN, Mayer LD, Cullis PR, Madden TD, Bally MB. The liposomal formulation of doxorubicin. *Liposomes, Pt E.* 2005;391:71-97.
10. Yoo HS, Lee KH, Oh JE, Park TG. In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *J Control Release.* 2000;68(3):419-31.
11. Waterhouse DN, Tardi PG, Mayer LD, Bally MB. A comparison of liposomal formulations of doxorubicin with drug administered in free form: changing toxicity profiles. *Drug Saf.* 2001;24(12):903-20.
12. Ibrahim MA, Ashour OM, Ibrahim YF, El-Bitar HI, Gomaa W, Abdel-Rahim SR. Angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin AT(1)-receptor antagonism equally improve doxorubicin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Pharmacol Res.* 2009;60(5):373-81.



13. Green AE, Rose PG. Pegylated liposomal doxorubicin in ovarian cancer. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3):229-39.
14. Gordon AN, Granai CO, Rose PG, Hainsworth J, Lopez A, Weissman C, et al. Phase II study of liposomal doxorubicin in platinum- and paclitaxel-refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(17):3093-100.
15. Varma MVS, Ashokraj Y, Dey CS, Panchagnula R. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res*. 2003;48(4):347-59.
16. Murakami T, Takano M. Intestinal efflux transporters and drug absorption. *Expert Opin Drug Met*. 2008;4(7):923-39.
17. Nakanishi T. Drug transporters as targets for cancer chemotherapy. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2007;4(3):241-54.
18. Bansal T, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Emerging Significance of Flavonoids as P-Glycoprotein Inhibitors in Cancer Chemotherapy. *J Pharm Pharm Sci*. 2009;12(1):46-78.
19. Jin MS, Oldham ML, Zhang QJ, Chen J. Crystal structure of the multidrug transporter P-glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2012;490(7421):566-90.
20. Bansal T, Akhtar N, Jaggi M, Khar RK, Talegaonkar S. Novel formulation approaches for optimising delivery of anticancer drugs based on P-glycoprotein modulation. *Drug Discov Today*. 2009;14(21-22):1067-74.
21. Hyafil F, Vergely C, Du Vignaud P, Grand-Perret T. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res*. 1993;53(19):4595-602.
22. Planting AS, Sonneveld P, van der Gaast A, Sparreboom A, van der Burg ME, Luyten GP, et al. A phase I and pharmacologic study of the MDR converter GF120918 in combination with doxorubicin in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005;55(1):91-9.
23. Wallstab A, Koester M, Bohme M, Keppler D. Selective inhibition of MDR1 P-glycoprotein-mediated transport by the acridone carboxamide derivative GG918. *Br J Cancer*. 1999;79(7-8):1053-60.

24. Saneja A, Khare V, Alam N, Dubey RD, Gupta PN. Advances in P-glycoprotein-based approaches for delivering anticancer drugs: pharmacokinetic perspective and clinical relevance. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014;11(1):121-38.
25. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;66:2-25.
26. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release.* 2001;70(1-2):1-20.
27. Wang C, Wang Y, Wang Y, Fan M, Luo F, Qian Z. Characterization, pharmacokinetics and disposition of novel nanoscale preparations of paclitaxel. *Int J Pharm.* 2011;414(1-2):251-9.
28. Dawidczyk CM, Russell LM, Searson PC. Nanomedicines for cancer therapy: state-of-the-art and limitations to pre-clinical studies that hinder future developments. *Front Chem.* 2014;2.
29. Danhier F, Feron O, Preat V. To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release.* 2010;148(2):135-46.
30. Petrak K. Essential properties of drug-targeting delivery systems. *Drug Discovery Today.* 2005;10(23-24):1667-73.
31. Barenholz Y. Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release.* 2012;160(2):117-34.
32. Rosenblum D, Joshi N, Tao W, Karp JM, Peer D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nat Commun.* 2018;9(1):1410.
33. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986;46(12 Pt 1):6387-92.
34. Maeda H. Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. *P Jpn Acad B-Phys.* 2012;88(3):53-71.
35. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discovery Today.* 2010;15(19-20):842-50.

36. Awada A, Bondarenko IN, Bonnetterre J, Nowara E, Ferrero JM, Bakshi AV, et al. A randomized controlled phase II trial of a novel composition of paclitaxel embedded into neutral and cationic lipids targeting tumor endothelial cells in advanced triple-negative breast cancer (TNBC). *Ann Oncol.* 2014;25(4):824-31.
37. Burris HA, Wang JSZ, Johnson ML, Falchook GS, Jones SF, Strickland DK, et al. A phase I, open-label, first time-in-patient dose escalation and expansion study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of nanoparticle encapsulated Aurora B kinase inhibitor AZD2811 in patients with advanced solid tumours. *J Clin Oncol.* 2017;35.
38. Batist G, Sawyer M, Gabrail N, Christiansen N, Marshall JL, Spigel DR, et al. A multicenter, phase II study of CPX-1 liposome injection in patients (pts) with advanced colorectal cancer (CRC). *J Clin Oncol.* 2008;26(15):4108-4108.
39. Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G. Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *J Control Release.* 2012;161(2):175-87.
40. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliver Rev.* 2004;56(11):1649-59.
41. Attia MF, Anton N, Wallyn J, Omran Z, Vandamme TF. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J Pharm Pharmacol.* 2019;71:1185-98.
42. Stefanick JF, Ashley JD, Kiziltepe T, Bilgicer B. A Systematic Analysis of Peptide Linker Length and Liposomal Polyethylene Glycol Coating on Cellular Uptake of Peptide-Targeted Liposomes. *Acs Nano.* 2013;7(4):2935-47.
43. Gu F, Zhang L, Teply BA, Mann N, Wang A, Radovic-Moreno AF, et al. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *P Natl Acad Sci USA.* 2008;105(7):2586-91.
44. Gratton SEA, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *P Natl Acad Sci USA.* 2008;105(33):11613-8.
45. Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(8):615-27.
46. Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang XL, Chen CY, Zhao YL. Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials. *Small.* 2011;7(10):1322-37.

47. Bertrand N, Wu J, Xu XY, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliver Rev.* 2014;66:2-25.
48. Wu J, Chu CC. Block copolymer of poly(ester amide) and polyesters: Synthesis, characterization, and in vitro cellular response. *Acta Biomater.* 2012;8(12):4314-23.
49. Bazak R, Hourri M, El Achy S, Kamel S, Refaat T. Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *J Cancer Res Clin.* 2015;141(5):769-84.
50. Low PS, Kularatne SA. Folate-targeted therapeutic and imaging agents for cancer. *Curr Opin Chem Biol.* 2009;13(3):256-62.
51. Sudimack J, Lee RJ. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;41(2):147-62.
52. Xu S, Olenyuk BZ, Okamoto CT, Hamm-Alvarez SF. Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: Rationale and advances. *Adv Drug Deliver Rev.* 2013;65(1):121-38.
53. Franklin WA, Waintrub M, Edwards D, Christensen K, Prendegast P, Woods J, et al. New Anti-Lung-Cancer Antibody Cluster-12 Reacts with Human Folate Receptors Present on Adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 1994:89-95.
54. Weitman SD, Lark RH, Coney LR, Fort DW, Frasca V, Zurawski VR, et al. Distribution of the Folate Receptor Gp38 in Normal and Malignant-Cell Lines and Tissues. *Cancer Res.* 1992;52(12):3396-401.
55. Sudimack J, Lee RJ. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Deliver Rev.* 2000;41(2):147-62.
56. Xia W, Low PS. Folate-Targeted Therapies for Cancer. *J Med Chem.* 2010;53(19):6811-24.
57. Rao KS, El-Hami K, Kodaki T, Matsushige K, Makino K. A novel method for synthesis of silica nanoparticles. *J Colloid Interf Sci.* 2005;289(1):125-31.
58. Stöber W, Fink A, Bohn E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J Colloid Interf Sci.* 1968;26(1):62-9.
59. Klichko Y, Liong M, Choi E, Angelos S, Nel AE, Stoddart JF, et al. Mesostructured Silica for Optical Functionality, Nanomachines, and Drug Delivery. *J Am Ceram Soc.* 2009;92(1):S2-S10.

60. Kumar P, Tambe P, Paknikar KM, Gajbhiye V. Mesoporous silica nanoparticles as cutting-edge theranostics: Advancement from merely a carrier to tailor-made smart delivery platform. *J Control Release*. 2018;287:35-57.
61. Mamaeva V, Sahlgren C, Linden M. Mesoporous silica nanoparticles in medicine--recent advances. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(5):689-702.
62. Pandita D, Kumar S, Lather V. Hybrid poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: design and delivery prospectives. *Drug Discovery Today*. 2015;20(1):95-104.
63. Sailor MJ, Park JH. Hybrid Nanoparticles for Detection and Treatment of Cancer. *Advanced Materials*. 2012;24(28):3779-802.
64. Al-Jamal WT, Al-Jamal KT, Tian B, Lacerda L, Bomans PH, Frederik PM, et al. Lipid-quantum dot bilayer vesicles enhance tumor cell uptake and retention in vitro and in vivo. *ACS Nano*. 2008;2(3):408-18.
65. Mikhaylov G, Mikac U, Magaeva AA, Itin VI, Naiden EP, Psakhye I, et al. Ferri-liposomes as an MRI-visible drug-delivery system for targeting tumours and their microenvironment. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(9):594-602.
66. Wu GH, Milkhailovsky A, Khant HA, Fu C, Chiu W, Zasadzinski JA. Remotely triggered liposome release by near-infrared light absorption via hollow gold nanoshells. *J Am Chem Soc*. 2008;130(26):8175-+.
67. Hu JM, Qian YF, Wang XF, Liu T, Liu SY. Drug-Loaded and Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Surface-Embedded Amphiphilic Block Copolymer Micelles for Integrated Chemotherapeutic Drug Delivery and MR Imaging. *Langmuir*. 2012;28(4):2073-82.
68. Wang WW, Cheng D, Gong FM, Miao XM, Shuai XT. Design of Multifunctional Micelle for Tumor-Targeted Intracellular Drug Release and Fluorescent Imaging. *Advanced Materials*. 2012;24(1):115-20.
69. Park JH, von Maltzahn G, Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Micellar hybrid nanoparticles for simultaneous magnetofluorescent imaging and drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2008;47(38):7284-8.
70. Lee JE, Lee N, Kim H, Kim J, Choi SH, Kim JH, et al. Uniform mesoporous dye-doped silica nanoparticles decorated with multiple magnetite nanocrystals for simultaneous enhanced magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, and drug delivery. *J Am Chem Soc*. 2010;132(2):552-7.

71. Zhao T, Wu H, Yao SQ, Xu QH, Xu GQ. Nanocomposites containing gold nanorods and porphyrin-doped mesoporous silica with dual capability of two-photon imaging and photosensitization. *Langmuir*. 2010;26(18):14937-42.
72. Liu H, Chen D, Li L, Liu T, Tan L, Wu X, et al. Multifunctional gold nanoshells on silica nanorattles: a platform for the combination of photothermal therapy and chemotherapy with low systemic toxicity. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50(4):891-5.
73. Lee SM, Park H, Yoo KH. Synergistic Cancer Therapeutic Effects of Locally Delivered Drug and Heat Using Multifunctional Nanoparticles. *Advanced Materials*. 2010;22(36):4049-53.
74. Cho HS, Dong ZY, Pauletti GM, Zhang JM, Xu H, Gu HC, et al. Fluorescent, Superparamagnetic Nanospheres for Drug Storage, Targeting, and Imaging: A Multifunctional Nanocarrier System for Cancer Diagnosis and Treatment. *ACS Nano*. 2010;4(9):5398-404.
75. Yang J, Lee CH, Ko HJ, Suh JS, Yoon HG, Lee K, et al. Multifunctional magneto-polymeric nanohybrids for targeted detection and synergistic therapeutic effects on breast cancer. *Angew Chem Int Edit*. 2007;46(46):8836-9.
76. Huh YM, Lee ES, Lee JH, Jun YW, Kim PH, Yun CO, et al. Hybrid nanoparticles for magnetic resonance imaging of target-specific viral gene delivery. *Advanced Materials*. 2007;19(20):3109-12.
77. Steinmetz NF, Hong V, Spoerke ED, Lu P, Breitenkamp K, Finn MG, et al. Buckyballs Meet Viral Nanoparticles: Candidates for Biomedicine. *J Am Chem Soc*. 2009;131(47):17093-95.
78. Yi H, Ghosh D, Ham MH, Qi J, Barone PW, Strano MS, et al. M13 phage-functionalized single-walled carbon nanotubes as nanoprobe for second near-infrared window fluorescence imaging of targeted tumors. *Nano Lett*. 2012;12(3):1176-83.
79. Wang CG, Chen J, Talavage T, Irudayaraj J. Gold Nanorod/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticle "Nano-Pearl-Necklaces" for Simultaneous Targeting, Dual-Mode Imaging, and Photothermal Ablation of Cancer Cells. *Angew Chem Int Edit*. 2009;48(15):2759-63.
80. Kim J, Park S, Lee JE, Jin SM, Lee JH, Lee IS, et al. Designed fabrication of multifunctional magnetic gold nanoshells and their application to magnetic resonance imaging and photothermal therapy. *Angew Chem Int Edit*. 2006;45(46):7754-8.

81. Cheng L, Yang K, Li YG, Chen JH, Wang C, Shao MW, et al. Facile Preparation of Multifunctional Upconversion Nanoprobes for Multimodal Imaging and Dual-Targeted Photothermal Therapy. *Angew Chem Int Edit*. 2011;50(32):7385-90.
82. Ding X, Singh R, Burke A, Hatcher H, Olson J, Kraft RA, et al. Development of iron-containing multiwalled carbon nanotubes for MR-guided laser-induced thermotherapy. *Nanomedicine (Lond)*. 2011;6(8):1341-52.
83. Bhirde AA, Patel V, Gavard J, Zhang G, Sousa AA, Masedunskas A, et al. Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery. *Acs Nano*. 2009;3(2):307-16.
84. Yang F, Jin C, Yang D, Jiang YJ, Li J, Di Y, et al. Magnetic functionalised carbon nanotubes as drug vehicles for cancer lymph node metastasis treatment. *Eur J Cancer*. 2011;47(12):1873-82.
85. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Preat V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J Control Release*. 2012;161(2):505-22.
86. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2014;15(3):3640-59.
87. Pandita D, Kumar S, Lather V. Hybrid poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: design and delivery perspectives. *Drug Discov Today*. 2015;20(1):95-104.
88. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloid Surface B*. 2010;75(1):1-18.
89. Owens DE, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharmaceut*. 2006;307(1):93-102.
90. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol*. 2015;33(9):941-51.
91. Cho EJ, Holback H, Liu KC, Abouelmagd SA, Park J, Yeo Y. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. *Mol Pharmaceut*. 2013;10(6):2093-110.
92. Lu X-Y, Wu D-C, Li Z-J, Chen G-Q. Chapter 7 - Polymer Nanoparticles. In: Villaverde A, editor. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 104: Academic Press; 2011. p. 299-323.

93. Hoo CM, Starostin N, West P, Mecartney ML. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *J Nanopart Res.* 2008;10:89-96.
94. Mahl D, Diendorf J, Meyer-Zaika W, Epple M. Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles. *Colloid Surface A.* 2011;377(1-3):386-92.
95. Boyd RD, Pichaimuthu SK, Cuenat A. New approach to inter-technique comparisons for nanoparticle size measurements; using atomic force microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. *Colloid Surface A.* 2011;387(1-3):35-42.
96. Möller K, Kobler J, Bein T. Colloidal Suspensions of Nanometer-Sized Mesoporous Silica. *Advanced Functional Materials.* 2007;17(4):605-12.
97. Bala I, Hariharan S, Kumar MN. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2004;21(5):387-422.
98. Harrison MA, Rae IF. General techniques of cell culture. Cambridge ; New York, NY, USA: Cambridge University Press; 1997. 162 p. p.
99. Engel LW, Young NA, Tralka TS, Lippman ME, O'Brien SJ, Joyce MJ. Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res.* 1978;38(10):3352-64.
100. Meier R, Henning TD, Boddington S, Tavri S, Arora S, Piontek G, et al. Breast cancers: MR imaging of folate-receptor expression with the folate-specific nanoparticle P1133. *Radiology.* 2010;255(2):527-35.
101. Song DG, Ye Q, Poussin M, Chacon JA, Figini M, Powell DJ, Jr. Effective adoptive immunotherapy of triple-negative breast cancer by folate receptor-alpha redirected CAR T cells is influenced by surface antigen expression level. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1):56.
102. Mizusako H, Tagami T, Hattori K, Ozeki T. Active Drug Targeting of a Folate-Based Cyclodextrin-Doxorubicin Conjugate and the Cytotoxic Effect on Drug-Resistant Mammary Tumor Cells In Vitro. *J Pharm Sci.* 2015;104(9):2934-40.
103. Zheng XH, Xing D, Zhou FF, Wu BY, Chen WR. Indocyanine Green-Containing Nanostructure as Near Infrared Dual-Functional Targeting Probes for Optical Imaging and Photothermal Therapy. *Mol Pharmaceut.* 2011;8(2):447-56.
104. Zange R, Kissel T. Comparative in vitro biocompatibility testing of polycyanoacrylates and poly(D,L-lactide-co-glycolide) using different mouse



fibroblast (L929) biocompatibility test models. *Eur J Pharm Biopharm.* 1997;44(2):149-57.

105. Slater K. Cytotoxicity tests for high-throughput drug discovery. *Curr Opin Biotechnol.* 2001;12(1):70-4.

106. Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods.* 1988;115(1):61-9.

107. Ducat E, Evrard B, Peulen O, Piel G. Cellular uptake of liposomes monitored by confocal microscopy and flow cytometry. *J Drug Deliv Sci Tec.* 2011;21(6):469-77.

108. Wang TT, Bai J, Jiang X, Nienhaus GU. Cellular Uptake of Nanoparticles by Membrane Penetration: A Study Combining Confocal Microscopy with FTIR Spectroelectrochemistry. *Acs Nano.* 2012;6(2):1251-9.

109. Fernando LP, Kandel PK, Yu JB, McNeill J, Ackroyd PC, Christensen KA. Mechanism of Cellular Uptake of Highly Fluorescent Conjugated Polymer Nanoparticles. *Biomacromolecules.* 2010;11(10):2675-82.

110. Xu PS, Gullotti E, Tong L, Highley CB, Errabelli DR, Hasan T, et al. Intracellular Drug Delivery by Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles, Revisited. *Mol Pharmaceut.* 2009;6(1):190-201.

111. Reisch A, Klymchenko AS. Fluorescent Polymer Nanoparticles Based on Dyes: Seeking Brighter Tools for Bioimaging. *Small.* 2016;12(15):1968-92.

112. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem.* 2000;46(8 Pt 2):1221-9.

113. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:593-623.

114. Silverstein SC. Phagocytosis of Microbes - Insights and Prospects. *Trends Cell Biol.* 1995;5(3):141-2.

115. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release.* 2010;145(3):182-95.

116. Mahmoudi M, Azadmanesh K, Shokrgozar MA, Journeay WS, Laurent S. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle. *Chem Rev.* 2011;111(5):3407-32.

117. Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:857-902.
118. Thorn H, Stenkula KG, Karlsson M, Ortegren U, Nystrom FH, Gustavsson J, et al. Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes. *Mol Biol Cell.* 2003;14(10):3967-76.
119. Yameen B, Choi WI, Vilos C, Swami A, Shi JJ, Farokhzad OC. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. *J Control Release.* 2014;190:485-99.
120. Sandvig K, Torgersen ML, Raa HA, Van Deurs B. Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(3):267-76.
121. Fiorentini C, Falzano L, Fabbri A, Stringaro A, Logozzi M, Travaglione S, et al. Activation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor 1 induces macropinocytosis and scavenging activity in epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 2001;12(7):2061-73.
122. Mercer J, Helenius A. Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol.* 2009;11(5):510-20.
123. Kolb-Maurer A, Wilhelm M, Weissinger F, Brocker EB, Goebel W. Interaction of human hematopoietic stem cells with bacterial pathogens. *Blood.* 2002;100(10):3703-9.
124. Rappoport JZ. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochem J.* 2008;412:415-23.
125. Higgins MK, McMahon HT. Snap-shots of clathrin-mediated endocytosis. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(5):257-63.
126. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Bio.* 2007;8(3):185-94.
127. Kerr MC, Teasdale RD. Defining Macropinocytosis. *Traffic.* 2009;10(4):364-71.
128. Dutta D, Donaldson JG. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cell Logist.* 2012;2(4):203-8.
129. Orlandi PA, Fishman PH. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol.* 1998;141(4):905-15.

130. Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol.* 1993;123(5):1107-17.
131. Sofer A, Futerman AH. Cationic amphiphilic drugs inhibit the internalization of cholera toxin to the Golgi apparatus and the subsequent elevation of cyclic AMP. *J Biol Chem.* 1995;270(20):12117-22.
132. Gao HL, Yang Z, Zhang S, Cao SJ, Shen S, Pang ZQ, et al. Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization. *Sci Rep-Uk.* 2013;3.
133. Gao H, Yang Z, Zhang S, Cao S, Shen S, Pang Z, et al. Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization. *Sci Rep.* 2013;3:2534.
134. Hoang B, Ernsting MJ, Roy A, Murakami M, Undzys E, Li SD. Docetaxel-carboxymethylcellulose nanoparticles target cells via a SPARC and albumin dependent mechanism. *Biomaterials.* 2015;59:66-76.
135. Chen F, Zhu LY, Zhang YL, Kumar D, Cao GL, Hu XL, et al. Clathrin-mediated endocytosis is a candidate entry sorting mechanism for *Bombyx mori* cytopovirus. *Sci Rep-Uk.* 2018;8.
136. Gao HL, Yang Z, Zhang S, Cao SJ, Shen S, Pang ZQ, et al. Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization (vol 3, 2534, 2013). *Sci Rep-Uk.* 2014;4.
137. Antonescu CN, Diaz M, Femia G, Planas JV, Klip A. Clathrin-dependent and independent endocytosis of glucose transporter 4 (GLUT4) in myoblasts: Regulation by mitochondrial uncoupling. *Traffic.* 2008;9(7):1173-90.
138. Wiesner B, Beyermann M, Oksche A. Live cell imaging of G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol.* 2005;306:173-202.
139. Asefa T, Tao ZM. Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Chem Res Toxicol.* 2012;25(11):2265-84.
140. Kohane DS, Langer R. Biocompatibility and drug delivery systems. *Chem Sci.* 2010;1(4):441-6.
141. Farjadian F, Roointan A, Mohammadi-Samani S, Hosseini M. Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, pharmaceutical applications, biodistribution, and biosafety assessment. *Chem Eng J.* 2019;359:684-705.

142. Jaganathan H, Godin B. Biocompatibility assessment of Si-based nano- and micro-particles. *Adv Drug Deliver Rev.* 2012;64(15):1800-19.
143. Mekar H, Lu J, Tamanoi F. Development of mesoporous silica-based nanoparticles with controlled release capability for cancer therapy. *Adv Drug Deliver Rev.* 2015;95:40-9.
144. Wang Y, Zhao QF, Han N, Bai L, Li J, Liu J, et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomed-Nanotechnol.* 2015;11(2):313-27.
145. Qu W, Meng B, Yu Y, Wang S. Folic acid-conjugated mesoporous silica nanoparticles for enhanced therapeutic efficacy of topotecan in retina cancers. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:4379-89.
146. Qiao ZA, Zhang L, Guo MY, Liu YL, Huo QS. Synthesis of Mesoporous Silica Nanoparticles via Controlled Hydrolysis and Condensation of Silicon Alkoxide. *Chem Mater.* 2009;21(16):3823-9.
147. Wang ZL, Xu B, Zhang L, Zhang JB, Ma TH, Zhang JB, et al. Folic acid-functionalized mesoporous silica nanospheres hybridized with AIE luminogens for targeted cancer cell imaging. *Nanoscale.* 2013;5(5):2065-72.
148. Khosravian P, Shafiee Ardestani M, Khoobi M, Ostad SN, Dorkoosh FA, Akbari Javar H, et al. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid/methionine for active targeted delivery of docetaxel. *Onco Targets Ther.* 2016;9:7315-30.
149. Freitas LBD, Bravo IJG, Macedo WAD, de Sousa EMB. Mesoporous silica materials functionalized with folic acid: preparation, characterization and release profile study with methotrexate. *J Sol-Gel Sci Techn.* 2016;77(1):186-204.
150. Li HW, Gu JS, Shah LA, Siddiq M, Hu JH, Cai XB, et al. Bone cement based on vancomycin loaded mesoporous silica nanoparticle and calcium sulfate composites. *Mat Sci Eng C-Mater.* 2015;49:210-6.
151. Tang H, Guo J, Sun Y, Chang B, Ren Q, Yang W. Facile synthesis of pH sensitive polymer-coated mesoporous silica nanoparticles and their application in drug delivery. *Int J Pharm.* 2011;421(2):388-96.
152. Tang HY, Guo J, Sun Y, Chang BS, Ren QG, Yang WL. Facile synthesis of pH sensitive polymer-coated mesoporous silica nanoparticles and their application in drug delivery. *Int J Pharmaceut.* 2011;421(2):388-96.

153. Malekmohammadi S, Hadadzadeh H, Amirghofran Z. Preparation of folic acid-conjugated dendritic mesoporous silica nanoparticles for pH-controlled release and targeted delivery of a cyclometallated gold(III) complex as an antitumor agent. *J Mol Liq.* 2018;265:797-806.
154. Li DA, Zhang YT, Yu M, Guo J, Chaudhary D, Wang CC. Cancer therapy and fluorescence imaging using the active release of doxorubicin from MSPs/Ni-LDH folate targeting nanoparticles. *Biomaterials.* 2013;34(32):7913-22.
155. Yin F, Zhang BT, Zeng SW, Lin GM, Tian JL, Yang CB, et al. Folic acid-conjugated organically modified silica nanoparticles for enhanced targeted delivery in cancer cells and tumor in vivo. *J Mater Chem B.* 2015;3(29):6081-93.
156. Prasad R, Aiyer S, Chauhan DS, Srivastava R, Selvaraj K. Bioresponsive carbon nano-gated multifunctional mesoporous silica for cancer theranostics. *Nanoscale.* 2016;8(8):4537-46.
157. Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, Lin VSY. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliver Rev.* 2008;60(11):1278-88.
158. Asefa T, Tao Z. Biocompatibility of mesoporous silica nanoparticles. *Chem Res Toxicol.* 2012;25(11):2265-84.
159. Wei Y, Gao L, Wang L, Shi L, Wei ED, Zhou BT, et al. Polydopamine and peptide decorated doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles as a targeted drug delivery system for bladder cancer therapy. *Drug Deliv.* 2017;24(1):681-91.
160. Cha BG, Jeong JH, Kim J. Extra-Large Pore Mesoporous Silica Nanoparticles Enabling Co-Delivery of High Amounts of Protein Antigen and Toll-like Receptor 9 Agonist for Enhanced Cancer Vaccine Efficacy. *ACS Central Sci.* 2018;4(4):484-92.
161. Shahabi S, Doscher S, Bollhorst T, Treccani L, Maas M, Dringen R, et al. Enhancing Cellular Uptake and Doxorubicin Delivery of Mesoporous Silica Nanoparticles via Surface Functionalization: Effects of Serum. *ACS Appl Mater Inter.* 2015;7(48):26880-91.
162. Chen Y, Chen HR, Guo LM, He QJ, Chen F, Zhou J, et al. Hollow/Rattle-Type Mesoporous Nanostructures by a Structural Difference-Based Selective Etching Strategy. *ACS Nano.* 2010;4(1):529-39.
163. Fang XL, Chen C, Liu ZH, Liu PX, Zheng NF. A cationic surfactant assisted selective etching strategy to hollow mesoporous silica spheres. *Nanoscale.* 2011;3(4):1632-9.

164. Teng ZG, Su XD, Zheng YY, Sun J, Chen GT, Tian CC, et al. Mesoporous Silica Hollow Spheres with Ordered Radial Mesochannels by a Spontaneous Self-Transformation Approach. *Chem Mater*. 2013;25(1):98-105.
165. Saroj S, Rajput SJ. Etoposide encased folic acid adorned mesoporous silica nanoparticles as potent nanovehicles for enhanced prostate cancer therapy: synthesis, characterization, cellular uptake and biodistribution. *Artif Cell Nanomed B*. 2018;46:S1115-S30.
166. Porta F, Lamers GEM, Morrhayim J, Chatzopoulou A, Schaaf M, den Dulk H, et al. Folic Acid-Modified Mesoporous Silica Nanoparticles for Cellular and Nuclear Targeted Drug Delivery. *Adv Healthc Mater*. 2013;2(2):281-6.
167. Pieper S, Langer K. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles - a systematic evaluation of preparation techniques and parameters. *Mater Today-Proc*. 2017;4:S188-S92.
168. Washington KE, Kularatne RN, Biewer MC, Stefan MC. Combination Loading of Doxorubicin and Resveratrol in Polymeric Micelles for Increased Loading Efficiency and Efficacy. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018;4(3):997-1004.
169. Shahabi S, Doscher S, Bollhorst T, Treccani L, Maas M, Dringen R, et al. Enhancing Cellular Uptake and Doxorubicin Delivery of Mesoporous Silica Nanoparticles via Surface Functionalization: Effects of Serum. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(48):26880-91.
170. Jiang S, Hua L, Guo Z, Sun L. One-pot green synthesis of doxorubicin loaded-silica nanoparticles for in vivo cancer therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018;90:257-63.
171. Shen J, He Q, Gao Y, Shi J, Li Y. Mesoporous silica nanoparticles loading doxorubicin reverse multidrug resistance: performance and mechanism. *Nanoscale*. 2011;3(10):4314-22.
172. Kumar R, Kulkarni A, Nabulsi J, Nagesha DK, Cormack R, Makrigiorgos MG, et al. Facile synthesis of PEGylated PLGA nanoparticles encapsulating doxorubicin and its in vitro evaluation as potent drug delivery vehicle. *Drug Deliv Transl Re*. 2013;3(4):299-308.
173. Shi SX, Chen F, Cai WB. Biomedical applications of functionalized hollow mesoporous silica nanoparticles: focusing on molecular imaging. *Nanomedicine-Uk*. 2013;8(12):2027-39.

174. Zhou HY, Chen XG, Liu CS. Preparation, characteristics and biocompatibility of chitosan-based thermosensitive hydrogels as drug delivery system. *Journal of Biotechnology*. 2008;136:S421-S2.
175. Trewyn BG, Giri S, Slowing II, Lin VSY. Mesoporous silica nanoparticle based controlled release, drug delivery, and biosensor systems. *Chem Commun*. 2007(31):3236-45.
176. Manzano M, Colilla M, Vallet-Regi M. Drug delivery from ordered mesoporous matrices. *Expert Opin Drug Del*. 2009;6(12):1383-400.
177. Jafari S, Derakhshankhah H, Alaei L, Fattahi A, Varnamkhasti BS, Saboury AA. Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic/diagnostic applications. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:1100-11.
178. Qu W, Meng B, Yu YY, Wang SW. Folic acid-conjugated mesoporous silica nanoparticles for enhanced therapeutic efficacy of topotecan in retina cancers. *Int J Nanomed*. 2018;13:4379-89.
179. AbouAitah K, Swiderska-Sroda A, Farghali AA, Wojnarowicz J, Stefanek A, Gierlotka S, et al. Folic acid-conjugated mesoporous silica particles as nanocarriers of natural prodrugs for cancer targeting and antioxidant action. *Oncotarget*. 2018;9(41):26466-90.
180. Chen H, Shien K, Suzawa K, Tsukuda K, Tomida S, Sato H, et al. Elacridar, a third-generation ABCB1 inhibitor, overcomes resistance to docetaxel in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2017;14(4):4349-54.
181. Xiao H, He J, Li XX, Li B, Zhang L, Wang Y, et al. Polymeric nanovesicles as simultaneous delivery platforms with doxorubicin conjugation and elacridar encapsulation for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer. *J Mater Chem B*. 2018;6(45):7521-9.
182. Chen DZ, Pan XL, Xie FY, Lu Y, Zou H, Yin C, et al. Codelivery of doxorubicin and elacridar to target both liver cancer cells and stem cells by polylactide-co-glycolide/d-alpha-tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate nanoparticles. *Int J Nanomed*. 2018;13:6855-70.
183. Giacone DV, Carvalho VFM, Costa SKP, Lopes LB. Evidence That P-glycoprotein Inhibitor (Elacridar)-Loaded Nanocarriers Improve Epidermal Targeting of an Anticancer Drug via Absorptive Cutaneous Transporters Inhibition. *J Pharm Sci-U*. 2018;107(2):698-705.
184. Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Wu XY. Simultaneous delivery of doxorubicin and GG918 (Elacridar) by new Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles (PLN)

for enhanced treatment of multidrug-resistant breast cancer. *J Control Release*. 2006;116(3):275-84.


185. Khosravian P, Ardestani MS, Khoobi M, Ostad SN, Dorkoosh FA, Javar HA, et al. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid/methionine for active targeted delivery of docetaxel. *Oncotargets Ther*. 2016;9:7315-30.

186. Zhu YF, Fang Y, Kaskel S. Folate-Conjugated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> Hollow Mesoporous Spheres for Targeted Anticancer Drug Delivery. *J Phys Chem C*. 2010;114(39):16382-8.



## 8. EKLER

## EK-1: Turnitin Dijital Makbuz



**Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Hayrettin Tonbul  
 Assignment title: tez  
 Submission title: DOKSORUBİSİN VE ELAKRİDAR İÇ..  
 File name: TEZ\_EnstitÄ¼.docx  
 File size: 11.93M  
 Page count: 140  
 Word count: 23,208  
 Character count: 166,080  
 Submission date: 05-Oct-2019 05:53PM (UTC+0300)  
 Submission ID: 1186577044

T.C.  
SACHTIPE ÜNİVERSİTESİ  
MÜHÜRÜMÜHÜR ENSTİTÜSÜ

DOKSORUBİSİN VE ELAKRİDAR İÇİN PULASİKA NİBET  
NANOPARTİKÜLERİN FORMÜLASYONU VE NİME KANMERİDÖGE  
ETİNCİLİKİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Hayrettin Tonbul

Farmasötik Tezlik Programı  
BÖYÜKBAŞI

05082019  
05:53

Copyright 2019 Turnitin. All rights reserved.

## EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Çalışması

DOKSORUBİSİN VE ELAKRİDAR İÇEREN PLGA/SİLİKA  
HİBRİT NANOPARTİKÜLLERİN FORMÜLASYONU VE MEME  
KANSERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

## ORIGINALITY REPORT

<b>5%</b>	<b>2%</b>	<b>0%</b>	<b>4%</b>
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

<b>1</b>	<b>Submitted to Hacettepe University</b> Student Paper	<b>2%</b>
<b>2</b>	<b>www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</b> Internet Source	<b>2%</b>
<b>3</b>	<b>Submitted to TechKnowledge Turkey</b> Student Paper	<b>&lt;1%</b>
<b>4</b>	<b>Submitted to Marmara University</b> Student Paper	<b>&lt;1%</b>
<b>5</b>	<b>Submitted to Gaziantep Aniversitesi</b> Student Paper	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<b>Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi</b> Student Paper	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>Submitted to Anadolu University</b> Student Paper	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<b>www.frontiersin.org</b> Internet Source	<b>&lt;1%</b>

## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Hayrettin TONBUL

**Yazışma Adresi:** İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Malatya

**e-mail:** hayrettintonbul@hotmail.com, hayrettin.tonbul@inonu.edu.tr  
hayrettintonbul@hacettepe.edu.tr,

**Eğitim:**

**Lisans: 2009-2015**

Yakındoğu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Lefkoşa, KKTC (İngilizce)

**Doktora: 2015-...**

Hacettepe Üniversitesi, Farmasötik Teknoloji Doktora Programı, Ankara

**Akademik ve Mesleki Deneyim:**

**(2016-...)**

Araştırma Görevlisi

İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

**Yayınlar**

**SCI ve SCI-E indekslerine giren makaleler**

1. M. ARGAN, E. TOPAL, M. H. CELİKSOY, M. S. KAYNAK, Y. DUMAN, S. DEMİRTAS, C. ALATAS, **H. TONBUL**, Z. H. OKMEN & H. M. DALKİLİC, Independent predictive factors for the persistence and tolerance of cow's milk allergy, INTERNATIONAL FORUM OF ALLERGY & RHINOLOGY, 2019, 2042-6976, 9, 1, 67-71.
2. **H. TONBUL**, G. ULTAV, S. AKBAŞ, A. ŞAHİN, Y. AKTAŞ, Y. ÇAPAN, Synthesis of Small-Sized Mesoporous Silica Nanoparticles by Experimental Design and Characterization for Further Drug Delivery, LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY 2019, 38(1) (makale basım aşamasında).

**Alan indeksleri (EI, ECONLIT, CCI, CMCI, IM, CIJE, DI, Pub.Med. Scopus, vb) kapsamındaki dergilerde yayınlanmış makaleler**

1. E. TOPAL, M. ARGAN, M. H. CELİKSOY, M. S. KAYNAK, Y. DUMAN, S. DEMİRTAS, C. ALATAS, **H. TONBUL** & H. M. DALKİLİC, Demographics and clinical characteristic of patients diagnosed with hen's egg allergy, ANNALS OF MEDICAL RESEARCH, 2018, 1300-1744, 26, 1, 1-4.
2. A. SAHİN, S. C. TOKTAŞ, **H. TONBUL**, F. YERLİKAYA, Y. AKTAS, Y. CAPAN, Development of Paclitaxel and Flurbiprofen Co-Loaded PLGA Nanoparticles: Understanding Critical Formulation and Process Parameters Using Plackett-Burman Design, ISTANBUL JOURNAL OF PHARMACY, 2019 (makale basım aşamasında).

**Bildiriler**

**Poster Bildirileri (Uluslararası)**

1. **H. TONBUL**, A. ŞAHİN, M. S. KAYNAK, Y. ÇAPAN, Development And In Vitro Evaluation Of Transferrin Targeted Plga Nanoparticles, 18th International Pharmaceutical Technology Symposium (18th IPTS), 18-21 September 2016, Antalya-Turkey.

2. **H. TONBUL**, S. AKBAŞ, G. ULTAV, A. ŞAHİN, M. S. KAYNAK, Y. AKTAŞ, Y. ÇAPAN, Synthesis And Characterization of Silica Nanoparticles: Obtaining Nanoparticles Smaller Than 100 Nm, Poster Sunumu, 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), 11-13 October 2017, Ankara-Turkey.
3. G. ULTAV, S. AKBAŞ, **H. TONBUL**, A. ŞAHİN, Y. ÇAPAN, Development And In Vitro Evaluation of Ph Triggered Hollow Silica Nanoparticles as A Drug Delivery System, Poster Sunumu, 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), 11-13 October 2017, Ankara-Turkey.
4. S. AKBAŞ, G. ULTAV, **H. TONBUL**, A. ŞAHİN, Y. ÇAPAN, Characterization of Bevacizumab By Dynamic Light Scattering Technique, Poster Sunumu, 2nd International Gazi Pharma Symposium Series (GPSS-2017), 11-13 October 2017, Ankara-Turkey.
5. **H. TONBUL**, S. AKBAS, G. ULTAV, A. SAHİN, Y. AKTAŞ, Y. ÇAPAN, Developmet And Evaluation of Silica Nanoparticles Using A Quality By Design Approach, EUFEPS (European Federation for Pharmaceutical Sciences) Annual Meeting, 24-26 May 2018, Athens-Greece.
6. **H. TONBUL**, S. AKBAS, G. ULTAV, A. SAHİN, Y. AKTAŞ, Y. ÇAPAN, In Vitro Evaluation of Paclitaxel Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles, EUFEPS (European Federation for Pharmaceutical Sciences) Annual Meeting, 24-26 May 2018, Athens-Greece.
7. S. AKBAŞ, G. ULTAV, **H. TONBUL**, A. ŞAHİN, Y. ÇAPAN, A Comperison of PLGA Nanoparticle Preparation Methods For Bevacizumab Encapsulation, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-12), 26-29 June 2018, Ankara-Turkey.
8. **H. TONBUL**, G. ULTAV, S. AKBAŞ, A. ŞAHİN, E. TAVUKCUOĞLU, Y. AKTAŞ, G. ESENDAĞLI, Y. ÇAPAN, Preperation, Characterization, Cytotoxicity Evaluations of Folic Acid Conjugated Mezoporous Silica Nanoparticles, 19th International Pharmaceutical Technology Syposium (19th IPTS), 17-19 September 2018, Antalya-Turkey.
9. **H. TONBUL**, S. AKBAŞ, G. ULTAV, A. ŞAHİN, Y. ÇAPAN, Reversal of Drug Resistance in Emt6/Ar1 Cell Line By A Chemical Modulator: Elacridar, International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD)-2019, 1-3 July 2019, Malatya-Turkey.
10. **H. TONBUL**, G. ULTAV, S. AKBAŞ, A. ŞAHİN, E. TAVUKCUOĞLU, Y. AKTAŞ, G. ESENDAĞLI, Y. ÇAPAN, Folic Acid Conjugated Mesoporous Silica Nanoparticles for Enhanced Therapeutic Efficacy of Doxorubicin in Breast Cancer, 8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 14-16 October 2019, İzmir-Turkey. *(Bildiri kabul aldı, kongre henüz gerçekleştirilmedi)*
11. S. AKBAŞ, G. ULTAV, A. ŞAHİN, E. TAVUKÇUOĞLU, **H. TONBUL**, G. ESENDAĞLI, Y. ÇAPAN, Preparation of Active Targeted Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles With Oleyl Cysteineamide, 8th BBBB Conference on Pharmaceutical Sciences, 14-16 October 2019, İzmir-Turkey. *(Bildiri kabul aldı, kongre henüz gerçekleştirilmedi)*

**Sözlü Bildiriler (Ulusal)**

1. **H. TONBUL**, A. ŞAHİN, N. ÖZTÜRK, İ. VURAL, M. S. KAYNAK, Y. ÇAPAN, Transferrine Hedeflendirilmiş Paklitaksel Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Meme Kanserindeki Etkinliği, 1. Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Sempozyumu (ANES), 1-2 Haziran 2017, Eskişehir-Türkiye.

**Katıldığı Bilimsel Toplantılar**

1. 18th International Pharmaceutical Technology Symposium (18th IPTS), 18-21 September 2016, Antalya-Turkey.
2. TÜFTAD 25.Yıl "İlaçta İnavasyon ve Ar-Ge", 5-6 Mayıs 2017, Ankara, Türkiye
3. 1. Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Sempozyumu (ANES), 1-2 Haziran 2017, Eskişehir-Türkiye.
4. GPSS 2017: 2nd Gazi Pharma Symposium Series, 11-13 October 2017, Ankara, Turkey.
5. 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-12), 26-29 June 2018, Ankara-Turkey.
6. 19th International Pharmaceutical Technology Symposium, 17-19 September 2018, Antalya, Turkey.
7. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development (DRD)-2019, 1-3 July 2019, Malatya-Turkey.