MANYETİK NANO-SİKLODEKSTRİN-LİPOZOM ANTİ-KANSER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE KONTROLLÜ SALIM DAVRANIŞININ İNCELENMESİ

ERDAL ERTAŞ

TEMMUZ 2022

DİYARBAKIR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MANYETİK NANO-SİKLODEKSTRİN-LİPOZOM ANTİ-KANSER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE KONTROLLÜ SALIM DAVRANIŞININ İNCELENMESİ

ERDAL ERTAŞ

DİCLE ÜNİVERSİTESİ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM-ÖĞRETİM VE SINAV YÖNETMELİĞİNİN BİR PARÇASI OLARAK
KİMYA ANABİLİM DALINDA
DOKTORA TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

TEMMUZ 2022

DİYARBAKIR

MANYETİK NANO-SİKLODEKSTRİN-LİPOZOM ANTİ-KANSER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE KONTROLLÜ SALIM DAVRANIŞININ İNCELENMESİ

Erdal ERTAŞ tarafından Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin bir parçası olarak hazırlanan bu çalışma, aşağıda bilgileri yazılı jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek **Kimya Anabilim Dalı**'nda **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Neslihan DALKILIÇ
Müdür, **Fen Bilimleri Enstitüsü** _____

Prof. Dr. Bilsen TURAL
Danışman, **Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi** _____

Sınav Jürisi:

Prof. Dr. Sema ERDEMOĞLU **(*)**
Kimya Bölümü, İnönü Üniversitesi _____

Prof. Dr. Bilsen TURAL **(**)**
Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi _____

Prof. Dr. Burhan ATEŞ
Kimya Bölümü, İnönü Üniversitesi _____

Prof. Dr. Veysel TOLAN
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
Dicle Üniversitesi _____

Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL
Kimya Bölümü, Dicle Üniversitesi _____

ONAY

Savunma Tarihi: 05/07/2022

(*) Sınav Jürisi kısmının birinci satırına Jüri Başkanının bilgilerini yazınız.
(**) Sınav Jürisi kısmının ikinci satırına Tez Danışmanının bilgilerini yazınız.

Babama ve Anneme…

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tez çalışmasında yer alan tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu beyan ederim. Ayrıca, bahse konu bu kural ve ilkelerin gerektirdiği üzere, bu çalışmada özgün olmayan tüm bilimsel içerikleri kurallara uygun biçimde alıntılayıp kaynak gösterdiğimi beyan ederim. Beyanımla çelişen herhangi bir delil bulunduğu takdirde tüm sorumluluğu üstleneceğimi kabul ederim.

Erdal ERTAŞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmasının gerçekleştirilmesi ve hazırlama sürecimin her aşamasında büyük bir özveri ile bana her konuda destek olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yol gösteren, bu süreçte desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilimsel çalışmalarımı gerçekleştirebilmem adına her türlü olanağı sağlayan sabır ve hoşgörüsüyle danışmanlığımı yapan çok değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Bilsen TURAL'a,

Doktora eğitim çalışmalarım süresince, bilgi birikimlerini ve deneyimlerini benimle paylaşarak desteklerini benden esirgemeyen değerli hocam, sayın Prof. Dr. Servet TURAL'a,

Bu tez çalışması kapsamında sitotoksisite ve hücre kültürü deneylerinin yürütülebilmesi için her türlü olanağı sağlayan, laboratuvarının kapısını bizen açan ve bilgisine her zaman saygı duyduğum İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi değerli hocam sayın Prof. Dr. Burhan ATEŞ ve ekibine, özellikle çalışma boyunca emeğini ve özverisini esirgemeyen sayın Ali KURUÇAY'a,

Tez İzleme Komisyonunun üyeleri olan sayın Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL ve Prof. Dr. Veysel TOLAN'a,

Deneysel çalışmalarımda büyük katkılarda bulunan sayın Dr. Öğr. Üyesi Alican BİLDEN'ne, Öğr. Gör. Murat YALMAN'a, Dr. Fatih ÇAKIR'a, Dr. Ahmet İsmail ÖZKAN'a, Dr. Murat Evcil'e, Dr. Osman UÇ'a ve Mehmet ÇAVDAR'a

Bu tez çalışmasını 2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Program ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na ve 100/2000 bursiyer programı ile Yüksek Öğretim Kurumu (YÖK)'na,

ve tabi ki, bu zorlu ve yorucu çalışma sürecinde göstermiş oldukları özveri ve hassasiyetlerinden ötürü, her zaman destekleri ve varlıkları ile beni mutlu eden en değerli varlığım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR v

İÇİNDEKİLER vi

ŞEKİLLER LİSTESİ x

TABLOLAR LİSTESİ xiv

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ xv

ÖZET xix

ABSTRACT xxi

1. GİRİŞ 1

1.1 Kanser 3

1.1.1 Kansere yol açan nedenler 4

1.1.2 Kanser aşamaları 6

1.1.3 Kanser türleri 7

1.1.4 Kanserin güncel tedavi yöntemleri 7

1.1.4.1 Kemoterapi 8

1.1.4.2 Ameliyat 9

1.1.4.3 Radyasyon tedavisi 10

1.1.4.4 Hormonal tedavi 11

1.1.4.5 Hedefe yönelik tedavi 11

1.1.4.6 İmmünoterapi 12

1.1.5 Nanotıp 12

1.1.6 Kanser tedavisi için hedefe yönelik ilaç taşınımı 14

1.1.6.1Pasif hedefleme 15

1.1.6.2 Aktif hedefleme 16

1.1.6.3 Manyetik alan bazlı hedefleme 17

1.2 Lipozomlar 18

1.2.1 Lipozomların bileşenleri 20

1.2.1.1 Fosfolipitler…….20

1.2.1.2 Kolesterol…….22

1.2.2 Lipozomların sınıflandırılması……..……..…….23

1.2.2.1 Boyutuna göre sınıflandırılma……..23

1.2.3 Bileşime ve ilaç taşınımına göre lipozomlar…..……..25

1.2.4 Nanolipozom…….……..26

1.2.5 Lipozomların hazırlanma yöntemleri...…….……..27

1.2.5.1 Mekanik dispersiyon yöntemi…….28

1.2.5.2 Solvent dispersiyon yöntemi……...…29

1.2.5.3 Deterjan uzaklaştırma yöntemi……29

1.2.6 Lipozomlarda ilaç yükleme…….30

1.2.6.1 Pasif yükleme teknikleri……..30

1.2.6.2 Aktif yükleme teknikleri……..31

1.2.7 Lipozomların hedefleme stratejileri.....…….……..31

1.2.7.1 Pasif hedefleme…….……..32

1.2.7.2 Aktif hedefleme…….……..33

1.2.8 Lipzomların karakterizasyon yöntemleri....……..……....34

1.2.9 Lipozomların avantajları ve dezavantajları..…….…….…….35

1.2.10 Lipozomların uygulamaları…….…….…….36

1.3 Siklodekstrinler……..……..37

1.3.1 Siklodekstrinlerin yapısı…….…….....……38

1.3.2 Siklodekstrinlerin özellikleri…….…….....…….……41

1.3.3 Siklodekstrinlerin uygulamaları…….…….....…….……43

1.3.4 Siklodekstrinlerin inklüzyon kompleksleri……..…….....…….45

1.3.5 Bazı yeni dağıtım sistemlerinin tasarımında siklodekstrin uygulamaları.…46

1.4 Topotekan…….47

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR……...50

3. MATERYAL VE METOT.....63
3.1 Materyal.....63
3.1.1 Reaktifler ve kimyasallar.....63
3.1.2 Cihazlar ve aletler.....64
3.2 Metotlar.....64
3.2.1 Karakterizasyon.....65
3.2.1.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR).....65
3.2.1.2 Ultraviyole-görünür bölge spektrofotometre (UV-Vis).....65
3.2.1.3 Yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC).....65
3.2.1.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....66
3.2.1.5 Titreşimli örnek manyetometresi (VSM).....66
3.2.1.6 Geçirmeli elektron mikroskobu (TEM).....67
3.2.2 Sentez Prosedürleri.....67
3.2.2.1 Manyetik nanoparçacıkların (Fe_3O_4) sentezi.....68
3.2.2.2 Manyetik β-siklodekstrin (Fe_3O_4@β-CD) sentezi.....68
3.2.2.3 Lipozom sentezi.....70
3.2.3 Topotekan (TPT) yükleme çalışmaları.....70
3.2.3.1 Stok ve standart çözeltilerin hazırlanması..... 70
3.2.3.2 TPT'nin Fe_3O4@β-CD nanoparçacıklarına yükleme çalışmaları.....73
3.2.3.3 TPT ve Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin lipozoma yükleme çalışmaları.....73
3.2.4 TPT'nin Fe_3O_4@β-CD'ye yükleme parametrelerinin optimizasyonu.....74
3.2.4.1 pH çalışmaları.....74
3.2.4.2 Miktar çalışmaları.....75
3.2.4.3 Derişim çalışmaları.....75
3.2.5 İlaç salım çalışmaları.....76
3.2.6 Sitotoksisite çalışmaları.....76
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....78

4.1 Karakterizasyonlar……...78
4.1.1 FTIR analizi……..……..…….78
4.1.2 Titreşimli numune manyetometresi (VSM) analizi……...……..……..81
4.1.3 Parçacık boyutu dağılımı ve zeta potansiyel analizi…….……..82
4.1.4 Geçirmeli elektron mikroskobu (TEM) analizi…..…….…..……..88
4.1.5 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi……..……..92
4.1.6 Enerji dağılım X-ışını spektrometresi (EDX) analizi……..94
4.1.7 Optik mikroskop analizi……..…….……..96
4.1.8 Topotekan yükleme çalışmaları……..……..……..97
4.1.8.1 Optimum pH ve süre belirleme çalışmaları……..…..……97
4.1.8.2 Fe_3O_4@β-CD'nin miktarının belirlenmesi çalışmaları...…….……..99
4.1.8.3 TPT derişiminin etkisini belirleme çalışmaları……..……99
4.1.8.4 İlaç salım çalışmalarının sonuçları ….……..…..……..……100
4.1.9 Sitotoksisite sonuçları…….……..……101
4.1.10 Optik mikroskop görüntüleri……..……102
4.1.10.1 24. saat optik mikroskop görüntüleri …….…..……..……102
4.1.10.2 48. saat optik mikroskop görüntüleri……...……..……105
4.1.10.3 72. saat optik mikroskop görüntüleri……...……..……108
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER……..117
KAYNAKLAR…….120
ÖZGEÇMİŞ.....140

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1 Kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi 8
Şekil 1.2 Ameliyat türleri 9
Şekil 1.3 Kanseri teşhis etmek için ameliyat prosedürü 10
Şekil 1.4 Kanseri evrelemek için ameliyat prosedürü 10
Şekil 1.5 Nanoparçacıkların kanser hücrelerine pasif ve aktif olarak hedeflenmesi…17
Şekil 1.6 Manyetik alan bazlı ilaç hedefleme prensibi 18
Şekil 1.7 Lipozomun yapısı.....19
Şekil 1.8 Lipozomların hazırlanmasında kullanılan yaygın fosfolipitler.....21
Şekil 1.9 Kolesterolün kimyasal yapısı.....23
Şekil 1.10 Lipozomların şematik sınıflandırması.....25
Şekil 1.11 Lipozom hazırlama yöntemlerinin sınıflandırılması.....27
Şekil 1.12 Lipozomların mekanik dispersiyon yöntemi ile hazırlanması.....28
Şekil 1.13 Banyo sonikasyon ile lipozomun hazırlanması.....29
Şekil 1.14 Lipozomların solvent dispersiyon yöntemi ile hazırlanması 29
Şekil 1.15 Lipozomların deterjan uzaklaştırma yöntemi ile hazırlanması.....30
Şekil 1.16 İlaçların terapötik etkinliğini arttırmak için lipozomların bir tümöre pasif ve aktif hedefleme stratejilerinin şematik gösterimi 32
Şekil 1.17 α, β ve γ-CD'in kimyasal yapısı ve konformasyonu.....38
Şekil 1.18 Hidrofobik iç boşluğa ve hidrofilik dış yüzeye sahip α, β ve γ-CD toroidlerin toroidal şeklini ve göreli boyutlarını gösteren şematik çizim 39
Şekil 1.19 Hidrofobik (apolar) boşluğun birincil ve ikincil hidroksil kenarlarının yerleşimini gösteren siklodekstrin toroid 39
Şekil 1.20 İki CD yüzü üzerindeki boşluğu, birincil ve ikincil yüzleri ve birincil ve ikincil hidroksil gruplarının dağılımını gösteren şematik gösterim.....40
Şekil 1.21 Siklodekstrinlerin çeşitli uygulamaları.....44
Şekil 1.22 Topotekanın kimyasal yapısı 47
Şekil 2.1 F7-TPT-TSL'nin oluşum süreci ve yapısının şematik gösterimi ve hipertermi ile kombine kemoterapideki uygulamaları.....52
Şekil 2.2 β-CD-MNP, sitrat kaplı β-CD-MNP ve irinotekan yüklenmiş sitrat kaplı β-CD-MNP'nin şematik gösterimi.....56

Şekil 2.3 Geleneksel ve ilaç-siklodekstrin kompleksinin lipozom ile ilaç taşınımının şematik gösterimi.....59
Şekil 2.4 TOP'u içine alan, jelatin bir kabukla kaplanmış ve hedefleme ligandı olarak folik asit (FA) ile süslenmiş MSN'lerden oluşan tümör hedefli TOP nanosisteminin şematik gösterimi.....60
Şekil 2.5 Asetallenmiş α-CD'ye (Ac- α-CD) dayalı pH'a duyarlı PTX nanoaparçacık yapısının şematik gösterimi.....61
Şekil 3.1 Fe_3O_4 sentezinin şematik olarak gösterimi.....68
Şekil 3.2 Fe_3O_4@β-CD sentezinin gösterimi 69
Şekil 3.3 Fe_3O_4@β-CD sentezinin şematik olarak gösterimi.....69
Şekil 3.4 Lipozom sentezinin şematik olarak gösterimi 70
Şekil 3.5 2-25 µg/mL derişim aralığında karboksilat form için kalibrasyon grafiği…71
Şekil 3.6 pH 10'da karboksilat form için HPLC kromatogramı 71
Şekil 3.7 5-50 µg/mL derişim aralığında lakton form için kalibrasyon grafiği 72
Şekil 3.8 pH 4'te lakton form için HPLC kromatogramı……72
Şekil 3.9 TPT'nin Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklara yüklenmesi…….73
Şekil 3.10 TPT'nin lipozoma yüklenmesi……..……..…74
Şekil 3.11 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin lipozoma yüklenmesi……74
Şekil 3.12 TPT'nin analizinde kullanılan UV-Vis kalbirasyon grafiği……75
Şekil 4.1 Fe_3O_4'ün FTIR spektrumu…….. 78
Şekil 4.2 β-CD'nin FTIR spektrumu…….. 79
Şekil 4.3 Fe_3O_4@β-CD'nin FTIR spektrumu……. 80
Şekil 4.4 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin FTIR spektrumu…… 81
Şekil 4.5 Fe_3O_4'ün manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi 82
Şekil 4.6 Fe_3O_4@β-CD'nin manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi 82
Şekil 4.7 Fe_3O_4'ün boyut dağılım grafiği.....83
Şekil 4.8 Fe_3O_4@β-CD'nin boyut dağılım grafiği 84
Şekil 4.9 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin boyut dağılım grafiği 84
Şekil 4.10 Lipozom-TPT'nin boyut dağılım grafiği.....85
Şekil 4.11 Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin boyut dağılım grafiği 85
Şekil 4.12 Fe_3O_4'ün zeta potansiyel ölçüm grafiği.....86
Şekil 4.13 Fe_3O_4@β-CD'nin zeta potansiyel ölçüm grafiği 87
Şekil 4.14 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin zeta potansiyel ölçüm grafiği 87

Şekil 4.15 Lipozom-TPT'nin zeta potansiyel ölçüm grafiği.....87
Şekil 4.16 Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin zeta potansiyel ölçüm grafiği……88
Şekil 4.17 Fe_3O_4 nanopartiküllerin 50 nm skalada TEM görüntüsü 89
Şekil 4.18 Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllerin 20 nm skalada TEM görüntüsü……..…90
Şekil 4.19 Fe_3O_4@β-CD-TPT nanopartiküllerin 20 nm skalada TEM görüntüsü…..91
Şekil 4.20 Lipozom ve Lipozom-TPT'nin 50 ve 100 nm skalada TEM görüntüleri..92
Şekil 4.21 Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin 50 ve 100 nm skalada TEM görüntüleri……...92
Şekil 4.22 Fe_3O_4'ün 500 nm'deki SEM görüntüsü.....93
Şekil 4.23 Fe_3O_4@β-CD'nin 500 nm'deki SEM görüntüsü 93
Şekil 4.24 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin 500 nm'deki SEM görüntüsü 94
Şekil 4.25 Fe_3O_4'ün EDX spektrumu 94
Şekil 4.26 Fe_3O_4@β-CD'nin EDX spektrumu…… 95
Şekil 4.27 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin EDX spektrumu.....96
Şekil 4.28 Lipozomun optik mikroskop ile elde edilen görüntüsü.....97
Şekil 4.29 24. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 103
Şekil 4.30 24. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 103
Şekil 4.31 24. saate MCF-7 hücre hatlarına Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 104
Şekil 4.32 24. saatte MCF-7 hücre hatlarına TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 104
Şekil 4.33 24. saatte MCF-7 hücre hatlarına Lipozom-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 105
Şekil 4.34 48. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 105
Şekil 4.35 48. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri…….106
Şekil 4.36 48. saate MCF-7 hücre hatlarına Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 107

Şekil 4.37 48. saatte MCF-7 hücre hatlarına TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 107
Şekil 4.38 48. saatte MCF-7 hücre hatlarına Lipozom-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 108
Şekil 4.39 72. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 108
Şekil 4.40 72. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri…….109
Şekil 4.41 72. saate MCF-7 hücre hatlarına Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 110
Şekil 4.42 72. saatte MCF-7 hücre hatlarına TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 110
Şekil 4.43 72. saatte MCF-7 hücre hatlarına lipozom-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri 111
Şekil 4.44 MCF-7 hücre hattında Fe_3O_4@β-CD'in 24., 48. ve 72. saatte derişime bağlı % canlılık değerleri 112
Şekil 4.45 MCF-7 hücre hattında TPT'in 24., 48. ve 72. saatte derişime bağlı canlılık % değerleri 113
Şekil 4.46 MCF-7 hücre hattında Fe_3O_4@β-CD-TPT'in 24., 48. ve 72. saatte derişime bağlı % canlılık değerleri 114
Şekil 4.47 MCF-7 hücre hattında Lipozom-TPT'in 24., 48. ve 72. saatte derişime bağlı % canlılık değerleri 115
Şekil 4.48 MCF-7 hücre hattında Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'in 24., 48. ve 72. saatte derişime bağlı % canlılık değerleri 116

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1 Lipozomların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan fosfolipitler ve geçiş sıcaklıkları 22
Tablo 1.2 Bileşim ve ilaç taşınım yöntemine göre sınıflandırılan lipozomların özellikleri.....26
Tablo 1.3 Lipozomal özelliklerin değerlendirilmesi için kullanılan analitik teknikler 34
Tablo 1.4 Kimyasal olarak değiştirilmiş CD'ler ve kısaltmaları 41
Tablo 1.5 Siklodekstrinlerin fiziksel özellikleri ve moleküler boyutları 42
Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar ve aletler.....64
Tablo 4.1 Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT nanoparçacıkların parçacık boyut dağılımı ve zeta potansiyel değerleri……..……83
Tablo 4.2 Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT nanoparçacıkların EDX analiz sonuçları.....….96
Tablo 4.3 Fe_3O_4@β-CD'ye topotekanın yüklenme HPLC analiz sonuçları……98
Tablo 4.4 Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllerine topotekan yükleme, zamana karşı %tutunan TPT sonuçları.…….....98
Tablo 4.5 Fe_3O_4@β-CD'ye tutunan TPT derişimi ve % ilaç yükleme verimi……..……99
Tablo 4.6 Fe_3O_4@β-CD için miktara karşı tutunan ilaç derişimi ……..….99
Tablo 4.7 Topotekan derişiminin yükleme verimliliğine etkisi……100
Tablo 4.8 Fe_3O_4@β-CD nanoparçacık için pH ve süreye bağlı % salınan TPT ilacının gösterilmesi……..……101
Tablo 4.9 Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD@TPT nanoparçacıkların MCF-7 hücre hattı üzerinde IC_{50} değeri ……..…...…….102

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

Simge	Açıklama
%	Yüzde
nm	Nanometre
pH	Asitlik veya Bazlık Derecesi
mRNA	Haberci RNA
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
IC_{50}	İnhibe Edici Konsantrasyon (%50)
cDNA	Tamamlayıcı DNA
cm	Santimetre
Tc	Geçiş Sıcaklığı
µm	Mikrometre
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
g	Gram
L	Litre
°C	Santigrat Derece
Å	Angström
mM	Milimol
~	Yaklaşık
mg	Miligram
mL	Mililitre
µg	Mikrogram
rpm	Çalkalama Hızı

Kısaltma	Açıklama
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
EBV	Epstein–Barr virüsü
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
AJCC	Amerikan Ortak Kanser Komitesi
TNM	Tümör Nod Metastaz
ACS	Amerikan Kanser Derneği
Dr	Doktor
EPR	Gelişmiş Geçirgenlik ve Tutma
DDS	İlaç Dağıtım Sistemi
MCF-7	İnsan Meme Adenokarsinoma Hücreleri
ER	Östrojen Reseptörü
PR	Progesteron Reseptörü
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
IHC	İmmünohistokimya (IHC)
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
BT	Bilgisayarlı Tomografi
KKMM	Kendi Kendine Meme Muayenesi
CBE	Klinik Meme Muayenesi
DLPC	Dilauril fosfatidilkolin
DSPC	Distearoil Fosfatidilkolin
DOPC	Dioleolilfosfatidilkolin
DMPC	Dimiristoil Fosfatidilkolin
DMPE	Dimiristoil Fosfatidiletanolamin
DLPE	Dilauril Fosfatidiletanolamin
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilkolin
DOPE	Dioleoil Fosfatidiletanolamin
DLPG	Dilauril Fosfatidilgliserol
DSPS	Distearoil Fosfatidil Serin
DSPE	Distearoil Fosfatidiletanolamin
HSPC	Hidrojenlenmiş Soya Fosfatidil Kolin

DMPG	Dimiristoil Fosfatidil Gliserol
DSPG	Distearoil Fosfatidil Gliserol
POPC	Palmitoil-Oleoil Fosfatidil Kolin
MLV	Çok Lamelli Veziküller
SUV	Küçük Tek Lamelli Veziküller
LUV	Büyük Tek Lamelli Veziküller
OLV	Oligolamelli Veziküller
MVL	Multiveziküler Lipozom
PE	Fosfatidiletanolamin
PEG	Polietilen Glikol
P-NMR	Fosfor-Nükleer Manyetik Rezonans
Cryo-TEM	Kriyojenik-TEM
SAXS	Küçük açılı X-ışını saçılması
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
NTA	Nanoparçacık İzleme Analizi
FFF	Alan Akışı Fraksiyonasyonu
SEC	Boyut Dışlama Kromatografisi
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
LDE	Lazer Doppler Elektroforezi
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
TGA	Termogravimetrik Analiz
EPR	Elektron Paramanyetik Rezonans
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
XRD	X-Ray Kırınımı
UV–Vis	Ultraviyole-görünür
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
UPLC	Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi
ESR	Elektron Spin Rezonansı
^{1}H-NMR	Hidrojen-Nükleer Manyetik Rezonans
CD	Siklodekstrin
TOP1	Topoizomeraz 1
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

TPT	Topotekan
FA	Folik Asit
EE	Kapsülleme Etkinliliği
MNP	Manyetik Nanoparçacık
CPT-11	İrinotekan
PTX	Paklitaksel
FBS	Fetal Bovine Serum
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ATR	Zayıflatılmış Toplam Yansıma
BSE	Geri Saçılan Elektronlar
SE	İkincil Elektronlar
ODTÜ	Orta Doğu Teknik Üniversitesi
VSM	Titreşimli Örnek Manyetometresi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
MTT	3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NM	Nanomalzeme
ROS	Reaktif Oksijen Türleri

ÖZET

MANYETİK NANO-SİKLODEKSTRİN-LİPOZOM ANTİ-KANSER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE KONTROLLÜ SALIM DAVRANIŞININ İNCELENMESİ

Ertaş, Erdal

Doktora, Kimya Bölümü

Danışman: Prof. Dr. Bilsen TURAL

Temmuz 2022, 164 sayfa

Kanser, 21. yüzyılda kardiyovasküler rahatsızlıklardan sonra ikinci sırada yer alan en ölümcül hastalıklardan biridir. Hücrelerin hasar görmesi ve mutasyona uğraması sonucunda kontrolsüz bölünmelerinden kaynaklanmaktadır. Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda hem en sık görülen hem de en öldürücü kanser tipidir. Kanserli hücrelerin tedavi edilmesinde en önemli problem, özellikle kemoterapide kullanılan ilaçların kanser hücreleri için düşük seçicilik göstermesi ve sağlıklı hücreleri de etkileyerek birçok yan etkiye neden olmasıdır. Bu durumun ortadan kaldırılması için hedefe yönelik ilaç taşıma sistemleri öncelikli olarak çalışılmaktadır. Günümüzde aktif hedeflendirme yöntemleriyle beraber biyouyumlu ve biyo-bozunur manyetik nanoparçacık ve manyetik siklodekstrin-lipozomdan oluşturulan ilaç yüklü taşıma sistemleri meme kanserinin tedavi edilmesinde ümit verici bir yaklaşım sunmaktadır. Bu bölgede sürekli ilaç salınımını sağlamasıyla, sadece ilacın tedavi edici etkisini arttırmakla kalmayıp aynı zamanda istenilmeyen yan etkilerin azaltılması da hedeflenmektedir. Topotekan başta yumurtalık kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri olmak üzere meme kanseri ve prostat kanseri tedavisinde en yaygın kullanılan anti-kanser ilaçlardan kamptotesin analoğu olup topoizomeraz I inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Asidik koşullar altında aktif lakton form ve nötral veya alkali pH'da hidroliz ile inaktif karboksilat form baskındır Lakton halkasının açılması ile aktivite kaybolmakta ve yüksek toksik etki görülmektedir. Bundan dolayı çalışılması zor olan ilaçlardan biridir.

Bu tez çalışmasında manyetik β-siklodekstrin-topotekan (Fe_3O_4@βCD-TPT) inklüzyon kompleksleri (hidrofilik topotekan) hazırlanmış ve hem saf topotekan hem de kompleksleri ayrı ayrı lipozomlara hapsedilmiştir. Daha sonra insan meme kanseri (MCF-7) hücre dizilerinde in vitro sitotoksisite açısından değerlendirilmiştir. Manyetik olarak hazırlanan Fe_3O_4@β-CD-TPT kompleksleri ile Fe_3O_4@β-CD içinde topotekanın tutulmasının optimizasyonu sağlanmıştır. İnklüzyon kompleksleri UV-Vis spektroskopisi, geçirmeli elektron mikroskobu (TEM), dinamik ışık saçılımı spektrometresi (DLS) ve fourier dönüşümlü infrared spektrometresi (FTIR) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak doğrulanmıştır. Fe_3O_4@β-CD-TPT komplekslerinin suda çözünürlüğü belirgin şekilde iyileşmiş ve komplekslerin sonikasyon yaklaşımı kullanılarak hazırlanan lipozomlara başarılı bir şekilde kapsüllenmesi de sağlanmıştır. Lipozomal formülasyonlar, topotekan ve Fe_3O_4@β-CD-TPT kompleksi partikül boyutu, zeta potansiyel, yakalama etkinliği ve stabilite açısından karakterize edilmiştir. Topotekan, Fe_3O_4@β-CD-TPT kompleksi ve bunların optimize edilmiş lipozomal formları, meme kanseri (MCF-7) kanser

hücre dizilerinde sitotoksisite açısından değerlendirilmiştir. Test edilen tüm topotekan içeren formların, MTT analizi ile belirlendiği üzere, hücre çoğalmasını inhibe etmede etkili olduğu gözlenmiştir. Tüm topotekan formları için medyan etkili doz (IC_{50}), test edilen meme kanseri hücre dizileri için düşük µg/mL aralığında bulunmuştur. Sonuçlarımız, topotekan gibi pH duyarlı ilaçların Fe_3O_4@β-CD inklüzyon komplekslerinin lipozomlar gibi biyouyumlu veziküller içinde tutulabileceğini doğrulamaktadır ve bu onların antikanser aktivitelerini uzun süreye yaydığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Topotekan, Kanser, Siklodekstrin, Lipozom, Manyetik İlaç Taşınımı

ABSTRACT

MAGNETIC NANO-CYCLODEXSTRIN-LIPOSOME ANTI-CANCER DRUG CARRIER SYSTEM PREPARATION, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF CONTROLLED RELEASE BEHAVIOR

Ertaş, Erdal
Phd in Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Bilsen TURAL

July 2022, 164 pages

Cancer is one of the deadliest diseases in the 21st century, second only to cardiovascular diseases. It results from uncontrolled division of cells as a result of damage and mutation. Breast cancer is both the most common and the deadliest type of cancer in women worldwide. The most important problem in the treatment of cancerous cells is that the drugs used in chemotherapy show low selectivity for cancer cells and cause many side effects by affecting healthy cells. In order to eliminate this situation, targeted drug delivery systems are primarily studied. Today, drug-loaded delivery systems formed from biocompatible and biodegradable magnetic nanoparticles and magnetic cyclodextrin-liposome together with active targeting methods offer a promising approach in the treatment of breast cancer. By providing continuous drug release in this region, it is aimed not only to increase the therapeutic effect of the drug, but also to reduce the unwanted side effects. Topotecan is an analog of camptothecin, which is one of the most widely used anti-cancer drugs in the treatment of breast cancer and prostate cancer, especially ovarian cancer and small cell lung cancer, and acts as a topoisomerase I inhibitor. The active lactone form under acidic conditions and the inactive carboxylate form by hydrolysis at neutral or alkaline pH dominate. Therefore, it is one of the difficult drugs to study.

In this thesis study, magnetic β-cyclodextrin-topotecan (Fe_3O_4@βCD-TPT) inclusion complexes (hydrophilic topotecan) were prepared and both pure topotecan and its complexes were individually confined to liposomes. It was then evaluated for in vitro cytotoxicity in human breast cancer (MCF-7) cell lines. Optimization of topotecan retention in Fe_3O_4@β-CD was achieved with magnetically prepared Fe_3O_4@β-CD-TPT complexes. Inclusion complexes were verified using UV-Vis spectroscopy, transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering spectrometry (DLS) and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR), and high performance liquid chromatography (HPLC). The water solubility of the Fe_3O_4@β-CD-TPT complexes was significantly improved and successful encapsulation of the complexes into liposomes prepared using the sonication approach was also achieved. Liposomal formulations, topotecan and Fe_3O_4@β-CD-TPT complex were characterized for particle size, zeta potential, capture efficiency and stability. Topotecan, the Fe_3O_4@β-CD-TPT complex and their optimized liposomal forms were evaluated for cytotoxicity in breast cancer (MCF-7) cancer cell lines. All tested topotecan-containing forms were found to be effective in inhibiting cell proliferation, as determined by MTT analysis. The median effective dose (IC_{50}) for all topotecan forms was in the low μg/mL range for the breast cancer cell lines tested. Our results

confirm that Fe_3O_4@β-CD inclusion complexes of pH-sensitive drugs such as topotecan can be entrapped in biocompatible vesicles such as liposomes, suggesting that they extend their anticancer activity over a long period of time.

Keywords: Topotecan, Cancer, Cyclodextrin, Liposome, Magnetic Drug Delivery

1. GİRİŞ

Tıp alanındaki bilim ve teknoloji, kanserli hücreleri inhibe etmek için optimum stratejiler geliştirmeye devam etmektedir. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi yaygın kanser tedavileri, uygulama alanındaki başarısızlıkları ile yan etkilerinin varlığı ciddi manada zorluk teşkil etmektedir. Kanser tedavisindeki bu zorlukları aşmak için yeni stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır. Nanoteknoloji ve nanotıp kanser tedavisi için yeni fırsatlar sunmaktadır (Kuo vd., 2016; Hardiansyah vd., 2017).

Günümüzde nano ilaç taşıyıcılarında büyük ilerlemeler görülmüş olup bu alanda çoğunlukla lipozomlar (Jhaveri vd., 2018), nanopartiküller (Ashfaq vd., 2017), mikroküreler (albümin mikroküreler, jelatin mikroküreler, etilselüloz mikroküreler, nişasta mikroküreler) (Thakare vd., 2017; Nouri vd., 2019) ve dendrimer (Bello vd., 2017) gibi taşıyıcılar kullanılmaktadır. Ek olarak, ayrıca hücre zarları ve eksozomlar gibi ilaç taşıyıcıları üzerinde de çalışmalar devam etmektedir. (Reyes-Ruiz vd., 2019; Su vd., 2020). Böylece nano dağıtım sistemleri kullanılarak, birden fazla ilacın birlikte taşınması, ilacın biyoyararlanımını artırabilir ve spesifik olmayan toksisitelerini azaltma olanağı sunabilir.

Lipozomlar hem iyi biyouyumluluk ve biyobozunurluğa hem de düşük toksisiteye sahip parçacıklardır (Mu vd., 2017; Johnsen vd., 2018). Lipozomların yüzeyi, yarı ömürlerini uzatan oligosakaritler, glikoproteinler, polisakaritler ve sentetik polimerler gibi inert polimer molekülleri ile kaplanabilir (Zhang vd., 2016; Li vd., 2017). Kontrollü bir süreç kullanılarak hem yağda çözünen hem de suda çözünen ilaçları 100-200 nm boyutlarındaki partiküller hazırlanabilir. Bu lipozomları kullanarak, toksisiteyi azaltmak için kan dolaşımında retiküloendotelyal sistemin fagositozundan kaçınılabilir (Jain & Jain, 2016). İlaçların lipozomlardan salınması nispeten yavaş olduğundan, ilaçların tümör bölgesinde hızlı ve spesifik olarak salınmasına izin veren pH, sıcaklık, ultrason, fotodinamik dönüşüm ve mikrodalgalar (Jin vd., 2016) dahil olmak üzere ilaç salınımını iyileştirmek için çeşitli ajanlar kullanılmaktadır.

Manyetik nanopartiküllerin (MNP'lerin) kullanımı, Manyetik Rezonans Görüntülemede (MRI) kontrast ajanları olarak FDA ve diğer uluslararası düzenleyici kurumlar tarafından onaylanmıştır (Arbab vd., 2006; Bao vd, 2013). Bu nanoparçacıkların çok işlevli karakteri, yalnızca MRI'da bir kontrast maddesi olarak değil, aynı zamanda ilacı vücudun belirli bir bölgesine taşıyan manyetik olarak

yönlendirilen bir araç olarak da görev görebilmektedir. MNP'lerin kullanımı ilacın lokal etkisini artırabilir ve böylece hastaya olan yan etkiler en aza indirebilir.

Siklodekstrinler, biyomedikal uygulamalar için çok işlevli fiziko-kimyasal özelliklere sahip, MNP'ler ile birleştirilebilir, yüksek suda çözünme, stabilite ve organizma içinde daha yüksek bir biyoyararlanımı destekleyen inklüzyon komplekslerinin oluşumuna izin veren oligosakkaritlerdir. Literatür, topotekan gibi bazı kemoterapötik ajanların farmakolojik etkinliğini arttırmak için siklodekstrin bazlı supramoleküler sistemleri kullanan bazı stratejiler bildirmektedir (Badruddoza vd., 2013; Huang vd., 2014; Anirudhan vd., 2015).

Topotekan (TPT), kamptotesinin hidrofilik bir analoğudur. Yumurtalık, prostat, meme, küçük hücreli akciğer ve rahim ağzı kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan antikanser bir ilaçtır (Grahn vd., 2009; Chen vd., 2016). TPT fizyolojik koşullarda kararsızdır ve kapalı bir lakton halkasından inaktif karboksillenmiş forma pH'a bağlı hızlı ve geri dönüşümlü bir şekilde hidrolize uğrar. Bu yönü ile TPT, antitümör aktivitesini kaybeder. TPT'yi hidrolizden korumak için, siklodekstrin ve lipozom kullanılmaktadır. (Hao vd., 2005). TPT'nin manyetik siklodekstrin lipozomal kapsüllenmesi ile ilacın tümörlü dokuya daha fazla ve daha uzun süreli nüfus etmesi hem doku maruziyetini artırmakta hem de sistemik olarak temizlenmesini zorlaştırmaktadır (Seleci vd., 2017).

Bu tez çalışmasında manyetik β-siklodekstrin-topotekan (Fe_3O_4@βCD-TPT) inklüzyon kompleksleri (hidrofilik topotekan) üretilerek hem doğal topotekan hem de inklüzyon kompleksleri ayrı ayrı lipozomlara hapsedildi. Daha sonra bu yapılar in vitro koşullarda insan meme kanseri (MCF-7) hücre hatlarında sitotoksisite çalışmalarına alındı ve bu açıdan değerlendirmeler yapıldı. Manyetik olarak hazırlanan Fe_3O_4@β-CD-TPT kompleksleri ile Fe_3O_4@β-CD yapılarının içindeki topotekan tutulumunun optimizasyonu sağlandı. İnklüzyon kompleksleri UV-Vis spektroskopisi, geçirmeli elektron mikroskobu (TEM), dinamik ışık saçılımı spektrometresi (DLS), fourier dönüşümlü infrared spektrometresi (FTIR) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak doğrulandı. Fe_3O_4@β-CD-TPT komplekslerinin suda çözünürlüğü belirgin şekilde iyileşmiş ve komplekslerin sonikasyon yaklaşımı kullanılarak hazırlanan lipozomlara başarılı bir şekilde yakalanması da sağlanmıştır. Lipozomal formülasyonlar, topotekan ve Fe_3O_4@β-CD-TPT kompleksi partikül boyutu, zeta potansiyel, yakalama etkinliği ve stabilite açısından karakterize edildi.

Topotekan, Fe_3O_4@β-CD-TPT kompleksi ve bunların optimize edilmiş lipozomal formları, meme kanseri (MCF-7) kanser hücre dizilerinde sitotoksisite açısından değerlendirildi. Test edilen tüm topotekan içeren yapılar, bir MTT analizi ile belirlendiği üzere hücre çoğalmasını inhibe etmede etkili olduğu gözlemlendi. Tüm topotakan yapıları için medyan etkili dozun (IC_{50}), test edilen meme kanseri hücre dizileri için düşük µg/mL aralığında bulundu. Sonuçlarımız, topotekan gibi pH duyarlı ilaçların Fe_3O_4@β-CD inklüzyon komplekslerinin lipozomlar gibi biyouyumlu veziküller içinde tutulabileceğini doğrulamaktadır ve bu özellikleri ile bu yapıların antikanser aktivitelerini uzun süreye yaydığını göstermektedir. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar ile lipozomal manyetik siklodekstrin nanopartiküllerin potansiyel kemoterapötik uygulamalar için kontrollü topotekan taşınımı için potansiyel olarak kullanılabileceği fikrini desteklemektedir.

1.1 Kanser

Ulusal Kanser Enstitüsü ve Dünya Sağlık Örgütüne göre kanser; hücresel, biyokimyasal ve enzimatik parametrelerdeki değişikliklerin eşlik ettiği hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucunda vücuttaki herhangi bir bölgeyi etkileyebilen ve daha sonraki bir aşamada metastaz adı verilen bir süreçle vücudun farklı bölgelerine yayılabilen anormal hücre büyümesini içeren geniş bir hastalık grubunu temsil etmek için kullanılan genel bir terimdir (WHO, 2018). Dünya genelinde kalp ve damar hastalıklarından sonra kanser ikinci en büyük ölüm nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Lees vd., 2021). Dahası, kanser, yaşam düzenleyicisi olan hücresel yollardaki hataların birikmesinden kaynaklanan üç aşamalı bir süreçtir (Andima, 2020). İlk aşama (başlangıç evresi), tek bir somatik hücrenin, karsinojen adı verilen fiziksel veya kimyasal ajanların bir veya birkaçına maruz kalması üzerine genlerde anormalliklere neden olduğunda ortaya çıkar (Mahmood ve Srivastava, 2022). İkinci aşamada (tanıtım evresi), başlatılan hücreler çeşitli faktörlerle etkileşime girerek büyümeleri için uyarılır. Genlerde indüklenen anormallikler, anormal bir hücrenin oluşumuyla sonuçlanmakta, çoğalmakta ve komşu normal hücrelere göre hayatta kalabilmek için ek değişiklikler kazanmaktadır. Üçüncü aşama (ilerleme evresi), kanser oluşturan milyarlarca anormal hücre oluşturmak için değiştirilmiş hücrelerin çoğalmasını içerir. Preneoplastik hücrelerde iyi tanımlanmış morfolojik, moleküler ve

fonksiyonel değişikliklerin eşlik ettiği karsinogenez de karmaşık bir aşamadır (Andima, 2020).

Bu hastalık durumunda, Ulusal Kanser Enstitüsüne göre ‘‘hücrelerin olması gerekenden daha fazla bölündüğünde veya olması gerektiği zaman yok olmadığında ortaya çıkan anormal bir doku kütlesidir.’’ diye tabir edilen tümörler oluşmaktadır. Tüm tümörlerin kanserli olmadığını ve tüm kanserlerin tümör oluşturmadığını belirtmek önemlidir (Örn, Lösemi). Tümör kanserli olmadığında iyi huylu ve kanserli olduğunda ise kötü huylu olarak adlandırılmaktadır (Grumezescu, 2019).

Karsinom, sarkom, lösemi, lenfoma ve multipl miyelom gibi birçok kanser türü vardır. Aralarındaki fark, kanserin meydana geldiği yerdir. Üstelik kanser hücrelerinin ilk kez ortaya çıktığı doku etkilenen tek doku değildir, çünkü kanser hücreleri kan ve lenf sistemlerine ulaştıktan sonra vücuda yayılmakta ve bu da metastaz oluşumuna neden olmaktadır (Zarif vd., 2019).

Ulusal Kanser Enstitüsü'ne göre, 2040 yılına gelindiğinde kanser kaynaklı vaka sayısının 29,5 milyona ölüm sayısının ise 16 milyona çıkması öngörülmektedir (Malik vd., 2021). Bu istatistikler, 18,1 milyon vakanın bildirildiği ve yalnızca 9,6 milyon kansere bağlı ölümün kaydedildiği 2018'e kıyasla, teşhis edilen vakaların yüzdesinin 2040'da %70 ve ölüm sayısının %80 artacağını göstermektedir (Bray vd., 2018; Shah vd., 2019; Parham vd., 2021). Erkeklerde ve kadınlarda teşhis edilen en yaygın kanserler akciğer, prostat, meme, kolorektal, karaciğer, rahim ağzı ve mide kanserleridir.

Ayrıca kanser, sosyal, ekonomik ve politik bir sorunu temsil etmektedir (Ginsburg vd., 2017). Kanser teşhisi konan hastalardaki artış endişe verici boyutlara ulaşmıştır ve yüksek kaliteli tıbbi bakım ve tedaviye ihtiyaç duyulmasının tıbbi alanda bir zorunluluk olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu hastalığın neden olduğu ölümler, mevcut tedavilerin zayıf etkinliğinden kaynaklanmaktadır (Coleman, 2014).

1.1.1 Kansere yol açan nedenler

Morbiditesi yüksek hastalıklarda, hastalığı tedavi etmektense önlemek tercih edilen bir durum olsa da kanser türlerinin yarısından fazlasının nedenleri bilinmediğinden önlem alınamamaktadır (Coleman, 2014). Kanserin nedenleri ile ilgili olarak 1909 yılından

beri çalışmalar yürütülmekte olup 1949 yılında Strong ve arkadaşları tarafından kanserin tek bir mutasyon sonucu meydana geldiği varsayılmıştır. 1951'de Nordling ve arkadaşları, kanserin birikmiş mutasyon tarafından indüklendiğine dair başka bir teori öne sürmüş ve bu teori "çok aşamalı karsinojenez teorisi" veya Knudson hipotezi olarak bilinmektedir (Hiller vd., 2017).

2004'te Armitage ve Doll, Nordling'in (1953) fikrini genelleştirip kanserin **n** mutasyonun nihai sonucu olmadığını **n** evrenin nihai sonucu olduğunu belirtmişlerdir. Bu teori, bazı değişikliklerin genetik olmadığını ve kanser öncesi değişikliklerin hücresel modifikasyonların bir sonucu olabileceğini göstermektedir.
Karsinojenezin çok aşamalı hipotezi, 60 yıldan uzun süredir epidemiyolojik kanser modellemesinin odak noktasında kalmıştır. Armitage ve Doll (2004) ve Nordling (1953), ölüm oranının 1950'lerde meydana gelenden daha sağlam bir ölçüm olduğuna inandıkları için zamana karşı kanser ölümlerini hesaba kattılar. Burkitt lenfomasının %90'ından fazlası Epstein-Barr virüsünden (EBV) kaynaklanır. Bu virüs ayrıca, nazofaringeal ve mide karsinomu, Hodgkin lenfoma veya lenfoma ve bozulmuş bağışıklık sistemi kanserli hastalar için lenfoproliferatif hastalıkların ortaya çıkmasının nedenidir (Hiller vd., 2017).

Helicobacter pylori, hepatit B ve C enfeksiyonları ve insan papillomavirüsleri (HPV) kayda değer ölçüde mide, karaciğer ve servikal tümörlere neden olmaktadır. Önceki on yılda kanserin önlenmesindeki en önemli gelişmeler arasında göze çarpan bir nokta, HPV aşısının ortaya çıkması ve servikal hastalığı önceden tahmin etmek için kullanılmasıydı. Ayrıca, hepatit B virüsüne karşı aşı da bir önleme yöntemi olarak kabul edilmiştir. Çeşitli kanser türlerine (pankreas, özofagus, böbrek, endometriyum, kolorektal ve meme kanserleri gibi) yol açabilecek ana faktörlerden biri, günümüzde dünya çapında birçok klinisyen ve hekim tarafından bir hastalık olarak kabul edilen obezitedir. Ayrıca alkol ve farklı besinler (düşük lifli ürünler veya işlenmiş et) birden çok kanserin, örneğin göğüs, kolorektal, üst solunum yolu veya karaciğer kanserinin ortaya çıkmasında önemli bir rol oynar. Ek olarak, düşük fiziksel aktivite ve anormal vücut kitle indeksinin endometriyal, kolon ve meme kanserleri üzerinde yüksek etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Vineis ve Wild, 2014).

Akciğer kanseri, en yaygın ölümcül kanser türlerinden biridir. Örneğin, 2004 yılında yaklaşık 5,1 milyon ölüm, akciğer kanserinin ana nedeni olan tütün tüketimiyle ilişkilendirilmiştir (akciğer kanserinden etkilenen hastaların %71'i tütün kullanımıyla ilişkilendirilmiştir) (Beaglehole vd., 2011).

1.1.2 Kanser aşamaları

Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC), klinik ve bilimsel araştırmaları raporlamak için evrensel bir standardın kullanımını teşvik etmek amacıyla kanserin evrelenmesine yönelik bir sistem geliştirdi (Bellerive ve Singh, 2019). Farklı evreler kanserin ne kadar ilerlemiş olduğunu yansıtmakta ve temel olarak üç parametreye (kanserin yeri, yayılıp yayılmadığı ve vücudun çeşitli kısımlarını etkileyip etkilemediği gibi) bağlanmaktadır (Greene vd., 2002). Kanserin spesifik evresini belirlemek için doktorlar veya onkologlar, katı tümörler için sıklıkla tümör-beze-yayılma (TNM) evreleme sistemini kullanırlar. Bu sistem şunları içerir:

1) Birincil tümörün (T) boyutu ve yeri/yerleri, bu 1 küçük (0,1-2 cm) ve 4 büyük (<5 cm) olmak üzere 1-4 aralığında olabilir.
2) Tümörün lenf bezelerine yayılım gösterip göstermediğini, varsa nerede ve kaç (N) olduğunu gösterir. N, 0'dan (lenf beze yok) 3'e (kanser hücreleri sunan çok sayıda beze) kadar değişim gösterebilmektedir.
3) Kanser vücudun diğer bölgelerine yayıldı mı eğer öyleyse, nerede ve ne kadar (M) yayıldı? M, 0 değerini alırsa kanser yayılmadı. M, 1 değerini alırsa kanser yayıldı olarak ifade edilir
4) Kanserle bağlantılı, az ya da çok kanserin yayılmasını olası kılan herhangi bir biyobelirteç var mıdır?
5) TNM evreleme sisteminin sonuçları alındıktan sonra kanserin evresi belirlenebilir. Çoğu kanser türünün dört aşaması vardır, I- IV, ancak meme ve cilt kanseri gibi bazılarının 0 aşaması da vardır (Sanchez Vazquez, 2019).

Aşama 0; Bu aşama, kanserin "in situ (yerinde)" olduğunu açıklar. Kanser başladığı yerdedir ve yakın dokulara yayılmamıştır. Bu aşama tümörün ameliyatla çıkarılmasını mümkün kılan tedavi edilebildiği aşamadır.

Aşama I; Bu aşama, kanserin yakın dokulara derinlemesine yayılmadığı ve lenf bezeleri ile birlikte vücudun diğer bölümlerinin etkilenmediği aşamadır. Genellikle "erken kanser evresi" olarak ifade edilmektedir.

Aşama II ve Aşama III; Bu aşamalarda, tümör yakındaki dokuya derinlemesine yayılmış daha büyük tümörlerin gösterildiği aşamaları ifade etmektedir. Tümör lenf bezelerine yayılmış ancak vücudun diğer bölgelerine yayılmamış olabilir.
Aşama IV- Bu aşama, kanserin vücudun diğer organlarına veya bölümlerine yayıldığı "ileri veya metastatik kanser aşaması" olarak da bilinmektedir (Socinski vd., 2003).

Lokalize tümörler için (örneğin Aşama 0 veya I'de), cerrahi, radyoterapi veya fotodinamik terapi gibi tedaviler önerilir. Ancak kanser yayıldığında daha sistemik tedavilere ihtiyaç duyulur, bu tedaviler kemoterapi, hormon tedavisi ve hedefe yönelik kanser ilaçlarından oluşur.

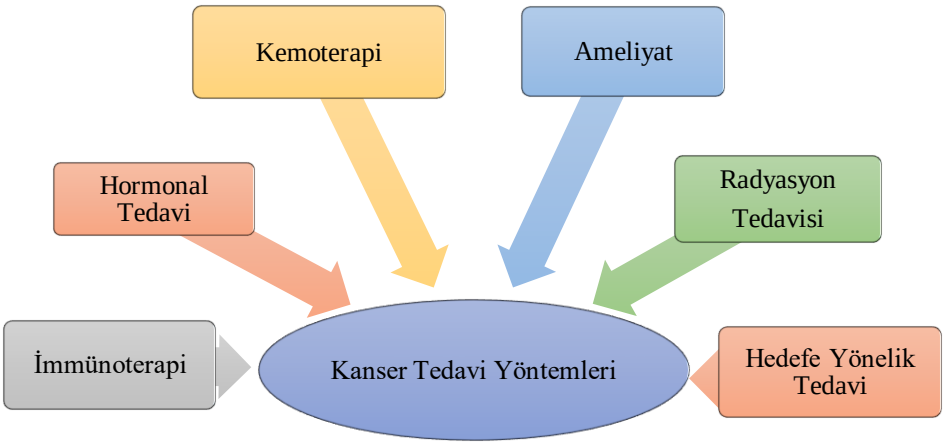
1.1.3 Kanser türleri

Amerikan Kanser Derneği'ne (ACS) göre, dünya çapında milyonlarca hastayı etkileyen birçok kanser türü vardır. Ancak farklı tiplerde lösemi, meme, rahim ağzı, akciğer, karaciğer, mesane, kolorektal, yumurtalık, pankreas, böbrek, kolon ve kemik kanseri en yaygın olanlardır (Siegel vd., 2019).

Ayrıca, zaman içinde bildirilen Castleman hastalığı, endometriyal kanser, yemek borusu ve göz kanserleri, safra kesesi kanseri, gastrointestinal karsinoid ve stromal tümörler, Hodgkin lenfoma, Kaposi sarkomu, gırtlak ve hipofarengeal kanserler, prostat kanseri, nazofarenks kanseri, ağız boşluğu ve orofaringeal, penis, mide, testis, timus, tiroid, rahim, vajina ve vulva kanserleri gibi başka kanser türleri de tespit edilmiştir (Grumezescu, 2019).

1.1.4 Kanserin güncel tedavi yöntemleri

Amerikan Kanser Derneği'ne göre Şekil 1.1'de gösterildiği gibi kanserin tedavisi için yaygın olarak kemoterapi, ameliyat, immünoterapi, hormonal tedavi, radyasyon tedavisi ve hedefe yönelik tedavi gibi çeşitli tedavi yöntemleri kullanılmaktadır.



Şekil 1.1 Kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi (Alavi ve Hamidi, 2019)

1.1.4.1 Kemoterapi

Kemoterapi bir kural olarak, hastalığı tedavi etmek için ilaçların ve narkotik maddelerin kullanılmasını içeren bir tedavi yöntemidir. Kemoterapi ilaçları, asıl olarak hücresel döngüyü temsil eden, hücresel gelişimin çeşitli aşamalarındaki hücreleri hedef alır. Hastalıklı hücreler, sağlıklı hücrelere göre daha hızlı bölünme eğiliminde olup onların kemoterapi ilaçları için bir hedef olmalarını sağlar. Her durumda, kemoterapi ilaçları normal hücreler ile kanser hücreleri arasında ayrım yapamadığından kanser hücreleri ile beraber normal hücrelerin zarar gördüğünü ve yan etkilere neden olabileceğini gösterir (Shaikh vd., 2021).

Kemoterapinin yorgunluk, kusma, saç dökülmesi, depresyon, tromboembolizm, miyalji ve nöropati gibi kısa süreli yan etkileri tedavi süresince ortaya çıkmakta ve genellikle tedavi tamamlandıktan kısa bir süre sonra bu etkiler sona ermektedir (Zhang vd., 2007; Frisk vd., 2012). Kilo alımı, kalp fonksiyon bozukluğu, lösemi ve kognitif bozukluk gibi uzun süreli yan etkiler tedavide daha sonra veya tedavinin tamamlanmasından sonra ortaya çıkmakta ve uzun yıllar sürmektedir (Gebauer vd., 2019).

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi yönteminin üç temel amacı vardır:

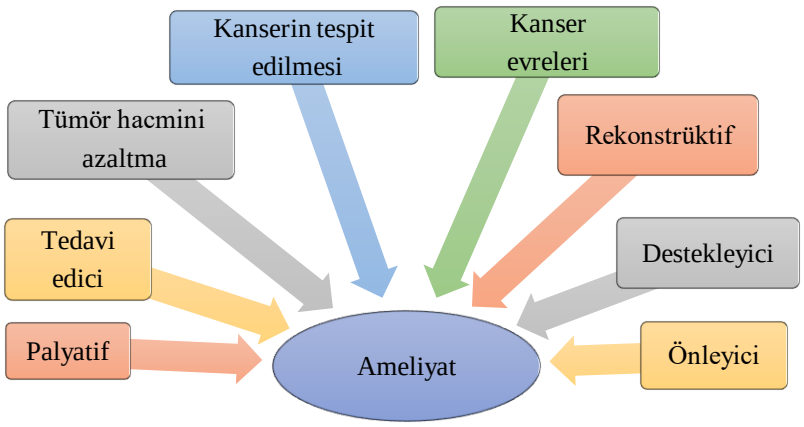
1. Hedef, tedavidir. Başlangıçta bu hedefe ulaşılıp ulaşılamayacağını bilmek imkânsız olsa bile bu, kemoterapinin temel amacıdır ve tedaviden sonra kanserin ortadan kalkmasını içerir ve maalesef çoğu vakada bunu söylemek birkaç yıl alır. Bir kişinin iyileştiğini ve ayrıca tedaviden sonra kanserin nüksetmesinin beklendiğini ve bu

nedenle kemoterapinin kesinlikle iyileşmeyi sağlayan bir tedavi yöntemi olmadığını kabul etmek önemlidir.

2. Eğer bir tedavi mümkün değilse, kanser tedavisinin amacı hastalığı kontrol altına almak olabilir. Bu durumlarda kemoterapi, tümörleri küçültmek ve/veya kanserin büyümesini ve yayılmasını durdurmak için kullanılır. Bu, kanserli kişinin daha iyi hissetmesine ve daha uzun yaşamasına yardımcı olabilir.
3. Palyasyon (hafifletme), kanserin evresi ilerlemiş olduğunda, kemoterapi kanserin semptomlarını azaltmak için kullanılır. Çünkü kanserin son aşamalarında tedavi artık bir seçenek değildir ve kemoterapi, bu hastaların kendilerini daha iyi hissetmelerine yardımcı olabilecek geçici çözüm için önerilen bir tedavidir (Grumezescu, 2019; Zarif vd., 2019).

1.1.4.2 Ameliyat

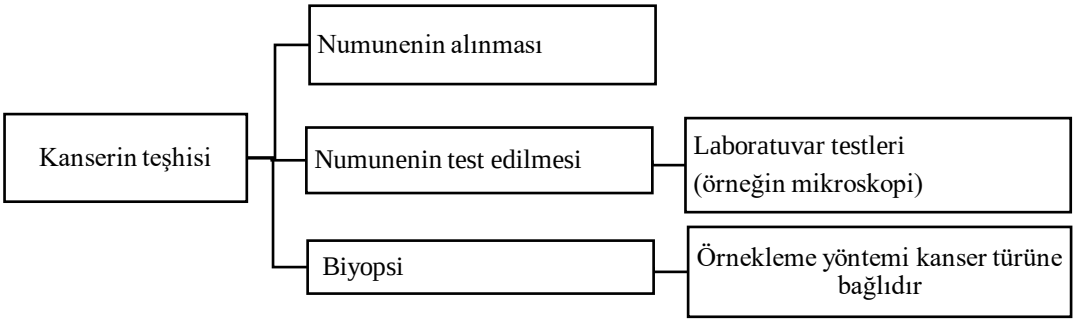
Ameliyat, kanserin tedavi edilmesi için yıllardır kullanılan bir tedavi yöntemidir. Bu tür bir tedavi, kanserin teşhis edilmesinde ve onun vücutta ne kadar yayılmış olabileceğini keşfetmede önemli bir rol üstlenmektedir. Cerrahi sistemlerde ilerleme, uzmanların çok sayıda hastayı ameliyat etmesini ve harika sonuçlar almasını sağlar. Ameliyatlar kullanım amacına göre farklılık göstermekte ve bunlar şematik olarak Şekil 1.2'de gösterilmektedir.



Şekil 1.2 Ameliyat türleri

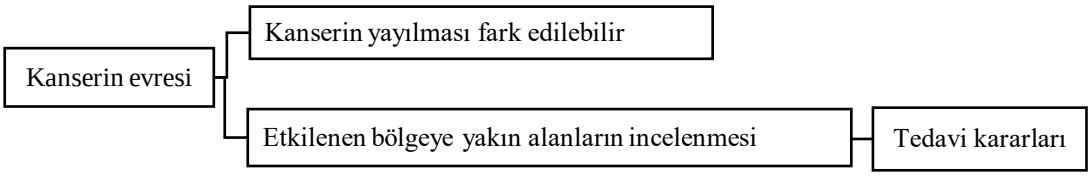
Teşhis amacıyla ameliyat ile etkilenen bir bölgeden çıkarılan dokunun incelenmesi (Şekil 1.3), hastalığın varlığını, nedenini veya kapsamını keşfetmek için yapılır. Hangi bölgede ameliyat yapılırsa yapılsın sonuçta ameliyat bölgesinde bazı

komplikasyonların olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Örneğin, akciğer kanserinin teşhis edilmesi için yapılan biyopsilerde, hava embolisi, pulmoner kanama veya pnömotoraks gibi komplikasyonlar olasıdır (Zarif vd., 2019).



Şekil 1.3 Kanseri teşhis etmek için ameliyat prosedürü (Zarif vd., 2019)

Ayrıca, teşhis için kanser şüphesi olan bölgeden çıkarılan dokunun tanı için uygun olmayabileceğinden de bahsetmek önemlidir, bu nedenle biyopsilerde cerrahlar doğru tanı için tümörden daha fazla örnek almaktadır (Sharma ve Shepard, 2018). Ameliyat yöntemi kanserin hangi evrede olduğunu belirlemek için yapılırsa (Şekil 1.4), incelenen ana konu kanserin yayılım gösterme durumudur. Bu tür cerrahi yöntemde, hastalığın evrim derecesinin daha iyi anlaşılmasına olanak tanımakta ve hastayı tedavi edilmesi için daha iyi bir karar alınabilmektedir.



Şekil 1.4 Kanseri evrelemek için ameliyat prosedürü (Zarif vd., 2019)

1.1.4.3 Radyasyon tedavisi

Radyasyon tedavisi, tümörün bulunduğu bölgeyi yüksek enerjili X ışınları ile ışınlamak ve kanser hücrelerini X ışınlarıyla yok etmek için kullanılan bir yöntemdir. Ayrıca, radyasyon terapisinde X-ışınlarına ek olarak gama ışınlarının, elektron ışınlarının veya protonların kullanılmasıyla kanserli hücrelerin tekrar ortaya çıkması önlenebilir ya da hastalık uzadığında görülen semptomların tedavi edilmesi sağlanabilir.

Radyasyon tedavisi lokal bir tedavi yöntemi olduğu için avantajları ve dezavantajları ortaya çıkmaktadır. En önemli avantajlarından biri, kemoterapi yönteminde olduğu gibi sağlıklı hücrelerin zarar görmemesi ve ilaç kullanılmadığından sistemik yan etkiler görülmes. Bu tedavi yönteminde en önemli dezavantajlardan biri, tümör hücrelerinin tüm vücuda yayıldığı kanser türleri için kullanılamaz çünkü bu tedavi yönteminde vücudun tüm bölgelerine ulaşmak mümkün olamamaktadır (Zarif vd., 2019; Shaikh vd., 2021).

1.1.4.4 Hormonal tedavi

Hormonal tedavi, meme ve prostat kanserleri gibi gelişimsel hormonlardan yüksek oranda etkilenen organ kanserleri için kullanılan etkili bir başka tedavi yöntemidir. 1890'larda Thomas Beatson'ın meme gelişimi ile yumurtalıklar arasındaki ilişkiyi ve yumurtalıklar tarafından metastatik meme kanseri ilerlemesinin "bilinmeyen" bir kontrolünün belirlenmesine ilişkin çalışmasında, yumurtalıkları çıkarıldıktan sonra tavşanların göğüslerinin süt üretmeyi bıraktığını rapor etmiştir (Jayaraman vd., 2021).

Daha sonra araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalar sonucunda, kanser ile ilişkili organdaki bazı kısımların veya damarların çıkarılması durumunda kanserin büyümesinin sınırlı olduğu bazı durumlarda ise kanser gelişiminin durduğu belirtilmiştir. Yapılan bazı çalışmalar neticesinde yeni ilaçların elde edilmesine katkı sunulmuştur (Malik vd., 2021). Bu bağlamda, 1941 yılında Dr. Charles Brenton Huggins'in (1941) prostat kanseri ve testis hormonları arasındaki ilişki üzerine yaptığı çalışmada finasterid ve dutasterid gibi antiandrojenik etkileri olan ilaçların tasarlanmasına katkıda bulunmuştur. Bir somatostatin analoğu olan Octreotid, başlıca gastrointestinal sistem ve bu sistem ile ilişkili yardımcı organların etkilendiği kanserlerin tedavi edilmesinde diğer ilaçlarla kombinasyon halinde uygulanan hormon tedavisi olarak kullanılır (Jayeshkumar vd., 2019).

1.1.4.5 Hedefe yönelik tedavi

Kemoterapi ile tedavi yönteminde kullanılan ilaçların neden olduğu yan etkilerin ortadan kaldırılması ve tümör hücreleri üzerinde spesifik etkiye duyulan ihtiyaç nedeniyle kanser için yeni bir tedavinin geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu gereklilik sonucunda ortaya çıkan hedefe yönelik tedavi, kanser hücreleri ve sağlıklı hücreleri ayırabilen ilaçların kullanıldığı tedavi yöntemidir. Kullanılan bu ilaçlar

kemoterapi olarak kabul edilmesine rağmen etki mekanizması açısından genel olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarından farklılık göstermektedir. Bu tedavi yönteminde kullanılan ilaçlar için de yan etkiler tamamen ortadan kaldırılamamıştır (Zarif vd., 2019).

1.1.4.6 İmmünoterapi

Klinisyenler tarafından günümüzde kullanılan bir başka tedavi kanserli hücrelerin hedef alınması ve yok edilmesi için antikorların ya da spesifik biyomoleküllerin kullanım potansiyelini keşfetmeyi amaçlayan immünoterapi yöntemidir. Bu tedavi yöntemi, 1970'lerde George Jean Franz Köhler ve César Milstein tarafından monoklonal antikorların seri üretiminin mümkün kılınmasıyla ortaya çıkmış ancak kullanılan tedavideki yan etkileri optimize etmek ve incelemek için çalışmalar uzun zaman almıştır (Krukemeyer vd., 2015). İmmünoterapi, aktivasyon immünoterapisi ve baskılayıcı immünoterapi olarak ikiye ayrılmaktadır. Aktivasyon immünoterapisi, kanserli hücrelere karşı savaşmada hastaların kendi bağışıklık sistemini teşvik etmek için kullanılır. Baskılayıcı immünoterapi ise esas olarak otoimmün bozukluklar ve alerjiler için bağışıklık tepkisini azaltmak için kullanılır (Zarif vd., 2019).

1.1.5 Nanotıp

Nanotıp basitçe sağlık hizmetlerinde değişiklikleri gerçekleştirmek için nanoteknolojinin tıbbi uygulaması olarak ifade edilmesidir. Ulusal nanoteknoloji girişimi açıklamasına bakacak olursak nanoteknoloji, 1-100 nm arasında en az bir boyuta sahip maddenin manipüle edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Benzer şekilde, Avrupa Bilim Kuruluşu'na göre nanotıp, hastalıkların teşhis edilmesi, önlenmesi ve tedavisi için nano boyutlu cihazların kullanılması ve hastalıkların altında yatan karmaşık patofizyolojinin daha iyi anlaşılmasını sağlayan bir teknik olarak tanımlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda hedeflenen toplumların kaliteli bir yaşam sürmesini sağlamaktır. Nanomedikal alan, vücutta meydana gelen birçok bozukluğun potansiyel tedavisinin anahtarını elinde bulundurmakla kalmaz, aynı zamanda bizlere nano ölçekte yer alan bu moleküllerin biyolojik etkileri hakkında yeni bir perspektiften bakmamız gerektiğini hatırlatır (Malik vd., 2021).

Nanotıp yeni bir araştırma alanı gibi görünmesine rağmen bu alanın temelleri on yedinci yüzyılda Dr. Francis Anthony ve Nicholas Culpepper tarafından kolloidal altın

ve altın tuzu içeren çözeltilerin kullanılmasına kadar uzanmaktadır (Jayaraman vd., 2021). Bu alanın modern tıbbi uygulamaları, 1908 yılında Nobel ödüllü Sir Élie Metchnikoff ve Dr. Paul Ehrlich tarafından fagositoz ve hücre üzerine spesifik tanı ve tedavi çalışmaları sonucunda biyolojik mekanizmalar için ilaç alımı, immünoloji, hücre sinyalizasyonu ve bağlantısı gibi durumların derinlemesine incelenmesinden sonra gelişim göstermiştir (Astruc, 2015). Yaşadığımız zaman dilimde meydana gelen ilerlemeler ile birlikte hesaplamalı, elektronik ve moleküler gelişmelerle beraber nanoteknoloji, biyomoleküler makine simülasyonlarına, nanoelektronik cihazlara, inert ilaç taşıyıcı sistemlere ve nanobotlara başarıyla entegre edilmiştir. Özellikle, kanser gibi hedeflenmesi zor hastalıklar ve spesifik in vivo görüntüleme uygulamaları için ilaç taşıyıcısı olarak hareket edebilen nanomalzemelerin ve bunların özelliklerinin daha fazla incelenmesi gereklidir. Literatürde nanomalzemeler ve nanoparçacıklar birbirlerinin yerine kullanılan terimler olarak kabul edilmesine rağmen, nanomalzemelerin işlevsel özelliklerini geliştirmek için boyutlarının en az birinde nanoparçacıkları içeren toplu moleküller olduğunu anlamamız gerekir (Buzea vd., 2007).

Nanotıp yeni bir bilimsel disiplin olmasına rağmen, özellikle kısa sürede insan gücünde ve hedefe yönelik terapide önemli bir araştırma olanağı sunar. Bu durumun ana nedeni geleneksel ilaç tedavilerine göre nanotıbbın muazzam avantajlar sunmasından kaynaklanmaktadır (Ventola, 2012; Wang vd., 2013):

- Benzer moleküler boyutlardaki biyomolekül ve nanopartiküllerin varlığından dolayı onları daha ayarlanabilir, tasarlanabilir ve hedefe özel hale getirdiğinden kullanılan ilaçlara karşı bağışıklık tepkisi gibi yan etkilerin olasılığında azalma sağlayabilir
- Genel kullanım alanına sahip olan ilaçların çözünürlük, geçirgenlik ve biyoyararlanım gibi çeşitli reolojik, termodinamik ve metabolik dezavantajlarının üstesinden gelebilmek için özel olarak nanomalzemeler tasarlanabilir.
- Nanoyapılı malzemelerin daha az radyotoksik, güvenilir optik ve elektronik özellikleri sayesinde in vivo görüntüleme uygulamaları için onları avantajlı duruma getirir.

- Nanoilaç taşıyıcı sistemlerin kapsüllenmiş yapısı ve nano boyutları (artan yüzey alanı), onlara yoğun miktarlarda terapötik ilaçları hedefe taşıması için bir avantaj sağladığından hedef hücre üzerinde kayda değer oranda bir etkiye yol açar.
- Sıcaklık veya pH değişimi sırasında meydan gelen baskılara cevap verebilen ve nanoyapı modifikasyonlarına neden olan nanomalzemeler, kontrollü bir ilaç dağıtım stratejisinin temelini oluşturmaktadır.

Nanotıp alanında nanomalzemelerin kullanımı teşhis (görüntüleme ve tıbbi biyosensörler), rejeneratif tıp (kemik ve kıkırdak rejenerasyonu, diş hekimliği, diş çürüğü yönetimi, diş implantları ve hücre kapsülleme), terapi (ilaç dağıtımı, fototerapi, immünoterapi, otoimmün hastalık tedavisi ve kanser immünoterapisi) durumlarını içermektedir (Smolkova vd., 2017).

1.1.6 Kanser tedavisi için hedefe yönelik ilaç taşınımı

Geleneksel tedavi edici etken maddelerin (ilaçların) seçici olmama, istenmeyen yan etkiler, düşük verimlilik ve zayıf biyolojik dağılım gibi dezavantajları bilinmektedir. İlaç taşınım sistemleri (DDS), istenen tedavi edici etkileri elde etmek için farmasötik bileşiklerin insanda uygulanmasına yönelik sistemler ile ilgilidir. DDS'deki gelişmelerin paralelinde suda iyileştirilmiş ilaç çözünürlüğü veya bileşiklerin enzimatik bozulmadan korunması, uzatılmış sistemik dolaşım süresi, yarı ömür ve dağılım hacmi dahil olmak üzere artan tedavi edici indeks, doku ya da hücreye özgü azaltılmış hedef dışı yan etkilerle alım ve kontrollü salım profili gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır (Sala Faig, 2020; Zhang, 2014).

Hedefe yönelik ilaç taşınımı, ilacın, uygulama yeri ve yöntemlerinden bağımsız olarak hedef doku veya organda seçici ve nicel olarak birikme yeteneği olarak ifade edilmesidir. Hedeflenen ilaç dağıtımının amacı, düşük sistemik maruziyet ile birlikte normal dokularda herhangi bir yan etki olmaksızın hedef bölgede yüksek lokal ilaç konsantrasyonları elde etmektir (Hirsjarvi vd., 2011; Mishra vd., 2013). Sonuç olarak, hedefe yönelik ilaç taşınımı, önemli bazı avantajlar sunabilir:
(1) yönetim protokollerinin basitleştirilmesi
(2) tedavi edici bir etki elde etmek için gerekli olan terapi maliyetinde ve ilaç miktarında ciddi azalma

(3) hedef olmayan alanlar üzerinde olumsuz etkiler olmaksızın gerekli bölgelerdeki ilaç konsantrasyonunda keskin artış (Singh vd., 2019).

Genel olarak, hedefe yönelik ilaç taşınım sistemleri, pasif hedefleme, aktif hedefleme ve manyetik alan bazlı hedefleme olmak üzere üç hedefleme yöntemini kapsamaktadır (Attia vd., 2019). Pasif hedefleme, hedefleyici ligandların var olmaması durumunda, tercihen tümör bölgesinde nanoparçacık birikimini ifade etmek için kullanılmaktadır. Nanoparçacığın boyut, şekil, yüzey yükü vb. gibi fizikokimyasal özellikler biriktirme verimliliğin belirlenmesinde önemlidir. Aktif hedefleme, tümörle ilgili doku, hücre veya alt organlara karşı seçiciliği ve afinitesi olan ligandlarla yüzey modifikasyonu yoluyla tümör bölgesinde nanoparçacıkların tercihli birikimini artırabilme olarak ifade edilmesidir. Manyetik alan yönlendirmeli hedefleme, tümör bölgesine dıştan bir manyetik alan uygulayarak akış yönünün yönlendirilmesi için manyetit (Fe_3O_4) gibi manyetik bileşimlere sahip işlevselleştirilmiş nanoparçacıkların ifade edilmesidir (Yang, 2019).

1.1.6.1 Pasif hedefleme

Pasif hedefleme, 1986'da Matsumura ve Maeda tarafından bildirilen gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisine (EPR) dayanmakta (Matsumura ve Maeda, 1986) ve tümör ile normal dokunun farklı özelliklerini kullanmak için tasarlanmıştır. Pasif hedeflemede, ilaçlar tedavi edici bir rol oynamak için hedef bölgeye başarıyla taşınmaktadır. Kanser hücrelerinin orantısız çoğalması neovaskülarizasyona sebep olmakta ve kan akışının olduğu damarlardaki geniş gözenekler, normal damarlara kıyasla tümör damarlarının geçirgenliğinin kötüleşmesine neden olmaktadır (Carmeliet ve Jain, 2000). Hızlı ve yetersiz anjiyogenez nedeniyle tümörü besleyen kan damarlarından nanoparçacıklar da dahil olmak üzere makromoleküllerin sızmasına ve tümör dokusu içinde birikmesine olanak tanımaktadır. Pasif hedefleme, kanserle ilişkili zayıf lenfli süzülme, nanoparçacıkların tutulmasını artırarak nanotaşıyıcıların içeriklerini tümör hücrelerine salmasına izin vermektedir. Bu süreçler, pasif hedeflemenin itici güçlerinden biri olan gelişmiş geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisine neden olmaktadır (Maeda, 2001).

EPR etkisi, nanoparçacıkların boyutundan etkilenmektedir. Çünkü literatürde yer alan çalışmalarda daha küçük nanoparçacıkların daha iyi penetrasyon kabiliyetine sahip

olduğunu ancak normal damarlara sızmadığını göstermiştir (Torchilin, 2005; Caritá vd., 2018). Öte yandan, bağışıklık sistemi tarafından daha büyük parçacıkların uzaklaştırılması daha olası görülmektedir (Sykes vd., 2014). EPR etkisine ek olarak, tümör mikroçevresi de pasif dağıtımında önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Glikoliz olayı, kanser hücrelerinin çoğalması için ana enerji kaynağı ve metabolik özelliklerinden biridir (Pelicano vd., 2006). Tümör mikro ortamının glikoliz olayında asitlik sağlandığından pH'ın düşüşüne neden olmaktadır. Daha sonra, pH'a duyarlı bazı nanoparçacıklar, düşük pH seviyesi tarafından tetiklendiği için kanser hücrelerinin yakınında ilacın salınımına neden olabilmektedir (Lim vd., 2018).
Bununla birlikte, spesifik olmayan ilaç taşınımından dolayı, EPR etkisinin evrensel olmayan varlığı ve çeşitli tümörler arasında kan damarlarının farklı geçirgenliği dahil olmak üzere pasif hedefleme ile ilgili bazı dezavantajlar vardır (Sriraman vd., 2014). Pasif hedefleme Şekil 1.5'te şematik olarak gösterilmektedir.

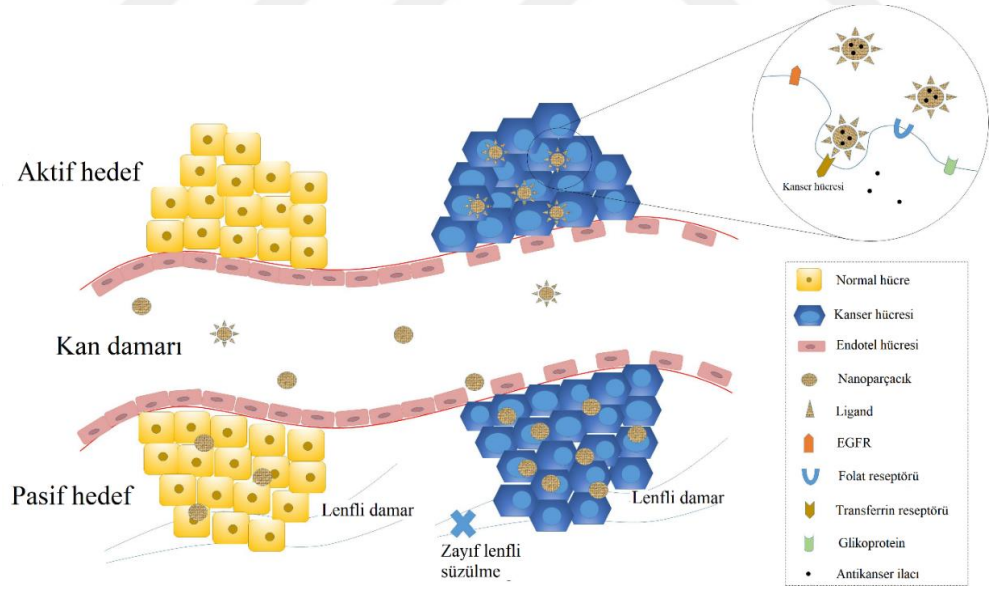
1.1.6.2 Aktif hedefleme

Spesifik olmayan bir strateji olan pasif hedeflemeden farklı olarak aktif ilaç hedefleme, ligand-reseptör, antijen-antikor ve enzim-substrat gibi spesifik biyolojik çiftler/sistemler arasındaki etkileşimleri içeren spesifik bir yaklaşımdır. Aktif hedeflemede, tedavi ediciler ayrıca uyaranlara duyarlı nano taşıyıcılar (sıcaklık, ultrason, manyetik alan) aracılığıyla ilgili hücrelere özel olarak taşınabilir (Fleige vd., 2012; Mura vd., 2013; Himri ve Guaadaoui, 2018).

Aktif hedefleme stratejisi, ilgili hedef tarafından seçici ve özel olarak tanınan ilaç dağıtım sisteminin (DDS) yüzeyine aktif ajanların veya ligandların bağlanmasına dayanır (Şekil 1.5). Bu aktif ajanların/ligandların bağlanması, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştirilebilir ve daha fazla alımı kolaylaştırır. Bu yaklaşım, vücuttaki patolojik hücreler ve spesifik dokularla seçicilik, tanınabilirlik ve etkileşim (bağlanma) potansiyeli sağlar (Minko vd., 2004; Torchilin, 2010).
Fizyolojik koşullarda, bağlanma ilişkili parça-reseptörlerin olması zorunludur. Örneğin tümör hücrelerinde, reseptörler normal hücrelere göre (yüksek oranda) aşırı eksprese edilmekte ve moleküler hedefler, genellikle, tedavi edicilerin bölgeye özel verilmesi için yüzey reseptörlerinin bu tür aşırı ekspresyonuna yönelik olarak kullanılmaktadır. DDS'lerin kullanılması, düşük ekspresyonu olan hücreler üzerinde bile kusursuz etkiler yaratır (Danhier vd., 2010; Muro, 2012).

Hedeflenen hücreler, dokular veya organlar üzerindeki reseptörlere spesifik bağlanma için farmasötikler/ilaçlar veya ilaç nanotaşıyıcıları üzerinde uygun modifikasyonlar ve işlevselleştirme, birkaç hedefleme bileşeninin kullanımını içerebilir. Bunlara peptitler, antikorlar ve bunların parçaları ile şeker kalıntıları, lektinler, vitaminler (yani folat), transferrin, mRNA'lar gibi yapılar dahildir. Hedefleme parçaları, ilaç ve ilaç taşıyıcılarının yalnızca hedeflenen etki bölgelerine uygun bir şekilde ulaşmasını, spesifik olmayan birikim ve hedef bölge ile çevresinde oluşabilecek yan etkilerden kaçınmasını sağlayacaktır (Torchilin, 2000; Ferris vd., 2011; Mahon vd., 2012; Morachis vd., 2012; de Oliveira vd., 2016).

Aktif hedefleme, penetrasyon derecesine bağlı olarak organ seviyesi, hücresel seviye ve hücre altı seviye olarak ayrılabilir. Hücre içi/hücre altı hedefleme için, terapötik maddenin aktif formu, etki mekanizması için hücre içi hedefe ulaşmalıdır. Söz konusu hedefler, endozom, lizozom, endoplazmik retikulum, çekirdek, mitokondri ve hatta mRNA bağlayıcı kompleksler gibi plazma zarı veya hücre bileşenleri üzerinde yer alabilir (Harris vd., 2010; Heller vd., 2012; Lammers vd., 2012; Thanki vd., 2015).

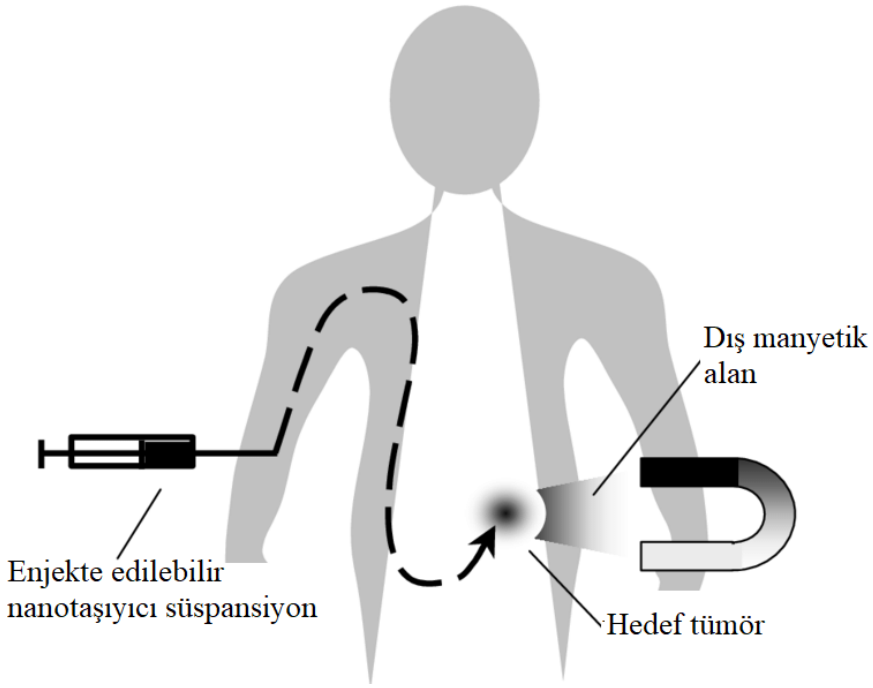


Şekil 1.5 Nanoparçacıkların kanser hücrelerine pasif ve aktif olarak hedeflenmesi (Yao vd., 2020)

1.1.6.3 Manyetik alan bazlı hedefleme

Parçacık ve membran etkileşimine dayanan önceki aktif hedefleme yöntemlerinden farklı olarak, manyetik alan bazlı hedefleme, manyetik nanoparçacıkların yönlendirilebilmesi ve böylece tümör bölgesindeki birikimlerini artıran bir harici manyetik alanın uygulanmasıdır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak, Shi ve arkadaşları,

hiçbir in vitro veri elde etmemesine rağmen, boşlukta kapsüllenmiş Fe_3O_4 partikülleri ile ses tipi içi boş manyetik nanoparçacıkları sentezlediler (Shi vd., 2011). Daha sonraları, Wu ve arakadaşları, MCF-7 ve HeLa hücrelerine karşı ihmal edilebilecek düzeyde hemolitik aktivite ve çok düşük sitotoksisite gösteren, manyetik bir çekirdeğe ve mezogözenekli bir silika kabuğuna sahip ses tipi manyetik nanoparçacıklar hazırladılar (Wu vd., 2013). Yapılan çalışmaların sonucunda sentezlenen nanopartiküller önemli derecede hedeflenen organda manyetik alan bazlı hedefleme ile bir birikim sergilemiştir (Liong vd., 2008). İlaç yüklü nanoyapılar, mükemmel derecede tümör büyümesi azaltıcı ve bir harici manyetik alan varlığında tümör bölgesinde önemli ölçüde arttırılmış ilaç birikimi göstermektedir (Yang, 2019). Manyetik alan bazlı hedeflemenin şematik olarak gösterimi Şekil 1.6'da gösterilmektedir.



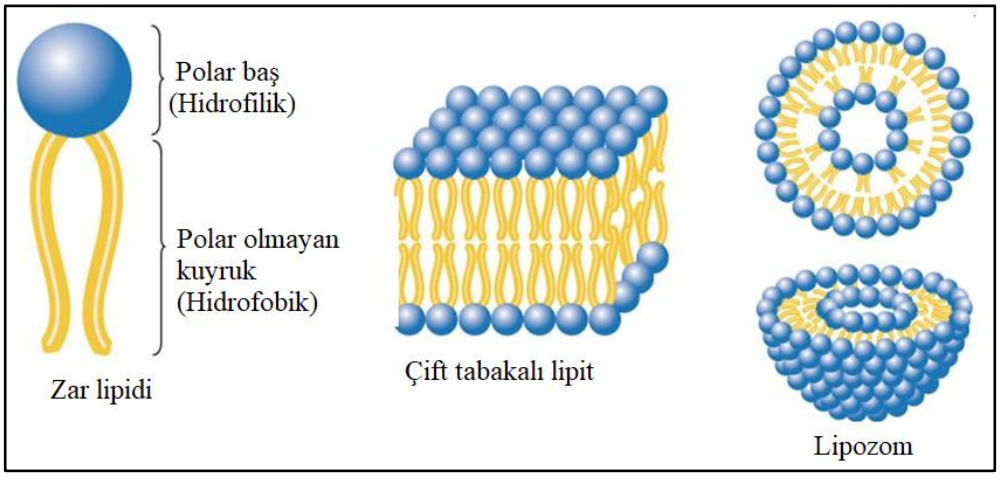
Şekil 1.6 Manyetik alan bazlı ilaç hedeflemenin prensibi (Douziech-Eyrolles vd., 2007)

1.2 Lipozomlar

Lipozom kelimesi, lipidleri tanımlayan "lipos" ve vezikül gövdesini ifade eden "soma" dan gelmektedir (Dua vd., 2012). Bu kelimeler, lipid çift tabakalı bir kesecik oluşturmak için fosfolipitlerin kullanılmasıyla oluşturulabilen yaklaşık 25-500 nm'lik küresel nanotaşıyıcı zardan oluşan mikroskobik bir membran olarak tanımlanabilir (Ashtikar vd., 2016; Jadhav ve Patil, 2014; Swart, 2019; Faroog 2019). Membranın yapısı önemli ölçüde değişebilmekte ve her biri kendi özelliklerine ve uygulamalarına

sahip çok sayıda farklı lipozom oluşturmayı mümkün kılmaktadır. Bu sistem ilaç taşınımı için kullanıldığında hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçlar bu yapı ile taşımayı kolaylaştırmaktadır (Scholtz, 2010).

İlk olarak İngiliz hematolog Dr. Alec Bangham tarafından 1960'ların ortalarında bir elektron mikroskobu altında gözlemlenen lipozom, bir lipit çift tabakasından oluşan içi boş bir veziküldür ve genellikle hücre zarının bileşimi olan bazı doğal fosfolipitlerden oluşmaktadır (Li, 2014). Fosfolipitler, bir fosfat grubu içeren moleküller, hidrofobik iki ‘‘kuyruğa’’ ve bir hidrofilik ‘‘baş’’ gruba sahip olan karakteristik kısımlardır. Fosfolipitlerin bu özelliğinden dolayı, memelilerde geleneksel hücre zarlarını taklit eden lipit çift tabakalı veziküller oluşur. Lipozomlarda, lipit çift tabakaları ve çift tabakalar tarafından kapsüllenmiş hidrofilik bölge arasındaki hidrofobik bölge olmak üzere başlıca iki bölge yer almaktadır (Tran vd., 2017; Khodabandehloo vd., 2016; Lim vd., 2013; Pantapasis vd., 2017). Ayrıca, lipozomlar kolesterol gibi başka lipid zincirlerini veya molekülleri de içerebilir. Lipozomlar, toksik olmamaları, büyük hacimleri ve hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçlara biyouyumlulukları açısından incelenmiştir. Bu nedenle, hidrofobik ve hidrofilik ilaçların lipozomlar kullanılarak birlikte taşınabileceği sonucuna varılabilir. Ayrıca, kanser tedavisi için DNA veya RNA taşınımı için de kullanım olanağı bulmuşlardır (Güven, 2019; Li, 2014; Faroog, 2019). Lipozomun temsili yapısı Şekil 1.7'de gösterilmektedir.



Şekil 1.7 Lipozomun yapısı (Swart, 2019)

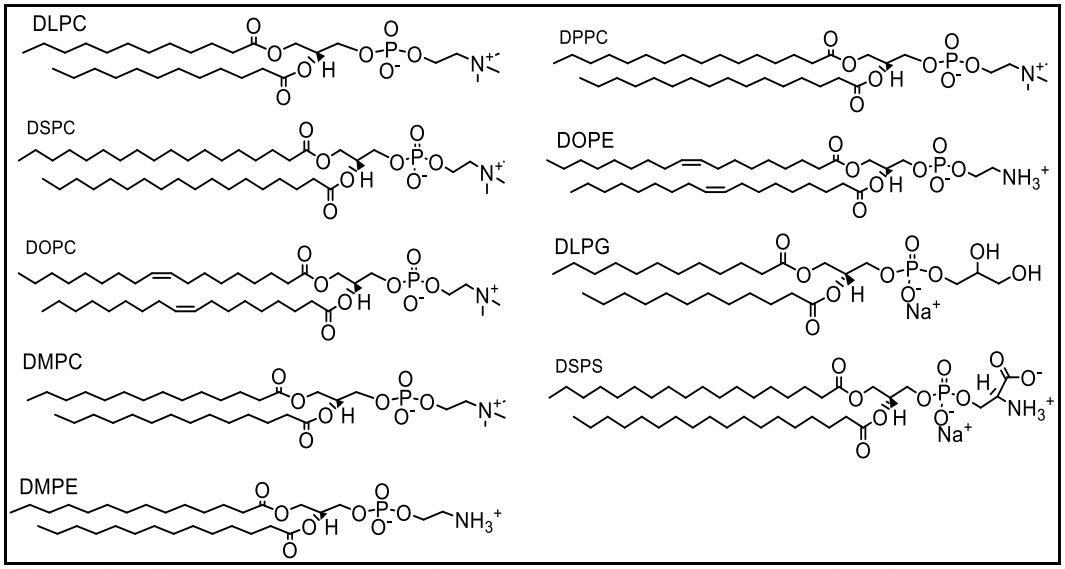
1.2.1 Lipozomların bileşenleri

Lipozomların ana bileşenleri fosfolipitler ve kolesteroldür (Shashi vd., 2012; Alonjang, 2018).

1.2.1.1 Fosfolipitler

Fosfolipitler hem hidrofobik kuyruğa hem de hidrofilik baş grubuna sahip amfifilik moleküllerdir. Fosfolipit moleküllerinin baş grupları suyu severken, yağlı asit kuyrukları genellikle açil zincirleri olup hidrofobiktir (Mozafari, 2005). Fosfolipitlerin genel kimyasal yapısı bir gliserol omurgasına sahiptir. Gliserol molekülünün 3 numaralı pozisyonundaki hidroksil grubu, fosforik asitle ve 1 ve 2 pozisyonlarındaki hidroksil grupları ise genellikle uzun zincirli yağ asitleri ile esterleşmiştir. Uzun zincirli yağ asitleri, fosfolipit moleküllerine lipid özelliklerini veren kısımdır. Fosforik asidin geri kalan oksijen gruplarından biri ayrıca gliserol, kolin, etanolamin, serin ve inositol dahil olmak üzere çeşitli organik moleküllerle esterleşebilir. Bağlı olan alkol ile birlikte fosfat kısmı, fosfolipitin baş grubunu temsil etmektedir (Vemuri ve Rhodes, 1995).

Lipozomların hazırlanmasında çeşitli fosfolipit grupları yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu fosfolipitler doğal kaynaklı, yarı sentetik veya tamamen sentetik olabilir. Doğal kaynaklardan modifiye edilmiş fosfolipitler veya doğal baş gruplarına sahip fosfolipitler de lipozomal formülasyonlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Dilauril fosfatidilkolin (DLPC), distearoil fosfatidilkolin (DSPC), dioleolilfosfatidilkolin (DOPC), dimiristoil fosfatidilkolin (DMPC), dimiristoil fosfatidiletanolamin (DMPE), dilauril fosfatidiletanolamin (DLPE), dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), dioleoil fosfatidiletanolamin (DOPE), Dilauril fosfatidilgliserol (DLPG), Distearoil fosfatidil serin (DSPS) ve Distearoil fosfatidiletanolamin (DSPE) lipozom hazırlanmasında en yaygın kullanılan fosfolipitler arasındadır (Shah vd., 2017). Yaygın olarak kullanılan bazı fosfolipitlerin yapıları Şekil 1.8'de verilmiştir (Samad vd., 2007).



Şekil 1.8 Lipozomların hazırlanmasında kullanılan yaygın fosfolipitler (Shah vd., 2017).

Lipozomların hazırlanmasında kullanılan fosfolipitlerin kimyasal özellikleri, lipozomun da özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Lipozomal formülasyonların biyolojik dağılımı, açıklık, ilaç salımı geçirgenliği ve yüzey yükü, her zaman oluşturdukları fosfolipitlerin kimyasal doğasına bağlıdır. Benzer şekilde, lipozomların kapsülleme verimliliği, toksisiteleri ve stabiliteleri de hazırlanmalarında kullanılan fosfolipitlerin türünden etkilenir. Hidrofilik-lipofilik denge, bir amfifilin lipozomal vezikül oluşturma yeteneğinin tahmini için yararlı bir gösterge olmuştur. Tek kuyruklu amfifiller, kolesterol varlığında kendiliğinden birleşen veziküller oluşturabilir, ancak ilaç kapsülleme etkinliği, çift kuyruklu amfifillerden daha azdır (Mozafari, 2007). Fosfolipitlerin bileşimi ve yüzey yükü, ilaç yüklü lipozomların doku dağılımına ve total (klirens) kinetiğine de karar verir. Gangliositler, kan akışında daha uzun dolaşımdaki lipozomlar sağlamak için yüzey yüklü gruplar tabakası sağlamak için bazen lipozom formülasyonlarına dahil edilen bir sfingolipid sınıfıdır (Shah vd., 2017).

Fosfolipitlerin tümü, akışkanlıklarının değiştiği bir sıcaklığa sahiptir. Bu sıcaklık, geçiş sıcaklığı (T_C) olarak da bilinir. T_C, açil zincirinin uzunluğu ile doğru orantılı olup zincir ne kadar uzunsa, T_C o kadar yüksek ve elde edilen membran yapı o kadar sert olmaktadır. Membran yapının sertliği de daha iyi stabilite sorumluluğu sağlamaktadır. Daha sert zarlar, ilaçların içeride hapsedilmesini veya başka bir ifadeyle ilaç sızıntısını engelleme özelliği sağlamaktadır (Sharma ve Sharma, 1997). T_C, zarın diğer lipozomlarla kaynaşmaya tepki verme şeklini, kümelenmeyi, stabiliteyi, geçirgenliği

etkileyebildiği ve ayrıca biyolojik sistemlerin varlığında lipozomların reaksiyona girme şekline katkıda bulunduğu için çok önemlidir (Scholtz, 2010; Cheung, 2020). Lipozomların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan fosfolipitler için geçiş sıcaklıkları Tablo 1.1'de yer almaktadır.

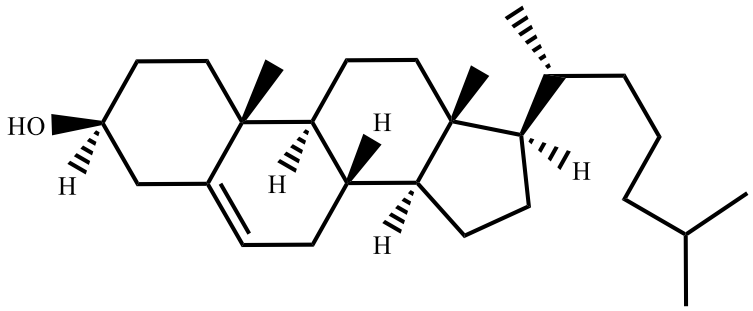
Tablo 1.1 Lipozomların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan fosfolipitlerin geçiş sıcaklıkları (Sercombe vd., 2015; Cheung 2020)

Fosfolipit	Kısaltmalar *	Tc (°C)
Dimiristoil fosfatidil kolin	DMPC (14:0/14:0 PC)	23
Dipalmitoil fosfatidil kolin	DPPC (16:0/16:0 PC)	41
Disteroil fosfatidil kolin	DSPC (18:0/18:0 PC)	55
Hidrojenlenmiş Soya Fosfatidil kolin	HSPC[#]	52
Dioleoil fosfatidil kolin	DOPC (18:1/18:1 PC)	-17
Palmitoil-oleoil fosfatidil kolin	POPC (16:0/18:1 PC)	-2
Dioleoilfosfatidil-etanolamin	DOPE (18:1/18:1 PC)	-16
Dimiristoil fosfatidil gliserol	DMPG (14:0/14:0 PG)	23
Dipalmitoil fosfatidil gliserol	DPPG (16:0/16:0 PG)	41
Distearoil fosfatidil gliserol	DSPG (18:0/18:0 PG)	55

* Yağ asitlerinin sayısal kısaltması, her bir yağ asidi asil zincirinin karbon atomu ve çift bağlarının sayısını gösterir. [#]HSPC, öncelikle DSPC ve DPPC'nin bir karışımıdır

1.2.1.2 Kolesterol

Kolesterol (Şekil 1.9), lipozomal kompozisyonda stratejik bir rol oynar ve hem lipozomal stabilite hem de in vitro ilaç salınımı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Lipozomal formülasyonlardaki kolesterol içeriği, sağlamlığı kontrol edebilen lipozomal yapıda önemli bir değişkendir (Briuglia vd., 2015). Kolesterol iki tabakalı faza entegre edildiğinde, hidroksil grubu, genel zar özelliklerini etkileyen fosfolipitlerin ester bağlarının karboksil gruplarının yanına yerleştirilir. Dengeleyici olarak kolesterolün kullanımına ilişkin çeşitli çalışmalar, zara eklenmesi sonucunda; vezikül direncini artırabildiğini (Virden ve Berg, 1992), ilaç katılma verimliliğini azaltabildiğini (Mohammed vd., 2004), fosfolipitlerin yağ asidi zincirleri arasında boşluk oluşturabildiğini (Rödel, 2019), artan stabilite için intravezikül etkileşimlerinin akışkanlığını değiştirdiğini ve aşırı kayma stresi altında lipit çift tabakalı yapının korunmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2000). Sulandırıldıktan sonra iki tabakalı faza dahil edilebilen kolesterol için doyma limiti yaklaşık olarak %50 mol'dür (Rödel, 2019)



Şekil 1.9 Kolesterolün kimyasal yapısı

1.2.2 Lipozomların sınıflandırılması

Lipozomlar, morfolojilerine göre çok lamelli veziküller (MLV'ler), küçük tek lamelli veziküller (SUV'ler), büyük tek lamelli veziküller (LUV'ler), oligolamelli veziküller (OLV'ler) ve multiveziküler lipozomlar (MVL'ler) olarak sınıflandırılır (Şekil 1.11).

1.2.2.1 Boyutuna göre sınıflandırılma

- ***Çok lamelli veziküller (MLV)***

Çok lamelli veziküller (MLV'ler) yaygın olarak "geleneksel lipozomlar" olarak adlandırılırlar. Birkaç eşmerkezli fosfolipit çift katmanından oluşan lipozom türünün boyut aralığı 0,1 μm ile 20 μm arasında yer almaktadır (Şekil 1.10). İnce film hidratasyon yöntemi ile hazırlanırlar. İnce bir lipid filmi, fosfolipitin kolesterollü veya kolesterolsüz organik bir çözücü (örneğin kloroform) içinde yuvarlak tabanlı bir balon içinde çözülmesiyle hazırlanır. Organik çözücünün döner buharlaştırıcı kullanılarak vakum altında buharlaştırılması, balonun iç duvarlarında ince bir lipid filminin oluşmasına neden olur. Çalkalanmaya devam edilirken su eklenmesi MLV'lerin oluşumuna neden olur (Bangham vd., 1965; Elhissi vd., 2006). Bu prosedür, fosfolipitin faz geçiş sıcaklığının (Tc) üzerinde gerçekleştirilir. Döner buharlaştırıcı tarafından buharlaştırılan solvent ya bertaraf edilir ya da yeniden kullanım için bir yoğunlaştırma ile toplanır (Hussein, 2014).

- **Küçük tek lamelli vezikül (SUV)**

Küçük bir tek lamelli vezikül (SUV), boyutu 25 ile 100 nm arasında değişen bir lipozom oluşturan tek bir fosfolipit çift tabakasından oluşur (Şekil 1.10). Batzsri ve Korn (1973), uygun seyreltme ve karıştırma ile fosfolipitin Tc'sinin üzerindeki sulu faza etanolik bir fosfolipit çözeltisinin enjeksiyonuyla SUV'ların hazırlandığını bildirmişlerdir. Genellikle SUV'ler, MLV'lerin prob sonikasyonu ile dağılımları

sonucunda üretilebilirler. Bu yöntemde, sonikatörün probu, lipozom içeren çözeltiye daldırılır ve SUV'leri oluşturmak üzere MLV'leri bozmak için en yüksek frekansta çalıştırılır (Jain, 2012). Prob, titanyum gibi inert veya biyolojik olarak çevreci bir metalden oluşmakta, lipozom vezikülleri ile uyum içinde salınabilecek şekilde salınan elektrik akımı frekansına ayarlanmıştır. Prob sonikasyonu, probun ucu tarafından hazırlamaya yüksek güç girişi nedeniyle hızla aşırı ısı üretebilir. Artan gaz değişimi ve yüksek sıcaklık nedeniyle, yüksek lipid çift tabakanın bozulması riski vardır. Bu nedenle, lipozomlar gibi ısıya dayanıksız numuneler işlenirken sonikasyon süresince numuneler soğuk tutulmalı ve soğutma periyotlarıyla sonikasyon işlemi kısa aralıklarla gerçekleştirilmelidir (Santos vd., 2009).

- ***Büyük tek lamelli vezikül (LUV)***

Büyük tek lamelli veziküller (LUV'ler), SUV'lere benzemektedir, ancak 0.1 µm ile 1 µm aralığına düşen daha büyük bir boyuta sahip olan bu lipozom türü tek bir fosfolipit çift katmandan oluşur (Şekil 1.10). MLV'lere göre hidrofilik ilaçların tutulması için daha yüksek etkinlik sağladığı bildirilmiştir. LUV'ler, daha önce enjekte edilen fosfolipitin Tc'sinin üzerinde ısıtılmış olan bir sulu faza eterli bir fosfolipit çözeltisinin enjeksiyonu ile hazırlanır (Deamer ve Bangham, 1976). Bu yöntemle ilgili dezavantajlar, ortamın homojen olmaması (70-190 nm) ve kapsüllenmiş ilacın yüksek sıcaklık veya organik çözücülerle birlikte yer almasıdır (Chauhan vd., 2012; Schieren vd., 1978). Başka bir yöntemde, sulu ilaç çözeltisi ile ilaçsız SUV'lerin süspansiyonunu karıştırdıktan sonra dondurarak kurutmak suretiyle suyu alınmış-yeniden hidratlanmış veziküller hazırlanabilir. SUV'ler, rehidrasyondan sonra tipik olarak 1 µm veya daha az vezikül boyutuna sahip olabilen LUV'lere dönüşebilir (Kirby ve Gregoriadis, 1984).

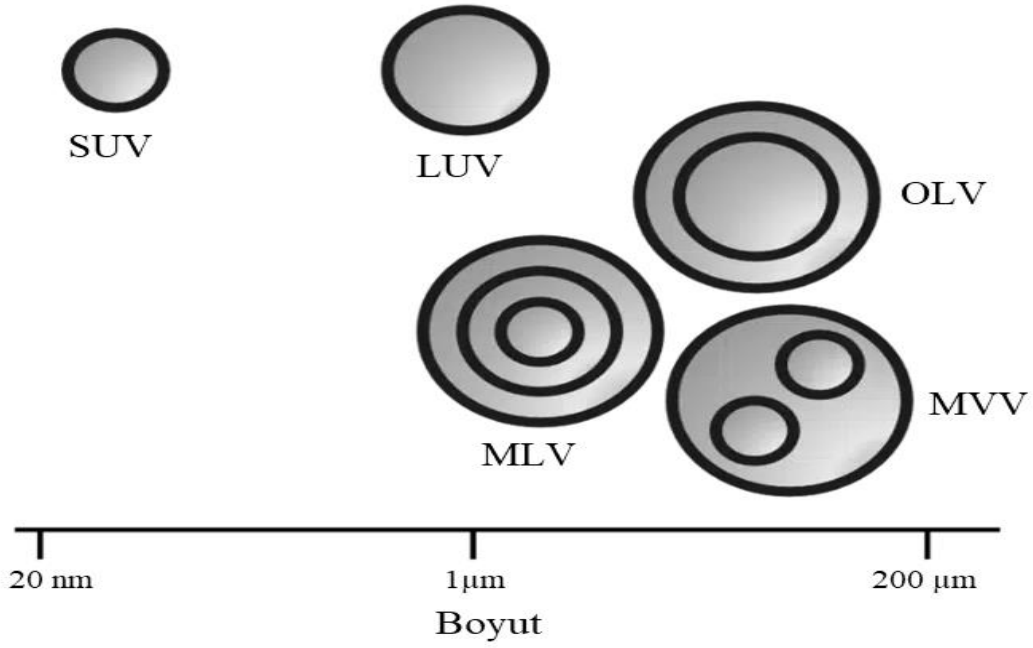
- ***Oligolamelli veziküller (OLV)***

Sadece iki veya üç fosfolipit çift katmanına sahip olan MLV'ler, oligolamelli veziküller (OLV'ler) olarak bilinmekte ve 100-10000 nm aralığında yer alırlar (Şekil 1.10). Szoka ve Papahadjopoulos (1978) tarafından ters faz buharlaştırma yöntemi olarak bilinen bir yöntem tanıtıldı (Szoka ve Papahadjopoulos, 1978; Wang vd., 2022). Bu yöntemde, OLV'ler ve LUV'lerin bir karışımı üretilir ve bunlar ters buharlaşma vezikülleri (REV'ler) olarak adlandırılır. REV'ler, sulu fazın %62'sine kadar tutulma sağlar (Jain, 2012). Alternatif olarak, etanol bazlı prolipozomlardan oligolamelli

lipozomlar üretilebilir. Etanol bazlı prolipozomlar, sulu fazın eklenmesi ve çalkalanması üzerine lipozomlar oluşturan fosfolipitlerin konsantre etanolik karışımlarıdır (Perrett vd., 1991).

- ***Çok biçimli lamelli veziküller (MVV)***

Bir MLV'ye benzer boyutta büyük bir vezikül, bir grup lipozomu çevrelediğinde, sonraki vezikül durumu multiveziküler lipozom (MVL) olarak bilinir (Kim vd., 1983) (Şekil 1.10). MVL'ler, sulu sakkaroz çözeltisi ve emülsiyonun eklenerek sonrasında organik çözücünün ılık sıcaklıkta buharlaştırılmasıyla oluşturulur. Bu yönteme göre hazırlanan MVL'ler, yüksek depolama stabilitesine ve kolay üretim özelliğine sahip olabileceğinden, ince film yöntemiyle hazırlanan MLV'lere göre bazı avantajlara sahip olabilirler (Kim vd., 1987).



Şekil 1.10 Lipozomların şematik sınıflandırması (Clergeaud Veiga, 2014)

1.2.3 Bileşime ve ilaç taşınımına göre lipozomlar

Bileşimlerine ve ilaç taşıma yöntemine göre geleneksel, pH-duyarlı, katyonik, uzun dolaşımlı, immüno, ısıya duyarlı ve manyetik lipozomlar olarak sınıflandırılabilirler (Varun vd., 2012). Bu lipozomların özellikleri Tablo 1.2'de listelenmiştir.

Tablo 1.2 Bileşime ve ilaç taşınım yöntemine göre sınıflandırılan lipozomların özellikleri (Volkwyn, 2019)

Lipozom Türü	**Özellikleri**
Geleneksel lipozomlar	➢ Nötr veya negatif yüklü fosfolipitler ve kolesterolden oluşur ➢ Kısa dolaşım yarı ömrüne sahiptir ➢ Farmakokinetik özellikleri doza bağlıdır
pH-duyarlı lipozomlar	➢ Fosfatidiletanolamin (PE) gibi fosfolipitlerden oluşur ➢ Düşük pH'ta kaplanmış pit endositoza tabidir ➢ Makromoleküllerin ve zayıf bazların hücre içi iletimi için uygundur ➢ Farmakokinetik özellikleri, geleneksel lipozomlarınkine benzerdir.
Manyetik lipozomlar	➢ Fosfatidilkolin, kolesterol ve az miktarda kolloidal manyetik demir oksit parçacıklarından oluşur.
Isıya duyarlı lipozomlar	➢ Dipalmitoil fosfatidilkolinden oluşurlar ➢ Lipitlerin faz geçiş sıcaklığı olan 41°C'de maksimum salınım elde edilecektir.
Katyonik lipozomlar	➢ Katyonik lipidlerden oluşurlar ➢ Hücreler veya endozom zarları ile kaynaşabilirler ➢ DNA ve RNA gibi negatif yüklü makromoleküller için uygundur ➢ Esas olarak bölgesel uygulama için kullanılırlar ➢ Yapısal olarak kararsız ➢ Yüksek dozlarda toksik etkilere sahiptirler.
Uzun dolaşımlı lipozomlar	➢ Gizli lipozomlar olarak da bilinirler. ➢ Nötr yüksek geçiş sıcaklığına lipidler ve kolesterolden oluşurlar ➢ Uzun dolaşım yarı ömrüne sahiptirler ➢ Farmakokinetik özellikleri dozdan bağımsızdır ➢ Yüzey grupları hidrofilik kaplamaya sahiptir.
İmmüno lipozomlar	➢ Bağlı antikor ya da tanıma dizisine sahip geleneksel veya uzun dolaşımdaki lipozomlar ➢ Reseptör aracılı endositoza tabidirler ➢ Hücreye spesifik bağlanma sağlayabilirler

1.2.4 Nanolipozom

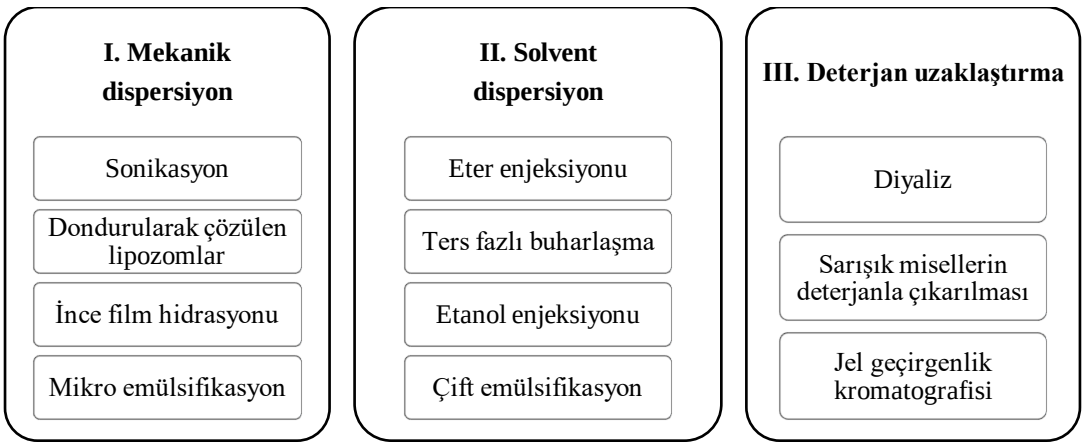
Nanolipozomlar, yakın zamanda tanıtılan lipozomların nanometrik versiyonlarıdır ve mikrotaşıyıcılara göre birçok avantajları vardır. Mikrofajlar tarafından tanınmayı önleyerek, kanda daha uzun süre dolaşırlar. Kılcal damarlar ve biyolojik zarlar yoluyla dokuların derinliklerine nüfuz edebilirler. Ayrıca, hücreler tarafından kolayca alınırlar, böylece hedef bölgede terapötik etkinliğin artmasıyla sonuçlanır, istenen alanda etkiyi haftalarca bile uzun bir süre boyunca sürdürürler. Ayrıca, kapsüllenmiş ilaçların

kontrollü salımını ve hassas hedeflemesini büyük ölçüde geliştirirler. Nanolipozomların, çözünürlüklerini ve biyoyararlanımlarını, in vitro ve in vivo stabilitelerini artırarak ve yan etkilerini önleyerek ilaçların performansını birçok kat arttırdığı bulunmuştur. Antioksidanlar hem askorbik asit hem de E vitamini gibi hassas biyomalzemelerin gıda sistemindeki bir oksidasyon bölgesine kapsüllenmesi ve taşınması için yaygın olarak kullanılırlar (Mozafari, 2007; Maherani vd., 2011).

1.2.5 Lipozomların hazırlanma yöntemleri

Lipozom hazırlamada geleneksel yöntemlerin uygulama alanları çok geniştir (Meure vd., 2008). Genel olarak bu yöntemler, organik çözücüler içinde çözülmüş lipid çözeltilerini, ortamdaki organik çözücünün uzaklaştırılması, lipidin sulu ortamda dağıtılarak yeniden boyutlandırılmasını, oluşan lipozomların saflaştırılmasını ve elde edilen lipozomların analiz aşamalarını içerir (Akbarzadeh vd., 2013). Şekil 1.11'de gösterildiği gibi, birden fazla lipozom hazırlama yöntemi vardır ve aralarındaki temel fark, lipidlerin kurutulması ve sulu ortamda yeniden dağıtılarak boyutlandırlması işlemidir. Hazırlama yöntemleri mekanik dispersiyon, solvent dispersiyonu ve deterjanın uzaklaştırılması olarak üç ana kategoride sınıflandırılabilir. Hazırlama yöntemine bağlı olarak farklı boyut ve lamellere sahip lipozomlar elde edilebilir (Guimarães, 2021).

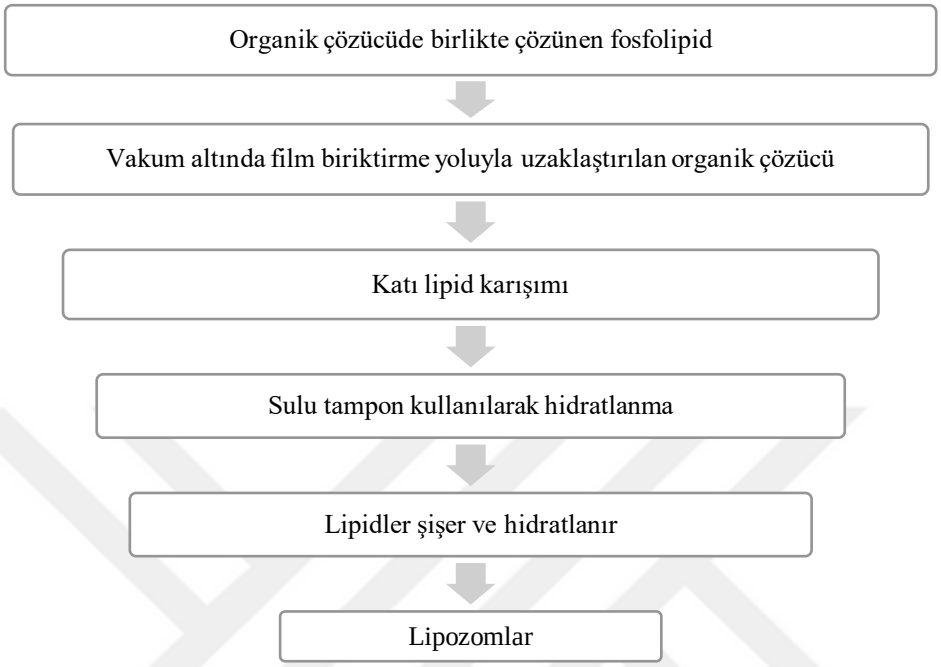
Lipozom hazırlama yönteminin optimal seçimi hapsedilecek malzemenin fizikokimyasal özellikleri, istenen boyut ve veziküllerin çoklu dağılımı, istenen çift katmanlı özellikler ve ölçek büyütme olasılığına bağlı olarak değişiklik gösterir.



Şekil 1.11 Lipozom hazırlama yöntemlerinin sınıflandırılması

1.2.5.1 Mekanik Dispersiyon Yöntemi

Mekanik dispersiyon yöntemi kullanılarak hazırlanan lipozomların şematik gösterimi Şekil 1.12'de gösterilmektedir.



Şekil 1.12 Lipozomların mekanik dispersiyon yöntemi ile hazırlanması

- ***Sonikasyon ile lipozom hazırlanması***

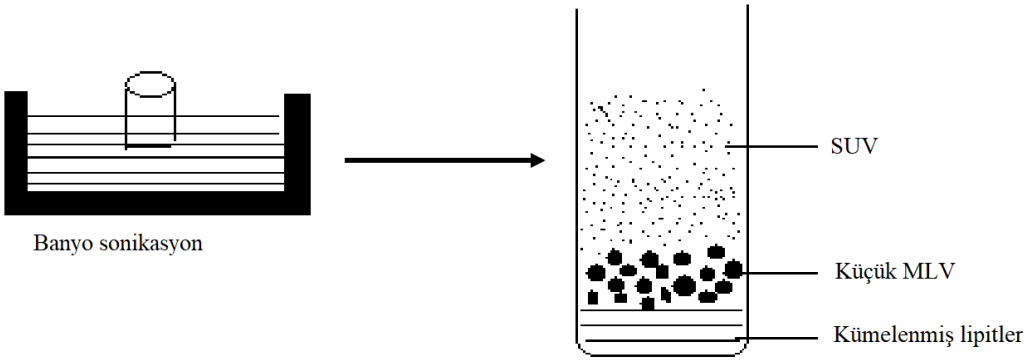
Sonikasyon, SUV hazırlanması için belki de en yaygın olarak kullanılan lipozom hazırlama yöntemidir. Burada, MLV'ler, pasif bir atmosfer altında banyo tipi bir sonikatör veya bir prob sonikatörü ile sonikasyona tabi tutulur. Bu yöntemin ana dezavantajları, çok düşük iç hacim/kapsülleme etkinliği, kapsüllenecek fosfolipitlerin ve bileşiklerin olası bozunması, büyük moleküllerin ortadan kaldırılması, prob ucundan metal kirliliği ve SUV ile birlikte MLV'nin varlığıdır (Ansari ve Mannan, 2017).

- ***Prob sonikasyonu***

Prob sonikatörün ucu, doğrudan lipozom dispersiyonunun içine daldırılmıştır. Bu yöntemde lipid dispersiyonuna enerji girişi çok yüksektir ve prob ile çözelti arasında enerjinin birleşmesi sıcaklıkta artışa yol açar; bu nedenle, deneyin yapıldığı kap bir su/buz banyosuna daldırılmalıdır. Bu yöntemde sonikasyonun 1 saati boyunca, lipidlerin %5'inden fazlası deesterifiye edilebilir. Ayrıca, sonikatörün probunda yer alan titanyumun dökülmesi nedeniyle çözelti kirlenebilir (Tonger vd., 2020).

- ***Banyo sonikasyonu***

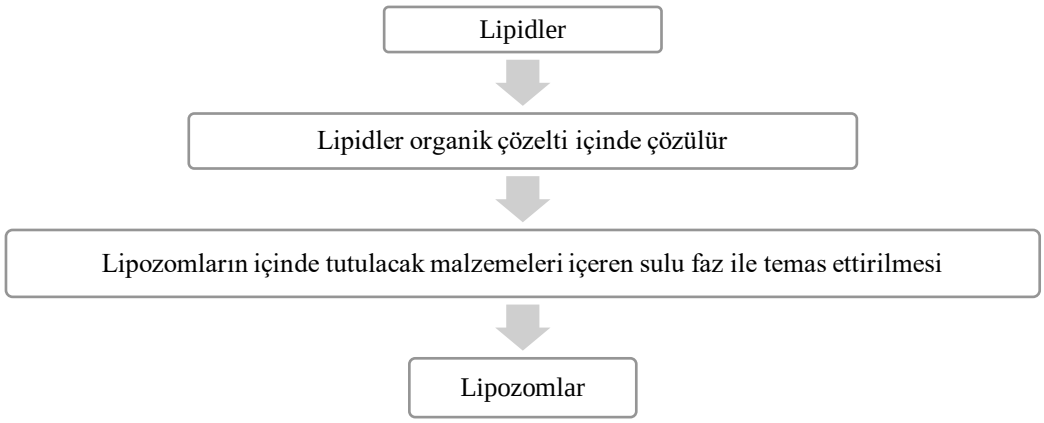
Bu işlemler genellikle, vezikül boyutuna ulaşmak için gerekli olmayabilecek büyük hacimli seyreltik lipidler için kullanılır. Lipozom süspansiyonu test tüpünde tutulur ve bir banyo sonikatörüne yerleştirilir. Bu yöntemde lipid dispersiyonunun sıcaklığını kontrol etmek, prob kullanılarak doğrudan dispersiyon yoluyla sonikasyon işleminin aksine, genel olarak daha kolaydır. Elde edilecek olan lipozomun boyutu sıcaklık, bileşim ve konsantrasyon, sonikasyon süresi ve gücü, ürünün hacminden etkilenir (Andhale vd., 2016). Banyo sonikasyon ile elde edilen lipozomların şematik gösterimi Şekil 1.13'te gösterilmektedir.



Şekil 1.13 Banyo sonikasyon ile lipozomun hazırlanması (Dwivedi vd., 2015)

1.2.5.2 Solvent dispersiyon yöntemi

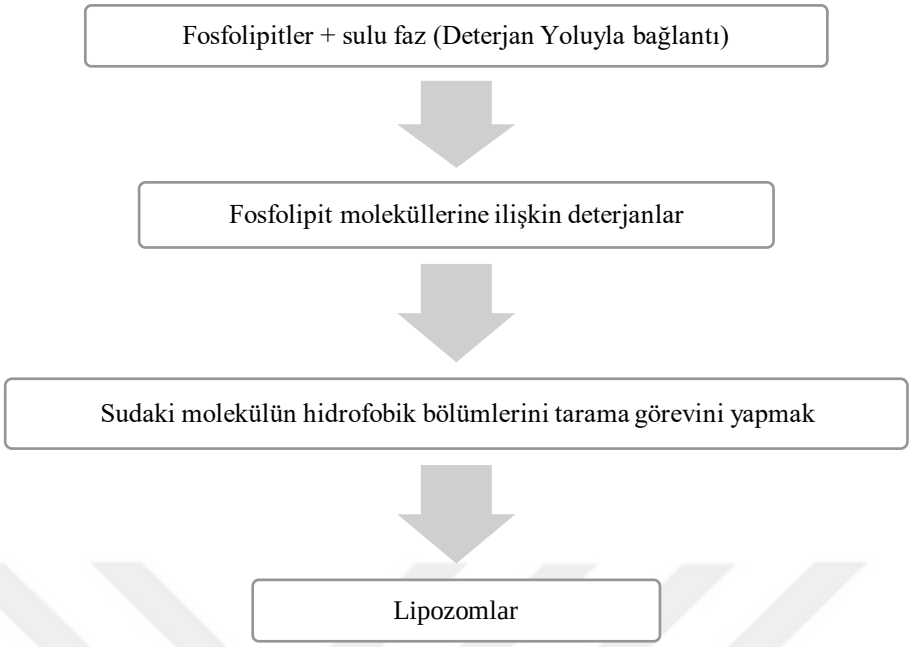
Solvent dispersiyon yöntemi kullanılarak hazırlanan lipozomların şematik gösterimi Şekil 1.14'te gösterilmektedir.



Şekil 1.14 Lipozomların solvent dispersiyon yöntemi ile hazırlanması

1.2.5.3 Deterjan uzaklaştırma yöntemi ile lipozom hazırlanması

Deterjan uzaklaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan lipozomların şematik gösterimi Şekil 1.15'te gösterilmektedir.



Şekil 1.15 Lipozomların deterjan uzaklaştırma yöntemi ile hazırlanması

1.2.6 Lipozomlarda ilaç yükleme

İlaç hapsetme verimi, tutulması, hazırlama işleminin kolaylığı ve ölçeklenebilirliği, lipozomun stabilitesi ve yöntemin maliyet etkinliği, lipozomlara ilaç yükleme yönteminin seçimine bağlı olarak değişkenlik gösterir. İlaçları lipozomlara dahil etmenin iki farklı yöntemi vardır. Bunlar pasif ve aktif ilaç yükleme (kapsülleme) teknikleri olarak bilinirler. Pasif yükleme tekniğinde ilaçlar, hazırlanmaları sırasında lipozomların içinde hapsedilir. Aktif yükleme durumunda, ilaçlar sağlam lipozomlara yüklenir (Maherani vd., 2011).

1.2.6.1 Pasif yükleme teknikleri

Pasif yükleme tekniğinde ilacın kapsüllenmesi lipozom oluşumu sırasında olmaktadır. Hidrofilik ilaçların lipozomların iç çekirdeğine yüklenmesi lipozomların oluşumu sırasında ince lipid filmin hidratlanması için kullanılan tampon ile karıştırılması sonucu olmaktadır. Lipofilik ilaçlar yüklenmesi ise ince kuru lipid filminin hazırlanması sırasında ilaçların diğer lipozom bileşenleriyle karıştırılması sonucunda lipid çift katmanlarına kapsüllenmesiyle olmaktadır. Ortamda kalan ilaç molekülleri, jel filtrasyon kromatografisi ya da diyaliz ile lipozom süspansiyonundan uzaklaştırılır (Pandey vd., 2016).

Kapsülleme verimliliği lipid konsantrasyonuna, lipozom boyutuna, lipid seçimi gibi özelliklere bağlı olarak farklılık gösterir. Lipid çift tabakası ile etkileşime girmeyen suda çözünür bileşiklerin kapsülleme etkinliği, pasif yöntemle yüklendiğinde ve lipozomlar içinde bulunan sulu hacimle orantılı görünüyorsa nispeten daha düşüktür (Tyagi vd., 2013). Büyük lipozomların kapsülleme verimliliği küçük lipozomlardan daha yüksek olacaktır (Akbarzadeh vd., 2013). Lipofilik bileşik gibi lipid çift tabakası ile etkileşime giren ilaç normal olarak daha iyi kapsülleme verimine sahiptir.

Bu nedenle, lipofilikliği artırmak ve lipit çift tabakasına daha iyi yüklenmesi için lipofilik zinciri ilaç molekülüne bağlayarak kapsülleme verimliliğini artırmak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Sutradhar ve Amin, 2014; Bozzuto ve Molinari, 2015). Bu teknikle verimli bir şekilde daha iyi yükleme için lipid bileşiminin seçimi de kritik öneme sahiptir. Örneğin, siRNA gibi yüksek oranda negatif yüklü nükleotit bileşiklerini yüklemek için lipid seçimi, geliştirilmiş ilaç/lipid etkileşiminden dolayı kapsülleme verimini önemli ölçüde artıracaktır.

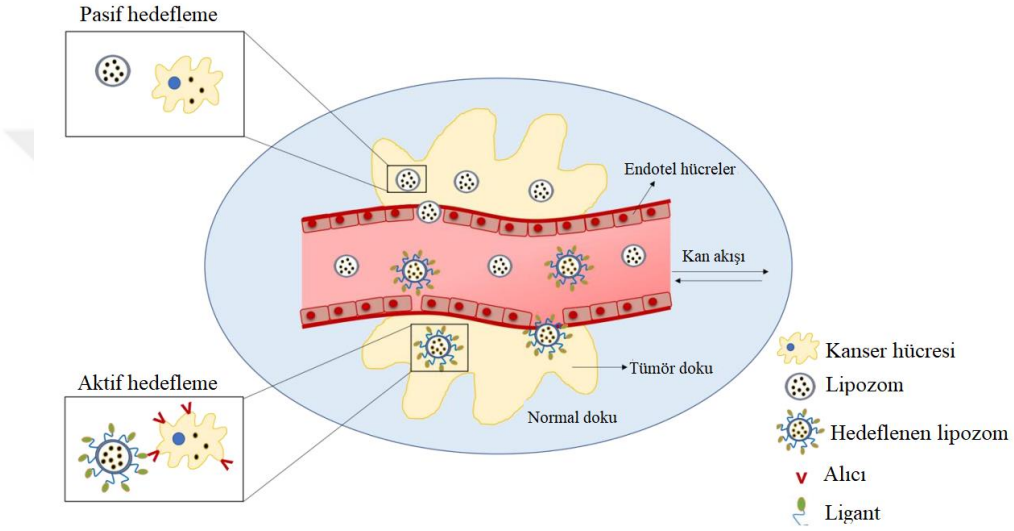
1.2.6.2 Aktif yükleme teknikleri

Belirli alkali ya da zayıf asidik yapıdaki ilaç molekülleri, aktif yükleme veya uzaktan yükleme yöntemiyle önceden oluşturulan lipozomlara yüklenmektedir. Bu süreç, pH tarafından oluşturulan bir elektrokimyasal potansiyel veya lipozomların lipid çift tabakası boyunca oluşturulan iyon gradyanları tarafından yürütülür (Akbarzadeh vd., 2013; Bozzuto ve Molinari, 2015). Belirtilen pH ve iyon konsantrasyonuna sahip tamponun kullanılması sonucunda lipozomların hazırlanması sırasında pH veya iyon gradyanları oluşturulur. Lipozomların harici pH'ı daha sonra farklı pH'lı başka bir tamponla veya diyaliz yoluyla iyon konsantrasyonu veya boyut dışlama kromatografisi ile değiştirilir. Lipozom zarları boyunca pH gradyanı oluşturulduktan sonra, ilaç, çift tabaka boyunca akışkanlığı ve verimli taşımayı sağlamak için tipik olarak lipitlerin faz geçiş sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklıkta lipozomlarla karıştırılarak yüklenir. İlaç molekülleri, lipozomlardaki iyonlarla etkileştikten sonra yüklenmiş olur. Yüklenen ilaç molekülleri dışarı çıkamaz ve lipozom çekirdeği içinde hapsolmuş olarak varlığını sürdürür (Pandey vd., 2016).

1.2.7 Lipozomların hedefleme stratejileri

Genel olarak, lipozom formülasyonunun araştırma ve geliştirme alanı, onların hedefleme stratejileridir. Spesifik hedefleme, ilaç dağıtım sistemleri olarak

lipozomların en eski fonksiyonel özelliğidir (Zylberberg ve Matosevic, 2016). Bu nedenle, belirli bölgelerin hedeflenmesi hem yeni tanı araçlarının geliştirilmesine hem de tedavi edici ajanların etkinliğinin iyileştirilmesine odaklanmaktadır (Fay ve Scott, 2011). Günümüz koşullarında, lipozomların hedeflenmesinin genel olarak sınıflandırılabileceği iki ana strateji vardır, bunlar pasif ve aktif hedeflemedir. Pasif doku hedeflemesi, esas olarak kanser damar sisteminin özellikleri ve hücre bağlanması için amaçlanan lipozom yüzeyindeki alıcıya özgü ligandlar aracılığıyla aktif doku hedeflemesi yoluyla elde edilir (Şekil 1.16).



Şekil 1.16 İlaçların terapötik etkinliğini arttırmak için lipozomların bir tümöre pasif ve aktif hedefleme stratejilerinin şematik gösterimi (Guimarães, 2021)

1.2.7.1 Pasif hedefleme

Pasif hedefleme yaklaşımları, kanserlerin ve çevrelerinin patofizyolojik özellikleri nedeniyle ağırlıklı olarak onkoloji alanında uygulanmaktadır (Wicki vd., 2015). Lipozomların dokulara veya hücrelere pasif olarak hedeflenmesi, sıvılar içindeki moleküler enerji yoluyla sızan tümör vaskülatür yoluyla bunların taşınması ve tümör dokular arası boşluklara iletilmesiyle gerçekleştirilir (Gogoi vd., 2016). Bu şekilde, 10 ile 500 nm arasında değişen hedeflenmemiş lipozomlar, anormal sızan kan damarları ve fonksiyonel lenfatiklerin eksikliği nedeniyle, damar sisteminin artırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi yoluyla tercihen tümör ve iltihaplı dokular üzerinde birikebilir (Torchilin, 2011; Fang vd., 2011; Biswas ve Torchilin, 2014).

Pasif hedefleme, fagositik alım veya mononükleer fagositik sistem (MPS) hücreleri tarafından boşluk gibi organizma savunma mekanizmaları tarafından hızlı eliminasyonundan kaçınabilecek bir lipozomal formülasyon geliştirme ihtiyacını içerir

(Kraft vd., 2014). Bu ihtiyaç doğrultusunda, gizli lipozomların hazırlanması, lipozomların polietilen glikol (PEG) ile yüzey modifikasyonu nedeniyle dolaşım sürelerini artırmaya izin veren pasif hedefleme yaklaşımlarında kullanılmak için iyi bir örnek olabilir. Bu yöntem aynı zamanda, kanser hücrelerine spesifik hedeflemeyi indükleyebilen, yükleri gibi lipozomların özgün özelliklerinin kullanımını da içerir. Başka bir örnek katyonik lipozomlardır. Bu tip lipozomların, elektrostatik etkileşimlerle tümör endotel hücrelerinde özel olarak açıklanan negatif yüklü fosfolipit baş gruplarını bağladığı rapor edilmiştir (Byrne vd., 2008). Sadece EPR etkisine dayalı hedefleme mekanizması, sitotoksik ilaçların yan etkilerini azaltmak için yeterli değildir. EPR etkisinin tümörler içindeki heterojenliği ve bunların bazı katı tümörlerle sınırlı olması, pasif hedefleme yoluyla verilen ilaçların etkinliğini de etkileyebilir (Kraft vd., 2014; Park vd., 2019). Bu nedenle, aktif hedefleme gibi gelişmiş işlevlere sahip alternatif hedefleme yaklaşımlarının geliştirilmesi araştırma konusu olmuştur.

1.2.7.2 Aktif hedefleme

1906'da vizyon sahibi Paul Ehrlich, vücutta spesifik ilaç taşınımını yönlendirmek için gereken "sihirli bir maddeyi" tanımlayarak aktif hedefleme kavramını sunmuştur (Strebhardt ve Ullrich, 2008). O zamandan bu yana dünya genelindeki araştırmacılar, teşhis ve tedaviyi hassas bir şekilde kolaylaştıran seçili hücreleri hedef alacak "sihirli maddeyi" aramaktadırlar (Bazak vd., 2015). Aktif hedefleme, lipozomal sistemlerin geliştirilmiş iletimi için bir hedefleme ligandının lipozomların yüzeyine bağlanmasını içerir (Riaz vd., 2018). Aktif hedefleme için antikorlar, nükleik asitler (aptamerler), peptitler, tam proteinler (örneğin transferrin) ve vitaminler (örneğin folik asit) gibi küçük moleküller dahil olmak üzere çok sayıda hedefleme ligandları kullanılmıştır (Wicki vd., 2015). Hedef ligandların seçiminde çeşitli faktörler göz önünde bulundurulur. Bunlar arasında, hedef üzerinde bağıl olarak aşırı veya seçici ekspresyon derecesi, ligand hedefli formülasyonun hedef hücre alımı ve hedef molekülün kaplanma derecesi yer alır (Noble vd., 2014; Sawant ve Torchilin, 2012). Ayrıca, bu ligandlar sağlıklı hücrelere bağlanmayı en aza indirirken hedef hücrelere bağlanmaya izin verecek şekilde seçilmelidir (Torchilin, 2005).

Lipozomları işlevselleştirmek için mevcut üç ana yaklaşım vardır. Birincisi, lipozom hazırlama sırasında diğer lipid bileşenleriyle karıştırılmadan önce istenen hedefleme ligandının bir lipide bağlanmasıdır. İkinci yaklaşımda, hazırlandıktan hemen sonra,

lipozomlar gerekli hedefleme ligandı ile işlevselleştirilir (Marqués-Gallego ve de Kroon, 2014). Sonunda amin, karboksilik asit, tiyol veya maleimid grupları ile işlevselleştirilmiş bir PEG ayırıcılı baş grup modifiye lipidler, bu yaklaşım için mevcut seçenekleri temsil eder (Conde vd., 2014). Başka bir yaklaşımda, işlevselleştirilmiş lipidin önceden oluşturulmuş lipozomlara sonradan eklenmesi önerilmiştir. Bu yöntem, misel fazından işlevselleştirilmiş lipidlerin önceden oluşturulmuş ve hatta ilaç yüklü lipozomlara kendiliğinden dahil edilmesi ilkesine dayanmaktadır. Hedefleme molekülünün türevlendirilmesi, aktifleştirilmiş lipidlerin tamponda bulunanlar gibi diğer lipozomal bileşenlerle etkileşimini önlemek için bir yöntem olarak ayrı bir aşamada gerçekleşir (Steenpaß vd., 2006).

1.2.8 Lipozomların karakterizasyon yöntemleri

Üretimden sonra ve uygulamadan önce, in vitro ve in vivo performanslarını güvence altına almak adına fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değerlendirilmesi için lipozomların kapsamlı bir şekilde karakterize edilmesi gerekir (Çağdaş vd., 2014). Değerlendirme amaçlı karakterizasyon parametreleri, fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametreleri içeren üç geniş kategoriye ayrılabilir. Lipozomları karakterize etmek için en çok araştırılan özellikler boyut, boyut dağılımı (polidispersite indeksi, PDI kullanılarak rapor edilmiştir), yüzey yükü (zeta potansiyeli ölçümü yoluyla), şekil, katmanlılık, faz davranışı, kapsülleme verimliliği ve in vitro ilaç salımıdır (Kachare vd., 2020; Pattni vd., 2015; Nkanga vd., 2019). Tablo 1.3'te lipozomal özelliklerin değerlendirilmesi için kullanılan ana analitik teknikler yer almaktadır.

Tablo 1.3 Lipozomal özelliklerin değerlendirilmesi için kullanılan analitik teknikler (Guimarães, 2021)

Özellikler	**Analitik teknikler**
Şekil	Mikroskopi teknikleri: TEM, Cryo-TEM ve AFM.
Katmanlılık	Cryo-TEM, ^{31}P-NMR, Küçük açılı X-ışını saçılması (SAXS) ve sıkışmış hacim belirleme teknikleri.
İlaç salımı	Spektrofotometri yöntemleri, HPLC ve UPLC.
Zeta potansiyeli	Lazer Doppler elektroforezi (LDE) ve kapiler elektroforez
Boyut	Dinamik ışık saçılımı (DLS), Nanoparçacık izleme analizi (NTA), Nükleer manyetik rezonans (NMR), Alan akışı fraksiyonasyonu (FFF), Boyut dışlama kromatografisi (SEC). Mikroskopi teknikleri: Geçirimli elektron mikroskobu (TEM), Kriyojenik-TEM (Cryo-TEM) ve Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), Optik Mikroskopi.

Tablo 1.3 Lipozomal özelliklerin değerlendirilmesi için kullanılan analitik teknikler (Devamı) (Guimarães, 2021)

Özellikler	Analitik teknikler
Faz davranışı	Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), Termogravimetrik analiz (TGA), floresan prob polarizasyonu, NMR, Elektron paramanyetik rezonans (EPR), Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve Xray kırınımı (XRD).
Kapsülleme Verimliliği	Ultraviyole-görünür (UV–Vis) ve floresan spektroskopisi, enzim veya protein bazlı testler, Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), Ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC), Sıvı ve Gaz kromatografisi kütle spektrometrisi, Elektron spin rezonansı (ESR) ve 1H NMR.

1.2.9 Lipozomların avantajları ve dezavantajları

Lipozomlar, başarılı kapsülleme araçları ve biyoaktif taşıyıcılar olarak bir dizi avantaja sahiptir (Kumar vd., 2021):

- Sürekli salınım sağlarlar
- Noniyoniktirler
- Lipozomlar, hedeflenen ilaç taşınımı veya bölgeye özgü ilaç taşıyıcısı olarak kullanılırlar
- Hapsedilen ilacın yabancı bir madde olarak ortamdan uzaklaştırılmasını engellerler ve dengede kalmasını sağlarlar
- Hem suda hem de yağda çözünen ilaçları taşıyabilirler
- Biyobozunur ilacı oksidasyondan koruyarak stabilize edilebilirler
- Protein stabilizasyonunu geliştirirler
- Kontrollü hidrasyon sağlarlar
- Çeşitli yollarla uygulanabilirler
- Farmakokinetik ve farmakodinamiği değiştirebilirler
- Lipozomlar, genlerin hücrelere verilmesinde çeşitli avantajlar önermiştir
- Lipozomların hem negatif hem de pozitif yüklü molekülleri vardır
- Lipozomlar, DNA'yı parçalayıcı süreçlerden korur
- Lipozomlar, muhtemelen bir kromozom olarak büyük DNA parçacıklarını taşıyabilir
- Lipozomlar, belirli hücrelere veya dokulara hedeflenir
- Lipozomlar daha etkili ve tedavi edici bir ilaç indeksidir
- Lipozomlar, hassas dokunun toksik ilaca maruziyetini azaltmaya yardımcı olur

- Aktif hedefleme elde etmek için bölgeye özgü ligandlarla etkileşim esnekliğine sahiptirler

Öte yandan, lipozomların diğer nanotaşıyıcı adaylarının aksine birkaç dezavantajı da vardır (Monisha et al., 2018).

- Nispeten üretimler maliyetlidir
- Kapsüllenmiş ilaç / moleküllerin karışması ve sızıntısı olabilir
- Fosfolipitin oksidasyon ve hidroliz durumu olabilir
- Modifiye edilmeyen lipozomların yarılanma ömrü kısa olabilir
- Modifiye edilmeyen lipozomlar orta düzeyde çözünürlük ve kararlılığa sahiptir
- Modifiye edilmeyen lipozomlar RES hücreleri tarafından hızlı salınırlar

1.2.10 Lipozomların uygulamaları

Lipozomların yapısal ve fizyolojik özellikleri çeşitli olduğundan geniş uygulama alanlarına sahiptirler (Chaudhari, 2005);

- Lipozomlar hem in vitro hem de in vivo ilaç için taşıyıcı görevi görürler
- Hedeflenen ilaç taşınım sisteminde lipozomlar metotreksat, aktinomisin-D vb. gibi antikanser ilaç taşıyıcıları olarak kullanılır
- Lipozomların kapsüllenmesi, enzim saflaştırmasında bir adım olarak kullanılmıştır
- Oral uygulama için kapsüllenmiş insülin ve büyüme hormonu olarak lipozomların kullanımı rapor edilmiştir
- Hücre biyolojisinde lipozomların en önemli kullanımı, zar lipidinin durumunu idare etmektir
- Lipozomlar, enzimatik kofaktörler gibi önemli düzenleyici molekülleri hücrelere yerleştirmek için kullanılabilir
- Lipozom kolajen jelleri, çeşitli biyoaktif ilaçların taşınımını yavaş salınımı gösterir, bu nedenle çoklu dozaj durumuna göre bariz bir avantaja sahiptir
- Bu teknik aynı zamanda yara ve yanık tedavisinde de güncel olarak uygulanabilir
- Antimikrobiyallerin veya hücre büyüme faktörlerinin lipozomlara dahil edilmesi, gelişmiş hücre büyümesini ve enfeksiyon oluşumunun engellenmesi için kolaylaştırıcı olabilirler
- Membran düzeyinde belirlenen bu hücresel işlevleri modellemek için araştırma aracı olarak uygulanabilirler

- Mikro analiz (membran immunoassay) alanında kullanılabilirler
- Lipozomlar, tanısal görüntüleme için radyofarmasötiklerin taşıyıcıları olarak kullanılırlar
- Yabancı kimyasalların ve ilaçların sentezi için hızla gelişen rekombinant DNA teknolojisi alanında endüstriyel olarak kullanılabilirler
- Kozmetikte uygulama: Lipozomlar, doğal nemlendirici faktör (NMF), alfa hidroksi asit (AHA), proteinler, vitaminler (A ve E), yağlar, fitosteroller ve antioksidanlar gibi maddelerin taşıyıcıları olarak kullanılırlar

1.3 Siklodekstrinler

Supramoleküler kimya, etkileşen türler arasında kovalent bağların kurulmadığı moleküller arası etkileşimleri içerir. Bu etkileşen türler iyonlar, moleküller veya radikaller olabilir. Genel olarak, etkileşimlerin çoğu konak-konuk ilişkileri şeklinde gerçekleşir. Moleküller arası etkileşimler için kullanılan konaklar arasında, aşağıdaki nedenlerden dolayı çok önemli konak olarak kabul edilen siklodekstrinler (CD'ler) yer alır (Szejtli, 1998; Al-Derbali, 2016).

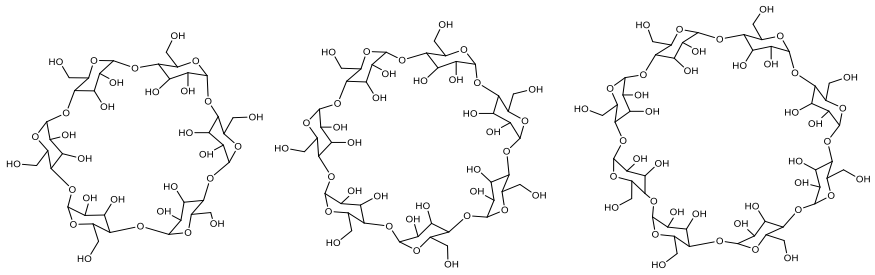
- Nişasta gibi yenilenebilir doğal malzemelerden nispeten basit enzimik dönüşüm yoluyla üretilebilen yarı doğal ürünlerdir.
- Her yıl büyük miktarlarda ve çevre dostu teknolojilerle üretilmektedir.
- Ticari ve endüstriyel uygulanabilirliği ile ekonomik olup kompleks oluşturma yetenekleri, onları ilaç özelliklerini değiştirmedeki uygulamalara borçludur. Benzersiz "moleküler kapsülleme" özellikleri nedeniyle, birçok endüstriyel üründe, teknolojide ve analitik yöntemde yaygın olarak kullanım alanına sahiptirler.
- Doğal ikincil karakteristik toksik etkileri, uygun CD tipi, türevi ya da uygulama modu seçilerek ortadan kaldırılabilir.
- İnsanlar tarafından ilaç, gıda veya kozmetik içeriği olarak tüketim olanağına sahip olması çok önemlidir.

CD'ler yüzyılı aşkın süredir bilinmesine rağmen, bir şekilde yeni bir farmasötik yardımcı madde grubu olarak kabul edilmektedir. Tarihsel olarak, CD kimyası yirminci yüzyılın başlarında öne çıkmaya başlamış ve CD'ler ile kompleksleri hakkındaki ilk patent 1953'te tescil edilmiştir. Ancak yüksek üretim maliyetleri onlar için bir dezavantaj oluşturmaktadır. Sonuç olarak, 1970'ten önce yalnızca küçük

miktarlarda CD üretimi yapılıyordu. Biyoteknolojideki son gelişmelerle birlikte, CD üretimindeki önemli gelişme, üretim maliyetlerinin düşmesiyle sonuçlanmış ve bu gelişme aynı zamanda yüksek oranda saflaştırılmış CD'lerin yanı sıra farmasötik yardımcı maddeler olarak çok uygun olan diğer CD türevlerinin var olmasına yol açmıştır. CD'ler ve bunların türevleri büyük ölçüde ilaçların suda çözünürlüğünü, stabilitesini ve biyoyararlanımını arttırmak için kullanılmaktadır. Ek olarak, sıvı ilaçları mikrokristalin tozlara dönüştürmek, ilaç-ilaç veya ilaç-katkı etkileşimlerini önlemek, mide-bağırsak veya göz tahrişini azaltmak ve hoş olmayan tat ve kokuyu azaltmak veya ortadan kaldırmak için de kullanılabilirler (da Conceição, 2020; Loftsson ve Brewster 1996; Al-Derbali, 2016).

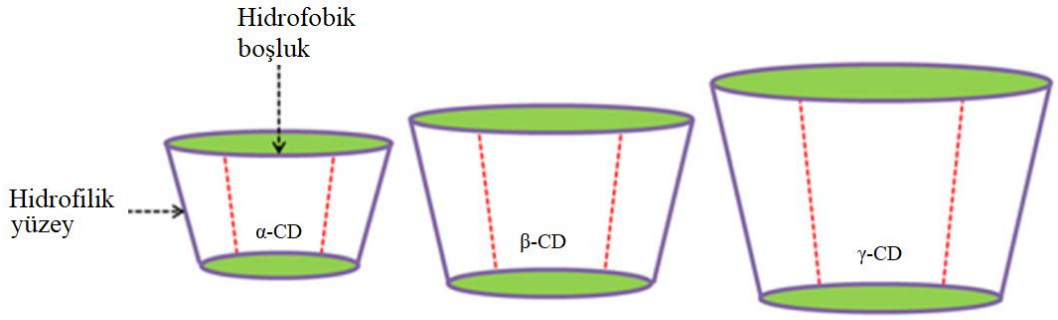
1.3.1 Siklodekstrinlerin yapısı

Siklodekstrinler, α-1,4 glikozidik bağlarla birbirine bağlanan glukopiranoz birimlerinden oluşan siklik moleküllerdir. Yaygın olarak 6, 7 veya 8 α-D-glikoz birimi mevcut olup bu birime karşılık gelen siklodekstrin, sırasıyla α, β ve γ siklodekstrin olarak adlandırılır (Şekil 1.17). δ-CD (9 glukopiranoz birimi içerir) olarak adlandırılan daha yüksek benzer üyeler de rapor edilmiş, ancak bunlar oldukça esnek bir yapıya sahip ve daha az yaygın olarak kullanılmaktadır (Wistuba vd., 2006; Akasaka vd., 2000). Ayrıca, CD'ler için yaygın sterik engel nedeniyle beş veya daha az glukopiranoz birimine sahip olma olasılığı oldukça düşüktür (Sengupta vd., 2018; Tanwar, 2018).



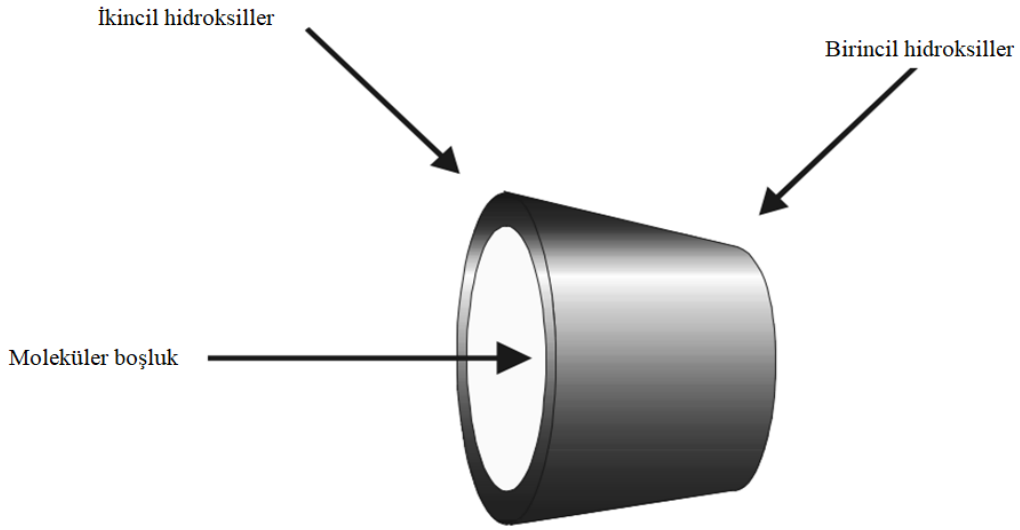
Şekil 1.17 α, β ve γ-CD'in kimyasal yapısı ve konformasyonu (Lupidi, 2016)

Nispeten hidrofobik bir boşluğa sahip, oyuk çapı 0.47 ve 0.83 nm (mevcut glikoz birimlerinin sayısına bağlı olarak) ve hidrofilik bir dış yüzey (Şekil 1.18) ile toroidal bir şekle (kesik koni gibi) sahiptirler (Demchenko, 2020; Gidwani ve Vyas 2015).



Şekil 1.18 Hidrofobik iç boşluğa ve hidrofilik dış yüzeye sahip α, β ve γ-CD toroidlerin toroidal şeklini ve göreli boyutlarını gösteren şematik çizim (Sengupta vd., 2018)

Siklodekstrinlerin birincil -OH grupları dar tarafa işaret ederken, ikincil -OH grupları koninin geniş tarafında yer alır (Şekil 1.19). Siklodekstrinler, nişastanın siklodekstrin glukonotransferaz enzimi tarafından bozulmasını içeren bir molekül içi transglikozilasyon reaksiyonu ile oluşturulur (Del Valle, 2004).

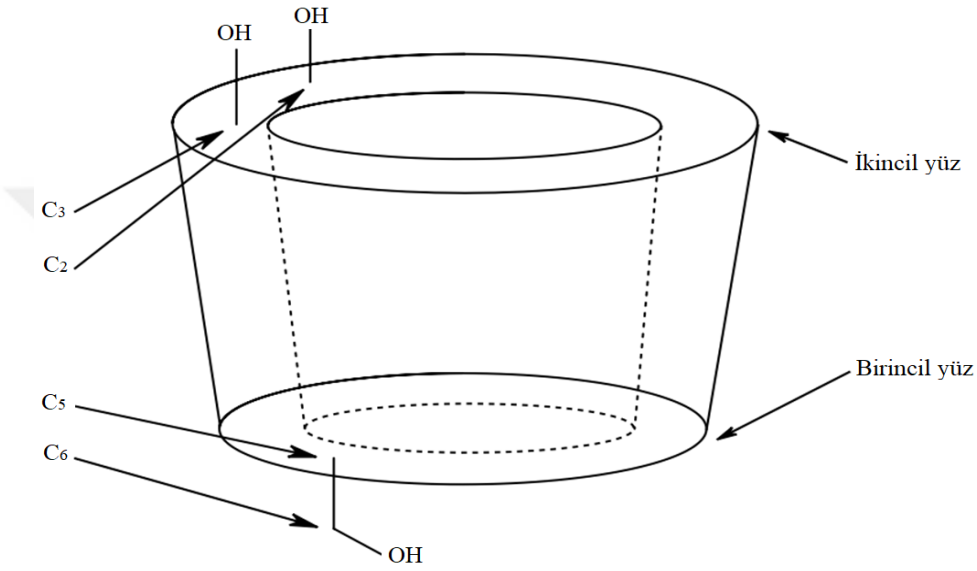


Şekil 1.19 Hidrofobik (apolar) boşluğun birincil ve ikincil hidroksil kenarlarının yerleşimini gösteren siklodekstrin toroid (van den Boogaard, 2003)

-OH grupları dış uzaya baktığından, siklodekstrinler suda yüksek çözünürlük gösterirken, iç boşluk düşük polariteli küçük "konuk" molekülleri barındırabilir. Bu nedenle siklodekstrinler, çeşitli küçük hidrofobik molekülleri hapsedebilir, böylece bunların sulu çözelti içinde çözünürlüklerini ve stabilitelerini geliştirebilirler. Doğal siklodekstrinler, aşağıdaki sırada artan çözünürlük (25 ° C'de) değerlerine sahiptir: β-CD için çözünürlük değeri 18,5 g/L, α-CD için çözünürlük değeri 145 g/L ve γ-CD için çözünürlük değeri ise 232 g/L olarak bulunmuştur (Demchenko, 2020).

Siklodekstrinler yapılarında glikoz kalıntısı $^4C_1$ konformasyon (sandalye) içinde yer almaktadır. Moleküllerin döngüsel yönelimi, yapıyı halka veya toroidal bir şekil haline

getirir. Glikopiranoz birimlerinin C_1 konformasyonu, halkanın iki kenarından birinde ikincil hidroksillerin (C_2 ve C_3) varlığını desteklerken, tüm birincil hidroksiller (C_6) diğer tarafta yer almaktadır. Boşluğun içi, C_3 ve C_5'ten gelen hidrojenler ve glikoz halkası oksijeninin yalnız çiftlerinden oluşur (Şekil 1.20). Yüzeyde bulunan bu hidroksil gruplarının ve boşluk içindeki glikozidik oksijenlerin varlığı, iç kısmı hidrofobik ve dış kısmı hidrofilik hale getirmektedir (Şekil 1.18). Bu olağanüstü özellik, CD'lerin geniş uygulama alanlarının temel dayanağını oluşturmaktadır.



Şekil 1.20 İki CD yüzü üzerindeki boşluğu, birincil ve ikincil yüzleri ve birincil ve ikincil hidroksil gruplarının dağılımını gösteren şematik gösterim (Popr, 2017).

Araştırmacıların birçoğu tarafından, bitişik glukopiranoz birimlerinin ikincil hidroksil grubu arasında çözelti içinde molekül içi hidrojen bağlarının oluşumunu gösteren NMR çalışmaları gerçekleştirildi. Çalışmalar ayrıca, glukopiranoz birimlerinin rotasyonunun bu bağların varlığından dolayı kısıtlandığını ve dolayısıyla CD moleküllerinin yapısal sertliğine katkıda bulunduğunu ileri sürdü.

Boşluk çapları α, β ve γ-CD'ler için sırasıyla 4.7-5.3, 6.0-6.5 ve 7.5-8.3 Å aralığında değişmektedir. Boşluk boyutu varyasyonu, CD'nin boyut ve geometrisine göre hidrofobik konukları seçici bir şekilde yapıya bağlanmasını sağlar. α, β ve γ-CD'ler için bitişik glikopiranoz birimlerinin O(2) ve O(3) atomları arasındaki zayıf moleküller arası hidrojen bağı etkileşimlerin ortalama bağ mesafeleri sırasıyla 3.00, 2.86 ve 2.81 Å olduğundan, γ-CD üç doğal CD'ler arasında en esnek tür olarak gösterilmektedir. Fakat, intramoleküler hidrojen bağı, β-CD'nin kuvvetini arttırmakta ve bu oluşan durumda γ-CD'lere kıyasla sulu çözünürlükte azalmaya neden olmaktadır.

Çözünürlüğünün düşük olmasının bir başka nedeni de sonunda kısıtlanmış makrosiklik harekete yol açan, boşluktaki ve molekül çevresindeki yerel su yapısını oldukça artırma eğilimi olabilir.

CD'lerin azalan çözünürlük durumları nedeniyle ticari olarak kullanımlarında bir kısıtlama olmuştur. Bu durum, özellikle β-CD'de daha fazla karşımıza çıkmaktadır. Bu sorunun üstesinden gelmek için, araştırmacılar kimyasal olarak β-CD'nin yapısal modifikasyonları üzerinde çalışmalar yapmıştır (Li vd., 2022). Çalışmalar sonucunda, birçok β-CD türevi, doğal β-CD'den daha yüksek suda çözünürlükleri nedeniyle sentezlenmiştir. CD'nin kimyasal modifikasyonu, amorf, kristalize edilemeyen CD türevlerinin üretimine yol açmıştır. Bu modifikasyonların avantajları, azaltılmış toksisite, gelişmiş suda çözünürlük, fiziksel ve mikrobiyolojik kararlılıktır. Birincil ve ikincil hidroksil grupları, türevlerini sentezlemek için 20 farklı fonksiyonel grup ile yer değiştirme yapabilmektedir. Yaygın olarak kullanım alanı bulan CD türevlerinden bazıları Tablo 1.4'te listelenmiştir.

Tablo 1.4 Kimyasal olarak değiştirilmiş CD'ler ve kısaltmaları (Tanwar, 2018).

Siklodekstrin (CD)	**Kısaltma**
Hidroksietil-β-CD	HE-β-CD
Hidroksipropil-β-CD	HP-β-CD
Sulfobütileter-β-CD	SE-β-CD
Metil-β-CD	M-β-CD
Dimetil-β-CD	DM-β-CD (DIMEB)
Karboksimetil-β-CD	CM-β-CD
Karboksimetil etil-β-CD	CME-β-CD
Glukozil-β-CD	G1-β-CD
Maltosil-β-CD	G2-β-CD
Tri-O-metil-β-CD	TRIMEB
Tri-O-etil-β-CD	TE-β-CD
Tri-O-butiril-β-CD	TB-β-CD

1.3.2 Siklodekstrinlerin özellikleri

Siklodekstrinlerin dışında yer alan birincil ve ikincil hidroksiller, siklodekstrinleri suda çözünür hale getiren yapıları oluşturmaktadır. Siklodekstrinlerin birçoğu organik çözücülerde çözünmemektedir. Siklodekstrin halkalarının boşluğu, bir C-H grupları halkası, bir glikozidik oksijen atomları halkası ve yine bir C-H grupları halkasından

oluşur. Bu, siklodekstrin halkalarının içini daha az polar hale getirir. En yaygın olarak kullanılan üç siklodekstrinin bazı önemli özellikleri ve moleküler boyutları ile ilgili bilgiler Tablo 1.5'te yer almaktadır (Saenger, 1980).

Tablo 1.5 Siklodekstrinlerin fiziksel özellikleri ve moleküler boyutları

Özellik	**Siklodekstrin Türleri**		
	α	**β**	**γ**
Glikoz birimlerinin sayısı	6	7	8
Moleküler ağırlık (g / mol)	972	1135	1297
Boşluk hacmi ($Å^3$)	176	346	510
25 ° C'de suda çözünürlük (g/100 ml)	14.5	1.85	23.2
Spesifik rotasyon $[\alpha]_D^{25}$	150.5 ± 0.5	162.5 ± 0.5	177.4 ± 0.5
İç çap (Å)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Dış çap (Å)	14.6±0.4	15.4±0.4	17.5±0.4
Yükseklik konisi (Å)	7.9±0.1	7.9±0.1	7.9±0.1
Kristal formlar (suda)	Altıgen Plakalar	Monoklinik paralelkenarlar	Kuadratik prizmalar
25 ° C'de pK (potansiyometri ile)	12.332	12.202	12.081

Siklodekstrinler, halka açılmasına ve çeşitli lineer oligosakkaritlerin ve glikoz birimlerinin oluşumuna neden olan düşük pH'ta asit hidrolizine karşı hassastır, ancak alkali koşullar altında stabildirler. Siklodekstrinlerin toksik özelliği neredeyse yok denilecek kadar azdır. Siklodekstrinlerin az sayıdaki toksisitesinden biri hemoliz olayıdır. Hemoliz, siklodekstrinlerin membran bileşenleriyle etkileşimlerinden kaynaklanan ikincil bir olaydır. Düşük konsantrasyondaki siklodekstrinlerin insan eritrositlerini ozmotik ve ısı kaynaklı hemolize karşı koruduğu bildirilmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda, 37 °C, pH 7.4, 10 mM/L izotonik fosfat tamponunda, hücre zarından kolesterol ve fosfolipitlerin salınması sonucu hücre bozulmasına neden olurlar.

Siklodekstrin kompleks, çözünürlük geliştirme, kararsız konukların stabilizasyonu, uyumlu olmayan bileşiklerin fiziksel izolasyonu, uçuculuğun ve süblimasyonun kontrolü gibi konuk moleküllerin yararlı modifikasyonunu sağlayabilir. Ayrıca, konuğun kimyasal reaktivitesi, boşluğa dahil edilmesiyle değiştirilir.

Siklodekstrinler, dış yüzeyde hidrofobik boşluk ve hidrofilik olan halka benzeri yapıları nedeniyle konak-konuk kompleksini gerçekleştirebilir. Siklodekstrin

moleküllerinin hidrofobik boşluğu, içine uygun şekilde boyutlandırılmış polar olmayan parçaların iç kısımda kompleksleri oluşturmak için girebildiği bir mikro ortam sağlar. İnklüzyon kompleksinin oluşumu sırasında hiçbir kovalent bağ kopmamakta veya oluşmamaktadır. Kompleks oluşumun itici gücü, yüksek entalpili su moleküllerinin uygun bir konuk molekül ile yer değiştirmesidir. Su moleküllerine kıyasla daha hidrofobik bir konuk boşluk yapıda yer değiştirmekte ve ardından bir apolar-apolar etkileşim meydana gelmektedir. Yer değiştirme siklodekstrin halka yapısını azaltır ve daha kararlı bir düşük enerji durumuna neden olur (Rodpothong, 2015).

İnklüzyon kompleksi, diğer yöntemlerle elde edilemeyen konuk moleküllerin modifikasyonuna yarar sağlar ve bu birçok özelliği geliştirir (Del Valle, 2004):

- Çözünürlüğü az olan yüksek konuklarda çözünürlük artışı
- Oksidasyonun nedeniyle kararsız konuğun bozunma etkilerine karşı kararlılığı
- Uçuculuk ve süblimleşmenin kontrolü
- Uyumsuz bileşiklerin fiziksel izolasyonu
- Kromatografik ayrımlar
- Lezzetleri maskeleyerek tat değişikliği
- Hoş olmayan kokular ve tat salımı
- Kontrollü ilaç salınımı
- Kimyasal reaksiyonların yönlendirilmesi
- Floresans ve ışık emiliminin kontrolü

Bir siklodekstrinin katılma kompleksi oluşturma yeteneğinin iki temel faktörü vardır. Bunların ilki, konuk molekülün boyutuna göre siklodekstrinin göreceli boyut veya konuk içindeki belirli anahtar fonksiyonel gruplara bağlı olan sterik etkisidir (Del Valle, 2004). İkincisi, sistemin farklı bileşenleri (siklodekstrin, konuk, çözücü) arasındaki termodinamik etkileşimdir.

1.3.3 Siklodekstrinlerin uygulamaları

CD'lerin biyolojik olarak bozunabilirliği, biyouyumluluğu ve çok yönlülüğü nedeniyle endüstriyel uygulamaları çok çeşitlidir. CD'lerin çeşitli uygulamaları Şekil 1.21'de gösterilmektedir. CD'ler tekstil ve ilaç endüstrilerinin yanı sıra tarım, gıda teknolojisi, çevre koruma, kimyasal ve biyolojik analiz, boya ve kozmetikte kullanılmıştır. Bu

uygulamaların çoğu, CD'lerin birçok molekül türü ile kararlı kompleksler oluşturma yeteneği nedeniyle mümkündür (Poulson vd., 2021).



Şekil 1.21 Siklodekstrinlerin çeşitli uygulamaları

Her bağlanan yapı ayrı ayrı CD ile çevrelendiğinden, molekül mikroskobik bir bakış açısıyla mikro yapıda kapsüllendiğinden bileşiğin kimyasal ve fiziksel özelliklerinde avantajlı değişikliklere yol açabilir (Bertolla, 2010).

- Işığa veya oksijene duyarlı maddelerin stabilizasyonu.
- Konuk moleküllerin kimyasal reaktivitesinin modifikasyonu.
- Çok uçucu maddelerin fiksasyonu.
- Çözünürlüğün iyileştirilmesi.
- Sıvı maddelerin toz haline getirilmesi.
- Mikro organizmalar tarafından bozulmaya karşı koruma.
- Kötü koku ve tatların maskelenmesi.
- Maskeleme pigmentleri veya maddelerin rengi.
- Konuk moleküllerle CD'lerin katalitik aktivitesi.

CD'lerin veya türevlerinin bu özellikleri, onları gıda ve süsleme eşyaları, tarım, kimya teknolojileri, analitik kimya ve ilaç endüstrisindeki uygulamalar için uygun hale getirmektedir. Düşük fiyatı ve β-CD'nin en geniş bileşik yelpazesini içerme yeteneği,

β-CD'yi en yaygın olarak kullanılan siklodekstrinler yapar. Bu nedenle, aşağıda yer alan uygulama örnekleri β-CD'ye bağlı olarak özelliklerine odaklanılacaktır.

1.3.4 Siklodekstrinlerin inklüzyon kompleksleri

Doğası gereği hidrofobik olan iç boşluk, çeşitli konuk moleküllerin bağlanması ile kompleksler oluşturma yeteneği sağlama CD'lerin temel bir özelliğidir. CD bağlanma durumu, genellikle sadece bir molekülün, kompleks oluşturması için CD molekülünün boşluğu ile etkileşime girdiği stokiyometrik bir moleküler olgudur.

Kompleksleşme, termodinamik olarak, siklodekstrinin farklı bileşenleri ile aktif ilaç arasındaki etkileşimler olarak görülebilir. Aktif ilacı siklodekstrin içine çeken kompleks oluşum için net enerjik itici kuvvet gerekli olmalıdır. Siklodekstrinin en kararlı üç boyutlu yapısı, daha önce açıklandığı gibi, hidroksil gruplarını dış ortama sunan daha büyük ve daha küçük açıklıklara ve çoğunlukla boşluğun içini kaplayan hidrofobik işlevselliğe sahip bir toroidtir. Bu benzersiz konfigürasyon, polar moleküller ve fonksiyonel gruplarla aktif ilaç kompleksi oluşturmak için gerekli olan termodinamik bir itici güç yaratır. Siklodekstrin ve aktif ilaç arasında dengeyi kompleks oluşumuna doğru kaydıran dört olumlu etkileşim vardır (Lupidi, 2016):

- Polar su moleküllerinin apolar siklodekstrin boşluğunda yer değiştirmesi,
- Yer değiştiren su daha büyük yapıda döndükçe oluşan artan hidrojen bağı sayısı,
- Hidrofobik aktif ilaç ile sulu ortam arasındaki itici etkileşimin azalması,
- Aktif ilaç kendisini apolar siklodekstrin boşluğuna sokarken hidrofobik etkileşimlerde bir artış gösterir.

İlk kompleksleşme dengesi çok hızlı kurulurken, nihai dengeye ulaşılması daha uzun sürebilir. Aktif olan ilaç, siklodekstrin boşluğuna girdikten sonra, var olan zayıf van der Waals kuvvetlerinden maksimum fayda sağlamak için konformasyonel ayarlamalar yapar (Birhade vd., 2010). Kapsülleme, ilaç molekülünü çeşitli reaktif moleküllerin saldırısına karşı korumakta ve bu şekilde hidroliz, oksidasyon, sterik yeniden düzenleme ve hatta enzimatik ayrışma oranını azaltır (Loftsson ve Brewster, 1996). Ek olarak, CD'ler ışığa duyarlı çeşitli ilaçların foto bozulmasını azaltabilir.

İlaç-CD kompleksinden ilaç salınımında farklı mekanizmalar önemli bir rol oynar. İlacın (D) CD'ye kompleksleşmesi, molekül ve CD boşluğu arasındaki kovalent olmayan bir etkileşim yoluyla gerçekleşir. Bu, ilaç molekülünün sürekli olarak

konakçı CD ile birleştiği ve ayrıldığı dinamik bir süreçtir. 1: 1 oranında kompleks varsayıldığında, etkileşim aşağıdaki gibi olacaktır (Lupidi, 2016):

$$D_{boş} + CD_{boş} \overset{K}{\rightleftarrows} DCD_{kompleks} \quad (1.1)$$

İlaç salım mekanizması için iki parametre, kompleksleşme sabiti (K) ve kompleksin ömrü çok önemlidir.

1.3.5 Bazı yeni dağıtım sistemlerinin tasarımında siklodekstrin uygulamaları

Siklodekstrinlerin kompleks ilaçlar oluşturması veya farmasötik formülasyonlarda fonksiyonel taşıyıcı materyaller olarak hareket etmesi için gösterdiği belirli özellikler, gerekli ilaç miktarlarının bir süre hedeflenen bölgeye verimli ve hassas bir şekilde verilmesi için potansiyel adaylar olarak yeni uygulamaların olasılığını açmıştır. Son on beş yılda, farklı salım özelliklerine sahip diğer taşıyıcılarla birlikte CD konjugatların kullanılarak farklı salım kontrollü preparatlar tasarlamak için birçok yeni araç üzerinde çalışılmalar devam etmektedir.

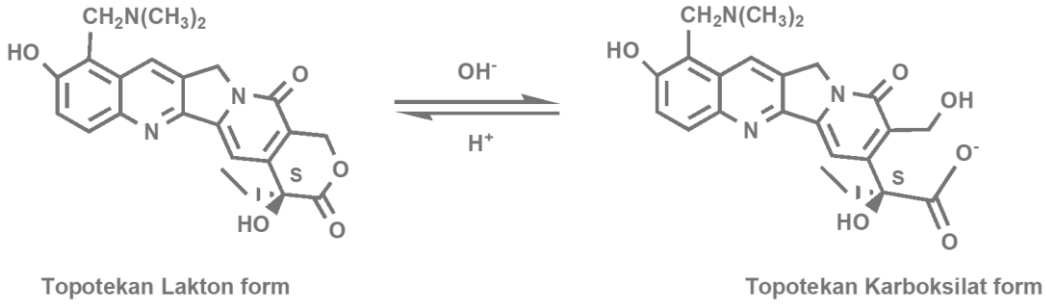
Lipozomlar; İlaç dağıtımında, CD-ilaç komplekslerini lipozomlara hapsetme kavramı, hem CD'lerin (ilaçların çözünürlüğünü artırmak gibi) hem de lipozomların (ilaçların hedeflenmesi gibi) avantajlarını tek bir sistemde birleştirerek her bir sistemle ilişkili sorunları ortadan kaldırır. Lipozomlar, hidrofilik ilaçları sulu fazda ve hidrofobik ilaçları lipit çift tabakalarında tutar ve ilaçları hedef bölgelere taşıma görevi görürler (Emara vd., 2002). Bazı lipofilik ilaçların iki tabaka oluşumuna ve stabilitesine müdahale edebilmesi, lipozomlarla ilişkilendirilebilecek değerli ilaçların aralığını ve miktarını sınırlar. CD'ler, suda çözünür kompleksler oluşturarak, çözünmeyen ilaçların veziküllerin sulu fazına uyum sağlamasına ve böylece potansiyel olarak ilaç-lipid kütle oranı seviyelerini artırmasına, kapsülleme (yani, membran stabilize edici ajanlar) için uygun olan çözünmeyen ilaçların aralığını genişletmesine ve ilaç hedeflemeye izin vermek ve ilacın toksisitesinde azalmaya izin verecektir. CD komplekslerinin intravenöz uygulamasıyla ilişkili problemler, örneğin hızlı idrara çıkarılması ve özellikle kronik kullanımdan sonra böbreklerde toksisite, lipozomlara hapsolmaları ile engellenebilir (Evrard vd., 2002).

Nanopartiküller; Nanopartiküller, hedeflenen ilaç taşınımını sağlamak ve zayıf şekilde çözünür ilaçların etkinliğini ve biyoyararlanımını artırmak için uygun olan stabil sistemlerdir. Bununla birlikte, nanopartiküllerin güvenliği ve etkinliği, polimerik

materyalin aşırı uygulanmasına yol açabilecek çok düşük ilaç yüklemeleri ve sınırlı tuzaklanma verimliliği (klasik su emülsiyonu polimerizasyon prosedürleriyle) ile sınırlıdır. Nanopartiküllerin tasarımında CD'lerin iki uygulaması çok ümit verici bulunmuştur. Bunlardan ilki nanopartiküllerin yükleme kapasitesini arttırmak, diğeri ise amfifilik CD diesterlerinin nanopresipitasyonuyla nanosferlerin ya da nanokapsüllerin kendiliğinden oluşumudur. Nanopartiküllerin hem oral hem de parenteral ilaç uygulamasına olan büyük ilgisi nedeniyle her iki yeni tekniğin de yararlı olduğu bildirilmiştir (Hedges, 1998).

1.4 Topotekan

Topotekan hidroklorür, suda çözünür, yarı sentetik bir kamptotesin analoğudur. 213-218 ºC aralığında erime noktasına sahip açık sarı ila yeşilimsi bir tozdur. Metanol içinde topotekan'ın ultraviyole absorpsiyon spektrumu, 207, 224, 269, 296, 318, 332, 371 ve 384 nm'lik maksimumları içerir (Patankar, 2010). E-halkasında bir α-hidroksilakton bulunan beş halkalı heterosiklik bir yapıya sahiptir (Şekil 1.22). İlacın lakton formu aktiftir; bununla birlikte, çoğu kamptotesin gibi, bu E-halkası, fizyolojik pH'ta (pH> 7) muhafaza edildiğinde dakikalar içinde ilacın halka açık bir formuna hızla hidrolize olur. Lakton halkasının hidrolizi, laktona karşılık gelen karboksilata dönüştürülmesini içerir. Lakton halkasının açılması, in vitro aktivite kaybına neden olur ve ayrıca in vivo antikanser aktivitesi azalır (Jaxel vd., 1989). Sağlam bir lakton halkasının, bu ilacın kanser hücrelerine pasif difüzyonu, ayrıca hedef topoizomeraz I enzimi ile etkileşimi için gerekli olduğu bulunmuştur (Hsiang vd., 1985; Hertzberg vd., 1989). Bu nedenle, E-halkanın bozulmamış lakton yapısını koruyabilen stratejiler, terapötik faydalar sağlamalıdır. Bu girişte daha sonra belirtildiği gibi, genel olarak ilaç taşıyıcı formülasyonları, ilacın lakton formunun hidrolizden korunmasına yardımcı olabilecek bir yaklaşım sağlar.



Şekil 1.22 Topotekanın kimyasal yapısı (Tarhan vd., 2019)

Topotekan, diğer suda çözünür kamptotesin analoğu irinotekan gibi bir topoizomeraz 1 inhibitörüdür. Topoizomeraz 1 (TOP1), DNA replikasyon işlemi sırasında önemli bir rol oynayan yüksek ökaryotlarda bulunan temel bir enzimdir (Huang vd., 2017). Kopyalama sırasında, süper sargılı çift sarmal olarak var olan DNA, yeni ipliklerin sentezi için bir şablon görevi gören tek sarmal oluşturmak için çözülür. TOP1, DNA ile geçici bölünebilir bir kompleks oluşturur ve sarmal çözüldüğünde ortaya çıkan burulma stresini hafifletmek için DNA'da çentik oluşturur. Bu geçici bir komplekstir ve enzim serbest bırakılarak yeni ipliğin yeniden bağlanmasına izin verilir. Topotekan, TOP1 çentikli DNA kompleksine bağlanır ve onu stabilize eder; böylece çentikli ipin yeniden bağlanmasını önler. Bu da geri dönüşü olmayan çift iplik kırılmalarının oluşumunu teşvik eder (Hsiang vd.,1985; Hsiang ve Liu, 1988; Hsiang vd.,1989).

Topotekan ve diğer kamptotesin analoglarının sitotoksik etkileri bu nedenle öncelikle tümör hücreleri hücre döngüsünün s-fazından (DNA sentezi) geçerken elde edilir. In vitro çalışmalar, s-fazındaki hücrelerin, G1 veya G2'de olduklarından 100-1000 kat daha kamptotesinlere karşı duyarlı olduklarını göstermiştir (Buzun vd., 2020). Topotekan'ın aktivitesi, büyük ölçüde ilacın uzun zaman dilimleri için lakton formunda mevcut olmasını sağlamaya bağlıdır.

Topotekan, birinci basamak kemoterapinin başarısız olmasından sonra yumurtalıkta metastatik karsinom ve nükseden küçük hücreli akciğer kanserinin tedavisi için 1996 yılında ABD-FDA tarafından onaylanmıştır. Hycamtin markası altında enjeksiyonluk liyofilize toz (sulandırılarak) olarak sağlanır (Patankar, 2010). Topotekan ayrıca gliomalarda, akut miyelojenöz lösemide, multipl miyelomda, nöroblastomda, meme kenserinde, pankreas kanserinde, retinoblastomda aktivite göstermiştir (Broom, 1996).

Topotekanın plazma proteinlerine bağlanması düşüktür (~%35) ve bu kamptotesin analoğunun benzersiz özelliklerinden birini vurgulamaktadır. Daha spesifik olarak, ana ilaç kamptotesinin lakton formunun hızla, insan serum albüminine güçlü bağlanma sergileyen ilacın karboksilat formuna dönüştüğü bilinmektedir (Adane, 2010). Lakton veya karboksilat formundaki topotekan, insan serum albümini ile hiçbir ilişki göstermez ve kültürdeki hücrelere karşı aktivitesi, serum albümininin varlığından etkilenmez (Mi vd., 1995). Topotekan'ın karaciğer mikrozomal enzimleri tarafından metabolizmada N-desmetil topotekan'a uğradığı gösterilmiştir. İlacın bu formu, ana

bileşiğe kıyasla azalmış anti-tümör aktivitesi sergiler (Rosing vd., 1999). Bununla birlikte, uygulanan topotekan dozunun %25-90'ının ana ilaç olarak hastalardan idrarla atıldığı unutulmamalıdır.

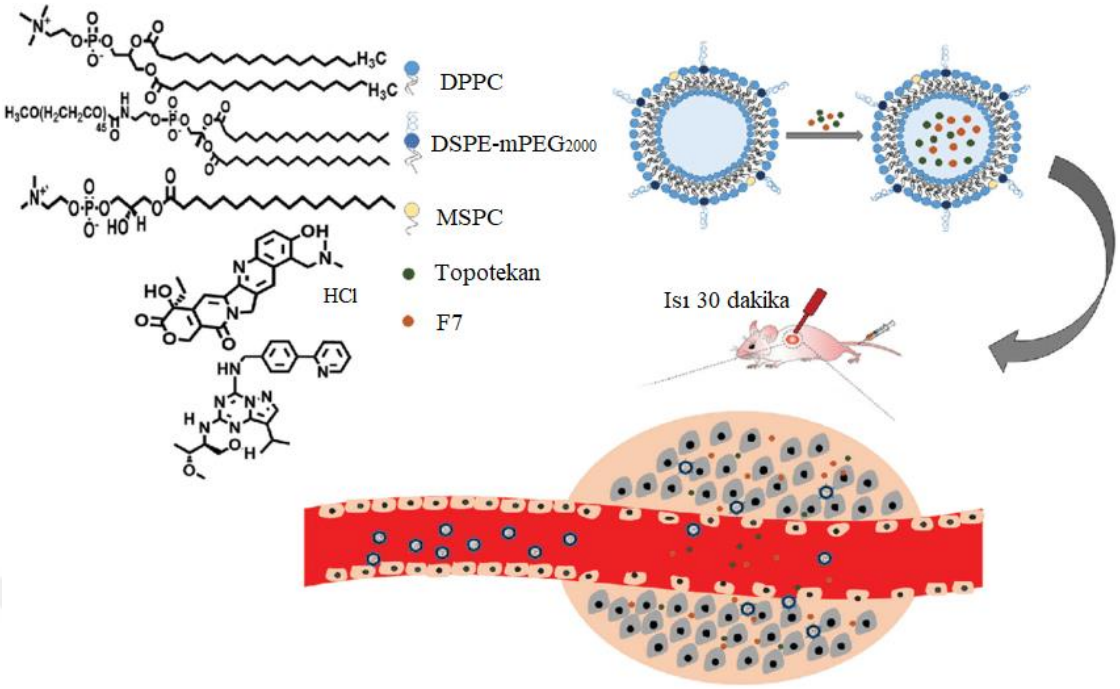
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Wang ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan çalışmada irinotekan ve berberinin birlikte verilmesi için nanolipozomlar geliştirdiler. Onivyde, irinotekanın farmakokinetiğini ve tümör biyodağılımını iyileştirebilen ilk irinotekan (IRI) nanolipozomudur. FDA, GEM için etkili olmayan pankreas kanseri hastalarının tedavisi için onivydeyi onaylamasına rağmen, onivydenin neden olduğu gastrointestinal toksisite, klinik uygulamada hala çözülmesi gereken bir sorundur. Birkaç farklı bitkiden ekstrakte edilen bir izokinolon alkaloidi olan berberinin (BER), sitotoksik ilaçlarla kombinasyon halinde bağırsak mukozitini hafifletmede ve sinerjik antikanser etkisi oluşturmada faydalı etki gösterdiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, tedavi edici etki, iki ilacın farklı farmakokinetik davranışından etkilendi. Onlar bu nedenle, lipBI olarak adlandırılan irinotekan ve berberinin birlikte verilmesi için nanolipozomlar oluşturmak için trietilamin-sükroz oktasülfat gradyanını kullandı. Bu birlikte taşınım için hazırlanan nanolipozomlar, vücutta sinerjik oran olarak varlığını sürdürdüğü, IRI ve BER'nin birlikte kullanıldığında tümör dağılımını yok ettiği bildirildi. LipBI'nin onivyde ile karşılaştırılmasında hem BXPC-3 pankreas kanseri modelinde tümör büyümesini ($p < 0,05$) hem de farelerde IRI'nin neden olduğu gastrointestinal toksisiteyi önemli ölçüde azalttığı rapor edildi. Genel olarak, pankreas kanseri tedavisinde IRI/BER yüklü lipozomların umut verici potansiyele sahip olduğu bildirildi (Wang vd., 2021).

Lin ve arkadaşları (2020), butilideneftalid (BP) etkili antikanser ilacı ile çalışmışlardır. BP'nin zayıf biyoyararlanımı onu ilaca dirençli beyin tümörlerinin tedavi edilmesinde etkisiz hale getirmektedir. Bununla birlikte, bu sorun, intranazal uygulama dahil olmak üzere, invaziv olmayan taşınım sistemlerinin kullanılmasıyla aşılmaya çalışıldı. Onların yaptığı çalışmada, BP'nin biyoyararlanımı, ilaç kararlılığı ve kapsülleme etkinliği (EE, %95'e kadar), lipozomal formülasyonlarda (CDD1) siklodekstrin ile kapsüllenmiş BP kullanılarak geliştirildi. CDD1 sisteminin fiziksel özellikleri ve kapsülleme etkinliği dinamik ışık saçılımı, geçirimli elektron mikroskobu, UV-Vis ve nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile araştırıldı. Sitotoksisite çalışmaları MTT denemesiyle incelendi ve hücresel alım durumu için floresan mikroskobu kullanıldı. CDD1 sistemi, tümör hücrelerinde 8 saatten fazla devam etti. Bu durum, BP içeren siklodekstrin veya BP içeren lipozomların tutulmasında önemli bir gelişme

olduğundan CDD1'de daha yüksek bir BP'nin içeriğine işaret edilmektedir. Nano ölçekli CDD1 formülasyonları, temozolomide dirençli glioblastoma multiforme hücrelerine uygulandıktan sonra hayatta kalma süresinin arttığı gözlemlendi. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresiyle ilacın biyolojik dağılımının, oral uygulama yöntemlerine kıyasla BP birikimini 10 kat arttırdığını ortaya koydu. Sonuç olarak, BP/siklodekstrin/lipozomal formülasyonlar, ilaca dirençli beyin tümörlerinin klinik tedavi uygulamalarında kullanım potansiyeline sahip olduğu bildirildi (Lin vd., 2020).

Du ve arkadaşları (2020), hedefleme etkinliğini arttırmak ve anti-tümör ilacın yan etkilerini azaltmak için topotekan (TPT) ve F7, tümörlerde arttırılmış geçirgenlik ile tutma ve ayrıca hedef bölgeye yönelik in vitro ısıtmayla kontrollü salım gösteren ısıya duyarlı lipozomlara (F7-TPT-TSL) birlikte yüklenme durumunu araştırdı. TPT, suda çözünür bir topoizomeraz I inhibitörü ve fizyolojik koşullar altında (pH 7,4) inaktif bir karboksilat yapısına dönüşebilen bir anti kanser ilaçtır. F7, yüksek toksisitesi nedeniyle kullanımı kısıtlanan döngüye bağımlı kinaza önemli ölçüde dirençli yeni bir ilaçtır. F7-TPT-TSL, mükemmel partikül dağılımına (yaklaşık 103 nm), yüksek tutma verimliliğine (>%95), bariz ısıya duyarlı özelliğe ve iyi kararlılığa sahiptir. Konfokal mikroskopi ile yapılan incelemede tümör hücrelerinde spesifik olarak daha yüksek TSL birikimi görüldü. F7-TPT-TSL/H'nin MTT analizi sonuçlarına göre diğer formülasyonlarla karşılaştırıldığında en güçlü hücre öldürücülüğüne sahip olduğu kanıtlandı. Sonrasında tedavi edici etkinlik, hipertermi ile birlikte TSL'de birlikte yüklenen TPT ve F7'nin uyumunu gösterdi. Bu nedenle, sıcaklıkla tetiklenen kanserin tedavi edilmesinde F7-TPT-TSL'nin umut verici bir sistem olarak hizmet edebileceği bildirildi. Şekil 2.1'de F7-TPT-TSL'nin oluşum süreci, yapısı ve hipertermi ile kombine kemoterapideki uygulamaları gösterilmektedir (Du vd., 2020).



Şekil 2.1 F7-TPT-TSL'nin oluşum süreci ve yapısının şematik gösterimi ve hipertermi ile kombine kemoterapideki uygulamaları

Mehmood ve arkadaşlarının (2020) yapmış olduğu bir araştırmada, topotekan ve doksorubisin gibi kanser ilaçlarının vücuda verilmesi durumunda sağlıklı doku etkileşimleri ve sistemik toksisite gibi riskler taşıdığı ortaya çıkmıştır. Isıya duyarlı lipozomların kullanımı, odaklanmış ultrason gibi hedef bölgede hiperterminin uygulanması üzerine ilaç salımı meydana geldiğinden, bu tür ilaçların minimum riskle verilmesi için hedeflenmiş taşınım için yeni bir yaklaşım sunar. Topotekan ve doksorubisinin ısıya duyarlı lipozomlar üretmek için film hidrasyon yöntemi kullanılarak tasarlandı ve bu ilaçların uygunlukları test edildi. Amonyum sülfat tamponu (300 mM pH 4,0) ile lipid film hidratlaştırıldı ve sonrasında istenilen boyutta lipozomun elde edilmesi için gaz ekstrüzyonu yapıldı. 38°C'de inkübasyonla lipozomlara ilaç yüklendi, sonrasında lipozomların dış kısmı tamponla pH 7,4'e ayarlandı. Diferansiyel taramalı kalorimetri, dinamik ışık saçılımı ve floresan ölçümleri ile karakteristik testler yapıldı. 46°C'deki faz geçiş sıcaklığında (TM) ve yaklaşık 100 nm çapa sahip ısıya duyarlı lipozomlar elde edilirken 39-42 °C sıcaklık aralığında ise ilaçlar yüklerini serbest bıraktılar. Doksorubisin'in kendi kendini söndürme özelliği nedeniyle doğru salım profili floresan okumaları yapılamadı. Bu nedenle topotekanın, doksorubisin ile karşılaştırıldığında ısıya duyarlı bir lipozom formülasyonunun tasarımı ve optimizasyonu için daha uygun bir model ilaç olduğu ve

hedef bölgenin dışına ilaç sızıntısı riskinin daha az olduğu anlaşıldı (Mehmood vd., 2020).

Patel ve Patel'in (2020) çalışmasında tümör bölgelerinde kontrollü ilaç salınımı sağlayan ilaç dağıtımının geliştirilmesi, antikanser tedavi edicilerin geliştirilmesi için çekici bir seçenek olarak ortaya çıkmıştır. Yeni nesil nano tedavi ediciler yalnızca nano ölçeği içermemeli, aktif veya pasif hedefleme yoluyla katı tümöre giden yolu bulmalıdır. Polietilenglikollenmiş lipidlerin yüzey modifikasyonu, lipozomların uzun dolaşımda olması ve pasif olarak tümörü hedef alması için uygulanan tekniklerden biridir. Lipozomların polietilenglikolasyonu, *in vivo* olarak ilaç molekülünün farmakokinetiğini değiştirmesine yardımcı oldu. Böyle karmaşık bir ilaç taşınım sisteminin klinik uygulamalara başarılı yolculuğu, derinlemesine anlama ve karakterizasyon gerektirdi. Onların yapmış olduğu araştırma neticesinde, klinik ihtiyacı karşılayan topotekan içeren sterik olarak stabilize lipozomlar üretildi ve karakterize edildi. Lipozomların hazırlanması için etanol enjeksiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ve ardından boyut küçültme için ekstrüzyon kullanıldı. Çalışma ortamı, diyaliz ve ardından ilaç yüklemesi kullanılarak sakkaroz çözeltisinin izotonik formu ile değiştirildi. Lipozomların membran fazı ve dinamikleri, ilaç ve lipid miktar tayini, boyut dağılımı, kapsüllenmiş ilacın durumu, lipozomların iç hacmi ve pH'ı, lipozom yüzeyinde kaplanmış polietilenglikolun varlığı ile kalınlığı ve in vitro sızıntı testi karakterize edildi. İncelenen tüm bu parametreler, formülasyonun farmakokinetik davranışı ve ilaçların in vivo olarak tümör hedefleme özelliği hakkında doğrudan veya dolaylı olarak bilgi sağlandı. Topotekanın nanolipozomlara yüklenmesi trans membran gradyan yöntemiyle uzaktan yapıldı. Topotekan lipozomlarının in vitro karakterizasyonu, tümör hücrelerini tedavi edici özelliğe sahip olduğu bildirildi (Patel ve Patel, 2020).

Tarhan ve arkadaşları (2019) tedavi edici ajanları ve biyo-makromolekülleri taşımak için yeni dallı manyetik nanokompozitin sentezini çalışmışlardır. Topotekan (TPT); akciğer, yumurtalık, meme, pankreas ve mide kanserine karşı önemli antitümör aktiviteye sahip olmasına rağmen, lakton formunun halka açılması sonrasında sitotoksik aktivitede azalmaya ve fizyolojik koşullarda ciddi yan etkilere neden olan bir ilaçtır. Lakton halka açıklığındaki sorunun giderilmesine katkıda bulunmak amacıyla, NαNα-Bis (karboksimetil)-L-lisin hidrat (NTA) dallanmış manyetik

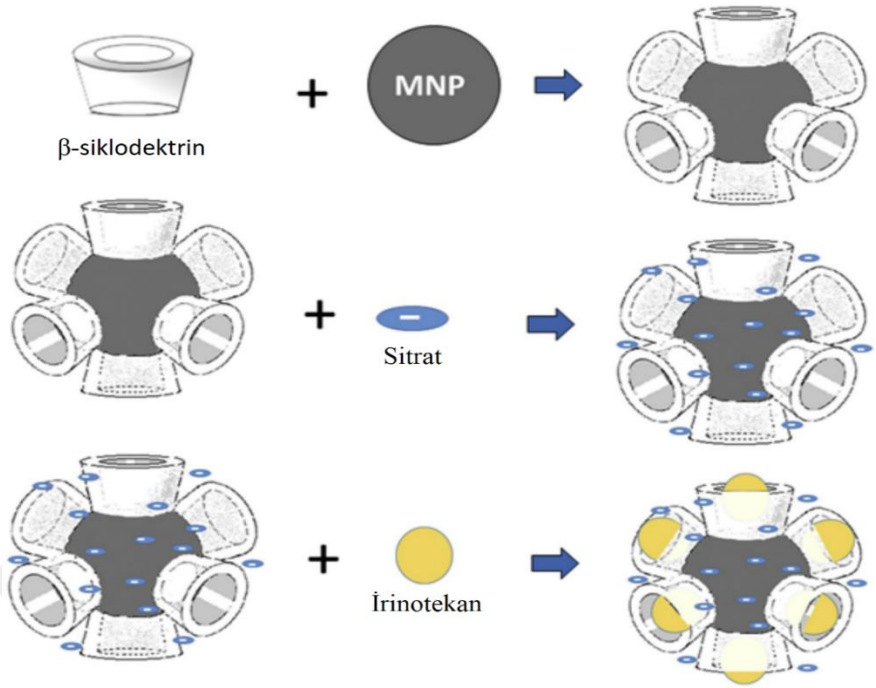
dekstran nanopartikülü (MD3) hazırlandı. Elde edilen MD3 manyetik nanokompozitin karakterizasyonu, çok yönlü analizler kullanılarak yapıldı. Sentezlenen ve karakterize edilen yeni MD3 nanokompozit ile TPT'nin kararlılığı ve salımı konsantrasyon, doz, pH ve zaman gibi çeşitli temel faktörler kullanılarak incelendi. TPT'nin MD3 üzerine hapsetme verimliliği ve yükleme kapasitesi pH 5'te sırasıyla %32,2 ve 1,44 mg/g olarak hesaplandı. İlaç yüklü MD3 ile farklı pH değerlerinde salım çalışmaları yapıldı ve en iyi salım kanserli bölgenin pH aralığında elde edildi. Başlangıç ilaç konsantrasyonu 0.118 mM olarak ölçüldü ve pH 5'te $3,8x10^{-2}$ mM ilacın nanokompozitlere yüklendiği hesaplandı. Ayrıca, pH 5,8'de 90 dakika sonra $9,2x10^{-4}$ mM ilacın salındığı ve 90 dakika boyunca ilacın salınma yüzdesi %2,42 olarak rapor edildi. Elde edilen veriler doğrultusunda biyouyumlu ve biyobozunur dallı MD3'ün kontrollü ilaç salımı için yeni bir ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Tarhan vd., 2019).

Yang ve arkadaşları (2019), ayırıcı ajanların (amonyum sülfat, sülfobütileter-β-siklodekstrin ve sukroz oktasülfatın) irinotekan lipozomlarının antitümör etkinliği üzerindeki etkisini araştırdılar. Onlara göre lipozom bazlı ilaç taşınım sistemlerinde uzaktan yükleme teknolojisi benzersiz bir başarıdır. Geleneksel pasif yükleme ile karşılaştırıldığında, uzaktan yükleme teknolojisi, yüksek ilaç yükleme verimliliği, düşük sızıntı oranı ve yeterli ilaç birikimi açısından farklı bir üstünlük sergilemektedir. Lipozom içi sulu fazda, ayırıcı ajanının karşı iyonu, ilaç karşı iyon tuzunun kristalizasyon durumunu kontrol edebilir ve böylece uzaktan yükleme etkinliğinin kontrolüne katkıda bulunabilir. Çalışmada, irinotekan (CPT-11) yüklü lipozomlar, amonyum sülfat (AS), sülfobütileter-P-siklodekstrin (SBE-P-CD) ve sakaroz oktasülfat (SOS) maddeleri kullanılarak geliştirildi. Elde edilen formülasyonlar sırasıyla AS lipozomal CPT-11, TEA-SBE-p-CD lipozomal CPT-11 ve TEA-SOS lipozomal CPT-11 olarak adlandırıldı. Kriyo geçirimli elektron mikrografları, TEA-SOS lipozomal CPT-11 içinde CPT-11'in biriktiğini gösterdi. Ayrıca, AS lipozomal CPT-11 ve TEA-SBE-β-CD lipozomal CPT-11 karşılaştırılmalarında, TEA-SOS lipozomal CPT-11'in daha yavaş ilaç salımı, daha uzun dolaşım süresi ve önemli ölçüde iyileştirilmiş antitümör etkinliği gösterdiği rapor edildi. Ayrıca çalışmalarında, ayırıcı ajanının uzaktan yükleme üzerindeki etkisine ilişkin yeni bilgiler elde edildi ve

CPT-11 yüklü lipozomların gelişimini değerlendirmek için faydalı bilgiler sağladı (Yang vd., 2019).

Jayawardana ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan çalışmada, piperlongumini β-Siklodekstrinlerile kompleks haline getirerek suda çözünmeyen ilacı (piperlongumine) lipozomlarda kapsüllemek için bir yöntem geliştirdiler. Kanserin tedavi edilmesinde nano taşıyıcı sistemlerin kullanılması ilaçların sürekli salımı ve vücudun tedaviye ihtiyaç duyulan belirli bölgelerini hedefleyebilmesi gibi avantajları nedeniyle ilgi çekicidir. Bununla birlikte, suda çözünmeyen kemoterapötik ilaçların lipozoma yüklenmesi zahmetli bir iştir. COLO 205 ve PC-3 hücre hatları ile inkübe edilmiş piperlongumin ile kapsüllenmiş lipozomlar, piperlongumin konsantrasyonu 20 μM olduğunda COLO 205 ve PC-3 hücrelerinin canlılığının sırasıyla %7 ve %41'e düştüğünü gösterdi (Jayawardana vd., 2018).

Monteiro ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışmada, daha kararlı demir oksit manyetik nanoparçacıkların (MNP'ler) oluşumunda farklı bileşenlerin (beta-siklodekstrin (β-CD), 2-hidroksipropil beta-siklodekstrin (HP-β-CD) ve sitrat anyonu) etkisi incelendi. MNP formülasyonları, FTIR, parçacık boyutu, dinamik ışık saçılımı ilkesine dayalı zeta potansiyeli, X-ışını toz modeli kırınımı, XPS spektroskopisi, geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve termogravimetrik analiz ile karakterize edildi. Sonuçlar, beta-siklodekstrinlerin ve sitratın, daha küçük boyutta kaplanmış MNP elde etmek için kilit bir rol oynadığını, irinotekan yüklenmesini ve salımı artırdığını, nanopartikül oksidasyonunu önlediğini ve daha stabil bir kolloidal dağılım elde etmek için etkili bir strateji olduğu kanıtlandı. Ayrıca sitrat kaplı β-CD-MNP'lerin, serbest irinotekan (IRI) ile aynı sitotoksiste etkiyi gösterdiği ifade edildi Şekil 2.2'de B-CD-MNP, sitrat kaplı B-CD-MNP ve irinotekan yüklenmiş sitrat kaplı B-CD-MNP'nin şematik olarak gösterilmektedir (Monteiro vd., 2017).



Şekil 2.2 B-CD-MNP, sitrat kaplı B-CD-MNP ve irinotekan yüklenmiş sitrat kaplı B-CD-MNP'nin şematik gösterimi

Hardiansyah ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada, hidrofobik bazlı ilaçların daha az hedeflenmiş ve sınırlı çözünürlüğe sahip olması ilaç taşınım sistemindeki önemli engellerden olması nedeniyle hidrofobik ilaçların çözünürlüğünü ve kontrollü salım davranışlarını artırmak için yeni stratejiler geliştirdiler. Çalışmada, hidrofobik ilacın bir modeli olan kurkumin, ilaç kontrollü salım sistemi için ilaç taşıyıcı platform olarak PEG'lenmiş manyetik lipozomlara yüklendi. İndükleyici manyetik ısıtma (hipertermi) ile uyarılan ilaç salımı, kurkumin yüklü PEG'lenmiş manyetik lipozomların in vitro hücresel sitotoksisite deneyi ve manyetik yönlendirme ile indüklenen hücresel içselleştirme durumu araştırıldı. İlaç taşıyıcılarının sonucu, süperparamanyetik bir özellik göstererek sulu çözelti içinde homojen olarak dağılabildiğini ve harici yüksek frekanslı manyetik alan (HFMF) ile endüktif manyetik ısıtma yapabileceğini gösterdi. In vitro kurkumin salım çalışmaları, ilaç taşıyıcılarının 37 °C'de önemli bir salım göstermediğini, 45 °C'de ise hızlı salım sergilediğini doğruladı. Bununla birlikte, 45 °C'de HFMF'ye maruz kalmayan kurkumine kıyasla, HFMF maruziyeti altında olan kurkumin üç kat daha yüksek salım gösterdi. In vitro sitotoksisite testi, kurkumin yüklü PEG'lenmiş manyetik lipozomların, artan kurkumin konsantrasyonuna paralel olarak MCF-7 hücrelerini verimli bir şekilde öldürebildiğini gösterdi. Bu nedenle, indükleyici manyetik ısıtma ile kombinasyon halindeki yeni hidrofobik ilaç yüklü PEG'lenmiş

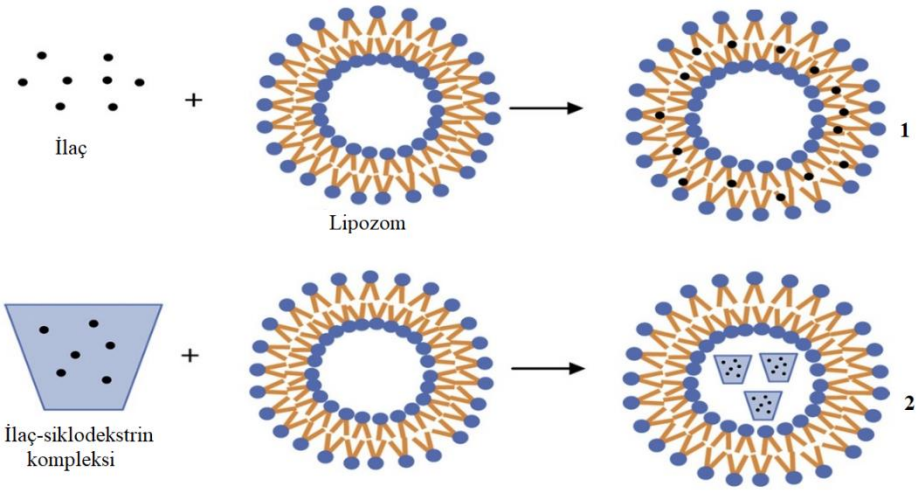
manyetik lipozomların, kanser tedavisi için kemoterapi ve termoterapi kombinasyonunda uygulanmak üzere umut verici olduğu tahmin edilmiştir (Hardiansyah vd., 2017).

Seleci ve arkadaşlarının (2017) çalışmasında, teranostik lipozomların hazırlanması, karakterizasyonu ve in vitro değerlendirmesi araştırıldı. Gelişmiş teranostik nanotıp, hastalıklı dokuların tanı ve etkili tedavisini birleştiren çok işlevli bir yaklaşım sunar. Bilindiği gibi, lipozom-kuantum dot (L-QD) hibrit veziküller, hücre görüntüleme için umut verici nanoyapılardır ve lipozomal-topotekan (L-TPT), sistemik temizliğe karşı koruma sağlayarak ve tümörün olduğu bölgede birikmesi için uzun süreye izin vererek TPT'nin etkinliğini arttırdı. Çalışmada, hidrofobik CdSe/ZnS QD ve TPT, sırasıyla iki katmanlı membranda ve lipozomların iç çekirdeğinde yer aldı. Lipozomların vezikül boyutunu, yükünü ve spektroskopik özelliklerini belirlemek için dinamik ışık saçılımı (DLS), zeta potansiyeli ölçümleri ve floresans/absorpsiyon spektroskopisi kullanılarak karakterizasyonları yapıldı. Ayrıca, nötr ve asidik pH koşulları altında ilaç salımı çalışıldı. TPT yüklü L-QD formülasyonunun hücresel alımını ve hücre içi taşınımını incelemek için floresan mikroskopisi ve akış sitometrisi analizleri yapıldı. Çalışmada kullanılan malzemelerin HeLa hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksisite araştırmaları MTT analizi ile yapıldı. Elde edilen verilere göre, TPT yüklü L-QD hibridinin yeterli fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu tedavi edici ve teşhis maddelerinin aynı anda birlikte verilmesini sağlayan umut verici çok işlevli bir taşınım aracı olarak kullanılabileceği bildirildi (Seleci vd., 2017).

Jain ve Jain (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, yumurtalık kanserinin kemoterapisi için tedavi edici etkinliği arttırmak adına sinerjik olarak aktif kombinasyonların kullanılması gerekliliği vurgulandı. Sinerjik olarak aktif paklitaksel-topotekanın kombinasyonu (Pac-Top; 20:1, w/w) yumurtalık kanserinin güvenli ve etkili tedavisi için folat bağlantılı polietilenglikol ile kaplanmış olan lipozomlara (FPL-Pac-Top) yüklendi. Karbodiimid kullanılarak bağlanma reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve reaksiyonların oluşum durumları kızılötesi spektral analizle doğrulandı. Oluşan bu lipozomların hem şekil ve fiziksel etkileşim durumu hem de lipozomlarda taşınan ilaçların in vitro salım kinetiği, hemolitik toksisite, OVCAR-3 hücre dizilerinde ex vivo farmakodinamik ve yumurtalık tümörü taşıyan farelerde ise farmakokinetik açıdan araştırıldı. Diferansiyel taramalı kalorimetre

çalışmaları ile lipozomların (150 nm) 41°C'de erimeye başladıkları gözlemlendi. Lipozomlardan ilaçların salımı Fickian difüzyon modeliyle takip edildi. Hematolojik çalışmalar, kan hücreleri için önemsiz toksisitenin varlığını ortaya çıkardı. İn vivo çalışmalar, uzun dolaşım davranışı (artan AUC0-t ve AUMC0-t ve MRT) ve yumurtalıklarda seçici FPL-Pac-Top birikiminin olduğunu ve FPL-Pac-Top, akış sitometrisinde daha az nekroz ve daha fazla apoptoz etki gösterdi. FPL-Pac-Top'un güçlü anti-kanser aktivitesi, viskozite termo duyarlılığı, uzun dolaşım yapısı ve hedeflenebilirlik gibi birçok özelliği ile ilişkilendirildi. Sonuç olarak FPL-Pac-Top'un, kanserin güvenli ve etkili bir şekilde tedavisinin hedeflenmesine katkı sunabileceği ifade edilmiştir (Jain ve Jain, 2016).

Wang ve arkadaşları (2016) geleneksel risperidon yüklü lipozom ile karşılaştırma yapabilmek için lipozom sisteminde kullanılmak üzere ilaç-siklodekstrin kompleksini hazırladılar. Çalışmalarında karşılaştırma yapabilmek için iki farklı yöntemle lipozom elde edildi. İnklüzyon komplekslerinin termal özellikleri ve lipozom morfolojisi için diferansiyel termal analiz (DTA) ile birlikte geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanıldı. Ayrıca, partikül boyutu, zeta potansiyeli ve kapsülleme verimliliğini ultrafiltrasyon ve ışık saçılım analizi ile incelendi. pH 7,4 fosfat tampon çözeltisinde in vitro salım çalışmaları gerçekleştiridi ve belirli zaman aralıklarında numuneler toplandı. Sonuç olarak, farklı yöntemlerle hazırlanan lipozomdaki ilaç-siklodekstrin kompleksi, geleneksel lipozomlardan daha düşük kapsülleme etkinliği gösterdi. Bununla birlikte, hazırlanan sistemin boyutu daha büyük ve kararlılığı ise ikincisinden daha iyiydi. Yeni taşınım sisteminin ikinci salım aşaması, birinci aşamadaki ilk ortaya çıkan salımdan sonra biraz daha yavaş olurken, geleneksel lipozom daha düzenli bir özellik sergiledi. Bu nedenle, yeni elde edilen lipozomun uzun etkili enjeksiyon ile birlikte uygulama formülasyonu olarak geliştirilme potansiyeline sahip olduğu rapor edildi. Şekil 2.3'te geleneksel ve ilaç-siklodekstrin kompleksinin lipozom ile ilaç taşınımı şematik olarak gösterilmektedir (Wang vd., 2016).

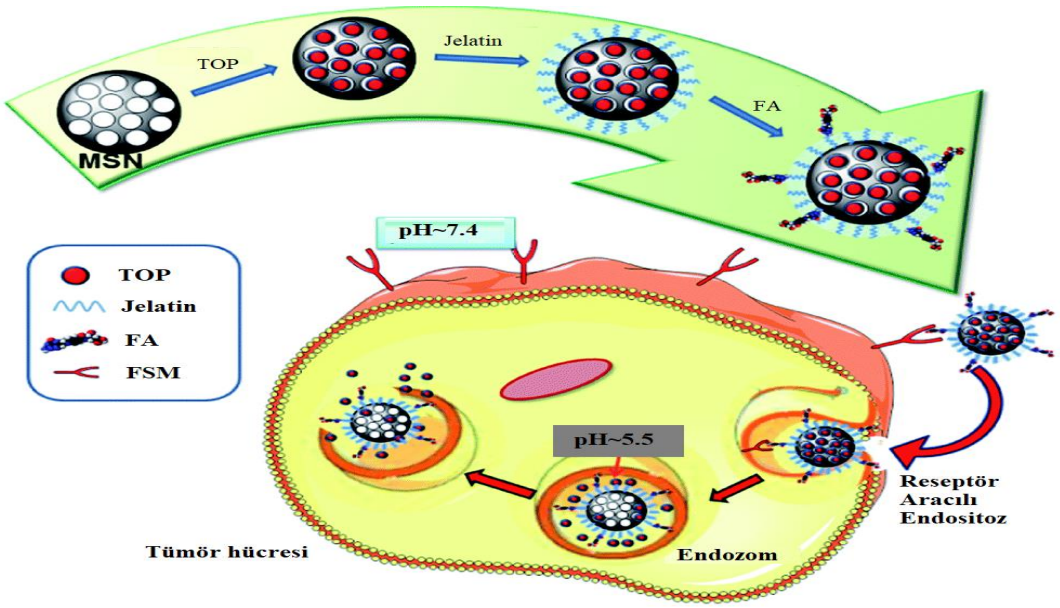


Şekil 2.3 Geleneksel ve ilaç-siklodekstrin kompleksinin lipozom ile ilaç taşınımının şematik gösterimi

Padhi ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan çalışmalarında, topotekan (TPT) çeşitli katı tümörlere karşı etkinlik göstermekte olan, ancak konu ile ilgili olarak farmasötik uyarılar nedeniyle klinik kullanımı kısıtlanan bir antikanser ilaç olması nedeniyle kısıtlamaya neden olan ilacın aktif lakton formunun inaktif karboksilat formuna hızlı dönüşümünü yavaşlatan ve sonuç olarak etkinliğini artıran başarılı bir TPT-PLGA (poli-laktid-ko-glikolid) nanosistemi formüle etmeye odaklanmışlardır. TPT-PLGA nanoparçacıklar, istenen parçacık boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli ve tutunma verimini elde etmek için sıralı optimizasyon ile bir çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği ile formüle edildi. TPT'nin kararlılığı, ilaç içeren fazda asidik bir pH'ta korunarak sağlandı ve sistem sitotoksik etki dahil olmak üzere in vitro-in vivo performans açısından değerlendirildi. Nanopartiküllerin içindeki düşük pH, ilacı aktif lakton formunda kalacak şekilde stabilize etti ve 15 güne kadar iki fazlı bir salım modelin varlığını ortaya çıkardı. Ek olarak, in vitro sitotoksisite analizinin yanı sıra in vivo antitümör etkinliği, saf ilaç (TPT) ile karşılaştırıldığında önemli bir yüksek proliferasyon inhibisyonu potansiyeli gösterdi. Bu nedenle araştırma verilerine göre, katı tümörleri tedavi etmek ve etkili taşınım için stabil TPT nanoparçacıkları geliştirmeye yönelik yenilikçi ve basit bir nano yapı rapor edildi (Padhi vd., 2016).

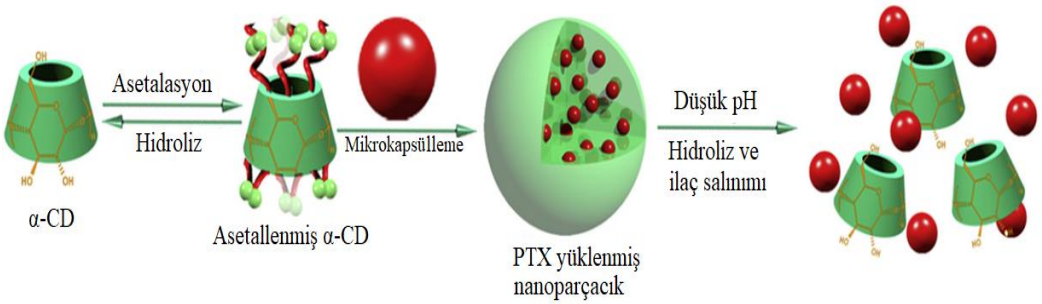
Martínez-Carmona ve arkadaşları (2016), topotekanın etkisiz karboksilat forma dönüşümünü engelleyecek bir çalışma yapmışlardır. Topotekan (TOP), kamptotesinin suda çözünür bir türevi olup farklı kanser türlerinin tedavi edilmesinde ilgi gören güçlü bir antitümör ilacıdır. Bununla birlikte, bu ilacın klinik kullanımındaki en büyük

dezavantajlarından biri, fizyolojik pH'ta etkisiz olan forma dönüşmesidir. Bu sorunu aşmak için mezogözenekli silika nanoparçacıklar (MSN'ler), umut verici nano taşıyıcılardır. Çalışmada TOP, MSN'ler içine kapsüllenmiş ve nanopartiküllerin içselleştirilmesini takiben asidik hücre bölmeleri sırasında (endo/lizozomlar; pH≤5.5) ilacın aktif formunun salınmasına izin veren tümör hücrelerine karşı seçicilik sağladığı rapor edildi. Bu amaçla, MSN'ler, TOP'u hidrolizden korumakta ve erken salınımını önlemekte, pH'a duyarlı bir katman görevi görmekte ve tümör hücrelerinde seçici içselleştirme için folik asit (FA) gibi hedefleyici ligandların aşılanması için çoklu sabitleme noktaları sağlayan çok işlevli bir jelatinli madde ile kaplandı. İn vitro testler, FA'ya afinitesi olan membran hücre yüzeyi işaretleyicilerini aşırı ifade eden kanser hücrelerinin, bu tür işaretleyicileri aşırı ifade etmeyen sağlıklı hücrelere göre daha yüksek oranda nanoparçacıkları benimsediğini gösterdi. Ayrıca nanosistemler, normal hücrelerin canlılığını azaltmazken tümör hücrelerini öldürmede etkili bulundu. Serbest olarak bulanan TOP, ilacın inaktivasyonuna atfedilebilecek her iki hücre hattını da yok etmede başarısız oldu. Bu yeni tasarlanan nano sistem, kansere karşı savaşmada ilaçların taşınması için doğru bir adım teşkil etmektedir. Şekil 2.4 TOP'u içine alan, jelatin bir kabukla kaplanmış ve hedefleme ligandı olarak folik asit (FA) ile süslenmiş MSN'lerden oluşan tümör hedefli TOP nanosistem şematik gösterilmektedir (Martínez-Carmona vd., 2016).



Şekil 2.4 TOP'u içine alan, jelatin bir kabukla kaplanmış ve hedefleme ligandı olarak folik asit (FA) ile süslenmiş MSN'lerden oluşan tümör hedefli TOP nanosisteminin şematik gösterimi

He ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada, pH'a duyarlı nanoparçacıkların tasarlanması, asetallenmiş α-siklodekstrin malzemelerinden kolaylıkla elde edildi. Tasarlanan nanoparçacıkların hidroliz periyodu, asetalasyon süresi ile kolayca kontrol edilebilen çeşitli asetal tiplerine sahip malzemelerin kullanılmasıyla hassas bir şekilde ayarlanabilir. pH duyarlılıkta hidrolize ve pH ile tetiklenen ilaç verme kapasitesine sahip bu nanoparçacıklar, in vitro ve in vivo olarak iyi biyouyumluluk gösterdi. Antikanser ilaç paklitakselin (PTX) yeni geliştirilen pH'a duyarlı nanosistemlere entegre edilmesi, çeşitli tümör hücrelerine karşı önemli ölçüde geliştirilmiş sitotoksik aktiviteye sahip nano tedavi edici maddelerin yolunu açabilir. Daha da önemlisi, bu şekilde formüle edilmiş tıbbi nano sistemler, PTX'e karşı dirençli olan kanser hücrelerinin çoklu ilaç direncini tersine çevirebilir. İn vivo antitümör çalışmaları, pH'a duyarlı nanosistemlerin, bozulmayan PTX ve pH'a duyarsız poli-laktid-ko-glikolid (PLGA) nanoformülasyonlarına göre üstünlüğünü de ortaya koydu. Dahası, diğer iki aside dayanıksız malzeme ile karşılaştırma yapıldığında siklodekstrin bazlı nano-taşıyıcıların ilaç yükleme kapasitesi, in vitro ve in vivo aktivite ve ayrıca hafifletilmiş yan etkiler açısından avantajlarını kanıtladı. Elde edilen veriler doğrultusunda pH'a duyarlı nanoparçacıkların, ilaç taşınımı için yeni nesil nano taşıyıcılar olarak hizmet edebileceği bildirildi. Şekil 2.5 Asetallenmiş α-CD'ye (Ac- α-CD) dayalı pH'a duyarlı PTX nanoaparçacık yapısı şematik olarak gösterilmketdir (He vd., 2013).



Şekil 2.5 Asetallenmiş α-CD'ye (Ac- α-CD) dayalı pH'a duyarlı PTX nanoaparçacık yapısının şematik gösterimi

Rahman ve arkadaşları (2012) tarafından sudaki çözünürlüğü zayıf ilaçların çözünürlüğünü ve dağıtım özelliklerini geliştirmek amacıyla, β-siklodekstrin-kurkumin (β-CD-C) inklüzyon kompleksleri (hidrofilik kurkumin) hazırlandı ve hem doğal kurkumin (hidrofobik) hem de kompleksleri ayrı ayrı lipozomlara hapsedildikten sonra akciğer ve kolon kanseri hücre hatlarında in vitro sitotoksisite açısından değerlendirildi. Metanol geri akışı ile hazırlanan β-CD-C kompleksleri ile

β-CD içinde kurkumin yüklenmesinin optimizasyonu sağlandı. İnklüzyon kompleksleri UV-Vis spektroskopisi, fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi ve X-ışını kırınımı kullanılarak karakterize edildi. Ayrıca, tüm lipozomal formülasyonlar, 2-8°C'de kurkumin ve β-CD-C kompleksi için yükleme etkinliği, partikül boyutu, polidispersite ve stabilite açısından karakterize edildi. B-CD-C komplekslerinin sudaki çözünürlüğü belirgin şekilde iyileşti ve komplekslerin bir ince film hidrasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan lipozomlara başarılı bir şekilde yüklenmesi de sağlandı. Kurkumin, βCD-C kompleksi ve bunların optimize edilmiş lipozomal formülasyonları, akciğer (A-459) ve kolon (SW-620) kanser hücre dizilerinde antikanser aktivite açısından değerlendirildi. Test edilen tüm kurkumin içeren formülasyonlar, bir MTT analizi ile belirlendiği üzere hücre çoğalmasını inhibe etmede etkili olduğu bulundu. Tüm kurkumin formülasyonları için medyan etkili dozun (IC50), test edilen hem kolon hem de akciğer kanseri hücre hatları için düşük μM aralığında olduğu rapor edildi. Çalışmanın sonuçlarına göre, kurkumin gibi suda az çözünen ilaçların β-CD inklüzyon komplekslerinin, lipozomlar gibi biyouyumlu veziküller içinde tutulabileceğini ve bu onların antikanser aktivitelerini engellemediğini doğruladı (Rahman vd., 2012).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Reaktifler ve kimyasallar

Çalışma süresince kullanılan tüm maddeler ve çözücüler analitik saflıkta olup ticari olarak satın alınıp kullanılmıştır. Manyetik demir oksit nanoparçacıklar (Fe_3O_4), manyetik β-siklodekstrin (Fe_3O_4@β-CD) ve lipozom literatürdeki sentezlenme mekanizmalarından yararlanılarak hazırlanmıştır.

Demir (III) Klorür Hekzahidrat ($FeCl_3.6H_2O$)

Demir (II) klorür tetrahidrat ($FeCl_2.4H_2O$)

β-siklodekstrin ($C_{42}H_{70}O_{35}$)

Glasiyel Asetik Asit (CH_3COOH)

MES (Tampon) ($C_6H_{13}NO_4S$)

Fosfat tuzu tamponu (Sigma 100 Tablet)

Asetonitril (CH_3CN)

Trietilamin ($C_6H_{15}N$)

Amonyak (NH_4OH)

Sodyum hidroksit (NaOH)

Hidroklorik asit (HCl)

Topotekan ($C_{23}H_{23}N_3O_5$)

Kolesterol ($C_{27}H_{46}O$)

Hidrojenlenmiş L-α-Fosfatidilkolin (1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine)

İzopropil Alkol (C_3H_8O)

Etil alkol (C_2H_5OH)

3.1.2 Cihazlar ve aletler

Bu çalışmanın büyük çoğunluğu Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Nanoteknoloji Araştırma Laboratuvarlarında bir kısmı ise İnönü Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında ve Ortadoğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Tez çalışması süresince faydalanılan cihaz ve araç-gereç listesi Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar ve aletler

Cihazın Adı	**Markası**
FT-IR	Perkin Elmer 400
UV-Vis Spektrofotometre	Agilent Cary 60
HPLC	Agilent 1260 Infinity Quaternary
SEM	QUANTA 400F
VSM	Cryogenic Limited PPMS
TEM	JEOL marka JEM 2100F
DLS	Malvern Nano ZS90
Etüv	Memmert
Ultra Saf Su Cihazı	Sartorius Arium Comfort
Sonikatör	Sonics
Işık Mikroskopu	Olympus CX21 Biyolojik Mikroskop
Ultrasonik Banyo	WiseClean
Manyetik Karıştırıcı-Isıtıcı	IKA C-MAG HS 7
pH Metre	Hanna HI 2211
Derin dondurucu	Vestel Buzdolabı ve Dondurucu
Mikropipetler	Eppendorf
Vorteks	Isolab
Hassas Terazi	Denver Instrument
Çalkalamalı İnkübatör	IKA KS 4000 i Control

3.2 Metotlar

Çalışmada hazırlanan nanomalzemelerin yapısal analiz, yüzey ve boyut morfolojisi manyetik karakterizasyonunda, taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirmeli elektron mikroskobu (TEM), optik mikroskop, fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR), parçacık boyutu dağılımı (DLS), zeta-potansiyel ölçüm ve titreşimli örnek manyetometresi (VSM) metotları kullanılmıştır. Ayrıca ilacın salım ve yükleme çalışmaları için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve ultraviyole-görünür bölge spektrofotometre (UV-Vis) kullanılmıştır.

3.2.1 Karakterizasyon

3.2.1.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), fonksiyonel grupları belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Genellikle fonksiyonel gruplar, bileşiğin kimyasal reaksiyon özelliklerini verir. Fonksiyonel grupların bazı örnekleri hidroksil (OH–) ve karbonildir (C=O). Fonksiyonel gruplar biliniyorsa, bileşik sınıfı belirlenebilir. Örneğin, hidroksil grubu (OH–) genellikle alkolleri ve karboksil asitleri temsil eder (Alqaheem ve Alomair, 2020).

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR) analizleri, Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi bünyesinde bulunan Perkin Elmer 400 FT-IR Spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır.

3.2.1.2 Ultraviyole-görünür bölge spektrofotometre (UV-Vis)

Moleküllerin incelenmesinde, molekülün absorpsiyon aralığının belirlenmesi, malzemenin potansiyel kullanımlarının belirlenebilmesi için hayati önem taşır. Absorpsiyon, fotonlardan gelen ışık enerjisi moleküller tarafından alındığında ve elektronlar daha yüksek uyarma durumlarına geçerken kinetik enerjiye dönüştürüldüğünde meydana gelir. Işıktan gelen enerjinin tamamı emilir, ancak belirli dalga boyları elektronik enerji seviyelerinde uyarılmaya neden olur. 200 ile 1100 nm dalga boyları aralığındaki ultraviyole ve görünür ışık, elektronik enerji seviyelerinde uyarılmaya neden olur. Her elektronik geçişte ayrıca titreşimsel ve rotasyonel geçişler olmaktadır. Bu enerji absorpsiyonu, bir CCD kamera kullanılarak ultraviyole/görünür absorpsiyon spektrometrisi (UV-Vis) ile tespit edilebilir. Yüklü birleştirilmiş cihaz (CCD) kamerası, numuneden gelen ışığın fotonlarını algılar ve spektroskopik bir spektrum oluşturmak için onu elektrik yüküne dönüştürür.

Ultraviyole-Görünür Bölge Spektrofotometre (UV-Vis) analizleri Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi bünyesinde bulunan Agilent Cary 60 cihazı ile yapılmıştır.

3.2.1.3 Yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (yaygın olarak HPLC olarak bilinir), bir karışımdaki her bir bileşeni ayırmak, tanımlamak veya ölçmek için kullanılan analitik bir tekniktir. Karışım, kolon kromatografisinin temel prensibi kullanılarak ayrılır ve ardından spektroskopi ile tanımlanır ve miktarı belirlenir.

Yüksek performanslı sıvı kromotografisi (HPLC) analizleri Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi bünyesinde bulunan Agilent 1260 Infinity Quaternary cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bütün analizlerde Poroshell 120 EC-C18 (boyutları 4,6 x 50 mm, tanecik boyutu 2,7 µm olan) kolonu kullanılmıştır. Kolonun maksimum basıncı 151,4 bar'a dayanıklı, akış hızı 1 mL/dakika, enjeksiyon hacmi 1µL olan ve yürütücü faz olarak trietilamin asetat/asetonitril 88/12 oranlarında çalışılmıştır. Okumalar adsorpsiyon 382 nm ve emisyon 516 nm'de floresans dedektör ile yapılmıştır.

3.2.1.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), odaklanmış bir elektron demeti ile yüzeyi tarayarak test edilen numunenin yüzeyini ölçmek için kullanılan bir tekniktir. Bu teknik ile nanometre (nm) ile mikrometre (µm) aralığındaki yapılar analiz edilebilir. Elde edilen görüntü 3 boyutlu bir fotoğrafta olacaktır. SEM sistemi, her numune tipi için uygun vakum seviyelerinin seçilebildiği bir vakum numune odasından oluşur. SEM tekniği, metaller gibi analiz edilebilen iletken numuneler için uygundur. Fakat, seramik ve polimerler gibi iletken olmayan numunelerde, görüntü kalitesini iyileştirmek için altın veya karbon kaplama yapılması gereklidir (Thongdee ve Jantaratana, 2021).

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarında bulanan QUANTA 400F Field Emission SEM Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu ile yapılmıştır.

3.2.1.5 Titreşimli örnek manyetometresi (VSM)

Titreşimli numune manyetometresi, ilk olarak 1955 yılında S. Foner (Foner, 1959) tarafından önerilen malzemelerin manyetik karakterizasyonu için en yaygın kullanılan yöntemdir. Manyetik ölçümler için doğrudan ve dolaylı teknikler kullanılarak günümüzde ticari olarak farklı tiplerde birçok VSM mevcuttur (Muhammad, 2011). Manyetometrenin çalışma prensibi Faraday'ın indüksiyon Yasasına dayanmaktadır. Genellikle numune uzun bir çubuğa yerleştirilir ve sabit bir manyetik alanda sabit toplama bobinleri arasına yerleştirilen mekanik vibratör tarafından belirlenir. Manyetik numunenin salınım hareketinin neden olduğu başıboş alan nedeniyle algılama bobinlerinde indüklenen voltaj, daha sonra kilitleme amplifikatörüne alınır ve numunenin manyetik momenti ile orantılı olarak sinyal üretir.

Titreşimli örnek manyetometresi (VSM) analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarında bulanan Cryogenic Limited PPMS cihazı ile yapılmıştır.

3.2.1.6 Geçirmeli elektron mikroskopu (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobu, malzeme bilimi için çok güçlü bir araçtır. Yüksek enerjili bir elektron demeti çok ince bir numuneden geçirilir ve elektronlar ve atomlar arasındaki etkileşimler kristal yapı gibi özellikleri ve yapıdaki kaymalar ve tane sınırları gibi özellikleri gözlemlemek için kullanılabilir. Kimyasal analizler de yapılabilir. TEM, katmanların büyümesini, bileşimlerini ve yarı iletkenlerdeki kusurları incelemek için kullanılabilir. Kuantum kuyularının, tellerin ve noktaların kalitesini, şeklini, boyutunu ve yoğunluğunu analiz etmek için yüksek çözünürlük kullanılabilir (Donten-Bury, 2018).

TEM, ışık mikroskobu ile aynı temel prensiplerde çalışır ancak ışık yerine elektronları kullanır. Elektronların dalga boyu ışığın dalga boyundan çok daha küçük olduğu için, TEM görüntüleri için elde edilebilecek optimal çözünürlük, bir ışık mikroskobundan çok daha iyi bir büyüklük derecesidir. Böylece, TEM'ler bazı durumlarda tek tek atomlar kadar küçük iç yapının en ince ayrıntılarını ortaya çıkarabilir (Shunmugaperumal, 2020).

Geçirmeli Elektron mikroskopu (TEM) analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarında bulanan JEOL marka JEM 2100F model Geçirimli Elektron Mikroskobu ile yapılmıştır.

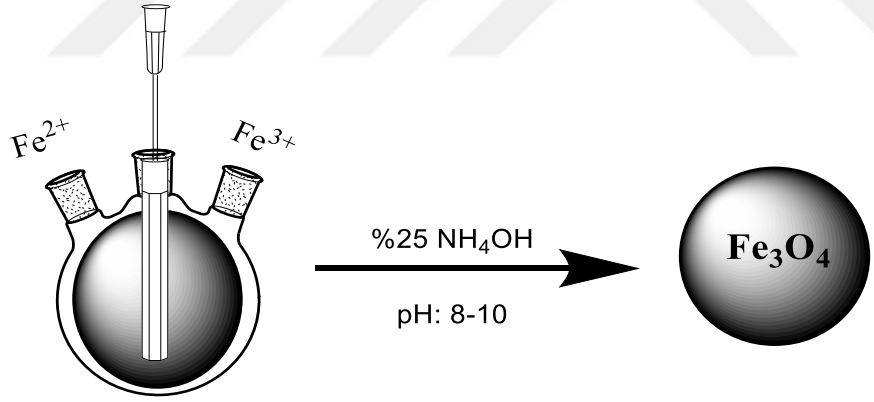
3.2.2 Sentez Prosedürleri

Nanopartiküllerin sentezlenmesinde uluslararası geçerliliği olan metotlardan faydalanılmıştır. Bu tez çalışmasında, demir oksit nanoparçacıklar (Fe_3O_4) birlikte çöktürme metodu ile sentezlenmiştir. Bu parçacıklar farklı fonksiyonel gruplarla fonksiyonlandırılmış farklı polimerlerle kaplanmıştır. Sentezlenen manyetik nanoparçacıkların yapısal analizi için FTIR kullanılmıştır. Elde edilen demir oksit nanoparçacıkların manyetik analizi, VSM ve boyut analizi ile yüzey morfolojisi için TEM, SEM, DLS ve Zeta potansiyel kullanılmıştır (Bütün karakterizasyon grafikleri ve yorumları Bulgular ve Tartışma bölümünde verilmiştir).

3.2.2.1 Manyetik nanoparçacıklarının (Fe_3O_4) sentezi

Manyetik nanoparçacıklar (Fe_3O_4) tek adımda kimyasal olarak birlikte çöktürme yöntemine göre hazırlanmıştır (Cruz vd. 2008). Fe_3O_4'lerin sentezi için 2,36 g $FeCl_3.6H_2O$ ve 0,86 g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (molar oranları Fe^{2+}: Fe^{3+}=1:2) karışımı, 50 mL distile su içinde, argon atmosfer altında (oksidasyonu önlemek için) yuvarlak dipli bir balonda çözülerek 1 saat boyunca mekanik karıştırma ile karıştırılmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımına damla damla %25 amonyak çözeltisi ilave edilmiş (siyah renkte Fe_3O_4 çökeltisi elde edilmiş) ve 30 dakika daha karıştırmaya devam edilmiştir. Reaksiyonun bu aşaması pH 8-10 aralığında olmalıdır. Reaksiyonun bitiminde Fe_3O_4 bir mıknatıs yardımıyla çöktürülüp deiyonize su ile birkaç kez yıkanmıştır (Şekil 3.1) (Gogoi vd. 2019). Çalışma için sentezlenen Fe_3O_4'ler istenilen miktarlarda kullanılmak üzere ıslak (sulu) vaziyette kapaklı falkon tüplerinde muhafaza edilmiştir (Tarhan vd., 2019).

$$Fe^{2+} + 2Fe^{3+} + 8OH^- \rightarrow Fe(OH)_2 2Fe(OH)_3 \rightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O \quad (3.1)$$

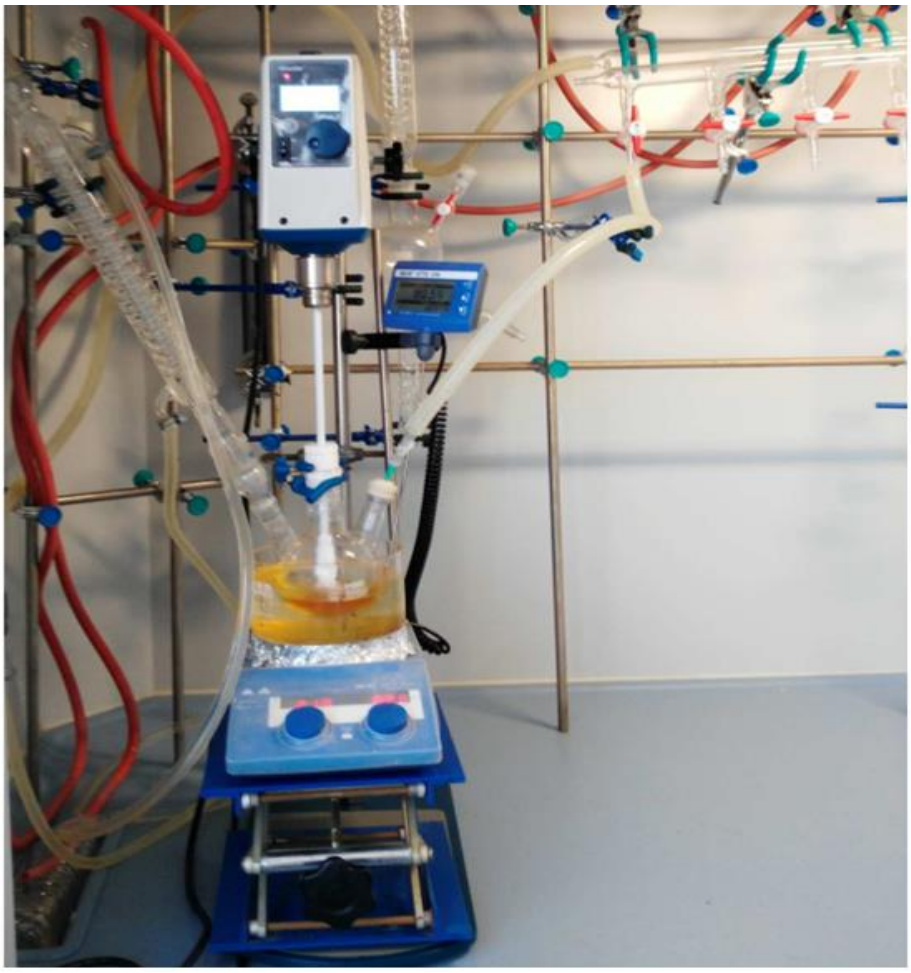


Şekil 3.1 Fe_3O_4 sentezinin şematik olarak gösterimi

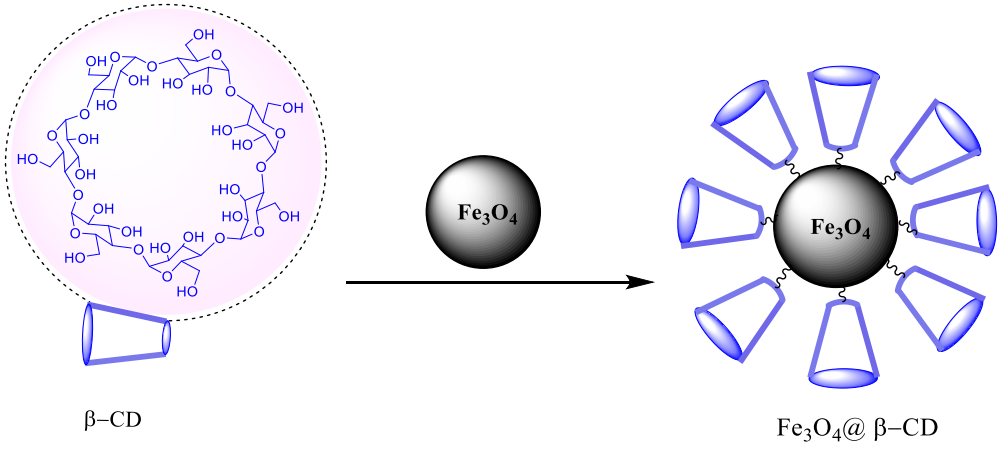
3.2.2.2 Manyetik β-siklodekstrin (Fe_3O_4@β-CD) sentezi

β-siklodekstrin kaplı demir oksit manyetik nanoparçacıklar tek adımda kimyasal olarak birlikte çöktürme yöntemine göre modifiye edilerek hazırlanmıştır (Cruz vd. 2008). Fe_3O_4@β-CD'lerin sentezi için 0,5 g β-siklodekstrin, 2,36 g $FeCl_3.6H_2O$ ve 0,86 g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (molar oranları Fe^{2+}: Fe^{3+}=1:2) karışımı, 50 mL distile su içinde, argon atmosfer altında yuvarlak dipli bir balonda çözülerek 24 saat boyunca mekanik karıştırma ile karıştırılmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımına damla damla %25 amonyak çözeltisi ilave edilmiş ve 30 dakika daha karıştırmaya devam edilmiştir

(Şekil 3.2). Reaksiyonun bu aşamasında pH 8-10 aralığında olmalıdır. Reaksiyonun bitiminde Fe_3O_4@β-CD'ler bir mıknatıs yardımıyla çöktürülüp deiyonize su ile birkaç kez yıkanmıştır (Şekil 3.3) (Gogoi vd., 2019). Çalışma için sentezlenen Fe_3O_4@β-CD'ler istenilen miktarlarda ıslak olarak kullanılmıştır.



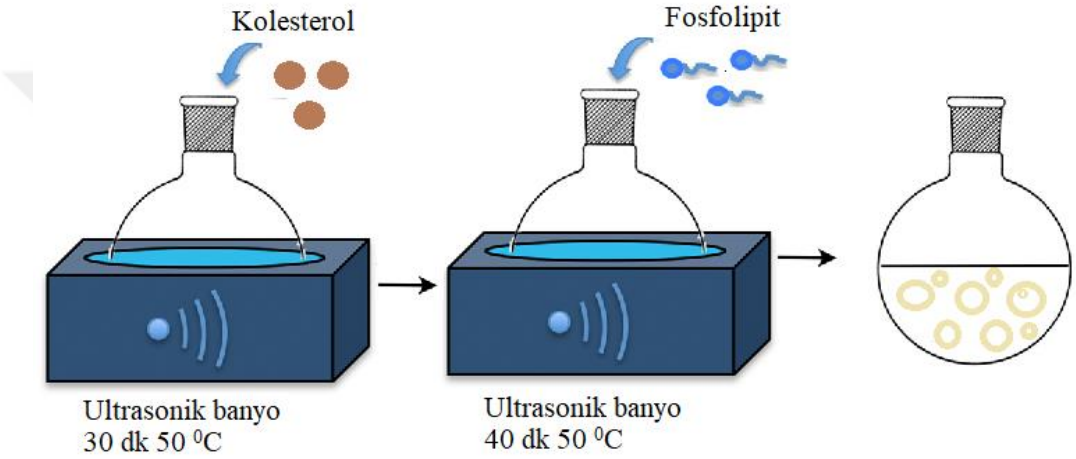
Şekil 3.2 Fe_3O_4@β-CD sentezinin gösterimi



Şekil 3.3 Fe_3O_4@β-CD sentezinin şematik olarak gösterimi

3.2.2.3 Lipozom sentezi

Lipozomlar ultrasonik banyonda sonikasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. 20 mg kolesterol 10 mL'lik bir falkona alınarak 10 mL ultra saf su eklenerek 50 ^{0}C'de 30 dk ultrasonik banyoda sonike edilerek çözündürülmüştür. 30 dk sonrasında 100 mg L-α-Fosfatidilkolin fosfo lipit kolesterol çözeltisine eklenerek 50 ^{0}C'de 40 dk ultrasonik banyoda karışım olarak sonike işlemine devam edilerek lipozomlar elde edilmiştir (Putri vd., 2017; Dwiastuti vd., 2016). Şematik olarak lipozom sentezi Şekil 3.4'te gösterilmektedir. Lipozomların görüntüleri, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Olympus CX21 Biyolojik Mikroskop ile alınmıştır.



Şekil 3.4 Lipozom sentezinin şematik olarak gösterimi

3.2.3 TPT yükleme çalışmaları

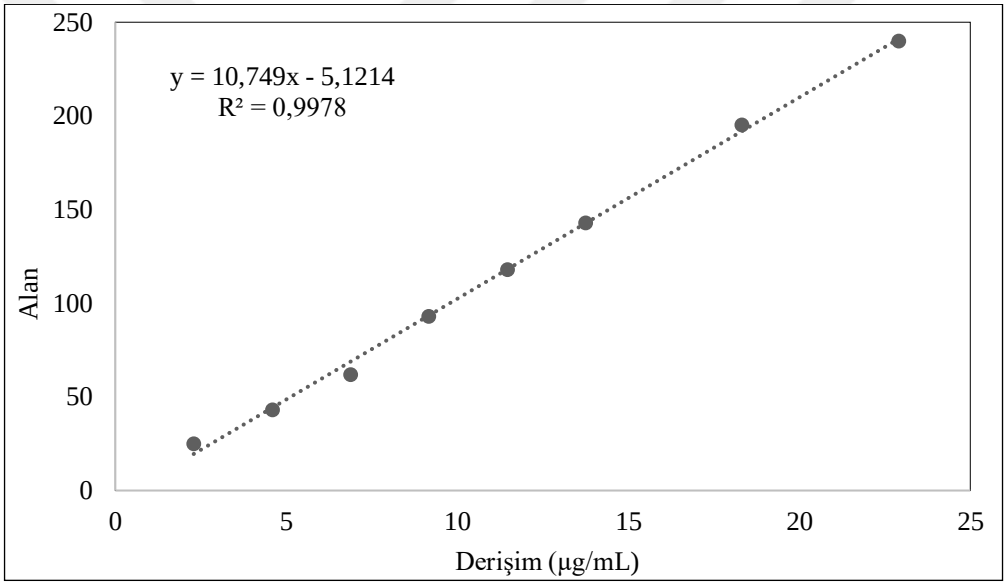
3.2.3.1 Stok ve standart çözeltilerin hazırlanması

Topotekan stok çözeltinin hazırlanması (1000 µg/mL): Tez çalışmasında kullanılmak üzere topotekan'dan 1000 µg/mL stok çözelti dimetil sülfoksit (DMSO) içinde hazırlanmıştır. 1000 µg/mL stok topotekan (Molekül Ağırlığı = 457,9 g/mol) çözeltisi için yaklaşık olarak 25 mg tartılıp 25 mL'lik bir balon jojede DMSO içinde çözülerek hazırlanmıştır. Diğer kullanılan derişimler stok çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır.

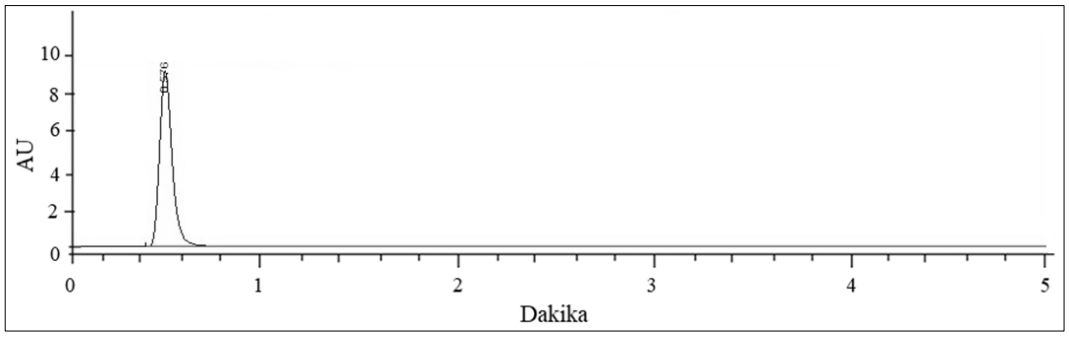
Topotekan, kamptotesin türevi olup ortamın pH'na bağlı olarak iki farklı formda bulunan bir anti kanser ilaçtır. Formlardan biri, kanser tedavilerinde kullanılan ve aktif form olan lakton formudur. Bu form, pH 5 ve 5'ten küçük değerlerde yani asidik ortamda mevcuttur. Toksik etki gösteren diğer form ise karboksilat formudur. Karboksilat, nötral ve bazik koşullardaki pH değerlerinde olan formdur. Topotekanın aktif lakton formda kalma koşullarının belirlenmesi önemlidir. Sentezi yapılmış nano-

malzemelere yüklenen topotekanın aktif lakton formda kalma durumu HPLC analizleri ile takip edilmiştir.

Standart çözeltilerin hazırlanması: HPLC analizleri ile topotekan'ın hem karboksilat hem de lakton formunu kantitatif olarak tayin etmek için sırasıyla 2-25 µg/mL ve 5-50 µg/mL derişim aralığında iki ayrı kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Lakton formun kalibrasyon grafiği için standart çözeltiler, 1000 µg/mL stok topotekan çözeltisinden pH 4 fosfat tamponu ile seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır. Karboksilat formun kalibrasyon grafiği için ise standart çözeltiler, 1000 µg/mL stok topotekan çözeltisinden pH 10 fosfat tamponu ile seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır. Karboksilat formun kalibrasyon grafiği ve pH 10'da HPLC kromatogramı Şekil 3.5 ve Şekil 3.6'da verilmiştir.

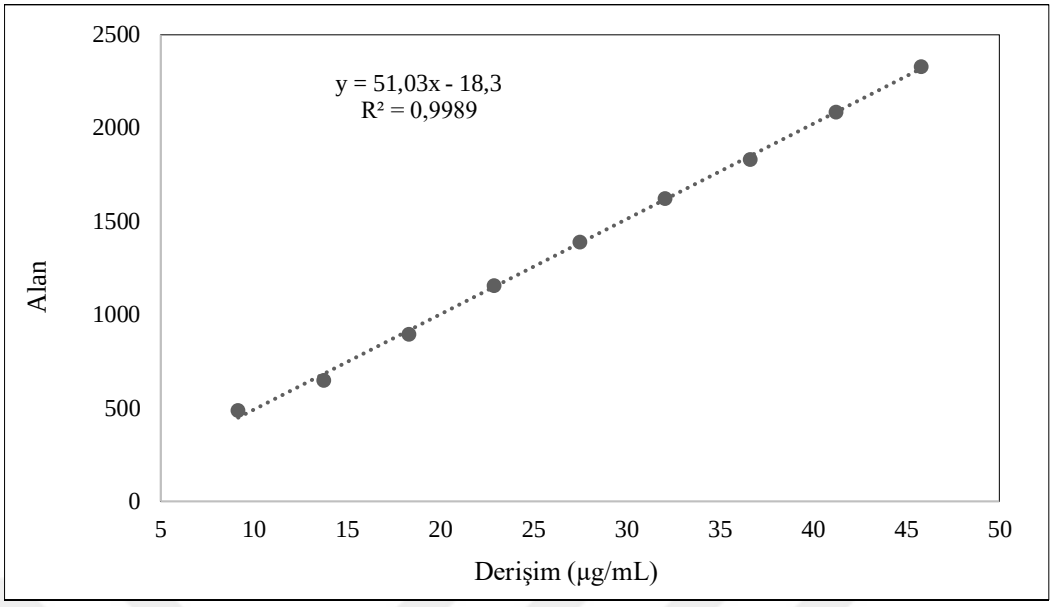


Şekil 3.5 2-25 µg/mL derişim aralığında karboksilat form için kalibrasyon grafiği

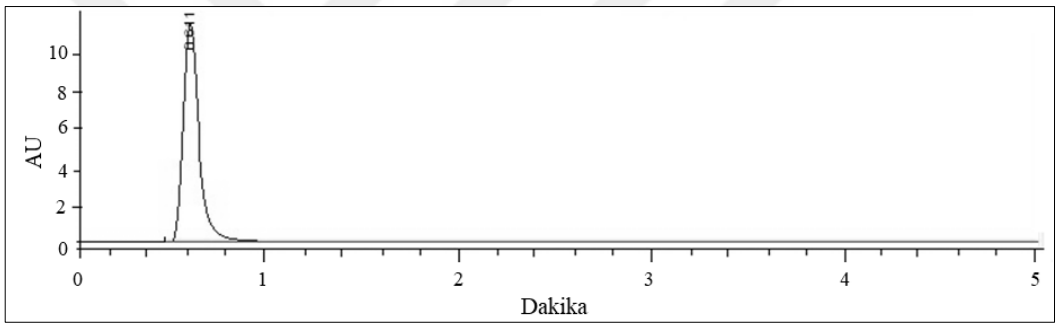


Şekil 3.6 pH 10'da karboksilat form için HPLC kromatogramı

Lakton formun kalibrasyon grafiği ve pH 4'te HPLC kromatogramı Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.7 5-50 µg/mL derişim aralığında lakton form için kalibrasyon grafiği



Şekil 3.8 pH 4'te lakton form için HPLC kromatogramı

Stok fosfat tamponunun hazırlanması: Ticari olarak tablet şeklinde satılan fosfat tuzunda, bir tablet tartıldığı zaman 1933 mg gelmektedir. 200 mL ultra saf su içinde bir tablet fosfat tuzu çözülerek pH 7,4 olan fosfat tampon hazırlanmıştır.

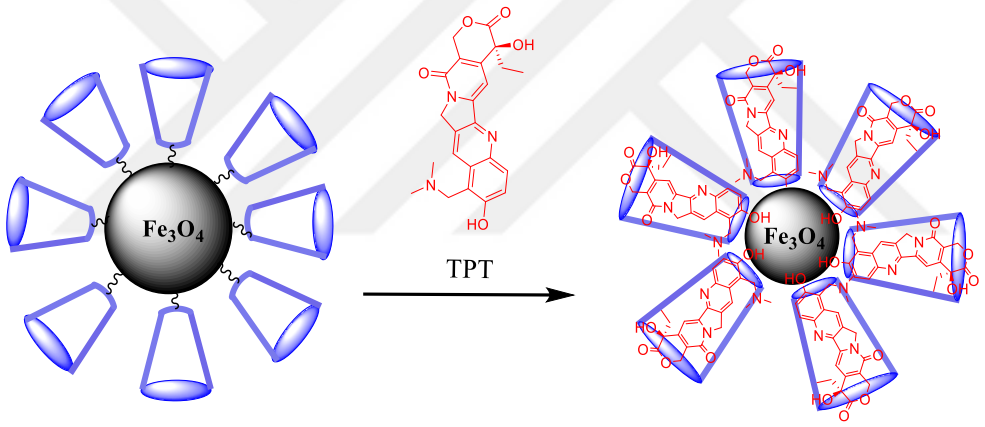
Farklı pH için fosfat tamponunun hazırlanması: HCl ve NaOH kullanılarak ihtiyaç duyulan pH değerlerine ayarlanmıştır. Standart lakton ve karboksilat formun çözeltileri hazırlanırken kullanılan pH 4 ve pH 10 tampon çözeltileri, stok tampon çözelti (pH 7,4) HCl ve NaOH çözeltilerinin kullanılmasıyla ayarlanmıştır. Sorpsiyon ve desorpsiyon çalışmaları için pH 5,0, pH 5,5, pH 6,5 ve pH 7,4'de tampon çözeltiler hazırlanmıştır. Hem stok olarak kullanılan hem de seyreltilerek hazırlanan bütün tampon çözeltiler filtrasyondan geçirildikten sonra buzdolabında muhafaza edilerek çalışmalarda kullanılmıştır.

800 mL deiyonize suda 10 mL trietilamin çözülüp, pH değerinin 5,5'e ayarlanması için glacial asetik asit kullanılmıştır. HPLC çalışmalarında yürütücü faz olarak

kullanmak üzere filtre edildikten sonra buzdolabında saklanmıştır. Analizlerde Poroshell 120 EC-C18 (boyutları 4,6 x 50 mm, tanecik boyutu 2,7 µm olan) kolonu kullanılmıştır. Kolonun maksimum basıncı 151,4 bar'a dayanıklı, akış hızı 1 mL/dakika, enjeksiyon hacmi 1µL olan ve yürütücü faz olarak trietilamin asetat/asetonitril 88/12 oranlarında çalışılmıştır. Okumalar adsorpsiyon 382 nm ve emisyon 516 nm'de floresans dedektör ile yapılmıştır.

3.2.3.2 TPT'nin Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklarına yükleme çalışmaları

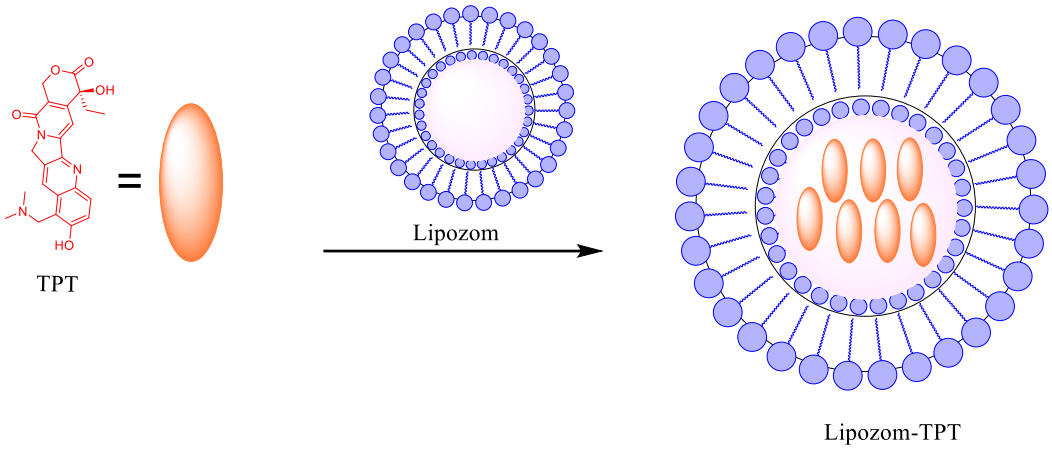
Sentezlenen nanoparçacıklara TPT yükleme çalışmaları yapılmış ve ilacın yüklenme verimliliği hesaplanmıştır. Çalışmalarda TPT'nin yükleme verimliliği üzerine nanoparçacık miktarı, ortamın pH'ı, TPT ile yüzeyin etkileşim süresi ve TPT'nin konsantrasyon etkileri araştırılmıştır. Şekil 3.9'da TPT'nin Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklara yüklenmesi şematik olarak gösterilmektedir.



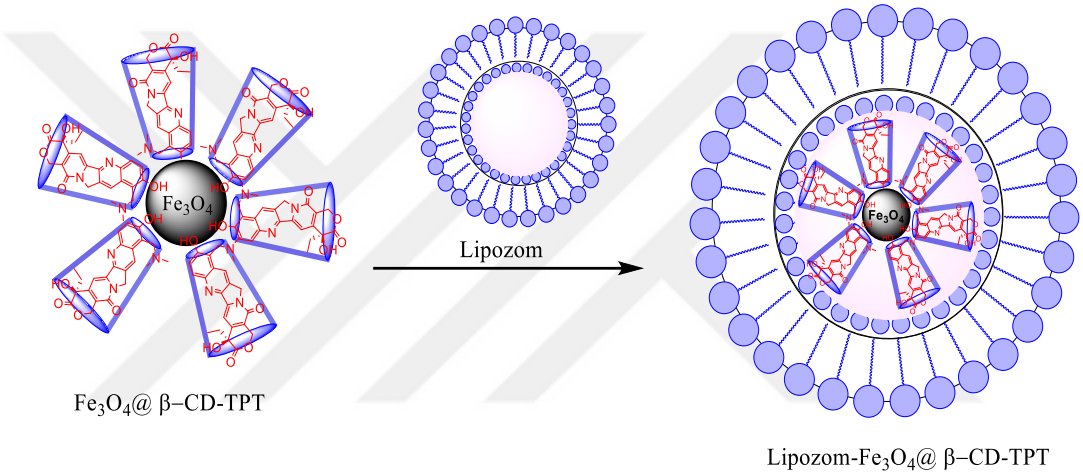
Şekil 3.9 TPT'nin Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklara yüklenmesi

3.2.3.3 TPT ve Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin lipozoma yüklenme çalışmaları

3,125, 6,25, 12,50, 25,00 ve 50,00 µg/mL derişimlerinde TPT ve Fe_3O_4@β-CD-TPT pH 5 fosfat tamponunda hazırlanmıştır. TPT:Lipozom ve Fe_3O_4@β-CD-TPT:Lipozom hacimsel olarak 1:1 oranında hazırlamak için TPT ve Fe_3O_4@β-CD-TPT çözeltilerinden (3,125, 6,25, 12,50, 25,00 ve 50,00 µg/mL) oda sıcaklığında 100 rpm'de 1 saat çalkalanmıştır. Sitotoksisite çalışmaları için çözeltilerden uygun miktarlar kullanılmıştır. Hazırlanan 1,5625, 3,125, 6,25, 12,50 ve 25,00 µg/mL Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT çözeltileri sitotoksisite çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11).



Şekil 3.10 TPT'nin lipozoma yüklenmesi



Şekil 3.11 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin lipozoma yüklenmesi

3.2.4 TPT'nin Fe_3O_4@β-CD'ye yükleme parametrelerinin optimizasyonu

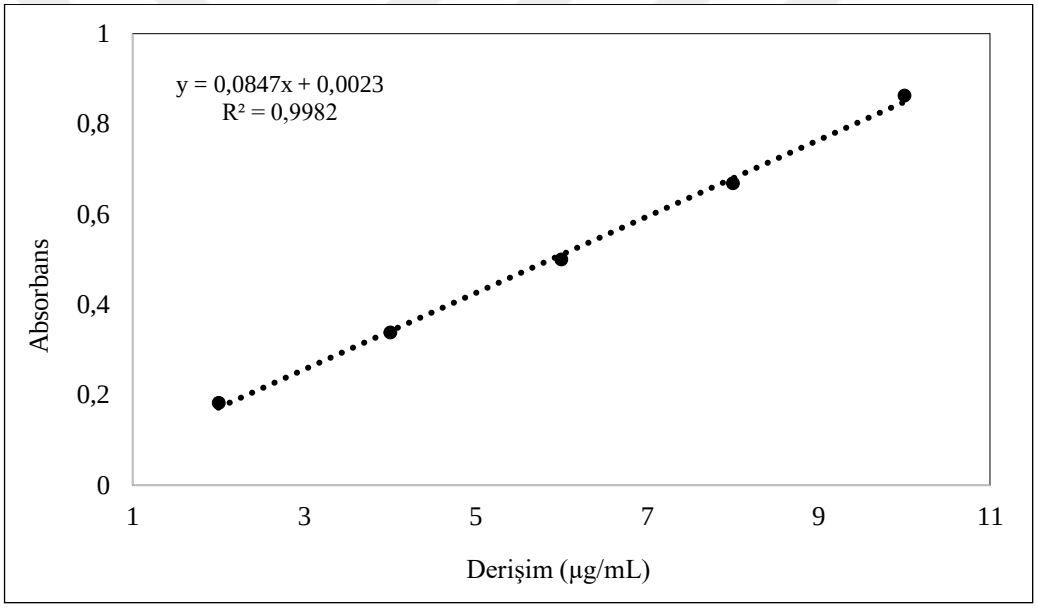
3.2.4.1 pH çalışmaları

TPT'nin yükleme çalışmalarında optimum pH değerlerinin belirlenmesi için üç farklı pH (5, 5,5 ve 6,5) değerinde süreye bağlı çalışılmıştır. 2 mL 50 µg/mL TPT fosfat tamponunda çözülmüş ve 50 mg Fe_3O_4@β-CD ile 200 rpm hızında 25 °C'de inkübatörde etkileştirilmiştir. Belirlenen her süre sonunda karışım mıknatıs yardımı ile çöktürülüp, süpernatant bir steril tüp içine alınarak sıvı azotta dondurulup, HPLC analizi için buzdolabında saklanmıştır. HPLC analizleri ile topotekanın aktif olan lakton formunun hangi pH değerinde kararlı olduğu belirlenmiştir. Optimize edilen bu pH değerlerinde Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklar için ilaç yükleme çalışmaları yapılmıştır. Aşağıda verilen formül (3.2) kullanılarak ilaç yükleme verimleri (%) hesaplanmıştır (Ali vd., 2020)). Elde edilen sonuçlar bulgular ve tartışma bölümünde verilmiştir.

$$\text{İlaç yükleme verimi}(\%) = \frac{\text{Başlangıç ilaç derişimi}\,(\mu g / ml) - \text{Süzüntüde kalan ilaç derişimi}\,(\mu g / ml)}{\text{Başlangıç ilaç derişimi}(\mu g / ml)} x100 \quad (3.2)$$

3.2.4.2 Miktar çalışmaları

Optimum Fe_3O_4@β-CD miktarını belirlemek için, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg ve 50 mg gibi farklı Fe_3O_4@β-CD nanoparçacık miktarları ile TPT yükleme çalışmaları yapılmıştır. pH 5 fosfat tamponunda hazırlanmış 2 mL 50 µg/mL TPT, Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklar ile 200 rpm'de 25 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra TPT yüklü Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklar bir mıknatıs yardımıyla çöktürülüp süpernatanttan ayrılmıştır. Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklara tutunmayan, süpernatantta kalan TPT'nin analizi, UV-Vis spektrofotometre ile 385 nm dalga boyunda yapılmıştır (Şekil 3.12). Sonuçlar bulgular ve tartışma bölümünde verilmiştir.



Şekil 3.12 TPT'nin analizinde kullanılan UV-Vis kalbirasyon grafiği

3.2.4.3 Derişim çalışmaları

TPT'nin Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklara yükleme verimi üzerine derişim etkisini incelemek için pH 5'de 2 mL 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL TPT, 50 mg Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklar ile 200 rpm ve 25 °C'de 24 saat süreyle etkileştirilmiştir. Mıknatıs yardımıyla TPT yüklenmiş Fe_3O_4@β-CD çöktürülerek ayrılmıştır. Süpernantantta geriye kalan TPT 385 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometre ile analizleri yapılmıştır.

3.2.5 İlaç salım çalışmaları

Fe_3O_4@β-CD@TPT nanoparçacıklarının ilaç salım çalışmaları 5,5, 6,5 ve 7,4 pH değerlerinde süreye bağlı çalışılmıştır. Salınan TPT, UV-Vis Spektrofotometre ile takip edilmiştir. 45 µg/mL 50 mg Fe_3O_4@β-CD-TPT alınarak ve üzerine 2'şer mL pH 5,5, pH 6,5 ve pH 7,4 fosfat tamponundan eklenmiştir. 24., 48. ve 72. saat salım çalışılmıştır. Salınan ilaç (%) aşağıda verilen denklem (3.3)'e göre hesaplanmıştır (Wu vd., 2015).

$$Salınan\ ilaç\,(\%) = \frac{Ortamdaki\ ilaç\,(\mu g / mL)}{Tutunan\ ilaç\,(\mu g / mL)} x100 \qquad (3.3)$$

3.2.6 Sitotoksisite çalışmaları

Sitotoksisite çalışmaları, İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Ana Bilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Burhan Ateş'in araştırma laboratuvarında ve çalışma ekibi tarafından yapılmıştır.

%10'luk FBS ve %1'lik Pen-Strep karışımı olan yüksek glukozlu DMEM besiyeri kullanılarak, flask içerisinde, 37 derecelik %5 CO_2 inkübatöründe MCF-7 (İnsan meme kanseri) hücreleri çoğaltılmıştır. 96'lık kuyucuklu plaka içerisine, her bir kuyucukta 10.000 adet MCF-7 hücresi olacak şekilde ekilmiştir. Kuyucuklu plaka ertesi güne kadar CO_2 inkübatöründe yapışması ve yayılması için beklenmiştir. Her malzeme için DMEM kullanılarak 25 µg'den 1,5625 µg'ye kadar olacak şekilde seri sulandırma yöntemiyle seyreltik konsantrasyonlar hazırlanmıştır.

Kuyucuklu plaka içerisindeki beklemiş besiyeri çekilip yerine Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom@Fe_3O_4@β-CD-TPT'den sırasıyla 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5 ve 25 µg/mL konsantrasyonlardan 100'er µL eklenmiştir. Ardından ertesi güne kadar %5'lik CO_2 inkübatöründe 37 derecede 24 saat inkübe edilmiştir. 5 mg/mL olacak şekilde MTT boyası PBS (Fosfat Tamponunda pH:7,4) içerisinde çözülmüştür. 24 saat sonra, tüm kuyucuklu plakaların eski besiyeri çekilip atılıp yerine her kuyucukta 90 µL DMEM ve her kuyucukta, 5mg/ml hazırlanmış 10 µL MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) olacak şekilde karışım hazırlanarak 100'er µL konulup ve 4 saat boyunca CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklu plakaların içindeki MTT'li besiyeri çekilip atılmıştır. Kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna

100 µL DMSO konulmuştur. Kuyucuklu plakalar DMSO yüklendikten hemen sonra 540 nm dalga boylarında spektrofotometre yardımıyla okuması yapılmıştır.

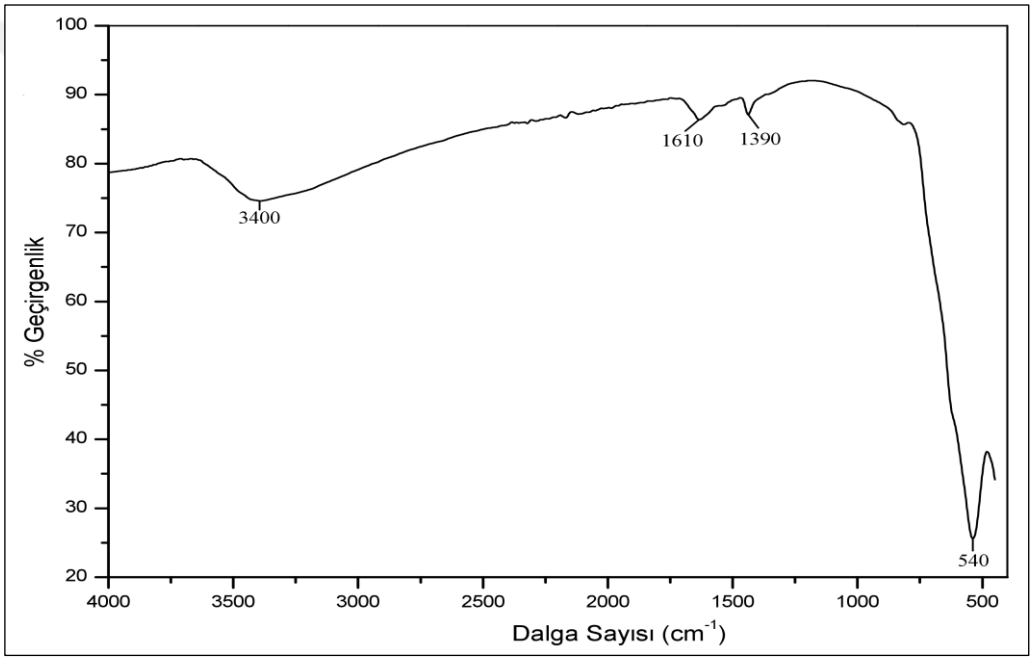
Araştırmada 96'lık kuyucukta yer alan kanserli hücrelere 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5 ve 25 µg/mL derişimler de Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom@Fe_3O_4@β-CD-TPT çözeltilerden uygun miktar eklenerek 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerin durumu Olympos CKX41 invert optik mikroskop kullanılarak 20x yakınlaştırma ile alınarak incelenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Karakterizasyon çalışmaları

4.1.1 FTIR analizi

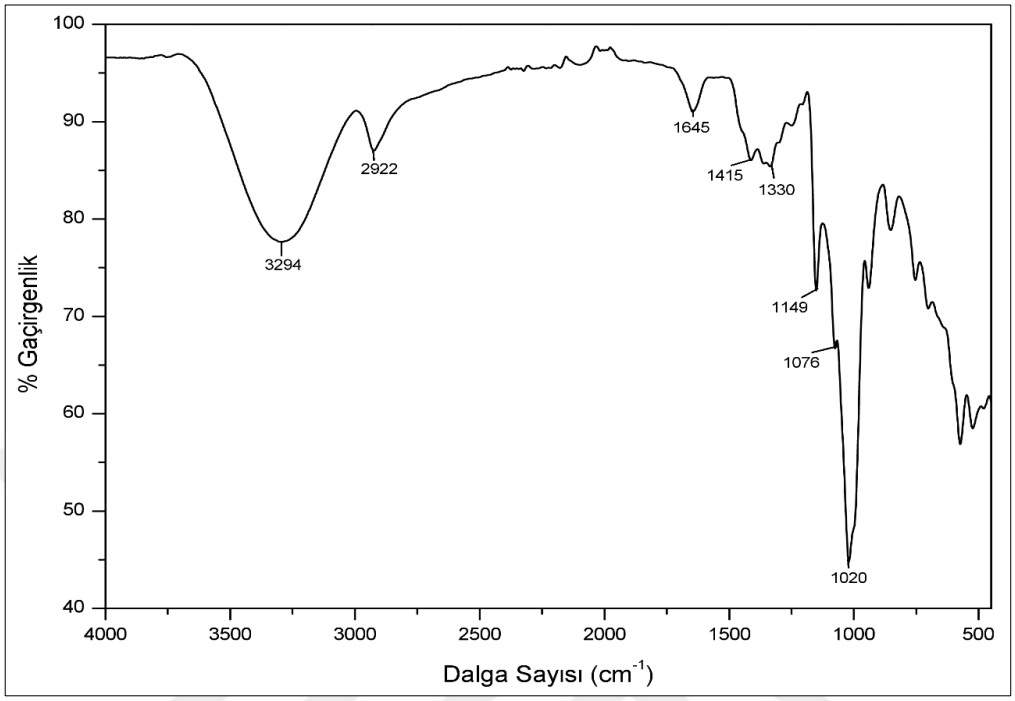
Şekil 4.1'de Fe_3O_4 nanoparçacıklarının FTIR spektrumu verilmiştir. Fe_3O_4 FTIR spektrumunda 3400 cm^{-1} görülen pik O-H esneme titreşimine, 1610 cm^{-1} yer alan pik ise Fe_3O_4 nanoparçacıkları absorbe olan H-O-H titreşimine aittir. 1390 cm^{-1}'deki pik O-H eğilme titreşimine ve 540 cm^{-1}'de yer alan pik ise karakteristik Fe-O varlığını göstermektedir (Liu vd., 2009). FTIR analiz sonucuna göre Fe_3O_4 nanoparçacık başarılı bir şekilde sentezlenmiştir.



Şekil 4.1 Fe_3O_4'ün FTIR spektrumu

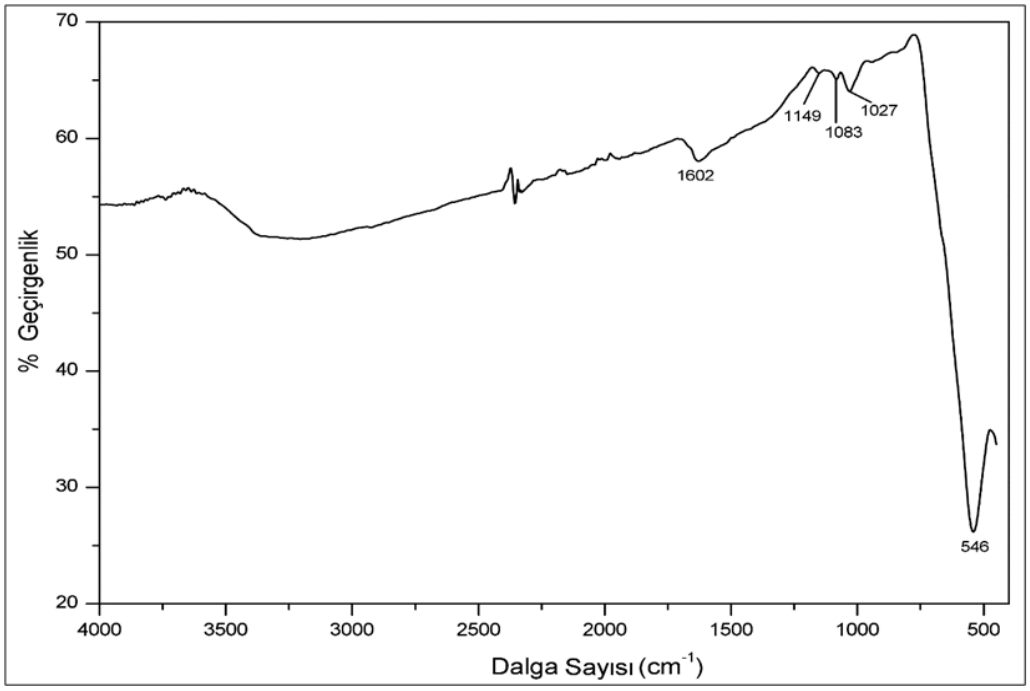
Şekil 4.2'de saf β-CD'nin FTIR spektrumu verilmiştir. β-siklodektrin (CD) içindeki O-H bağlarının karakteristik absorpsiyon tepe noktasının yaklaşık 3294 cm^{-1}'de bulunduğu görülebilir. ~ 2922 cm^{-1}'de bulunan pik CH ve CH_2 işlevsel gruplar içinde CH bağın gerilme titreşimine aittir. 1645 cm^{-1}'de bulunan pik O–H eğilme titreşiminin frekansına aittir (Ahadi vd., 2019). 1204-1414 cm^{-1} (1204, 1252, 1296, 1330, 1366 ve 1415 cm^{-1}) bölgesindeki absorpsiyon bantları, C-O ve C-H bükülmesinin birincil ve ikincil hidroksi grubundaki OH bağlarının deformasyon titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1149 cm^{-1}'deki pik, eter ve OH'taki hidroksi gruplarının eğilme titreşimlerinde C-O-C'ye ait bağları göstermektedir. 1020 ve 1076 cm^{-1}'deki öne çıkan

pikler eşleşmiş C-O /C-C germe ve OH eğilme titreşimlerine bağlanmaktadır (Ahadi vd., 2019).



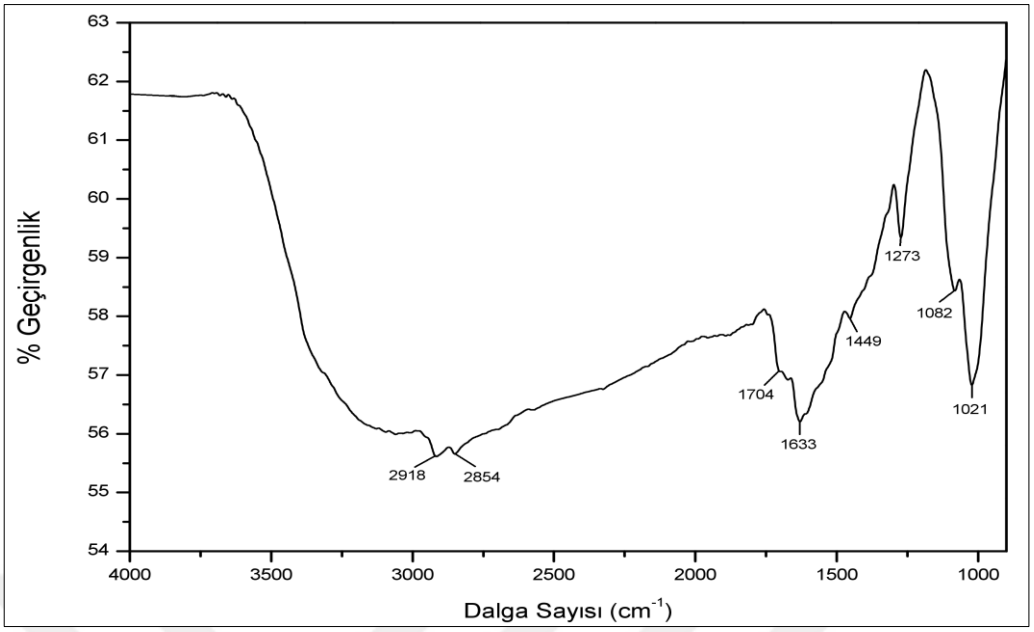
Şekil 4.2 β-CD'nin FTIR spektrumu

Fe_3O_4@β-CD FT-IR spektrumu Şekil 4.3'de verilmiştir. Spektrumdan da görüldüğü gibi Fe_3O_4 nanoparçacıklar ve β-CD'den kaynaklanan pikler Fe_3O_4@β-CD FTIR spektrumunda da mevcuttur. Fe_3O_4@β-CD FT-IR spektrumundaki Fe-O bağ titreşimine ait olan 546 cm^{-1}'deki güçlü pik yapıda Fe_3O_4 nanoparçacıklarının varlığını doğrulamaktadır (Mahpishanian ve Sereshti, 2017). 1149 cm^{-1}'deki pikler sırasıyla β-CD varlığını gösteren eter ve OH'taki hidroksi gruplarının eğilme titreşimlerinde C-O-C'ye ait bağlarını ve 1083 ve 1027 cm^{-1}'deki piklerde C-O /C-C germe ve OH eğilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. FTIR spektrumundaki Fe_3O_4 ve β-CD'nin varlığını kanıtlayıcı bu pikler Fe_3O_4@β-CD'nin başarılı bir şekilde sentezlendiği görülmektedir.



Şekil 4.3 Fe_3O_4@β-CD'nin FTIR spektrumu

Fe_3O_4@β-CD-TPT FTIR spektrumu Şekil 4.4'te verilmiştir. β-CD'nin karakteristik pikleri 1021 ve 1082 cm^{-1}'de gösterilmiştir. TPT ilacının Fe_3O_4@β-CD'de kapsüllenmesi, TPT'nin C-O ve C-H gerilme titreşimlerine karşılık gelen 1082 ve 2918 cm^{-1}'de pikleri gösteren FT-IR spektrumu ile doğrulanmıştır. β-CD'de 1645 cm^{-1}'de bulunan O–H eğilme titreşiminin frekansına ait olan pik 1633 cm^{-1}'e kaymıştır (Ahadi vd., 2019). Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin FTIR spektrumunda, TPT'nin hidroksil gerilme titreşimi piki yaklaşık 3000-3500 cm^{-1}'de, 1704 cm^{-1}'de lakton halka formu için C=O gerilme titreşimleri ve 1449 cm^{-1}'de benzen halkası C–N gerilme titreşim pikleri gösterilmiştir. Bu veriler TPT'nin Fe_3O_4@β-CD'ye başarıyla yüklendiğini göstermektedir (Wu vd., 2015; Krishnan vd., 2017).

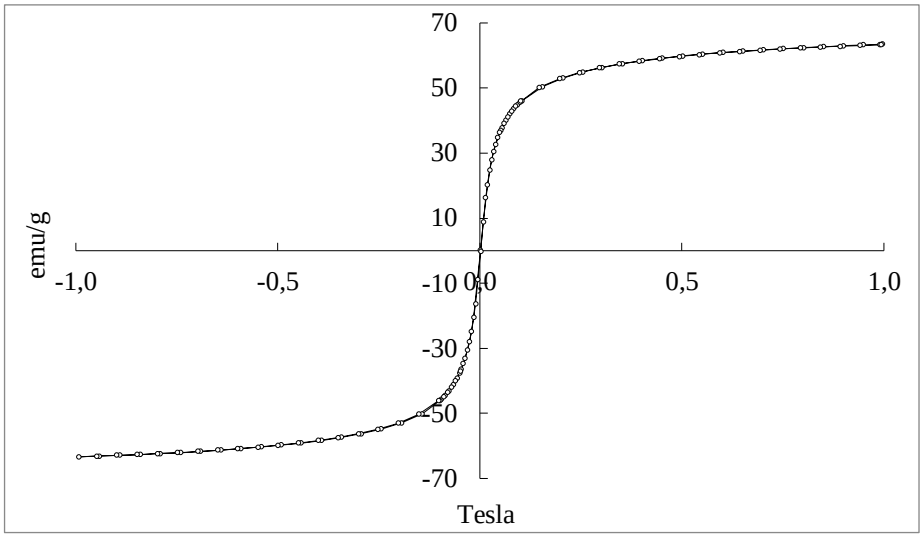


Şekil 4.4 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin FTIR spektrumu

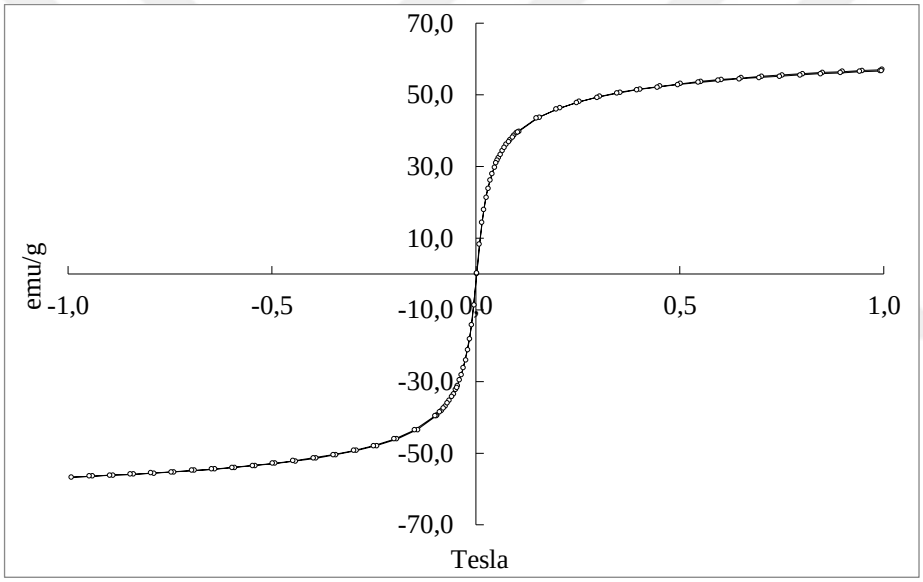
4.1.2 Titreşimli numune manyetometresi (VSM) analizi

VSM analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarında bulanan Cryogenic Limited PPMS cihazı ile yapılmıştır.

VSM tekniği, uygulanan manyetik alan altında manyetik partiküllerin manyetizasyon değerini ölçmek için kullanılır. Fe_3O_4 ve β-CD kaplı Fe_3O_4 nanopartiküllerinin manyetik özellikleri, oda sıcaklığında ölçülmüştür. Manyetik Fe_3O_4 ve Fe_3O4@β-CD nanopartiküllerin yüksek doygunluk manyetizasyon değeri biyomedikal uygulamalarda önemli bir parametredir. Fe_3O_4 ve Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllerinin M'ye karşı H eğrileri sırasıyla Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'te verilmiştir. Fe_3O_4 ve Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllerinin doygunluk manyetizasyon değerleri (Ms) sırasıyla 63,5 emu/g ve 57 emu/g olarak bulunmuştur (Zaitsev vd.,1999). Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllerinin Ms değerindeki düşüş, β-CD kaplama polimerinin varlığından kaynaklanmaktadır (Badruddoza, 2011).



Şekil 4.5 Fe_3O_4'ün manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi



Şekil 4.6 Fe_3O_4@β-CD'nin manyetik alana karşı mıknatıslanma eğrisi

4.1.3 Parçacık boyutu dağılımı ve zeta potansiyel analizi

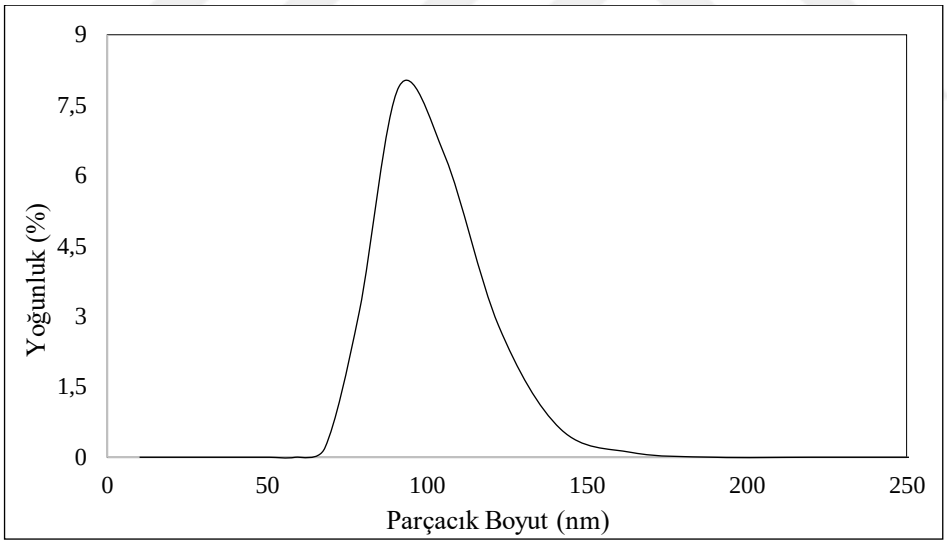
Parçacık boyutu dağılımı ve Zeta-Potansiyel ölçümü, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarında bulanan Malvern Nano ZS90 cihazı ile yapılmıştır. Parçacık boyutu ve yüzey yükü, etkili bir ilaç taşınımına sahip olmak için odaklanılması gereken en önemli kriterler olarak kabul edilir. Lipozomun ve manyetik manopartiküllerin partikül boyutu, tümör dokularında anti-kanser ilaçlarının hedeflenmesinde hayati bir rol oynar. Parçacık boyut dağılım analizi, parçacığın boyutuna ve optik özelliğine bağlı olarak paralel ışınının parçacık üzerine belirli açılarda sabitlenerek saçılması prensibine dayanılarak ölçüm yapan, Malvern marka

Nano ZS90 model zetasizer parçacık boyut ölçer cihazında yapılmıştır. Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin parçacık boyut dağılımı ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4.1'de listelenmiştir.

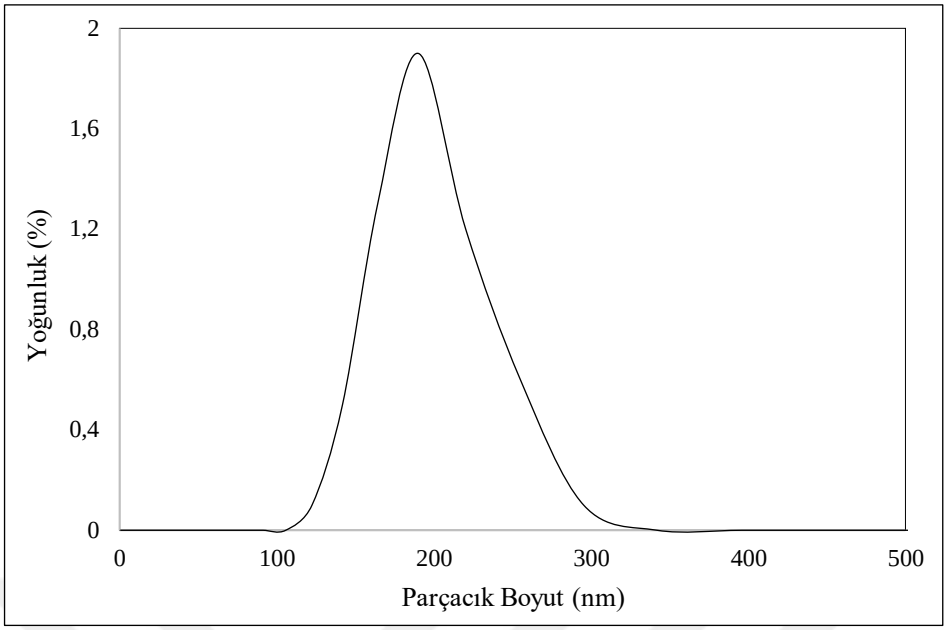
Tablo 4.1 Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT Nanoparçacıkların parçacık boyut dağılımı ve zeta potansiyel değerleri (n:3 için Xort±s)

Nanoparçacık	**Parçacık boyutu dağılımı (nm)**	**Zeta potansiyel (mV)**
Fe_3O_4	91,24±0,227	-6,27±0,202
Fe_3O_4@β-CD	190,06±0,451	+6,16±0,177
Fe_3O_4@β-CD-TPT	164,21±0,325	-9,47±0,225
Lipozom-TPT	95,27±0,260	-51,04±0,571
Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT	141,76±0,252	-21,36±0,351

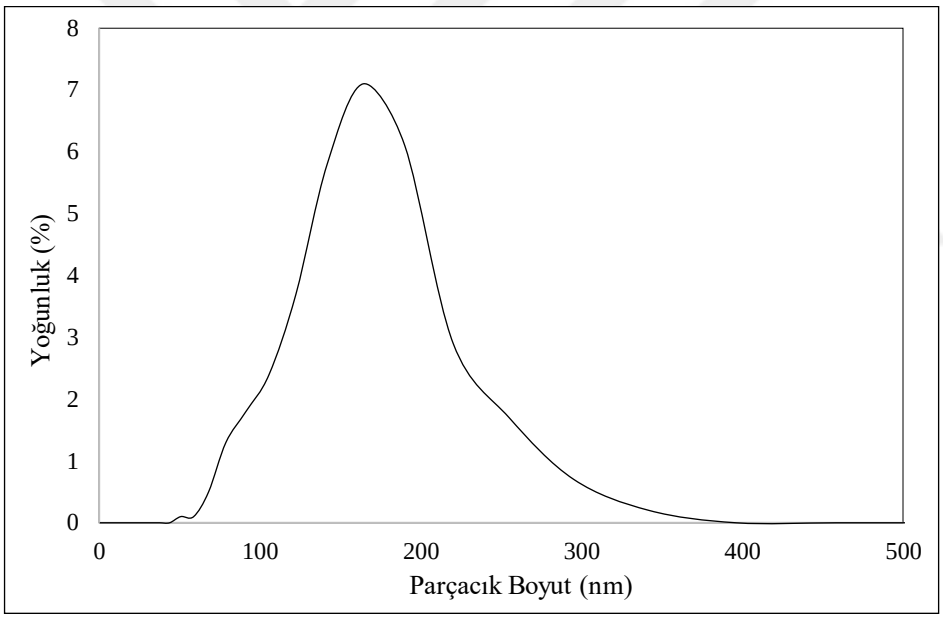
Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD, Fe_3O_4@β-CD-TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin boyut dağılımı grafikleri sırasıyla Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.



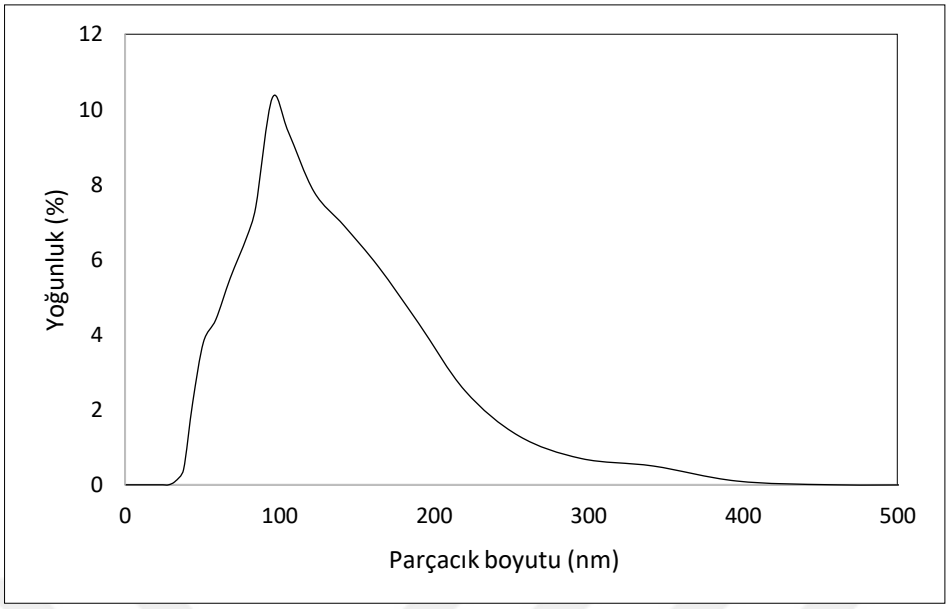
Şekil 4.7 Fe_3O_4'ün boyut dağılım grafiği



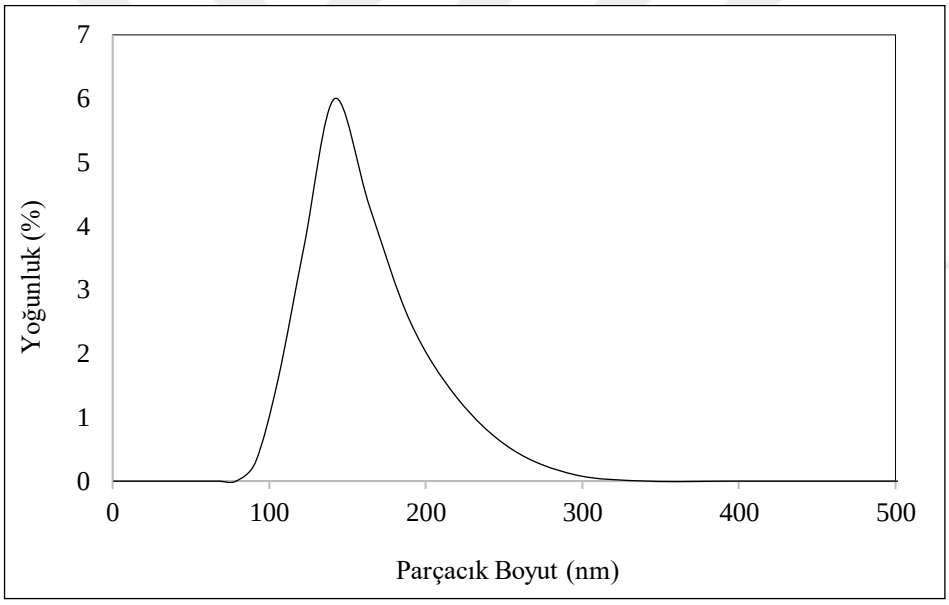
Şekil 4.8 Fe_3O_4@β-CD'nin boyut dağılım grafiği



Şekil 4.9 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin boyut dağılım grafiği



Şekil 4.10 Lipozomun-TPT'nin boyut dağılım grafiği

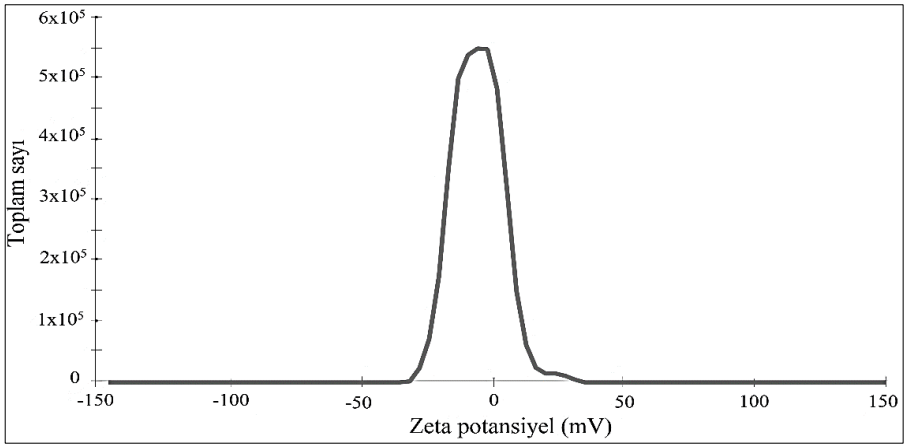


Şekil 4.11 Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin boyut dağılım grafiği

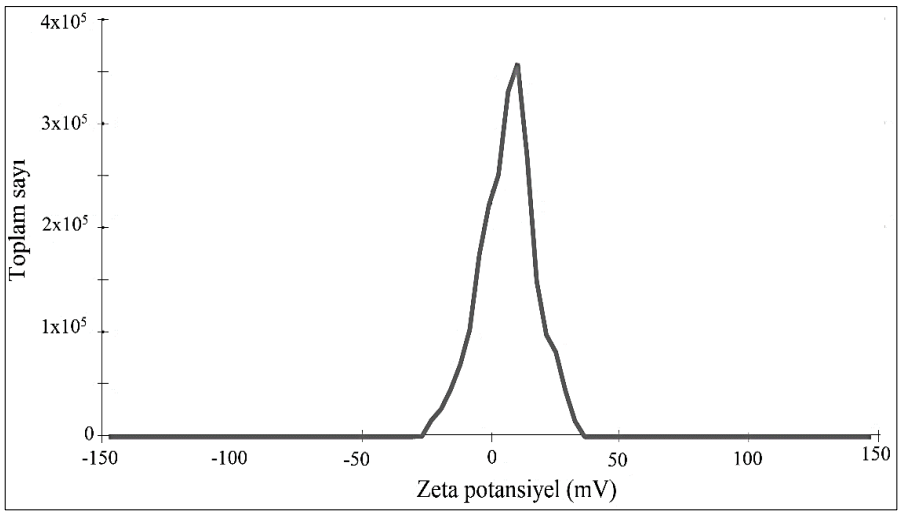
Zeta potansiyel, nanopartiküllerin sıvılarda fiziksel durumlarını (örneğin kararlılık, bir dispersiyonda toplanma, soğurma, vb.) ve dolayısıyla biyolojik sistemlerle etkileşimlerini etkileyen yüzey yüküdür. Zeta potansiyel değerleri -200 ile +200 mV arasında değişim göstermektedir (Sayyed-Alangi ve Nematzadeh, 2019). Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin Zeta-Potansiyel ölçüm eğrileri sırasıyla Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da verilmiştir. Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin zeta potansiyelleri sırasıyla −6,27,

+6,16, −9,47, -51,04 ve -21,36 mV olarak bulunmuştur. Hazırlanan nanolipozomal sistemlerin (Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT) zeta potansiyel değerleri (-51,04 ve -21,36 mV), sürdürülebilir nanolipozomal sistemler olduklarını göstermiştir.

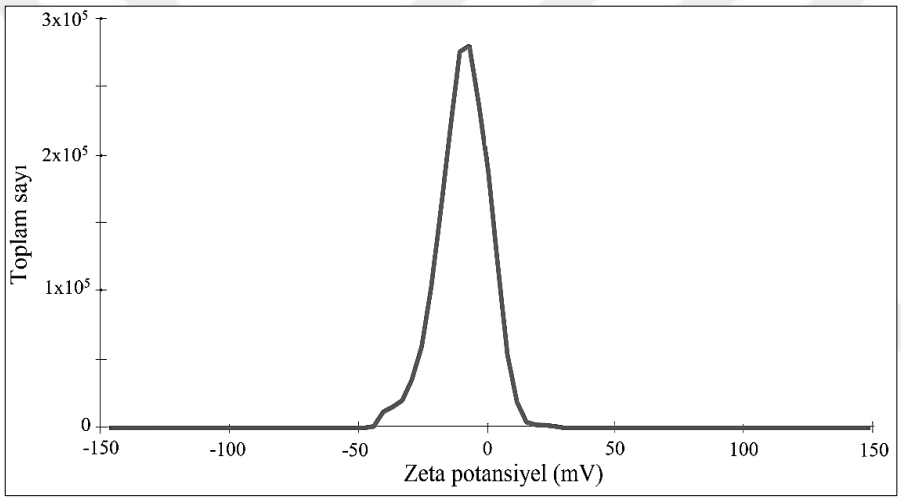
Yüzey yükü, ortamdaki kolloidal nanoparçacık sisteminin kararlılığını gösteren önemli bir işarettir. Benzer tipte yüzey yüküne sahip nanopartiküller arasındaki itme, ilave stabilite sunar (Chen vd., 2015). Yüzey yükü ne kadar iyi olursa, partiküller arasındaki itme de o kadar yüksek olur, bu da doğal agrega eğilimini azaltarak kararlı bir süspansiyon sağlar. Chen ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada, 238±10 nm boyutundaki β-CD nanopartiküllerinin zeta potansiyelini +34,5±0,3 olarak bulmuşlardır (Chen vd., 2015). Şekil 4.7.'den de görüldüğü gibi Fe_3O_4@β-CD'nin boyutu diğer hazırlanan malzemelere göre en yüksektir. Bunun nedeni β-CD'nin pozitif ve Fe_3O_4'in negatif zeta potansiyeli nedeniyle oluşan Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllerde aglomerasyonun daha yüksek olmasıdır. Lipozom, TPT ve Fe_3O_4 negatif zeta potansiyeline sahiptirler (Patel ve Patel, 2020; Gorospe vd., 2019). Bundan dolayı bunların malzemeye dahil edilmeleri zeta potansiyelin negatif etkisini artırmıştır. Nanopartiküllerin negatif yükünün, kan plazması üzerindeki düşük etkileşim süresinden ve dolayısıyla dolaşım sürelerinin artmasından dolayı arzu edildiği iyi bilinmektedir (Sukhanova vd., 2018). Öte yandan, pozitif yüklü nanopartiküller daha fazla sitotoksik etkiye sahiptir ve zarlara etkili bir şekilde nüfuz eder. Aynı zamanda negatif yüklü DNA'ya güçlü bir şekilde bağlanırlar (Liu vd., 2011). Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD-TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin negatif zeta potansiyel sonuçları olumlu değerlendirilmiştir.



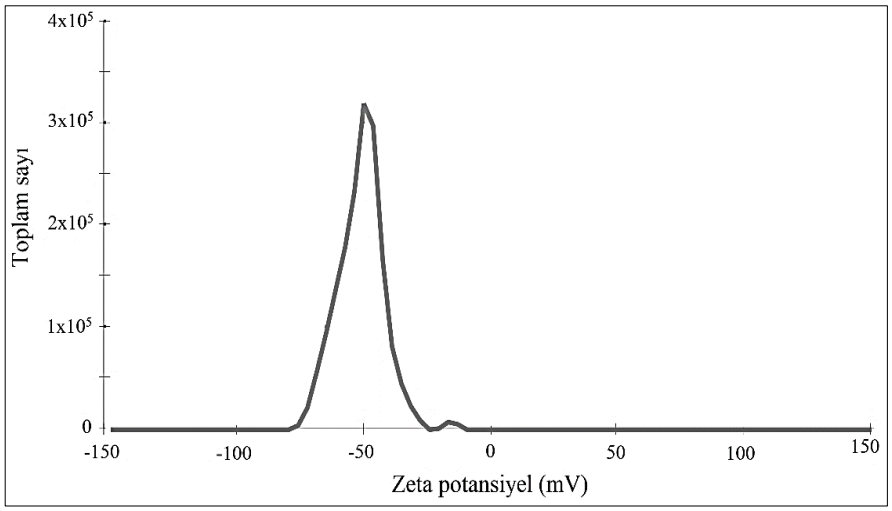
Şekil 4.12 Fe_3O_4'ün zeta potansiyel ölçüm grafiği



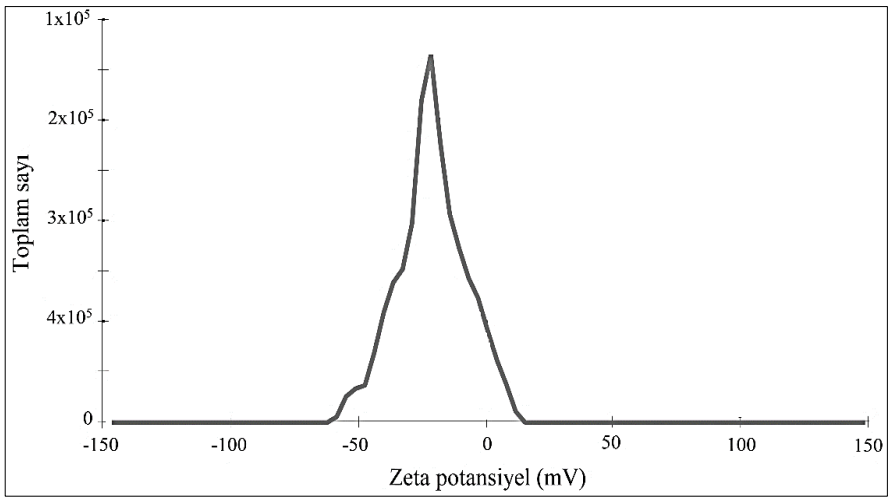
Şekil 4.13 Fe_3O_4@β-CD'nin zeta potansiyel ölçüm grafiği



Şekil 4.14 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin zeta potansiyel ölçüm grafiği



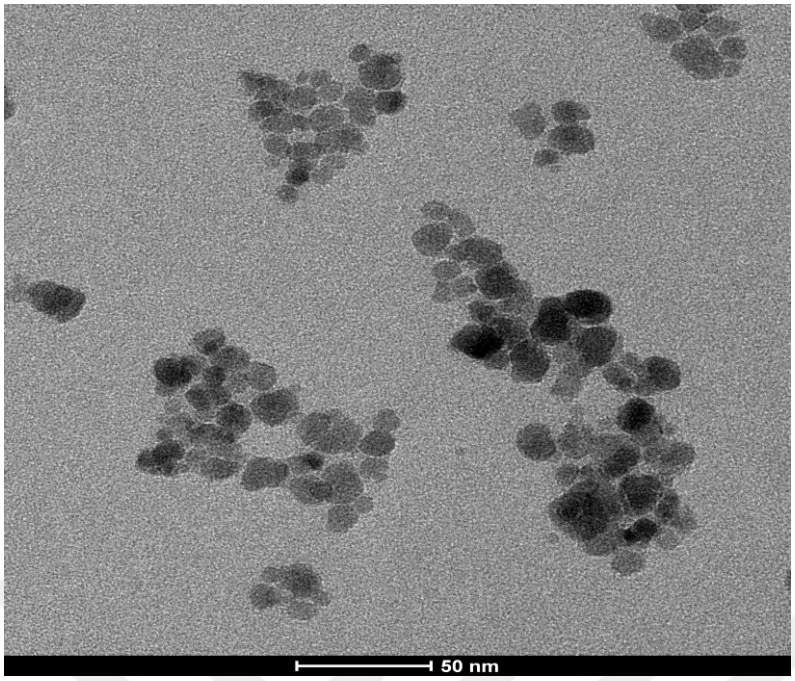
Şekil 4.15 Lipozom-TPT'nin zeta potansiyel ölçüm grafiği



Şekil 4.16 Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin Zeta potansiyel ölçüm grafiği

4.1.4 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi

Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, Lipozom ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin morfolojisi ve boyutları TEM görüntüleriyle karakterize edilmiştir. Şekil 4.17'deki Fe_3O_4 nanopartiküllerin TEM görüntüsünden de görüldüğü gibi nanopartiküller iyi şekilli, küresel veya elipsoidal yer yer aglomerasyona uğramıştır. TEM görüntüsü incelendiğinde aglomere olan nanopartiküller koyu renkli kısımlarda görülmektedir. Fe_3O_4 nanopartiküllerde yüzey/hacim oranı büyük olduğundan, nanopartiküller yüzey enerjilerini azaltmak için aglomere olmaya eğilim göstermiştir. Ayrıca, TEM görüntülerine ait sonuçlara göre sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerin parçacık boyutunun yaklaşık olarak 8 nm olduğu (Şekil 4.17) ve daha önceki çalışmalarımız ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Tural vd., 2009; Tural vd., 2016).

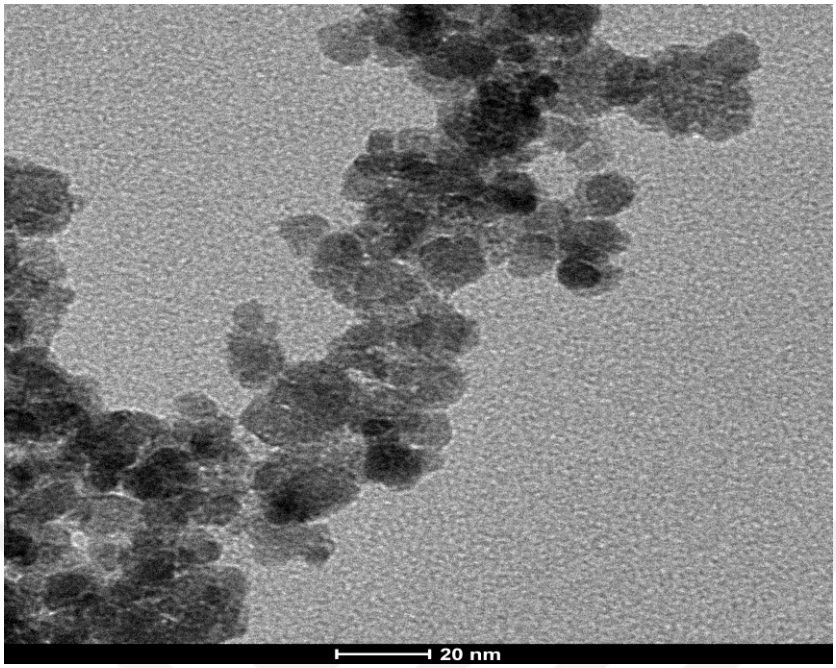


Şekil 4.17 Fe_3O_4 nanopartiküllerin 50 nm skalada TEM görüntüsü

Şekil 4.18'de Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllerin TEM görüntüsü verilmiştir. TEM görüntüsünden de görülebileceği gibi, Fe_3O_4 nanopartiküllerin β-CD ile kaplanmasından sonra aglomereasyon artmıştır. Bunun nedeni β-CD'nin pozitif ve Fe_3O_4'in negatif zeta potansiyeli nedeniyle oluşan Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllerde aglomerasyonun daha yüksek olmasıdır. Bu sonuç Şekil 4.8'de verilen Fe_3O_4@β-CD'nin aglomerasyon boyutunun diğer hazırlanan malzemelerden daha büyük olması ile de uyumludur.

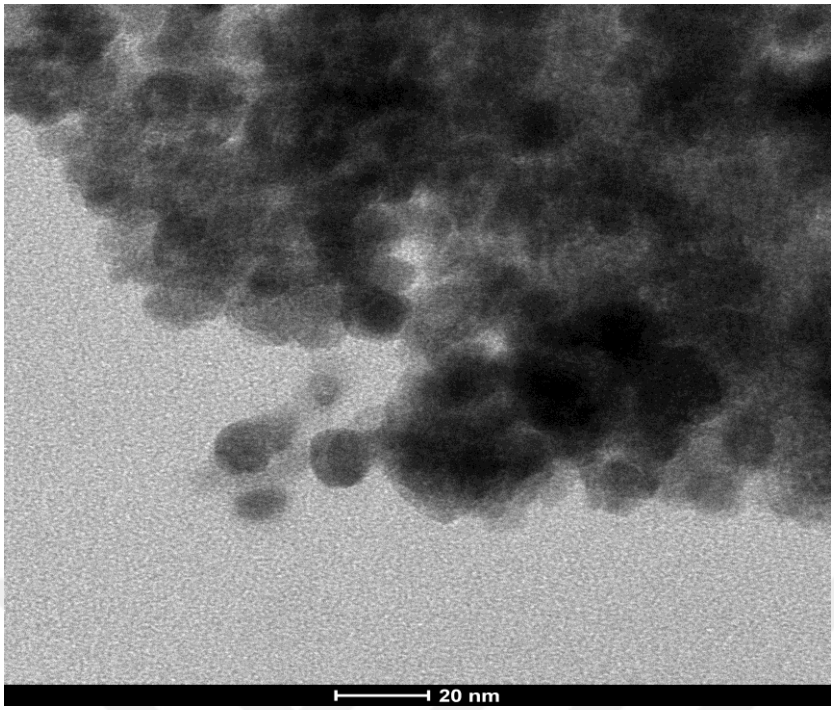
Ayrıca Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllerin küresel yapıda olduğu ve yaklaşık olarak 15 nm oldukları Şekil 4.18'deki TEM görüntüsünden görülmektedir. Shelat ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Fe_3O_4@β-CD için benzer görüntüler elde etmişlerdir (Shelat vd., 2018). Zhu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Fe_3O_4 nanopartikülleri β-CD ile kaplamıştır. Bu çalışmada alınan TEM görüntüleri ışığında, demir oksit nanopartiküllerin yaklaşık 10 nm boyutunda ve β-CD ile kaplandıktan sonra boyutun yaklaşık 16 nm olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada nanoparçacıkların

şekilsel olarak küresel veya elipsoidal oldukları da ifade edilmiştir (Zhu vd., 2011).



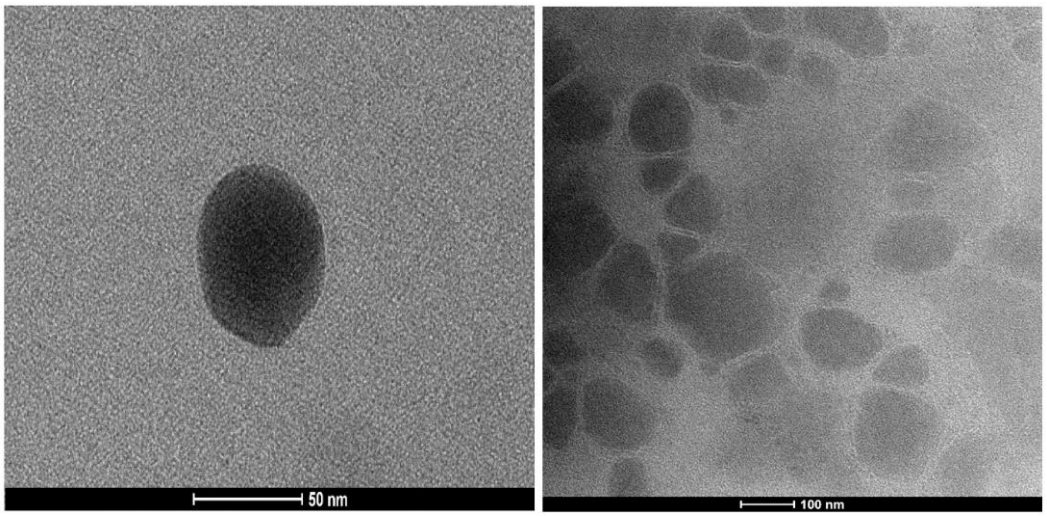
Şekil 4.18 Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllerin 20 nm skalada TEM görüntüsü

Fe_3O_4@β-CD-TPT nanopartiküllerinin 20 nm skaladaki TEM görüntüsü Şekil 4.19'da verilmiştir. TPT, Fe_3O_4@β-CD taşıyıcıları içinde kapsüllendiğinde, ortaya çıkan Fe_3O_4@β-CD-TPT inklüzyon kompleksleri, şekil ve morfolojiyi büyük ölçüde değiştirerek daha amorf hale gelmiştir (Şekil 4.19). Kapsüllenme sonrasında komplekslerin yüzey morfolojisindeki değişiklik, TPT'nin Fe_3O_4@β-CD'ye moleküler kapsüllenmesinden kaynaklanabilecek yeni bir katı fazın varlığının göstergesidir. TEM görüntüleri, manyetik nanotaşıyıcı (Fe_3O_4@β-CD) ve ilaç yüklü manyetik nano taşıyıcının (Fe_3O_4@β-CD-TPT) ayrı ayrı bileşenlerinin, ayrılmış parçacıklarla nanometre boyut aralığına sahip olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.19).

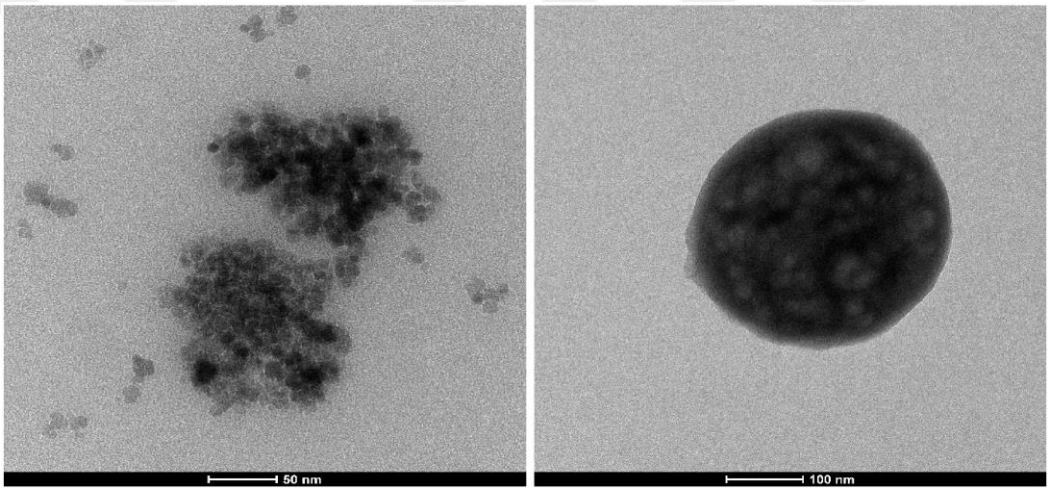


Şekil 4.19 Fe_3O_4@β-CD-TPT nanopartiküllerin 20 nm skalada TEM görüntüsü

Şekil 4.20'de Lipozom-TPT 50 ve 100 nm skalada TEM görüntüleri görülmektedir. TEM görüntüleri, lipozomların partikül boyutu, vezikül şekli ve lamelleritesinin, hazırlama sürecine bağlı olarak farklı olabileceğini (fosfolipitlerin kolesterolsüz oluşturacağı lipozomlar gibi) göstermiştir. Şekil 4.20'de gösterildiği gibi, nano-metrik boyutta (sonikasyondan sonra) tüm veziküller (lipozomlar) tiplerinin benzer tek lamelli, oval, küresel veya farklı şekillere sahip olduğu görülmüştür. Bu farklı şekilli lipozomlar numune hazırlama sırasında meydana gelebilecek lipozomların deformasyonundan kaynaklanmış olabilir. Kolesterol ve fosfolipitler etkileşimi sonrası oluşan lipozomların iki tabakalı yapısı, organize lipozomların varlığını doğrulayan Şekil 4.20'de açıkça görülmektedir (Hoppe vd., 2013; Pezeshky vd., 2016). Şekil 4.21'de Fe_3O_4@β-CD-TPT yüklü lipozom, küresel bir şekil ve homojen bir görünüm sergilerken, lipozomda Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin kapsüllenmesi gözlemlenmiştir (Gharib vd., 2015). TEM analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarındabulanan JEOL marka JEM 2100F model Geçirimli Elektron Mikroskobu ile yapılmıştır.



Şekil 4.20 Lipozom ve Lipozom-TPT'nin 50 ve 100 nm skalada TEM görüntüleri

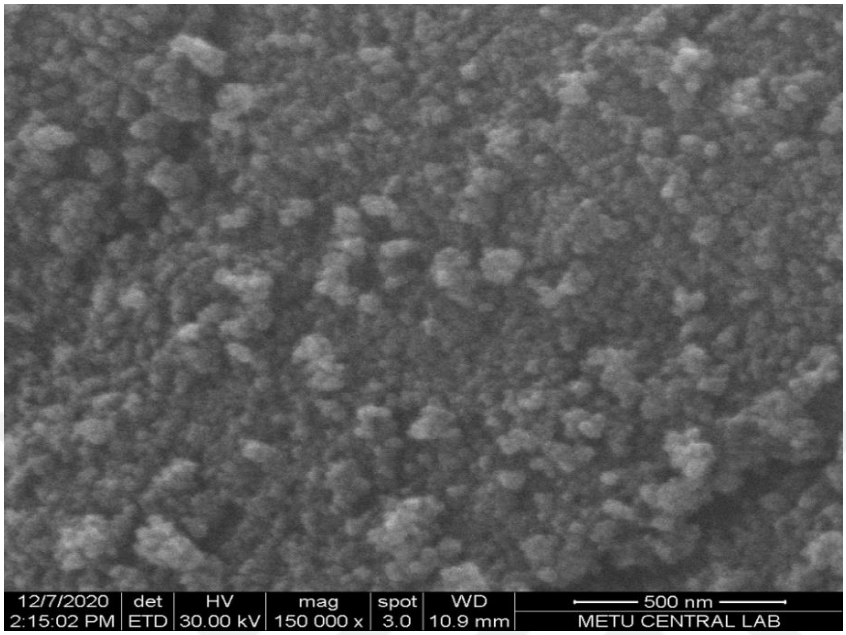


Şekil 4.21 Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin 50 ve 100 nm skalada TEM görüntüleri

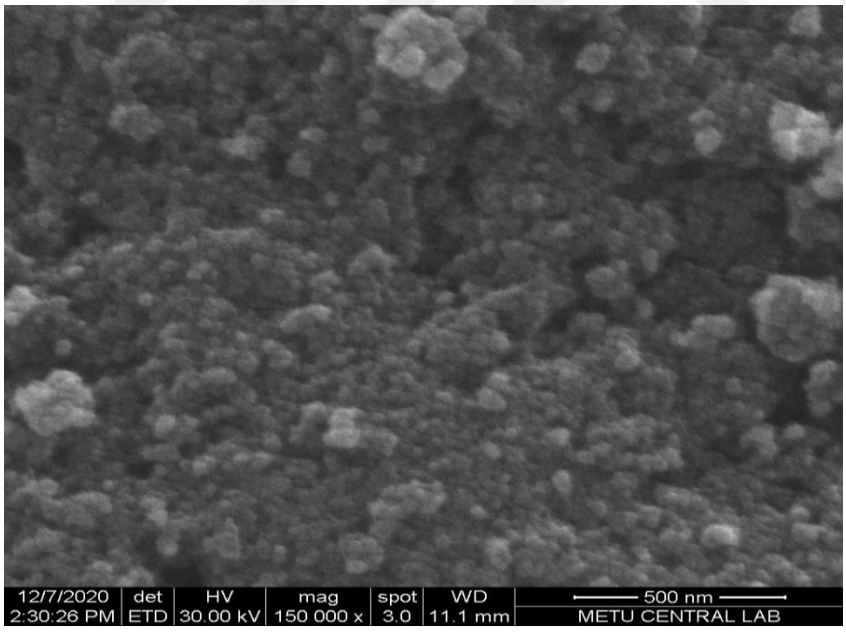
4.1.5 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin yüzey morfolojisi ve boyut aralığı SEM görüntüsü ile karakterize edilmiştir. SEM görüntülerinde görüldüğü gibi hem parçacık boyutlarının çok küçük olması hem de aglomerasyondan dolayı bu görüntülerinden yüzey morfolojisi hakkında net bir bilgi alınamamış olup küresel nanopartiküllerden oluştuğu gözlenmiştir. Şekil 4.22, 4.23 ve 4.24'te Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT için SEM görüntüleri sırasıyla verilmiştir. Bu görüntülerde TPT yüklendikten sonra yüzeyde meydana gelen değişimler gözlenebilmiştir.

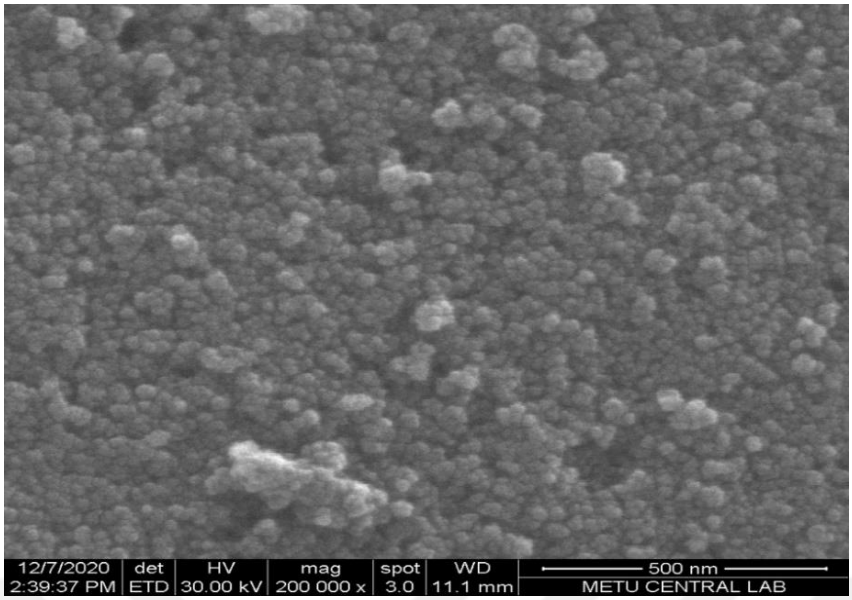
SEM analizleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkezi Laboratuvarında bulanan QUANTA 400F Field Emission SEM Yüksek çözünürlüklü taramalı elektron mikroskobu ile yapılmıştır.



Şekil 4.22 Fe_3O_4'ün 500 nm'deki SEM görüntüsü



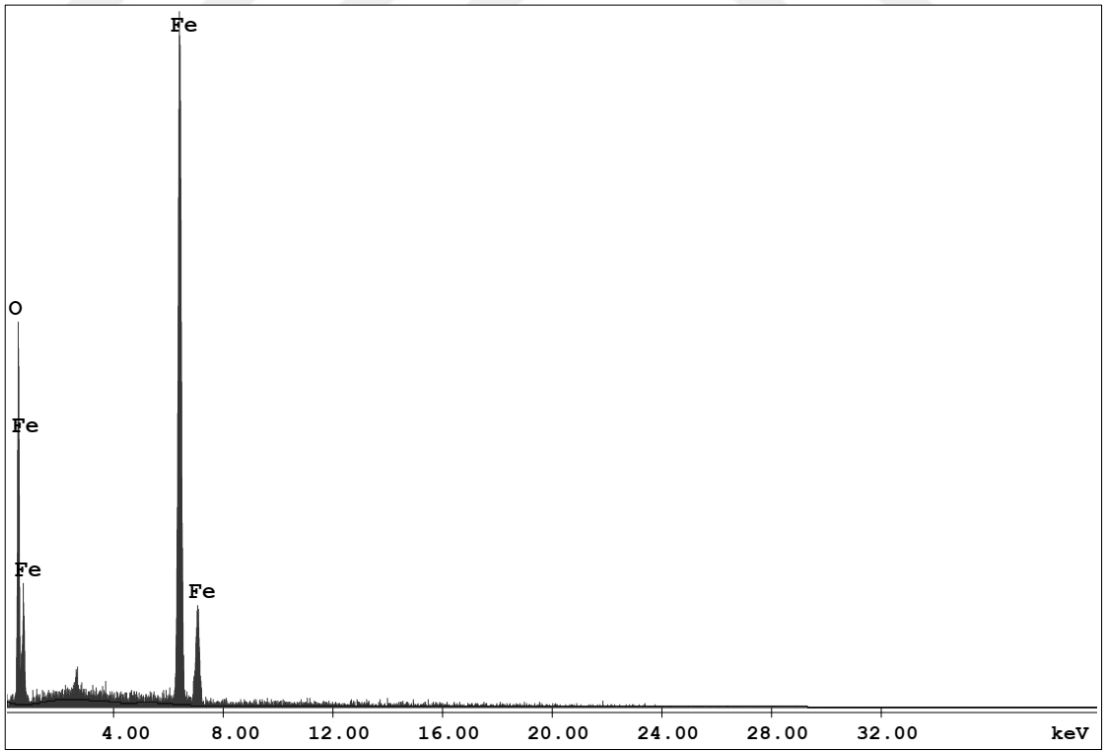
Şekil 4.23 Fe_3O_4@β-CD'nin 500 nm'deki SEM görüntüsü



Şekil 4.24 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin 500 nm'deki SEM görüntüsü

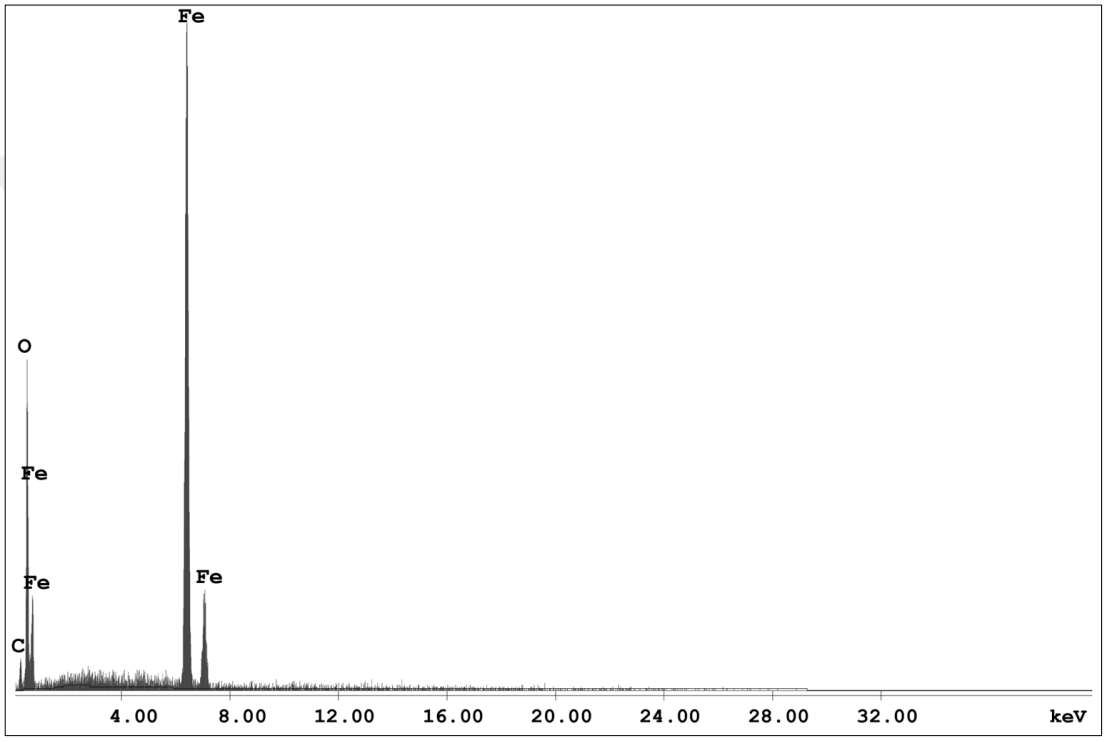
4.1.6 Enerji dağılım X-ışını spektrometresi (EDX) analizi

Şekil 4.25'te EDX spektrumu, Fe_3O_4 nanonanoparçacıkların temel parmak izlerini göstermiştir. Saf Fe_3O_4'lerin EDX spektrumlarında Fe ve O'nin ağırlık yüzdeleri Tablo 4.2'de gösterilmektedir.



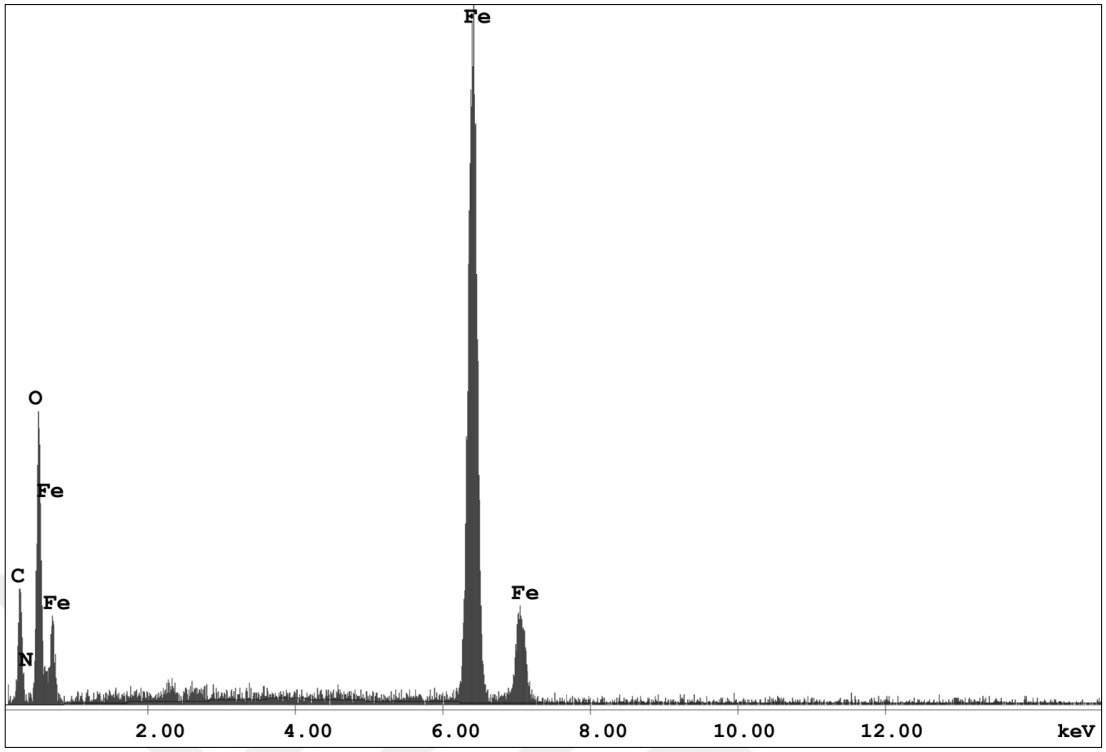
Şekil 4.25 Fe_3O_4'ün EDX spektrumu

Şekil 4.26'da EDX spektrumu Fe_3O_4@β-CD temel parmak izlerini göstermiştir. Fe_3O_4'e kıyasla elementel karbon ve daha yüksek ağırlık yüzdesi Fe ve O'nun varlığını gösterdi. Bu sonuç, β-CD'nin Fe_3O_4 nanoparçacıkların yüzeyinde başarılı bir şekilde kaplandığını bir kez daha doğrulamaktadır. Ayrıca, C ve O yüzdelerinde artış olmuş bu da daha yüksek β-CD bağ içeriğinin Fe_3O_4 nanoparçacıklarla etkileşerek kaplandığını göstermektedir. Fe_3O_4@β-CD'nin EDX spektrumlarında Fe, C ve O'nin ağırlık yüzdeleri Tablo 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.26 Fe_3O_4@β-CD'nin EDX spektrumu

Şekil 4.27'de EDX spektrumu Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin temel parmak izlerini göstermiştir. Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin EDX spektrumunda C ve N piklerinin intensitelerinde artış göstermesi topotekan'ın Fe_3O_4@β-CD nanoparçacığa başarılı bir biçimde yüklendiğini gösermektedir. Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin EDX spektrumlarında Fe, C, N ve O'nin ağırlık yüzdeleri Tablo 4.2'de gösterilmektedir.



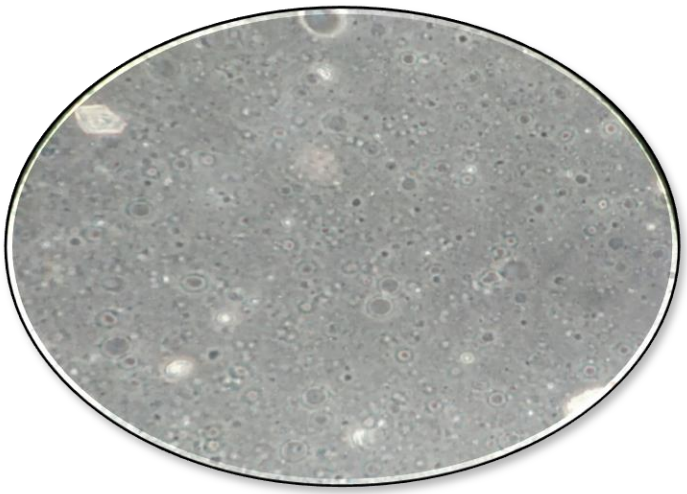
Şekil 4.27 Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin EDX spektrumu

Tablo 4.2 Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT nanoparçacıkların EDX analiz sonuçları (n:3 için Xort±s)

Nanoparçacıklar	Elementlerin Ağırlıkça Yüzdeleri (%)			
	Fe	O	C	N
Fe_3O_4	68,76±4,64	31,24±4,64		
Fe_3O_4@β-CD	59,97±3,59	29,32±4,20	10,71±3,83	
Fe_3O_4@β-CD-TPT	42,77±6,27	31,74±4,42	23,11±9,93	2,38±0,43

4.1.7 Optik mikroskop analizi

Şekil 4.28'de lipozomların fiziksel durumlarında meydana gelen değişimleri saptayabilmek için örneklerin ışık mikroskobu görüntüleri alınmıştır. Görüntülerde artan büyütme ile çoklu keseciklerin iç içe geçmiş yapılarının varlığı tespit edilmiştir. Oluşan lipozomların genel olarak küresel şekillerini korudukları fakat bazı yerlerde yer alan keseciklerin çekirdeklerinde veya çevre ortamlarında bulanıklaşan bozulmalar gözlemlenmiştir. Kavya ve ark. (2014) lipozomların morfoloji ve şeklini optik mikroskopi ile izlediler. Çalışmada çok katmanlı küresel lipozomlar, mikroskobun 100x boyutunda, immersiyon yağı ile doğru bir şekilde gözlemlendi (Kavya vd., 2014).



Şekil 4.28 Lipozomun optik mikroskop ile elde edilen görüntüsü (x40)

4.1.8 Topotekan yükleme çalışmaları

4.1.8.1 Optimum pH ve süre belirleme çalışmaları

Topotekan, kamptotesin türevi olup ortamın pH'na bağlı olarak iki farklı formda bulunan bir anti kanser ilaçtır. Formlardan biri, kanser tedavilerinde kullanılan ve aktif form olan lakton formudur. Bu form, pH 5 ve 5'ten küçük değerlerde yani asidik ortamda mevcuttur. Toksik etki gösteren diğer form ise karboksilat formudur. Karboksilat, nötral ve bazik koşullardaki pH değerlerinde olan formdur. Sentezi yapılmış Fe_3O_4@β-CD'nin, topotekanı aktif formda tutabilecek koşullar belirlenecektir. Yukarıda verilen literatür bilgiler ışığında, anti kanser ilaç olan topotekanın aktif lakton formda kalabilmesi için ilaç yükleme pH aralığı 5,0-6,5 olarak belirlenmiştir. 50 mg Fe_3O_4@β-CD, pH 5,0, 5,5 ve 6,5 değerlerinde 2 mL 50 µg/mL TPT ile etkileştirilmiştir. Tutunmadan geriye kalan TPT analizleri, Poroshell 120 EC-C18 kolon, akış hızı 1 mL/dakika, enjeksiyon hacmi 1µL olan ve yürütücü faz olarak trietilamin asetat/asetonitril 88/12 oranlarında HPLC ile yapılmıştır. Okumalar adsorpsiyon 382 nm ve emisyon 516 nm'de floresans dedektör ile yapılmıştır. Analiz sonuçları Tablo 4.3'te verilmiştir. Tutunan % TPT verimi denklem (3.2)'ye göre hesaplanmıştır. pH'ın artan değerlerine karşılık tutunan TPT konsantrasyonu artış göstermiş fakat pH artışı ile beraber tutunmayan kısımda karboksilat formda da artma gözlenmiştir. Tutunan TPT'nin hepsi lakton form olmayıp, bir miktar karboksilat form da Fe_3O_4@β-CD'ye tutunmuştur. TPT'nin aktif formu olan Lakton formun en fazla pH 5'te korunması ve ayrıca tümörlü bölgenin asidik olması (Lagadic-Gossmann vd.,

2004) nedeniyle optimum TPT yükleme pH değeri 5,0 ve yükleme süresi 24 saat olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.3 Fe_3O_4@β-CD'ye topotekanın yüklenme HPLC analiz sonuçları (C18 ve kolonun maksimum basıncı 151.4 mbar, akış hızı 1 mL/dakika, enjeksiyon hacmi 1µl olan ve yürütücü faz olarak trietil amin asetat/asetonitril 88/12 ve adsorpsiyon 382 ve emisyon 516 nm'de HPLC ile ölçüm sonuçları (n:3 için Xort±s)

pH	Süre (saat)	Lakton(µg/mL)	Karboksilat(µg/mL)	Tutunan(µg/mL)
5,0	1	34,15±0,10	0,85±0,10	15±0,25
	3	29,20±0,25	0,80±0,25	20±0,20
	6	19,25±0,18	0,75±0,18	30±0,35
	12	13,40±0,25	0,60±0,25	36±0,30
	24	4,50±0,20	0,50±0,20	45±0,15
5,5	1	37,05±0,13	0,95±0,13	12±0,10
	3	31,15±0,25	0,85±0,25	18±0,20
	6	21,20±0,18	0,80±0,18	28±0,40
	12	17,25±0,15	0,75±0,15	32±0,50
	24	9,35±0,28	0,65±0,28	40±0,35
6,5	1	38,75±0,17	1,25±0,17	10±0,15
	3	33,85±0,15	1,15±0,15	15±0,32
	6	24,00±0,27	1,00±0,27	25±0,35
	12	19,15±0,35	0,85±0,35	30±0,20
	24	14,2±0,30	0,80±0,30	35±0,45

Fe_3O_4@β-CD'ye TPT (%) yükleme çalışmalarının analizleri aynı zamanda UV-Vis spektrofotometre ile de yapılmıştır. Tablo 4.4'te 50 mg Fe_3O_4@β-CD, 2 mL 50 µg/mL TPT ile pH 5, 200 rpm 25 °C'de farklı sürelerde yapılan çalışmanın UV-Vis spektrofotometre analiz sonuçları verilmiştir. Bu sonuçlara göre 24 saat en iyi TPT yükleme süresi olup HPLC analiz sonuçları ile de tutarlıdır.

Tablo 4.4 Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllerine topotekan yükleme, zamana karşı %tutunan TPT sonuçları (pH: 5, 50 mg Fe_3O_4@β-CD ve 50 µg/mL TPT için UV-Vis spketrofotometre ile ölçüm sonuçları için UV-Vis spketrofotometre ile ölçüm sonuçları (n:3 için Xort±s))

Süre (saat)	% Tutunan (TPT)	Tutunan TPT (mg/g)
0.5	59,93±0,70	1,198±0,014
1	62,06±0,60	1,241±0,012
3	64,03±0,35	1,281±0,007
6	66,06±0,70	1,321±0,014
9	70,93±0,40	1,418±0,008
12	74,10±0,66	1,482±0,013
18	77,05±0,33	1,541±0,006
24	84,10±0,46	1,682±0,009
30	83,86±0,41	1,677±0,008
36	83,62±0,28	1,672±0,005

Tablo 4.5'te, 50 mg Fe_3O_4@β-CD, farklı pH değerinde (pH 5, 5,5 ve 6,5) 2 mL 50 µg/mL TPT ile 200 rpm, 25 °C'de 24 saat süre ile yapılan çalışmanın UV-Vis spektrofotometre analiz sonuçları verilmiştir. Tablo 4.4'te verilen analiz sonuçlarına göre en iyi TPT yükleme verimi pH 5,0'te elde edilmiştir.

Tablo 4.5 Fe_3O_4@β-CD'ye tutunan TPT derişimi ve % ilaç yükleme verimi (50 mg Fe_3O_4@β-CD ve süre: 24 saat, 50 µg/ml TPT için UV-Vis spketrofotometre ile ölçüm sonuçları (n:3 için Xort±s))

Nanoparçacık	pH	Tutunan Ortalama İlaç (µg/mL)	% İlaç Yükleme Verimi	Tutunan Ortalama İlaç (mg/g)
Fe_3O_4@β-CD	5	27,52±0,33	55,04±0,65	1,100±0,013
	5,5	23,42±0,38	46,84±0,76	0,936±0,015
	6,5	21,25±0,25	42,5±0,50	0,850±0,010

4.1.8.2 Fe_3O_4@β-CD'nin miktarının belirlenmesi çalışmaları

Optimum miktar belirlenmesi çalışmasında Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklardan farklı dozlarda alınıp pH 5'te 2 mL 50 µg/mL TPT ile 200 rpm'de ve 25 °C'de etkileştirilmiştir. Tablo 4.6'da görüldüğü gibi miktar arttıkça tutunan TPT konsantrasyonunda artış görülmektedir. Bu nedenle optimum doz belirleme çalışmasında sitotoksisite deneyleri de dikkate alınarak 50 mg'lık örneklerin en uygun doz olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.6 Fe_3O_4@β-CD için miktara karşı tutunan ilaç derişimi (pH: 5, süre: 24 saat ve 50 µg/mL TPT için UV-Vis spketrofotometre ile ölçüm sonuçları (n:3 için Xort±s))

Fe_3O_4@β-CD (mg)	%Tutunan TPT (µg/ml)	Tutunan TPT (mg/g)
5	15,13±0,42	6,05±0,17
10	17,60±0,61	3,52±0,07
15	20,90±0,83	2,79±0,24
20	25,86±1,31	2,58±0,19
25	30,60±1,21	2,45±0,10
40	38,13±0,42	1,90±0,02
50	45,03±0,46	1,80±0,01

4.1.8.3 TPT derişiminin etkisini belirleme çalışmaları

Bu çalışmada, 50 mg Fe_3O_4@β-CD nanoparçacık, pH 5'te farklı derişimlerde TPT (10, 20, 30, 40 ve 50 µg/mL) ile 24 saat 25 °C'de etkileştirilmiştir. Daha sonra bir mıknatıs yardımı ile süpernatant ayrılmıştır. Süpernatantta geriye kalan TPT analizi UV-Vis spektrofotometre ile yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.7'de verilmiştir. 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL derişimlerinde TPT'nin Fe_3O_4@β-CD'e tutunma verimleri sırasıyla %40,2 %48,17, %65,16, %70,00 ve %80,66 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.7). Sonuçlara

göre Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklara eklenen topotekanın derişimi artarken yüklenme veriminin de artış gösterdiği saptanmıştır (Aşık vd., 2013). Aljuffali ve ark. (2011) ve Hörmann ve ark. (2012) topotekan ilacının konsantrasyona bağlı toksik etkisini çalışmışlardır. İlacın yüksek dozlarda alınmasının toksik etki yaptığını belirtmişlerdir. Topotekan ile yapılan sitotoksisite çalışmalarında, genel olarak µg/mL düzeyinde ilaç derişimi ile çalışmaların varlığı tespit edilmiştir (Aljuffali vd., 2011; Hörmann vd., 2012). Bundan dolayı bu tez çalışmasında 50 µg/mL TPTderişimde yüklenen Fe_3O_4@β-CD ile in vitro çalışmalar yapılmıştır.

Tablo 4.7 Topotekan derişiminin yükleme verimliliğine etkisi (pH: 5, 50 mg Fe_3O_4@β-CD ve süre: 24 saat için UV-Vis spketrofotometre ile ölçüm sonuçları (n:3 için Xort±s))

Derişim (µg/mL)	% Tutunan TPT	Tutunan TPT (mg/g)
10	40,20 ±0,72	0,804±0,014
20	48,17±1,60	0,963±0,032
30	65,16±1,26	1,303±0,025
40	70,00±2,00	1,400±0,040
50	80,66±4,04	1,606±0,031

4.1.8.4 İlaç salım çalışmalarının sonuçları

Lagadic-Gossmann ve arkadaşları (2004), apoptozda hücre içi pH (pHi) değişikliklerinin hem kökeni hem de rolü hakkındaki bir derleme hazırlamışlardır. Derlemede kısaca şu hususlar vurgulanmıştır: Kanser hücre zarının içindeki sıvıda (sitoplazmasındaki) pHi >7.4 ve üzerindedir. Yani asidik değil, biraz baziktir, alkalidir ve kanser hücresinin içindeki pH artışı (alkali olması), hücrenin çoğalmasını kolaylaştırır ve ölümünüde (apopitozis) zorlaştırır. Kanser hücresi kendi sitoplazmasında ürettiği, içindeki asidi dışarı çevre dokuya atarak hem kendini her zaman bazik tutar hem de çevre dokuya (mikroçevre) asiti salgıladığı için peritümöral alanı ise hep asidik tutar. Normal bir hücre, içerideki ve dışarıdaki pH farkını tolere edemez, dayanamaz. Kanser hücresi ise kendi içini bazik tutarken çevresinin asidik olmasını fırsata çevirir, diğer sağlıklı dokulara hasar vererek kendisine yeni yer açma eylemine yönelir (Lagadic-Gossmann vd., 2004). Danhier ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, Tümörlerin hücre dışı pH değerlerinin 6,0'dan düşük olduğunu göstermişlerdir (Danhier vd., 2010). Tümörlü bölgenin pH'ı ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (Lardner, 2001; Kraus ve Wolf, 1996).

Laboratuvarda yapılan salım çalışmaları, sitotoksisite çalışmalarına yol gösterici olacaktır. Süre ve pH optimizasyonu önemli olduğundan, özellikle çalışılacak pH aralığı TPT'nin yapısı ve kanserli bölgenin pH değerleri göz önünde bulundurularak belirlenmiştir.

Bu nedenle 50 mg Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklar kullanılarak pH 5'te 50 µg/mL TPT yüklenmiştir. pH 5'te tutunan TPT derişimi 45 µg/mL olan TPT yüklü Fe_3O_4@β-CD-TPT nanoparçacıklar salım çalışmalarında kullanılmıştır. pH 5,5, 6,5. ve 7,4'te 36,5 °C'de salım çalışılmıştır. 24, 48, 72, 96 ve 120 saat ve farklı pH değerlerindeki salım sonuçları Tablo 4.8'de verilmiştir. Salınan ilaç (%) denklem (3.3) göre hesaplanmıştır. Salım sonuçları değerlendirildiğinde, salımın oldukça yavaş olduğu 120. saatte TPT'nin yaklaşık olarak %22'sinin salındığı görülmektedir. Farklı pH'larda süreye bağlı salım sonuçlarına bakıldığında en iyi sonuç pH 7,4'te elde edilmiştir. Kanserli bölgenin pH'ının 6'nın altında olduğu düşünüldüğünde bu sonuç oldukça iyidir.

Tablo 4.8 Fe_3O_4@β-CD nanoparçacık için pH ve süreye bağlı % salınan TPT ilacının gösterilmesi (Fe_3O_4@β-CD'de yüklü 45 µg/ml TPT'nin UV-Vis spketrofotometre ile ölçüm sonuçları (n:3 için Xort±s))

Süre	pH	Salınan TPT ilacı (%)
24 Saat	5,5	10,06±0,16
	6,5	11,17±0,21
	7,4	11,14±0,14
48 Saat	5,5	11,22±0,25
	6,5	10,03±0,15
	7,4	10,07±0,20
72 Saat	5,5	20,08±0,28
	6,5	17,87±0,25
	7,4	21,20±0,26
96 Saat	5,5	22.38±0,28
	6,5	22.22±0,23
	7,4	22.40±0,35
120 Saat	5,5	22.92±0,37
	6,5	22,98±0,18
	7,4	22,96±0,27

4.1.9 Sitotoksisite sonuçları

Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD@TPT parçacıkların sitotoksisitesi 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5 ve 25 µg/mL derişimler de çözeltiler hazırlanıp MCF-7 kanserli hücredeki etkileri araştırılmıştır.

TPT ve Lipozom-TPT'nin en düşük konsantrasyonlarında bile canlılığın %30'un altında seyretmesi nedeniyle, 72. saat IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Fe_3O_4@β-CD-TPT nanopartikülünün 24. saat sonucundaki canlılık değeri en yüksek konsantrasyonlarda bile %90'lardadır. Tablo 4.9'da farklı malzemelerin IC_{50} sonuçları gösterilmektedir.

Tablo 4.9 Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD@TPT nanoparçacıkların MCF-7 hücre hattı üzerinde IC_{50} değeri ((n:3 için Xort±s))

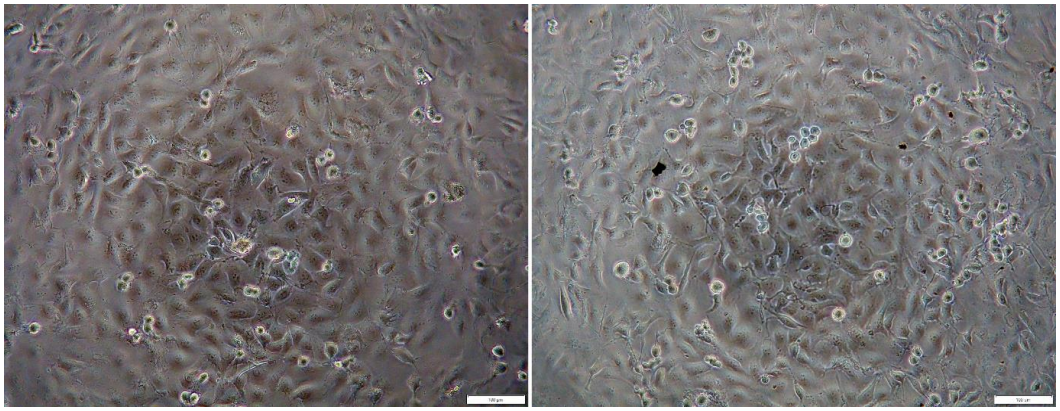
	IC_{50} µg/mL		
Malzeme	**24 Saat**	**48 Saat**	**72 Saat**
Fe_3O_4@β-CD	149,67±4,42	95,32±4,55	48,03±2,88
TPT	18.32±3.06	5.43±3.22	Yüksek Ölüm
Fe_3O_4@β-CD@TPT	Düşük Ölüm	47,93±3,24	25,31±3,26
Lipozom-TPT	25,85±4,66	5,31±2,13	Yüksek Ölüm
Lipozom@Fe_3O_4@β-CD@TPT	21,15±2,91	21,47±2,64	18,64±3,60

4.1.10 Optik mikroskop görüntüleri

25 µg/mL Fe_3O_4@β-CD, Fe_3O_4@β-CD-TPT, TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin MCF-7 hücre hatlarına 24., 48. ve 72. saat uygulanmalarından önce ve sonraki optik mikroskop görüntüleri verilmiştir.

4.1.10.1 24. saat optik mikroskop görüntüleri

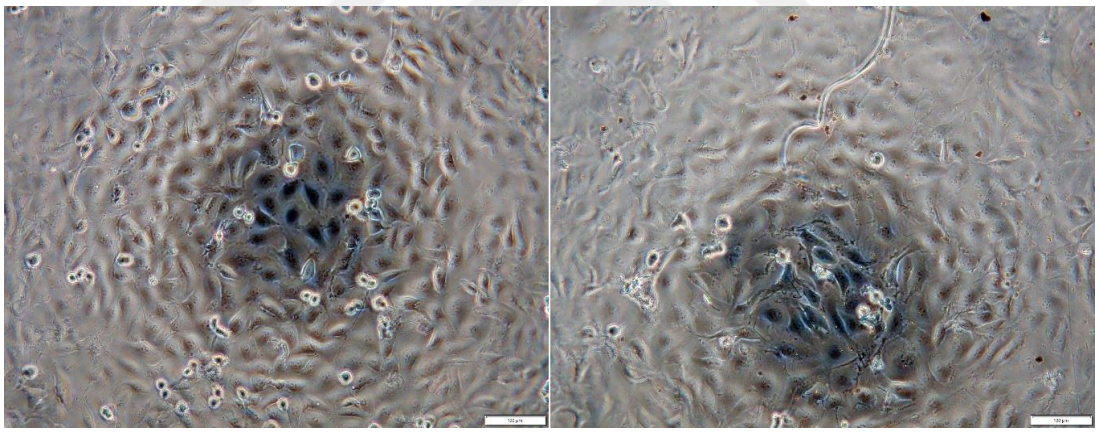
24. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Fe_3O_4@β-CD'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.29'da verilmiştir. Fe_3O_4@β-CD malzemesinin kanser hücreleri için sitotoksik etkisi ölçüldüğünde antikanser özelliğinin 24. saat için düşük olduğundan hücreler için gözle görülür değişim görülmemektedir.



Şekil 4.29 24. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

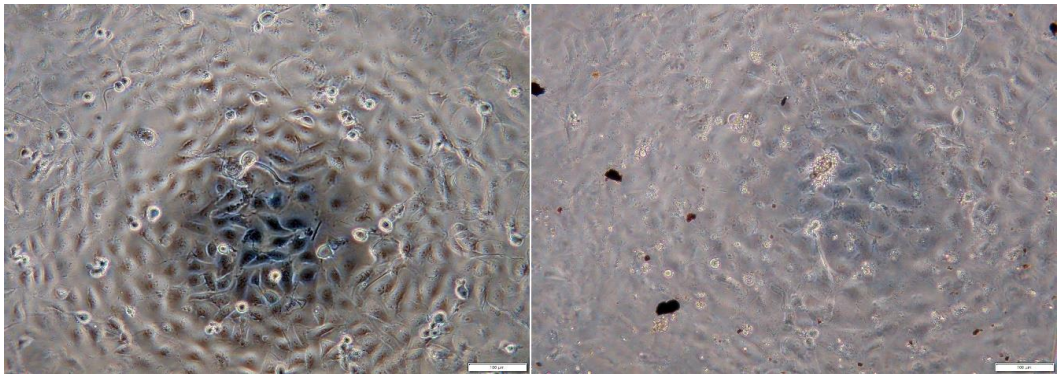
24. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.30'd0 verilmiştir.

Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin MCF-7 hücre hattı üzerinde olumsuz etkisi görülmüş olup ölüm oranı düşüktür. Hücreler erken apoptozda olduğundan canlı görülmüştür.



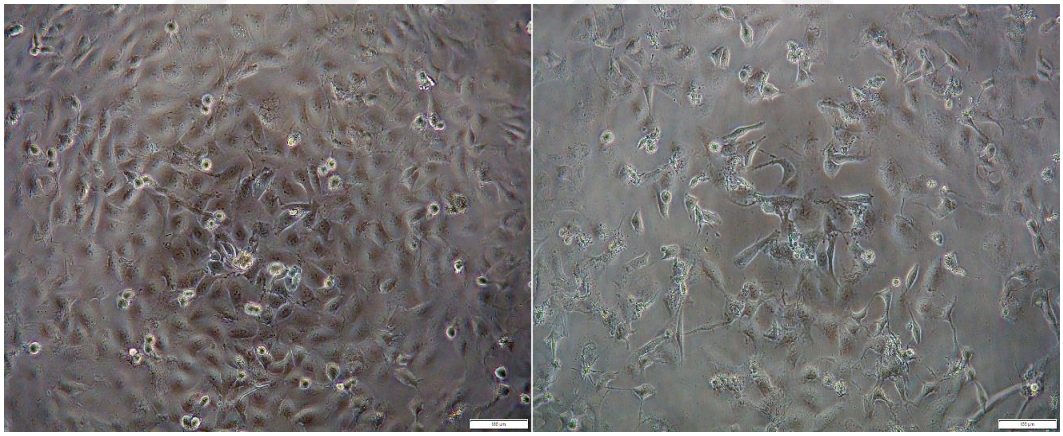
Şekil 4.30 24. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

24. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.31'de verilmiştir. Görüntülerden de görüldüğü gibi, Fe_3O_4@β-CD-TPT malzemesi lipozom ile kapsüllendiğinde TPT etkinliği artmaktadır. Fe_3O_4 siyah nanoparçacıkların çevresinde değişiklik görülmemektedir. Lipozomun ışığı kırma katsayısı yüksek olduğundan ölü hücrelerin görüntülenmesi zorlaşmıştır. Fakat küresel hücre sayısının artması hücre apoptozunun olduğunu göstermektedir.



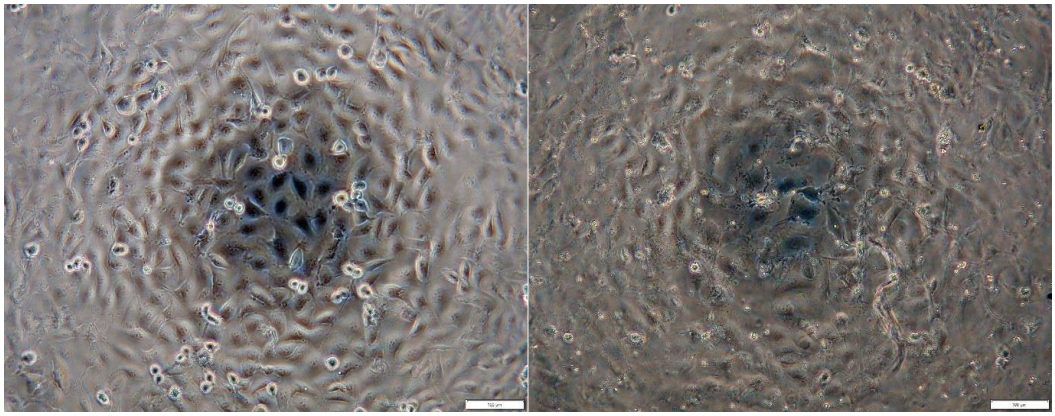
Şekil 4.31 24. saatte MCF-7 hücre hatlarına Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

24. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.32'de verilmiştir. pH 5'te 25 µg/mL TPT uygulandığında hücre ölümü açıkça görülmektedir. Hücre sayısının düşük olması bölünmeye engel olduğunu göstermekle birlikte hücrelerin morfolojik yapısının da değiştiğini göstermektedir. Bu değişim hücre zarının hasara uğraması olarak yorumlanmıştır.



Şekil 4.32 24. saatte MCF-7 hücre hatlarına TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

24. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Lipozom-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.33'te verilmiştir. Öldürücülüğü bilinen TPT anti-kanser ilacın ile ışığı kırma katsayısı yüksek olan lipozom ile kapsüllenmesinden alınan görüntülerde, lipozom-TPT'nin hücrelerin zarını yıpratmış olup tanecikli ölü hücreler görülmektedir.



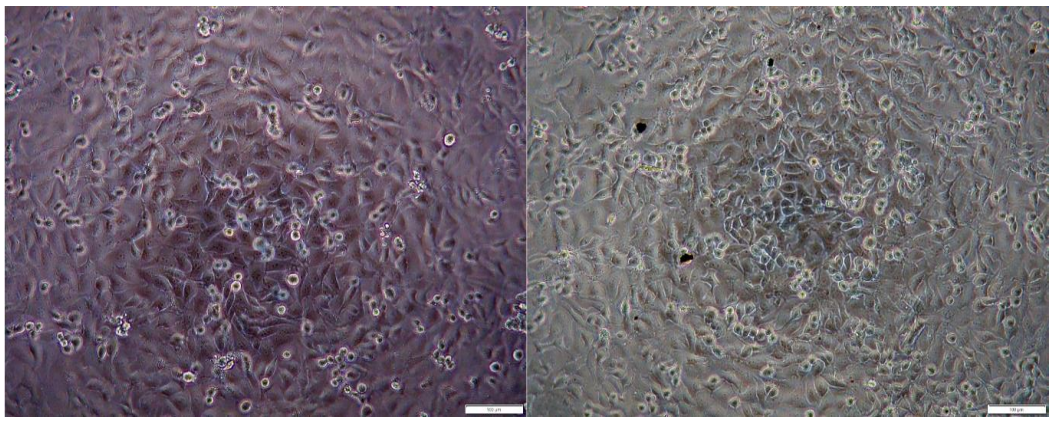
Şekil 4.33 24. saatte MCF-7 hücre hatlarına Lipozom-TPT'nin uygulanmadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

24. saatte MCF-7 hücre hattı ile yapılmış olan çalışmalarda kontrole kıyasla Fe_3O_4 içeren yapılar farklılıklar göstermiştir. Fe_3O_4 içeren Fe_3O_4@β-CD, Fe_3O_4@β-CD-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT nanopartikülleri, mikroskopta katı siyah olarak gözlemlenmiştir.

4.1.10.2 48. saat optik mikroskop görüntüleri

48. saat MCF-7 hücre hattı ile yapılmış olan çalışmalarda kontrole kıyasla farklılıklar görülmüştür. Fe_3O_4 içeren Fe_3O_4@β-CD, Fe_3O_4@β-CD-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT nanopartikülleri, mikroskopta katı siyah olarak gözlemlenmiştir.

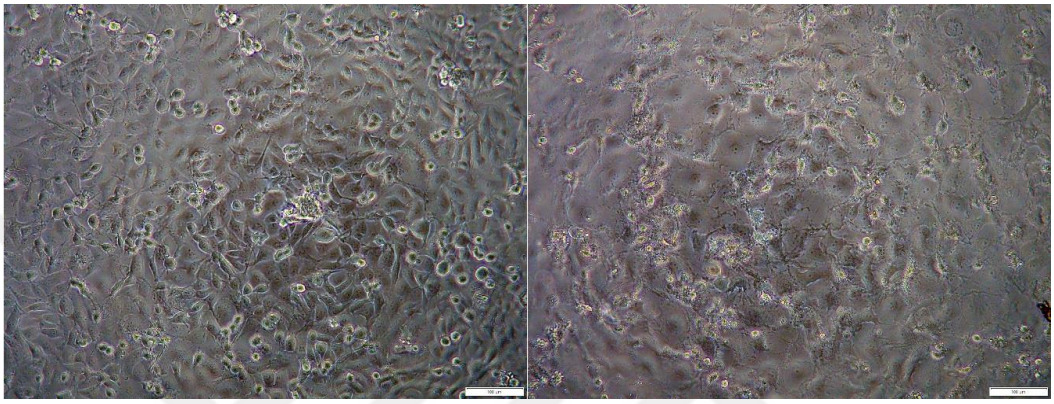
48. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Fe_3O_4@β-CD'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.34'te verilmiştir. Fe_3O_4@β-CD malzemesinin kanser hücreleri için sitotoksik etkisi ölçüldüğünde antikanser özelliğinin 48. saat IC_{50} değeri göz önüne alındığında gözle görülür değişim görülmeye başlanmıştır.



Şekil 4.34 48. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

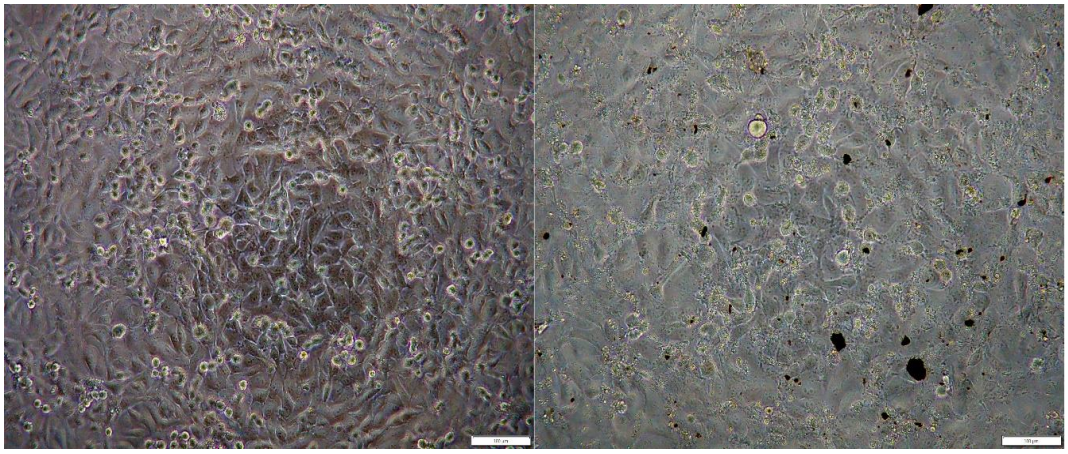
48. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.35'te verilmiştir.

Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin 24. saat ölüm oranı düşük görülmüştü. Fakat 48. saat IC_{50} değerindeki düşüşe paralel olarak Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin hücreler de ölüme neden olmaya başladığı görülmektedir.



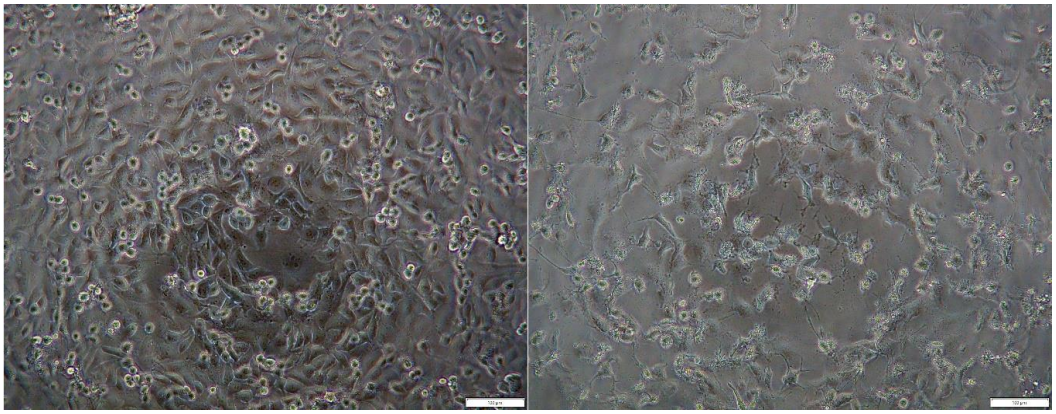
Şekil 4.35 48. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

48. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.36'da verilmiştir. Fe_3O_4@β-CD-TPT, lipozom ile katkılandığında etkinliği artmaktadır. Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin yapısında bulunan siyah Fe_3O_4 nanopartiküllerinin çevresinde bir değişiklik görülmemektedir. Lipozomun ışığı kırma katsayısı yüksek olduğundan ölü hücrelerin görüntülenmesi zorlaşmıştır. Fakat küresel hücre sayısının artması hücre apoptozunun olduğunu göstermektedir. IC_{50} değerleri dikkate alınıp 24. saat ile karşılaştırma yapıldığında pek fazla bir değişim görülmemiştir.



Şekil 4.36 48. saatte MCF-7 hücre hatlarına Lipozom@Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

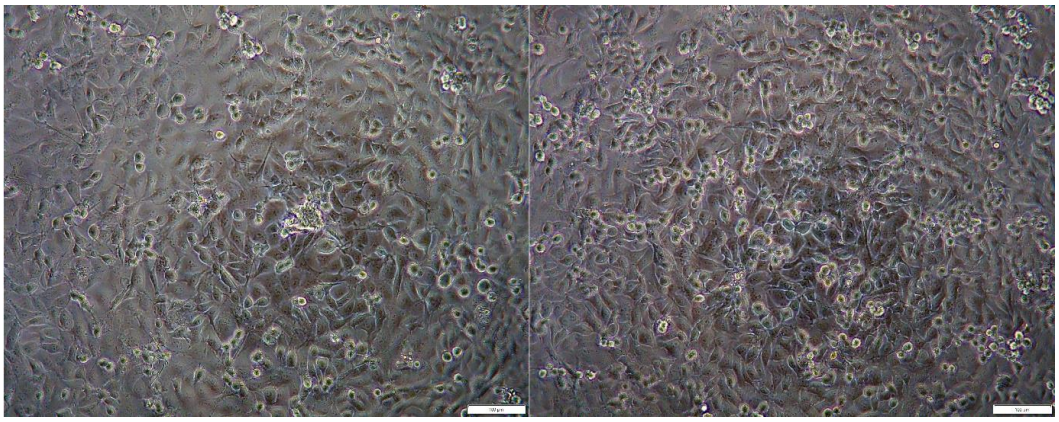
48. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.37'de verilmiştir. pH 5'te hazırlanan 25 µg/mL TPT uygulandığında hücre ölümü açıkça görülmektedir. Hücre sayısının düşük olması bölünmeye engel olduğunu göstermekle birlikte hücrelerin morfolojik yapısının da değiştiğini göstermektedir. IC_{50} değerindeki düşme nedeniyle TPT'nin 24 saat ile kıyaslandığında hücrelerde daha fazla ölüme neden olmaktadır.



Şekil 4.37 48. saatte MCF-7 hücre hatlarına TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

48. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Lipozom-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.38'de verilmiştir. TPT antikanser ilacı ile ışığı kırma katsayısı yüksek olan lipozomun kapsüllenmesi neticesinde elde edilen lipozom-TPT, MCF-7 hücre hatlarına 48. saat uygulanma öncesi ve sonrası alınan görüntülerde hücre zarlarının yıpranmış olduğu ve tanecikli ölü hücreler görülmektedir. 24. saat ile kıyaslandığında

IC_{50} değerinde düşme meydana geldiğinden lipozom-TPT hücrelerde daha fazla ölüme neden olduğu görülmüştür.

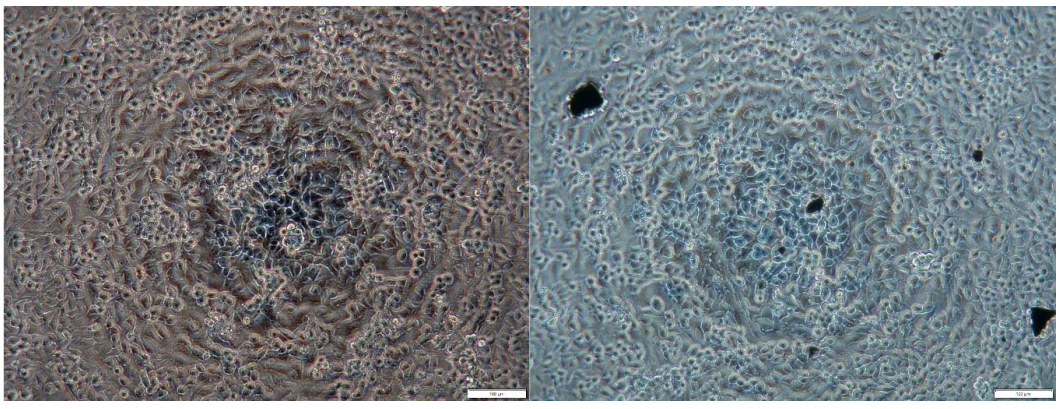


Şekil 4.38 48. saatte MCF-7 hücre hatlarına Lipozom-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

4.1.10.3 72. saat optik mikroskop görüntüleri

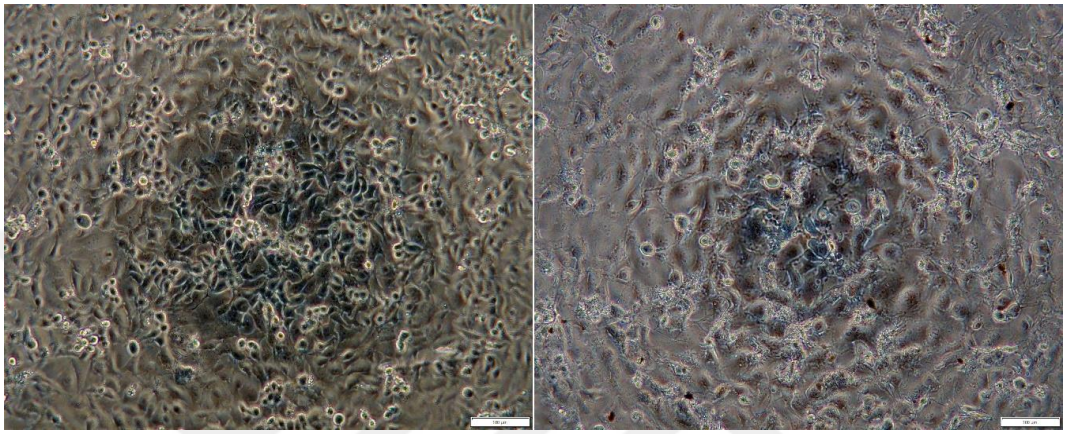
72. saat MCF-7 hücre hattı ile yapılmış olan çalışmalarda kontrole kıyasla farklılıklar görülmüştür. Fe_3O_4 içeren Fe_3O_4@β-CD, Fe_3O_4@β-CD-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT nanopartiküller, mikroskopta katı siyah olarak gözlemlenmiştir.

72. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Fe_3O_4@β-CD'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.39'da verilmiştir. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sitotoksik etkisi ölçüldüğünde antikanser özelliğinin 24. ve 48. saat ile IC_{50} değerleri karşılaştırıldığında 72. saatte Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıkların hücreler de daha fazla ölüme neden olduğu görülmektedir.



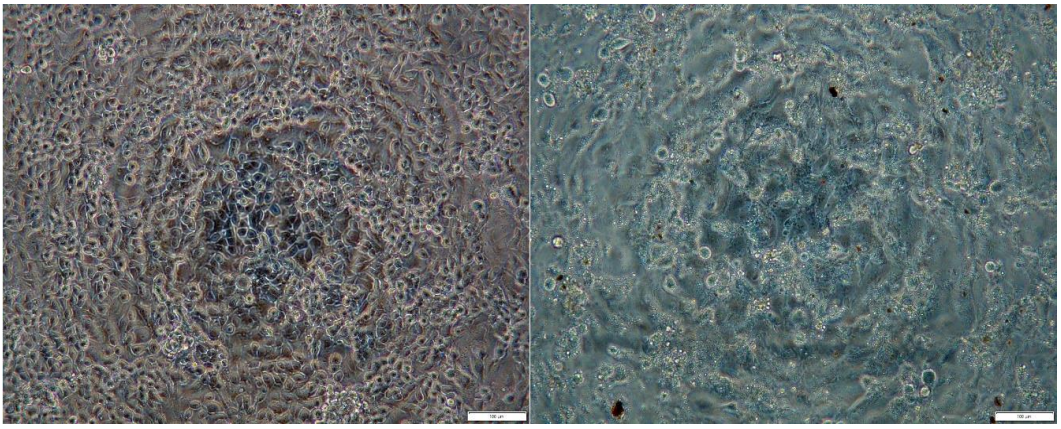
Şekil 4.39 72. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

72. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.40'ta verilmiştir. Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin 24. saat ölüm oranı düşük görülmüştü. Fakat 72. saat sonrasında IC_{50} değerindeki düşüş göz önünde bulundurulduğunda Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin hücreler de ciddi oranda ölümlere neden olduğu görülmektedir.



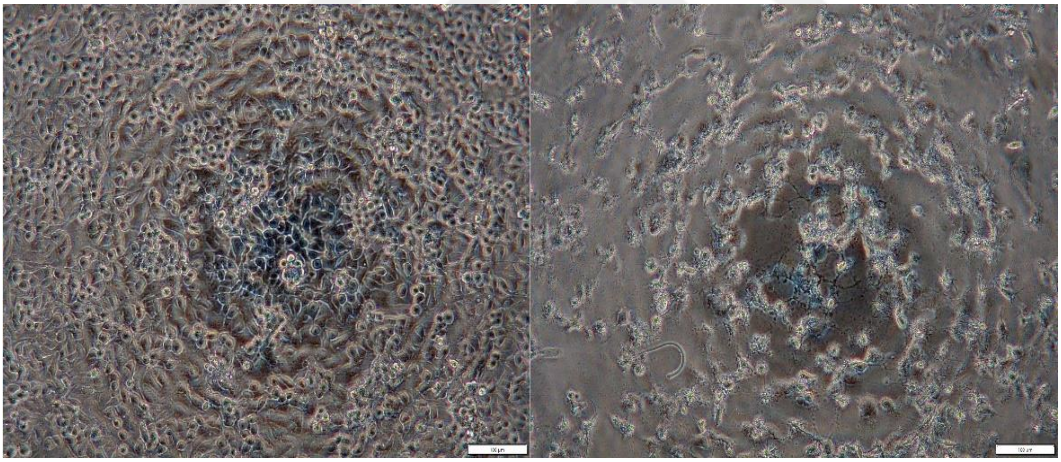
Şekil 4.40 72. saatte MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

72. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.41'de verilmiştir. Fe_3O_4@β-CD-TPT, lipozom ile kapsüllendiğinde TPT etkinliği artmaktadır. Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin yapısında bulunan siyah Fe_3O_4 nanopartiküllerinin çevresinde bir değişiklik görülmemektedir. Lipozomun ışığı kırma katsayısı yüksek olduğundan ölü hücrelerin görüntülenmesini zorlaştırmaktadır. Siyah partiküller olan Fe_3O_4 çevresinde önceki çalışma sürelerinin IC_{50} değerleri ile karşılaştırma yapıldığında çok az bir değişiklik görülmeye başlanmıştır.



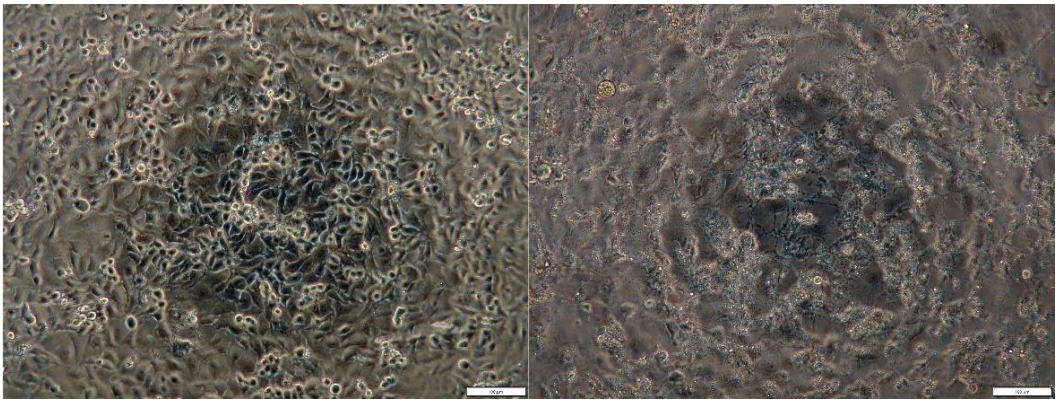
Şekil 4.41 72. saatte MCF-7 hücre hatlarına Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

72. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.42'de verilmiştir. pH 5'te hazırlanan 25 µg/mL TPT uygulandığında hücre ölümü açıkça görülmektedir. Bu süre sonunda TPT hücre hattında yüksek ölüme neden olduğundan IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.



Şekil 4.42 72. saatte MCF-7 hücre hatlarına TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

72. saatte MCF-7 hücre hatlarına 25 µg/mL Lipozom-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri (20x büyütme) Şekil 4.43'te verilmiştir. TPT antikanser ilacı ile ışığı kırma katsayısı yüksek olan lipozomun kapsüllenmesi neticesinde elde edilen lipozom-TPT, MCF-7 hücre hatlarına 72. saat uygulanma öncesi ve sonrası alınan görüntülerde hücre zarlarının yıpranmış olduğu ve tanecikli ölü hücreler görülmektedir. 24. ve 48. saat ile kıyaslandığında IC_{50} değerinde düşme meydana geldiğinden lipozom-TPT hücrelerde daha fazla ölüme neden olduğu görülmüştür.

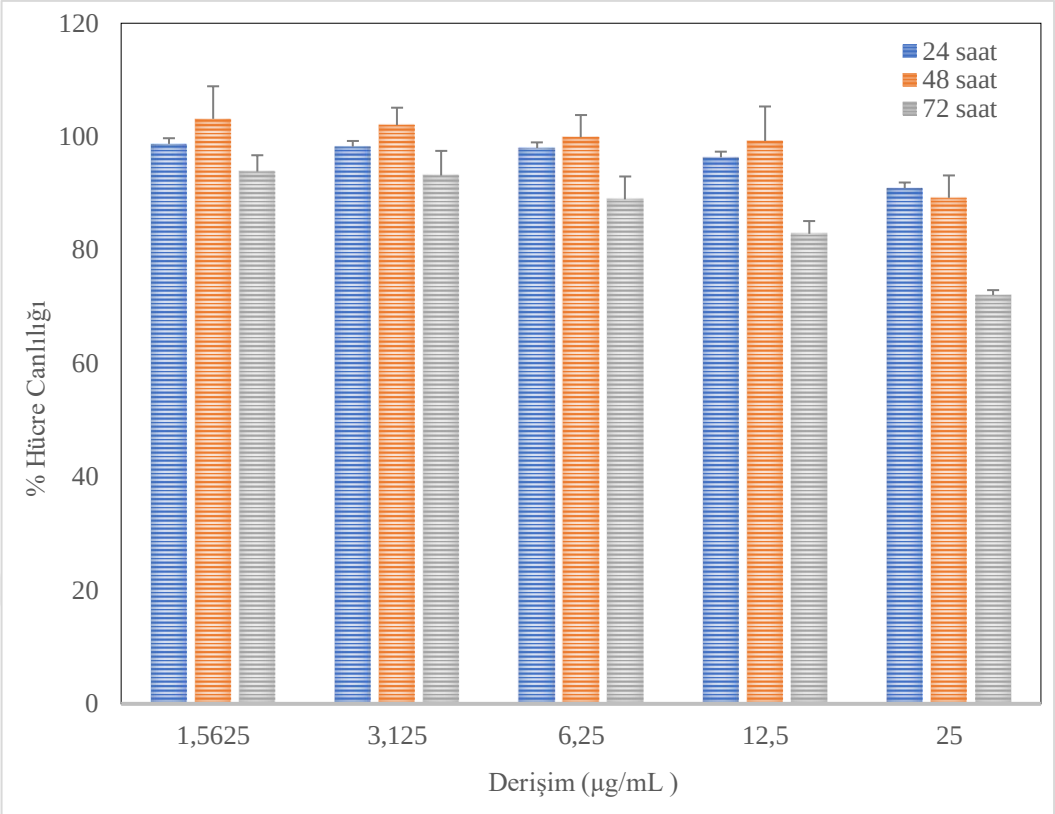


Şekil 4.43 72. saatte MCF-7 hücre hatlarına Lipozom-TPT'nin uygulamadan önce (solda) ve uygulandıktan sonraki (sağda) optik mikroskop görüntüleri

MCF-7 hücre hatlarına Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT parçacıklarının uygulaması yapıldıktan 24., 48. ve 72. saat sonraki canlılıkları değerlendirilmiştir. Farklı süre ve derişimde yer alan her bir nano-malzeme için üç tekrar çalışılmıştır. Çalışmada elde edilen veriler için istatistik analizi yapılmıştır.

Şekil 4.44'te Fe_3O_4@β-CD'in MCF-7 hücre hattı üzerine farklı derişimlerde 24., 48. ve 72. saatteki etkileri incelendiğinde, 1,5625 µg/ml derişim ve 24. saat hücre canlılığı %98 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 24. saat hücre canlılığı %91 olarak ölçülmüştür. 1,5625 µg/ml derişim ve 48 saat sonra hücre canlılığı %103 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 48. saat hücre canlılığı %89 olarak ölçülmüştür. 1,5625 µg/ml derişim ve 72. saat hücre canlılığı %94 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 72. saat ise hücre canlılığı %72 olarak ölçülmüştür.

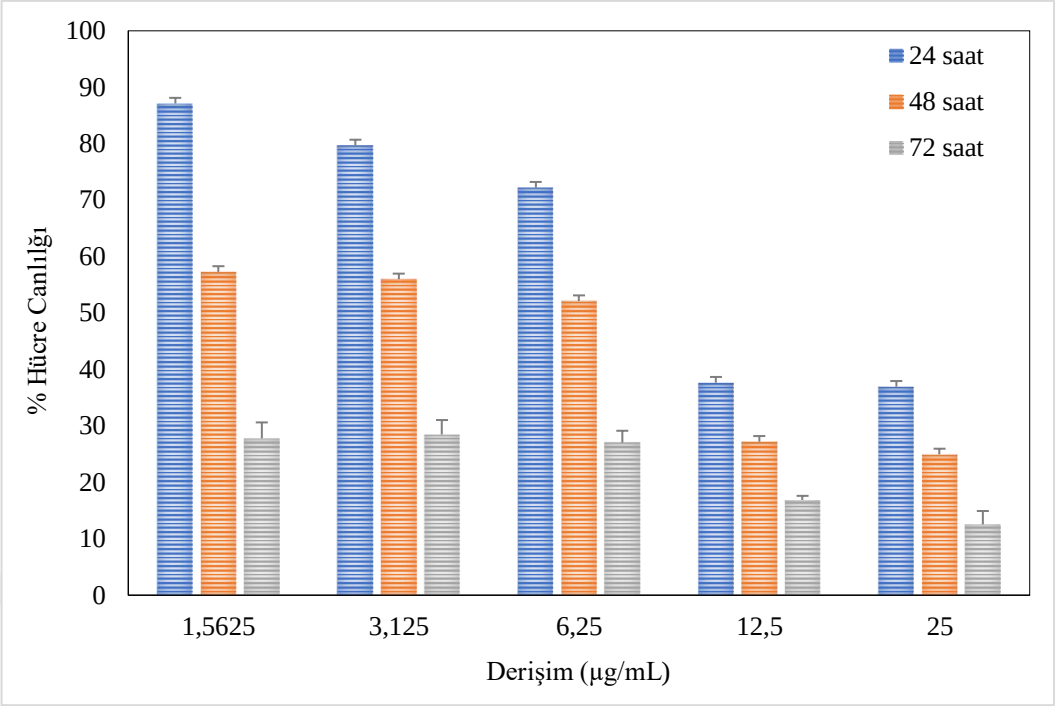
Elde edilen veriler doğrultusunda Fe_3O_4@β-CD'in MCF-7 hücre hattı üzerine süre artışına bağlı olarak etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Tüm sürelerde etki gösterdiği en iyi derişim 25 µg/ml olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.44 MCF-7 hücre hattında Fe_3O_4@β-CD'in 24., 48. ve 72. saatte derişime bağlı % canlılık değerleri

Şekil 4.45'te TPT'in MCF-7 hücre hattı üzerine farklı derişimlerde 24., 48. ve 72. saatteki etkileri incelendiğinde, 1,5625 µg/ml derişim ve 24. saat hücre canlılığı %87 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 24. saat hücre canlılığı %37 olarak ölçülmüştür. 1,5625 µg/ml derişim ve 48 saat sonra hücre canlılığı %57 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 48. saat hücre canlılığı %25 olarak ölçülmüştür. 1,5625 µg/ml derişim ve 72. saat hücre canlılığı %27 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 72. saat ise hücre canlılığı %12 olarak ölçülmüştür.

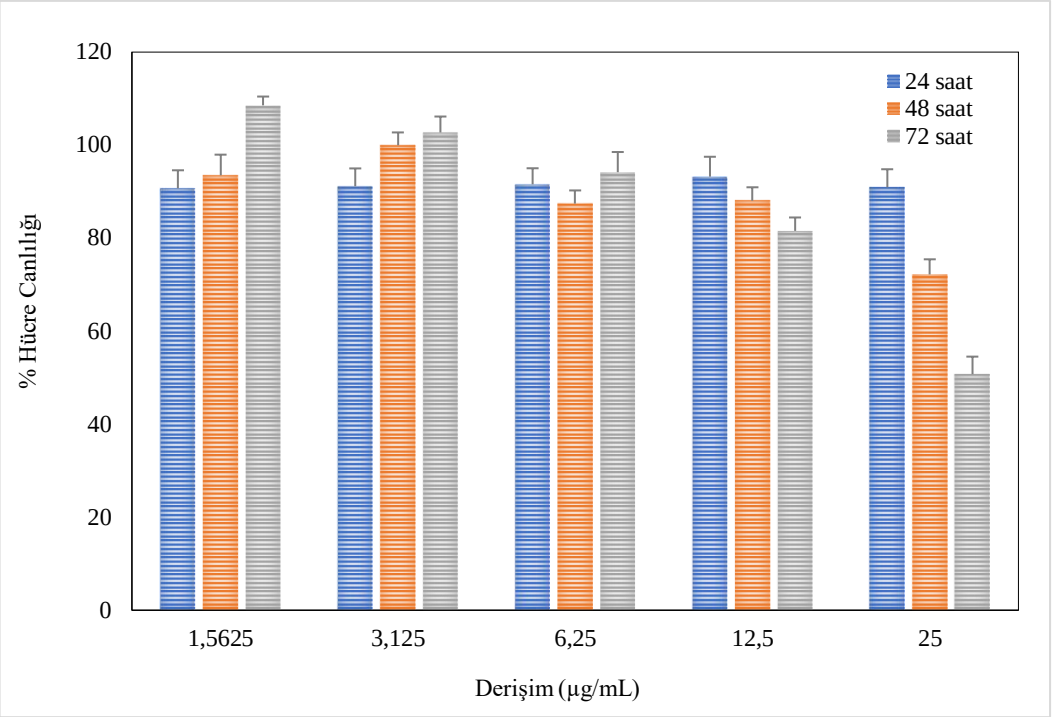
Elde edilen veriler doğrultusunda Fe_3O_4@β-CD'in MCF-7 hücre hattı üzerine süre artışına bağlı olarak etkisinin fazla olduğu 72. saat canlılığın değeri %30'un altında ölçüldüğünden tüm derişimlerde iyi sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.45 MCF-7 hücre hattında TPT'in 24., 48. ve 72. saatte derişime bağlı % canlılık değerleri

Şekil 4.46'da Fe_3O_4@β-CD-TPT'in MCF-7 hücre hattı üzerine farklı derişimlerde 24., 48. ve 72. saatteki etkileri incelendiğinde, 1,5625 µg/ml derişim ve 24. saat hücre canlılığı %91 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 24. saat hücre canlılığı %91 olarak ölçülmüştür. 1,5625 µg/ml derişim ve 48. saat hücre canlılığı %94 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 48. saat hücre canlılığı %72 olarak ölçülmüştür. 1,5625 µg/ml derişim ve 72. saat hücre canlılığı %108 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 72. saat ise hücre canlılığı %70 olarak ölçülmüştür.

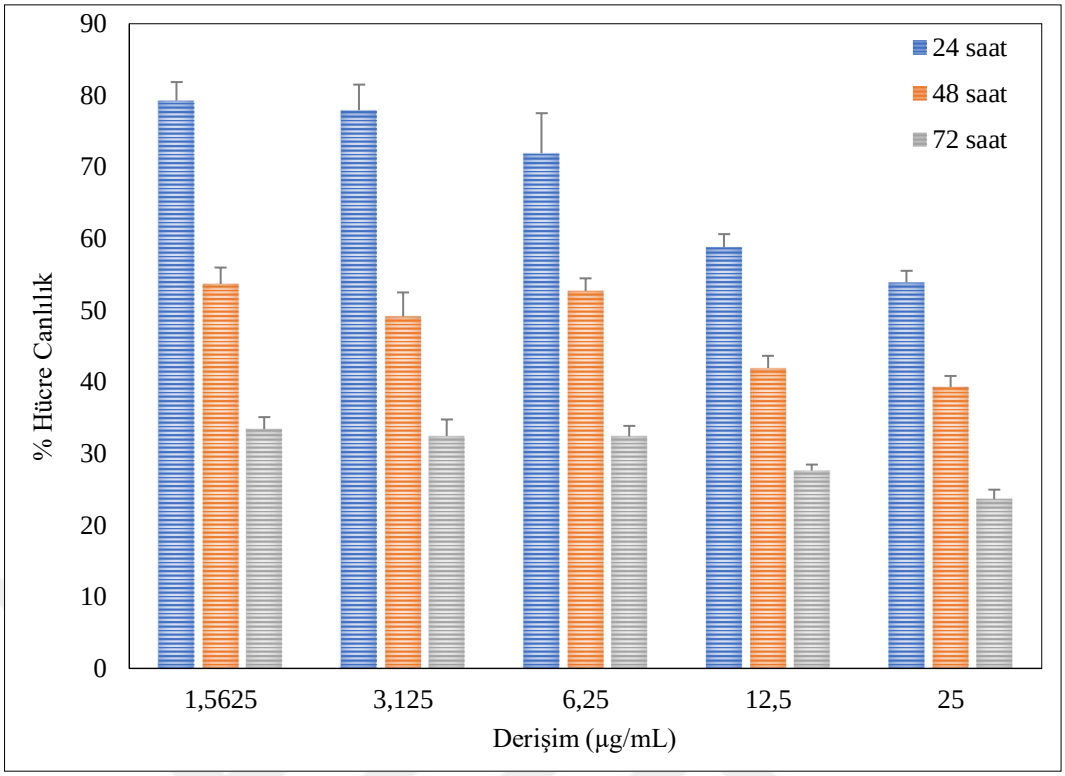
Elde edilen veriler doğrultusunda Fe_3O_4@β-CD-TPT'in MCF-7 hücre hattı üzerine süre artışına bağlı olarak etki gösterdiği gözlemlenmiştir. 25 µg/ml 'nin tüm sürelerde en iyi etkiyi gösteren derişim olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.46 MCF-7 hücre hattında Fe_3O_4@β-CD-TPT'in 24., 48. ve 72. saatte derişime bağlı % canlılık değerleri

Şekil 4.47'de Lipozom-TPT'in MCF-7 hücre hattı üzerine farklı derişimlerde 24., 48. ve 72. saatteki etkileri incelendiğinde, 1,5625 µg/ml derişim ve 24. saat hücre canlılığı %79 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 24. saat hücre canlılığı %53 olarak ölçülmüştür. 1,5625 µg/ml derişim ve 48. saat hücre canlılığı %54 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 48. saat hücre canlılığı %39 olarak ölçülmüştür. 1,5625 µg/ml derişim ve 72. saat hücre canlılığı %33 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 72. saat ise hücre canlılığı %23 olarak ölçülmüştür.

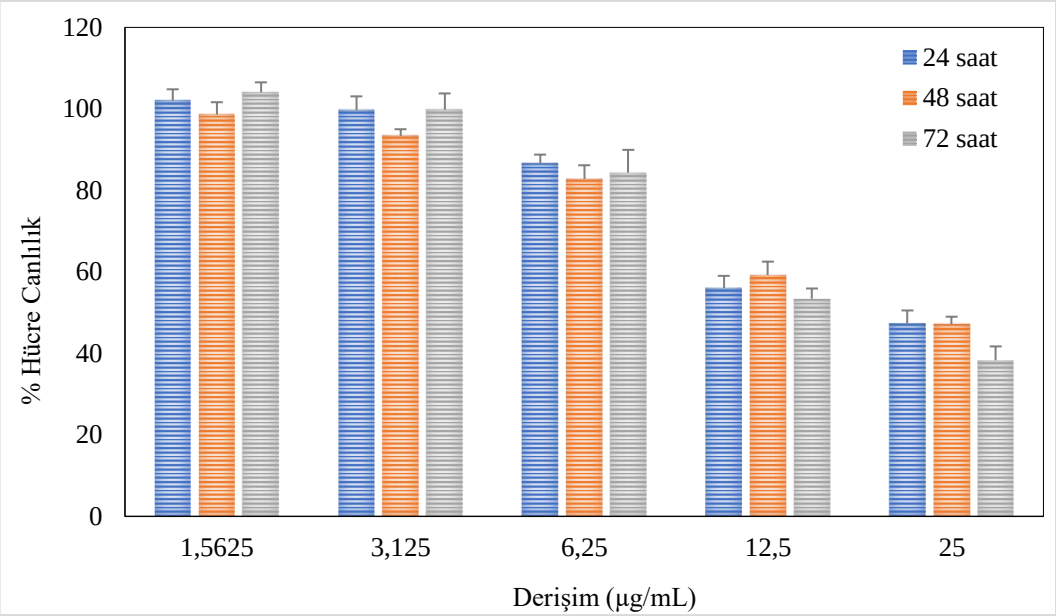
Elde edilen veriler doğrultusunda Lipozom-TPT'in MCF-7 hücre hattı üzerine süre artışına bağlı en iyi etkiyi canlılığın %30'un altında ölçülmesi sonrasında 72. saatte elde edildiği bulunmuştur.



Şekil 4.47 MCF-7 hücre hattında Lipozom-TPT'in 24., 48. ve 72. saatte derişime bağlı % canlılık değerleri

Şekil 4.48'de Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'in MCF-7 hücre hattı üzerine farklı derişimlerde 24., 48. ve 72. saatteki etkileri incelendiğinde, 1,5625 µg/ml derişim ve 24. saat hücre canlılığı %102 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 24. saat hücre canlılığı %47 olarak ölçülmüştür. 1,5625 µg/ml derişim ve 48. saat hücre canlılığı %99 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 48. saat hücre canlılığı %47 olarak ölçülmüştür. 1,5625 µg/ml derişim ve 72. saat hücre canlılığı %104 ölçülürken 25 µg/ml derişim ve 72. saat ise hücre canlılığı %38 olarak ölçülmüştür.

Elde edilen veriler doğrultusunda Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'in MCF-7 hücre hattı üzerine süre artışına bağlı olarak 72. saatte en iyi etkiyi gösterdiği ölçülmüştür.



Şekil 4.48 MCF-7 hücre hattında Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'in 24., 48. ve 72. saatte derişime bağlı % canlılık değerleri

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kanser, dünyada kalp hastalığından sonra ikinci en ölümcül hastalıktır. Kanserin bu kadar zorlu bir hastalık olmasının nedeni, mutasyona uğramış vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve tüm vücudunuza yayılıyor olmasıdır. Mevcut uygulanan yöntemler, kanserli hücreleri yok ederken sağlıklı hücreleri de yok etmektedir. Kemoterapi, hızlı büyüyen hücreleri yok eden kemoterapötik ajanların, vücuda zarar vermek için kan dolaşımına enjekte edildiği bir yöntemdir.

Topotekan (TPT), kamptotesinin suda çözünür bir türevi olup farklı kanser türlerinin tedavi edilmesinde ilgi gören güçlü bir antitümör ilacıdır. Bununla birlikte, bu ilacın klinik kullanımındaki en büyük dezavantajlarından biri, aktif olan lakton formun, fizyolojik pH'ta inaktif olan karboksilat forma dönüşmesidir. Bu sorunu aşmak için Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklar umut verici nano taşıyıcılardır. Bu tez çalışmasında TPT'nin, Fe_3O_4@β-CD'ler içine kapsüllenmesi ve ilacın aktif formunun korunabileceği, salınmasına izin veren tümör hücrelerine karşı seçicilik sağlaması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan Fe_3O_4@β-CD'ler, TPT'yi hidrolizden korumakta ve erken salınımını önlemekte, pH'a duyarlı bir katman görevi görmektedir. TPT ile yüklenmiş Fe_3O_4@β-CD (Fe_3O_4@β-CD-TPT), tümör hücrelerinde seçici içselleştirme için, mikrofajlar tarafından tanınmayı önleme böylece kanda daha uzun süre dolaşmak için, kılcal damarlar ve biyolojik zarlar yoluyla dokuların derinliklerine nüfuz etmek için, hücreler tarafından kolayca alınma böylece hedef bölgede terapötik etkinliğin artmasını sağlamak ve istenen alanda etkiyi uzun bir süre boyunca sürdürmek, kontrollü salımı ve hassas hedeflemeyi büyük ölçüde geliştirmek için lipozom ile kapsüllenmiştir.

Bu tez çalışmasında, Fe^{+2} ve Fe^{+3} tuzları kullanılarak birlikte çöktürme yöntemiyle manyetik demir oksit nanopartiküller sentezlenmiştir. Sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküller β-CD ile kaplanmıştır. Fe_3O_4@β-CD nanopartiküllere anti-kanser ilaç topotekan yüklenmiştir. İlaç yükleme ve salım koşulları optimize edilmiştir. Fe_3O_4@β-CD dozu, Topotekan derişimi ve süre çalışmaları yapılmıştır. İlaç yükleme çalışmaları pH 5,0, 5,5 ve 6,5'da ve 1-48 saat aralığında yapılmıştır. pH'ın artan değerlerine karşılık, tutunan TPT konsantrasyonu artış göstermiş fakat pH artışı ile beraber tutunmayan kısımda karboksilat formda da artma gözlenmiştir. Artan pH'a bağlı olarak, tutunan TPT'nin hepsi lakton form olmayıp, bir miktar karboksilat

formda da Fe_3O_4@β-CD'ye tutunmuştur. TPT'nin aktif lakton formunun pH 5'te en fazla korunması ve ayrıca tümörlü bölgenin asidik olması nedeniyle optimum TPT yükleme pH değeri 5 olarak belirlenmiştir.

50 mg Fe_3O_4@β-CD nanopartikül dozu ve 24 saat ilaç yükleme süresi optimize edilmiştir. Optimum TPT yükleme verimliliği farklı pH çalışmaları için %40-60 aralığında bulunmuştur. Fe_3O_4@β-CD-TPT ve TPT lipozomla kapsüllenmiştir. Sentezlenen malzemelerin görüntülenmeleri SEM, TEM ve optik mikroskop ile yapılmıştır. Tüm boş ve TPT yüklü Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklarının dar bir boyut dağılıma sahip, pürüzsüz ve tek biçimli küresel şekilli olduğu bulunmuştur. TEM görüntülerinden Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıklarının yaklaşık 15 nm boyutunda olduğu belirlenmiştir. Lipozom-TPT'nin TEM görüntüsünden, farklı şekil ve boyutlarda oluştuğu tespit edilmiştir. Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin TEM görüntüleri ise Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin lipozoma kapsüllendiğini ve parçacıkların homojen ve küresel olduğunu göstermektedir.

DLS, EDX, VSM, zeta potansiyel ve FTIR ile nano-malzemeler karakterize edilmiştir. FTIR analizleri ile Fe_3O_4@β-CD'nin başarılı bir şekilde sentezlendiği ve TPT'nin Fe_3O_4@β-CD'ye yüklendiği gösterilmiştir.

Fe_3O_4 ve Fe_3O_4@β-CD nanoparçacıkların başarılı bir şekilde sentezlendiği ve TPT'nin Fe_3O_4@β-CD'ye yüklendiği EDX analizi ile kanıtlanmış olup elde edilen sonuçların literatür ile uyum içinde olduğu gösterilmiştir.

Parçacık boyutu ve yüzey yükü, etkili bir ilaç taşınımına sahip olmak için odaklanılması gereken en önemli kriterler olarak kabul edilir. Lipozomun ve manyetik manopartiküllerin partikül boyutu, tümör dokularında anti-kanser ilaçlarının hedeflenmesinde hayati bir rol oynar. Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin zeta potansiyeli sonuçları hesaplanmış ve değerleri sırasıyla -6,27±0,202, +6,16±0,177, -9,47±0,225, -51,04±0,571 ve -21,36±0,351 mV olarak bulunmuştur. Bu nedenle hazırlanan nanolipozomal sistemlerin (Lipozom-TPT ve Lipozom@Fe_3O_4@β-CD-TPT) zeta potansiyel değerleri, sürdürülebilir nanolipozomal sistemler olduklarını göstermiştir. Fe_3O_4, Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, Lipozom-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-

CD-TPT'nin parçacık boyut dağılımı sırasıyla 91,24±0,227, 190,06±0,451, 164,21±0,325, 95,27±0,260 ve 141,76±0,252 nm olarak bulunmuştur.

Nanoyapıların etki bölgesini hedefleme, daha hızlı birikme ve tümör dokusuna daha derine nüfuz etme konusunda daha fazla yeteneğe sahiptirler. Tez çalışması kapsamında hazırlanan Fe_3O_4@β-CD ve Fe_3O_4@β-CD-TPT, Lipozom ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin aynı zamanda in vitro karakterizasyon çalışmaları da yapılmıştır. In vitro salım çalışmalarını destekleyici olması açısından laboratuvarda topotekan salım çalışmaları farklı sürelerde ve farklı pH aralıklarında yapılmıştır. β-CD yapısından dolayı Fe_3O_4@β-CD-TPT'nin salımı uzun sürmüştür. Kanser ilaçlarının uzun süre salım yapması istenilen bir durumdur. Laboratuvarda Fe_3O_4@β-CD-TPT ile yapılan UV-Vis spektrofotometrik olarak takibi yapılan ilaç salım çalışmalarında pH 5,5'te 120. saatte %22,92±0,37 ilaç salımı olmuştur. MCF-7 hücre hatları ile yapılan in vitro hücre çalışmalarında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sitotoksisite çalışmalarında, gecikmeli salım profili, uzun dolaşım süresi ve gelişmiş hücre içi alım nedeniyle, hedef nano-malzemelerimiz olan Fe_3O_4@β-CD-TPT ve Lipozom-Fe_3O_4@β-CD-TPT meme kanseri hücrelerinde yüksek antitümör etkinliği göstermiştir. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar ile lipozomal manyetik siklodekstrin nanopartiküllerin potansiyel kemoterapötik uygulamalar için kontrollü topotekan taşınımı için potansiyel olarak kullanılabileceği fikrini desteklemektedir.

KAYNAKLAR

Adane, E. D. (2010). *Lactone-carboxylate interconversion as a determinant of the clearance and oral bioavailabilty of the lipophilic camptothecin analog AR-67*. University of Kentucky.

Ahadi, N., Bodaghifard, M. A., & Mobinikhaledi, A. (2019). Cu (II)-β-cyclodextrin complex stabilized on magnetic nanoparticles: A retrievable hybrid promoter for green synthesis of spiropyrans. *Applied Organometallic Chemistry*, 33(2), e4738.

Akasaka, H., Endo, T., Nagase, H., Ueda, H., & Kobayashı, S. (2000). Complex formation of cyclomaltononaose δ-cyclodextrin (δ-CD) with macrocyclic compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(12), 1986-1989.

Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., & Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 1-9.

Alavi, M., & Hamidi, M. (2019). Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug Metabolism and Personalized Therapy*, 34(1).

Al-Derbali, M. A. (2016). *Formulation and evaluation of zidovudine cyclodextrin inclusion complex to enhance acid lability and palatability*.

Ali, S., Amin, M. U., Ali, M. Y., Tariq, I., Pinnapireddy, S. R., Duse, L., Bakowsky, U. (2020). Wavelength dependent photo-cytotoxicity to ovarian carcinoma cells using temoporfin loaded tetraether liposomes as efficient drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 150, 50-65.

Aljuffali, I. A., Mock, J. N., Costyn, L. J., Nguyen, H., Nagy, T., Cummings, B. S., & Arnold, R. D. (2011). Enhanced antitumor activity of low-dose continuous administration schedules of topotecan in prostate cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 12(5), 407-420.

Alonjang, E. N. (2018). *Active encapsulation of diclofenac sodium into liposomes for ophthalmic preparations*.

Alqaheem, Y., & Alomair, A. A. (2020). Microscopy and spectroscopy techniques for characterization of polymeric membranes. *Membranes*, 10(2), 33.

Andhale, V. A., Patil, P. R., Dhas, A. U., Chauhan, P. D., & Desai, S. V. (2016). Liposome: An emerging tool in drug carrier system. *International Journal of Pharmacy and Technology*, 8, 10982-11011.

Andima, M. (2020). *Natural product-loaded nanoparticles for cancer therapy-formulation, characterization, in silico and cellular studies* (Doctoral dissertation, University of Nairobi).

Anirudhan, T. S., Divya, P. L., & Nima, J. (2015). Synthesis and characterization of silane coated magnetic nanoparticles/glycidylmethacrylate-grafted-maleated cyclodextrin composite hydrogel as a drug carrier for the controlled delivery of 5-fluorouracil. *Materials Science and Engineering: C*, 55, 471-481.

Ansari, R., & Mannan, A. (2017). Liposomes as a novel drug delivery system. *International Journal of Pharmacy and Technology*, 9, 29735-29758.

Arbab, A. S., Liu, W., & Frank, J. A. (2006). Cellular magnetic resonance imaging: current status and future prospects. *Expert Review of Medical Devices*, 3(4), 427-439.

Armitage, P., & Doll, R. (2004). The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 91(12), 1983-1989.

Ashfaq, U. A., Riaz, M., Yasmeen, E., & Yousaf, M. Z. (2017). Recent advances in nanoparticle-based targeted drug-delivery systems against cancer and role of tumor microenvironment. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 34(4).

Ashtikar, M., Nagarsekar, K. & Fahr, A. (2016). Transdermal delivery form liposomal formulations – evolution of the technology over the last three decades. *Journal of Controlled Release*, 242:126-140.

Astruc, D. (2015). Introduction to nanomedicine. *Molecules*, 21(1), 4.

Aşık, M. D., Uğurlu, N., Yülek, F., Tuncer, S., Türk, Mustafa., Denkbaş, E. B. (2013). Ketorolac tromethamine loaded chitosan nanoparticles as a nanotherapeutic system for ocular diseases. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 41(1), 81-86.

Attia, M. F., Anton, N., Wallyn, J., Omran, Z., & Vandamme, T. F. (2019). An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(8), 1185-1198.

Badruddoza, A. Z. M. (2011). *Beta-cyclodextrin conjugated magnetic nanoparticles for bio-and environmental applications*.

Badruddoza, A. Z. M., Rahman, M. T., Ghosh, S., Hossain, M. Z., Shi, J., Hidajat, K., & Uddin, M. S. (2013). β-Cyclodextrin conjugated magnetic, fluorescent silica core–shell nanoparticles for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 449-457.

Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238-252.

Bao, G., Mitragotri, S., & Tong, S. (2013). Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 15, 253.

Batzri, S., & Korn, E. D. (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 298(4), 1015-1019.

Bazak, R., Houri, M., El Achy, S., Kamel, S., & Refaat, T. (2015). Cancer active targeting by nanoparticles: a comprehensive review of literature. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(5), 769-784.

Beaglehole, R., Bonita, R., & Magnusson, R. (2011). Global cancer prevention: an important pathway to global health and development. *Public Health*, 125(12), 821-831.

Bellerive, C., & Singh, A. D. (2019). Cancer Staging. *In Clinical Ophthalmic Oncology* (pp. 87-91). Springer, Cham.

Bello, M., Fragoso-Vuez, J., & Correa-Basurto, J. (2017). Theoretical studies for dendrimer-based drug delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 23(21), 3048-3061.

Bertolla, C. (2010*). Monofunctionalizations of beta-cyclodextrin, conjugation with recognition patterns, and biological evaluation.*

Birhade, S. T., Bankar, V. H., Gaikwad, P. D., & Pawar, S. P. (2010). Preparation and evaluation of cyclodextrin based binary systems for taste masking. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2(3), 199-203.

Biswas, S., & Torchilin, V. P. (2014). Nanopreparations for organelle-specific delivery in cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 26-41.

Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 975.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.

Briuglia, M. L., Rotella, C., McFarlane, A., & Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, 5(3), 231-242.

Broom, C. (1996). *Clinical studies of topotecan*. Annals of the New York Academy of Sciences, 803(1), 264-271.

Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71.

Buzun, K., Bielawska, A., Bielawski, K., & Gornowicz, A. (2020). DNA topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 1781-1799.

Byrne, J. D., Betancourt, T., & Brannon-Peppas, L. (2008). Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1615-1626.

Caritá, A. C., Eloy, J. O., Chorilli, M., Lee, R. J., & Leonardi, G. R. (2018). Recent advances and perspectives in liposomes for cutaneous drug delivery. *Current Medicinal Chemistry*, 25(5), 606-635.

Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249-257.

Chaudhari, A. (2005). *Formulation and characterization of liposomal formulations containing clindamycin* (Doctoral dissertation).

Chauhan, T., Arora, S., Parashar, B., & Chandel, A. (2012). Liposome drug delivery: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Chemistry*, 3, 754-764.

Chen, Y. Z., Huang, Y. K., Chen, Y., Ye, Y. J., Lou, K. Y., & Gao, F. (2015). Novel nanoparticles composed of chitosan and β-cyclodextrin derivatives as potential insoluble drug carrier. *Chinese Chemical Letters*, 26(7), 909-913.

Chen, Z. J., Zhang, Z., Xie, B. B., & Zhang, H. Y. (2016). Development and evaluation of topotecan loaded solid lipid nanoparticles: A study in cervical cancer cell lines. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 165, 182-188.

Cheung, C. (2020). *Preparation of multifunctional nanoparticles using microfluidics* (Doctoral dissertation, Queen's University Belfast).

Clergeaud Veiga, G. (2014). *Liposomes as versatile tools: nanoreactors, membrane models and drug delivery carriers* (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili).

Coleman, M. P. (2014). Cancer survival: global surveillance will stimulate health policy and improve equity. *The Lancet*, 383(9916), 564-573.

Conde, J., Dias, J. T., Grazú, V., Moros, M., Baptista, P. V., & de la Fuente, J. M. (2014). Revisiting 30 years of biofunctionalization and surface chemistry of inorganic nanoparticles for nanomedicine. *Frontiers in Chemistry*, 2, 48.

Cruz, L. C., Perez, C. M., Romero, H. M., & Casillas, P. G. (2008). Synthesis of magnetite nanoparticles–β-cyclodextrin complex. *Journal of Alloys and Compounds*, 466(1-2), 330-334.

Çağdaş, M., Sezer, A. D., & Bucak, S. (2014). Liposomes as potential drug carrier systems for drug delivery. *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, 1, 1-50.

da Conceição, J. M. G. M. (2020). *Cyclodextrins as excipients in solid oral dosage forms*.

Danhier, F., Feron, O., & Préat, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 148(2), 135-146.

de Oliveira, L. F., Bouchmella, K., Goncalves, K. D. A., Bettini, J., Kobarg, J., & Cardoso, M. B. (2016). Functionalized silica nanoparticles as an alternative platform for targeted drug-delivery of water insoluble drugs. *Langmuir*, 32(13), 3217-3225.

Deamer, D., & Bangham, A. D. (1976). Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 443(3), 629-634.

Del Valle, E. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033-1046.

Demchenko, A. P. (2020). Introduction to fluorescence sensing: Volume 1: *Materials and Devices* (Vol. 1). Springer Nature.

Donten-Bury, M. (2018). Application of SEM-FIB and TEM/STEM techniqes for characterization of materials. *In Materials Science and Condensed Matter Physics* (pp. 49-49).

Douziech-Eyrolles, L., Marchais, H., Hervé, K., Munnier, E., Souce, M., Linassier, C., Chourpa, I. (2007). Nanovectors for anticancer agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 2(4), 541.

Du, C., Li, S., Li, Y., Galons, H., Guo, N., Teng, Y., ... & Yu, P. (2020). F7 and topotecan co-loaded thermosensitive liposome as a nano-drug delivery system for tumor hyperthermia. *Drug delivery*, 27(1), 836-847.

Dua, J. S., Rana, A. C., & Bhandari, A. K. (2012). Liposome: methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(2), 14-20.

Dwiastuti, R., Noegrohati, S., Istyastono, E. P., & Marchaban. (2016). Formulation and physical properties observations of soy lecithin liposome containing 4-n-butylresorcinol. *In AIP Conference Proceedings* (Vol. 1755, No. 1, p. 160005). AIP Publishing LLC.

Dwivedi, C., Sivna, P. L., Rane, S., Yadav, R., Rao, S. P., Kumar, B., Sinha, D. (2015). Liposome: A powerful approach for vesicular drug delivery system. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4, 1110-1141.

Elhissi, A. M., Karnam, K. K., Danesh-Azari, M. R., Gill, H. S., & Taylor, K. M. (2006). Formulations generated from ethanol-based proliposomes for delivery via medical nebulizers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58(7), 887-894.

Emara, L. H., Badr, R. M., & Abd Elbary, A. (2002). Improving the dissolution and bioavailability of nifedipine using solid dispersions and solubilizers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(7), 795-807.

Evrard, B., Chiap, P., DeTullio, P., Ghalmi, F., Piel, G., Van Hees, T., Delattre, L. (2002). Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl-β-cyclodextrin. *Journal of Controlled Release*, 85(1-3), 45-50.

Fang, J., Nakamura, H., & Maeda, H. (2011). The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 136-151.

Farooq, A. (2019). *Doxorubicin-encapsulated Albumin liposomes with acoustic triggering for cancer treatment* (Doctoral dissertation).

Fay, F., & Scott, C. J. (2011). Antibody-targeted nanoparticles for cancer therapy.

Immunotherapy, 3(3), 381-394.

Ferris, D. P., Lu, J., Gothard, C., Yanes, R., Thomas, C. R., Olsen, J. C., & Zink, J. I. (2011). Synthesis of biomolecule-modified mesoporous silica nanoparticles for targeted hydrophobic drug delivery to cancer cells. *Small*, 7(13), 1816-1826.

Fleige, E., Quadir, M. A., & Haag, R. (2012). Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(9), 866-884.

Foner, S. (1959). Versatile and sensitive vibrating-sample magnetometer. *Review of Scientific Instruments*, 30(7), 548-557.

Frisk, J., Källström, A. C., Wall, N., Fredrikson, M., & Hammar, M. (2012). Acupuncture improves health-related quality-of-life (HRQoL) and sleep in women with breast cancer and hot flushes. *Supportive Care in Cancer*, 20(4), 715-724.

Gebauer, J., Higham, C., Langer, T., Denzer, C., & Brabant, G. (2019). Long-term endocrine and metabolic consequences of cancer treatment: a systematic review. *Endocrine Reviews*, 40(3), 711-767.

Gharib, R., Greige-Gerges, H., Fourmentin, S., Charcosset, C., & Auezova, L. (2015). Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. *Carbohydrate Polymers*, 129, 175-186.

Gidwani, B., & Vyas, A. (2015). A comprehensive review on cyclodextrin-based carriers for delivery of chemotherapeutic cytotoxic anticancer drugs. *BioMed Research International*, 2015.

Ginsburg, O., Badwe, R., Boyle, P., Derricks, G., Dare, A., Evans, T., Sullivan, R. (2017). Changing global policy to deliver safe, equitable, and affordable care for women's cancers. *The Lancet*, 389(10071), 871-880.

Gogoi, A., Navgire, M., Sarma, K. C., & Gogoi, P. (2019). Highly efficient heterogeneous Fenton activities of magnetic β-cyclodextrin (Fe) framework for Eriochrome black T degradation. *Materials Chemistry and Physics*, 231, 233-243.

Gogoi, M., Kumar, N., & Patra, S. (2016). Multifunctional magnetic liposomes for cancer imaging and therapeutic applications. *Nanoarchitectonics Smart Delivery Drug Targeting*,743-782.

Gorospe, A. E. B., Buenviaje, S. C., Edañol, Y. D. G., Cervera, R. B. M., & Payawan, L. M. (2019). One-step co-precipitation synthesis of water-stable poly (ethylene glycol)-coated magnetite nanoparticles. *In Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1191, No. 1, p. 012059). IOP Publishing.

Grahn, A. Y., Bankiewicz, K. S., Dugich-Djordjevic, M., Bringas, J. R., Hadaczek, P., Johnson, G. A., Luz, M. (2009). Non-PEGylated liposomes for convection-enhanced delivery of topotecan and gadodiamide in malignant glioma: initial experience. *Journal of Neuro-Oncology*, 95(2), 185-197.

Greene, F. L., Balch, C. M., Fleming, I. D., Fritz, A., Haller, D. G., Morrow, M., & Page, D. L. (Eds.). (2002*). AJCC cancer staging handbook: TNM classification of malignant tumors*. Springer Science & Business Media.

Grumezescu, A. M. (Ed.). (2019). *Biomedical applications of nanoparticles*. William Andrew.

Guimarães, D. I. P. (2021). *Development of liposomal formulations for therapeutic applications*.

Güven, H. (2019). *Design and preparation of alkali liposomes for drug delivery* (Master's thesis, Izmir Institute of Technology).

Hao, Y. L., Deng, Y. J., Chen, Y., Wang, X. M., Zhong, H. J., & Suo, X. B. (2005). In Vitro and In Vivo Studies of Different Liposomes Containing Topotecan. *Archives of Pharmacal Research*, 28(5), 626-635.

Haran, D. H., Kumar, M. A., Dinesh, S., Mohan, M., Sujith, A. N., Raghunath, G., Dey, S. (2011). Preparation of Amphiphilic B-Cyclodextrin Nanoparticles by Solvent Evaporation Method Influence of the Surfactant on Preparation and Hydrophobic Drug Loading. *Drug Invention Today*, 3(9).

Hardiansyah, A., Yang, M. C., Liu, T. Y., Kuo, C. Y., Huang, L. Y., Chan, T. Y. (2017). Hydrophobic drug-loaded PEGylated magnetic liposomes for drug-controlled release. *Nanoscale Research Letters*, 12(1), 1-11.

Harris, T. J., Green, J. J., Fung, P. W., Langer, R., Anderson, D. G., & Bhatia, S. N. (2010). Tissue-specific gene delivery via nanoparticle coating. *Biomaterials*, 31(5), 998-1006.

He, H., Chen, S., Zhou, J., Dou, Y., Song, L., Che, L., Li, X. (2013). Cyclodextrin-derived pH-responsive nanoparticles for delivery of paclitaxel. *Biomaterials*, 34(21), 5344-5358.

Hedges, A. R. (1998). Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*, 98, 2035-2044.

Heller, A., Brockhoff, G., & Goepferich, A. (2012). Targeting drugs to mitochondria. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(1), 1-18.

Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J., & Hecht, S. M. (1989). On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry*, 28(11), 4629-4638.

Higgins, C., & Hodges, C. (1941). The effects of castration, of estrogen and of androgen injection of serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate: Studies of prostate cancer. *Cancer Research*, 1, 293-297.

Hiller, J., Vallejo, C., Betthauser, L., & Keesling, J. (2017). Characteristic patterns of cancer incidence: Epidemiological data, biological theories, and multistage models. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 124, 41-48.

Himri, I., Guaadaoui, A. (2018). Cell and organ drug targeting: Types of drug delivery

systems and advanced targeting strategies. *In Nanostructures for the engineering of cells, tissues and organs* (pp. 1-66). William Andrew Publishing.

Hirsjarvi, S., Passirani, C., & Benoit, J. P. (2011). Passive and active tumour targeting with nanocarriers. *Current Drug Discovery Technologies*, 8(3), 188-196.

Hoppe, S. M., Sasaki, D. Y., Kinghorn, A. N., & Hattar, K. (2013). In-situ transmission electron microscopy of liposomes in an aqueous environment. *Langmuir*, 29(32), 9958-9961.

Hörmann, V., Kumi-Diaka, J., Durity, M., & Rathinavelu, A. (2012). Anticancer activities of genistein-topotecan combination in prostate cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(11), 2631-2636.

Hsiang, Y. H., & Liu, L. F. (1988). Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Research*, 48(7), 1722-1726.

Hsiang, Y. H., Hertzberg, R., Hecht, S., & Liu, L. F. (1985). Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *Journal of Biological Chemistry*, 260(27), 14873-14878.

Hsiang, Y. H., Lihou, M. G., & Liu, L. F. (1989). Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. *Cancer Research*, 49(18), 5077-5082.

Huang, S. Y. N., Williams, J. S., Arana, M. E., Kunkel, T. A., & Pommier, Y. (2017). Topoisomerase I-mediated cleavage at unrepaired ribonucleotides generates DNA double-strand breaks. The EMBO journal, 36(3), 361-373.

Huang, X., Yi, C., Fan, Y., Zhang, Y., Zhao, L., Liang, Z., & Pan, J. (2014). Magnetic Fe_3O_4 nanoparticles grafted with single-chain antibody (scFv) and docetaxel loaded β-cyclodextrin potential for ovarian cancer dual-targeting therapy. *Materials Science and Engineering: C*, 42, 325-332.

Hussein, N. R. (2014). *Bioadhesive microparticles and liposomes of anti-Parkinson drugs for nasal delivery* (Doctoral dissertation, University of Central Lancashire).

Jadhav, S.A. & Patil, S.V. 2014. Facile synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles and their characterization. *Frontiers of Materials Science*, 8(2):193-198.

Jain, A., & Jain, S. K. (2016). Multipronged, strategic delivery of paclitaxel-topotecan using engineered liposomes to ovarian cancer. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(1), 136-149.

Jain, M. L. (2012). *Development of liposome drug delivery systems for anti-glioma therapy* (Doctoral dissertation, University of Central Lancashire).

Jaxel, C., Kohn, K. W., Wani, M. C., Wall, M. E., & Pommier, Y. (1989). Structure-activity study of the actions of camptothecin derivatives on mammalian topoisomerase I: evidence for a specific receptor site and a relation to antitumor activity. *Cancer Research*, 49(6), 1465-1469.

Jayaraman, M., Dutta, P., Telang, J., & Krishnan BB, S. (2021). Nanoparticles for cancer therapy. *In Nanomedicine for Cancer Diagnosis and Therapy* (pp. 1-45). Springer, Singapore.

Jayawardana, K. W., Jyotsana, N., Zhang, Z., & King, M. R. (2018). Loading of piperlongumine to liposomes after complexation with ß-cyclodextrin and its effect on viability of colon and prostate cancer cells. *bioRxiv*, 314161.

Jayeshkumar, S. M., Yashvi, P., Bhimani, B., Patel, G., Patel, J., & Patel, U. (2019). Nebulization therapy for lung cancer. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(2), 920-934.

Jhaveri, A., Deshpande, P., Pattni, B., & Torchilin, V. (2018). Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma. *Journal of Controlled Release*, 277, 89-101.

Jin, Y., Liang, X., An, Y., Dai, Z. (2016). Microwave-triggered smart drug release from liposomes co-encapsulating doxorubicin and salt for local combined hyperthermia and chemotherapy of cancer. *Bioconjugate Chemistry*, 27(12), 2931-2942.

Johnsen, K. B., Gudbergsson, J. M., Duroux, M., Moos, T., Andresen, T. L., & Simonsen, J. B. (2018). On the use of liposome controls in studies investigating the clinical potential of extracellular vesicle-based drug delivery systems–A commentary. *Journal of Controlled Release*, 269, 10-14.

Kachare, D., Pawar, R. K., Ghadge, P. K., & Mali, S. S. (2020). Liposome as carrier for cancer treatment: a review. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*.

Kavya, J., Amsaveni, G., Yasmin, H., Murugesan, R., & Girigoswami, A. (2014). Gene expression profile induced by liposomal nanoformulation of anticancer agents: insight into cell death mechanism. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 6(2), 159-165.

Khodabandehloo, H., Zahednasab, H., & Hafez, A. A. (2016). Nanocarriers usage for drug delivery in cancer therapy. *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 9(2).

Khuriwal, N., & Mishra, N. (2018). Breast cancer diagnosis using adaptive voting ensemble machine learning algorithm. *In 2018 IEEMA Engineer Infinite Conference* (eTechNxT) (pp. 1-5). IEEE.

Kim, S., Kim, D. J., Geyer, M. A., & Howell, S. B. (1987). Multivesicular liposomes containing 1-β-D-arabinofuranosylcytosine for slow-release intrathecal therapy. *Cancer Research*, 47(15), 3935-3937.

Kim, S., Turker, M. S., Chi, E. Y., Sela, S., & Martin, G. M. (1983). Preparation of multivesicular liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 728(3), 339-348.

Kirby, C., & Gregoriadis, G. (1984). Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Bio/Technology*, 2(11), 979-984.

Kraft, J. C., Freeling, J. P., Wang, Z., & Ho, R. J. (2014). Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(1), 29-52.

Kraus, M., & Wolf, B. (1996). Implications of acidic tumor microenvironment for neoplastic growth and cancer treatment: a computer analysis. *Tumor Biology*, 17(3), 133-154.

Krishnan, P., Rajan, M., Kumari, S., Sakinah, S., Priya, S. P., Amira, F., Higuchi, A. (2017). Efficiency of newly formulated camptothecin with β-cyclodextrin-EDTA-Fe_3O_4 nanoparticle-conjugated nanocarriers as an anti-colon cancer (HT29) drug. *Scientific Reports*, 7(1), 10962.

Krukemeyer, M. G., Krenn, V., Huebner, F., Wagner, W., & Resch, R. (2015). History and possible uses of nanomedicine based on nanoparticles and nanotechnological progress. *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 6(6), 336.

Kumar, M., Singh, A., Pandey, S., Siddiqui, M. A., & Kumar, N. (2021). Liposomes: type, preapration and evaluation. *International Journal of Indigenous Herbs and Drugs*, 17-22.

Kuo, C. Y., Liu, T. Y., Chan, T. Y., Tsai, S. C., Hardiansyah, A., Huang, L. Y., Chiu, W. Y. (2016). Magnetically triggered nanovehicles for controlled drug release as a colorectal cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 140, 567-573.

Lagadic-Gossmann, D., Huc, L., & Lecureur, V. (2004). Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death & Differentiation*, 11(9), 953-961.

Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E., & Storm, G. (2012). Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 175-187.

Lardner, A. (2001). The effects of extracellular pH on immune function. *Journal of Leukocyte Biology*, 69(4), 522-530.

Lees, B., Hampton, J. M., Trentham-Dietz, A., Newcomb, P., & Spencer, R. (2021). A population-based study of causes of death after endometrial cancer according to major risk factors. *Gynecologic Oncology*, 160(3), 655-659.

Li, G., Li, H., Li, Y., Chen, X., Li, X., Wang, L., Zhou, Y. (2022). Stabilization/solidification of heavy metals and phe contaminated soil with β-cyclodextrin modified biochar (β-cd-bc) and portland cement. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3), 1060.

Li, M., Shi, F., Fei, X., Wu, S., Wu, D., Pan, M., Dou, J. (2017). PEGylated long-circulating liposomes deliver homoharringtonine to suppress multiple myeloma cancer stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 242(9), 996-1004.

Li, W. (2014). *Stimuli-Responsive Liposomes for Controlled Drug Delivery* (Doctoral dissertation).

Lim, E. K., Chung, B. H., & Chung, S. J. (2018). Recent advances in pH-sensitive polymeric nanoparticles for smart drug delivery in cancer therapy. *Current Drug Targets*, 19(4), 300-317.

Lim, E. K., Jang, E., Lee, K., Haam, S., & Huh, Y. M. (2013). Delivery of cancer therapeutics using nanotechnology. *Pharmaceutics*, 5(2), 294-317.

Lin, E. Y., Chen, Y. S., Li, Y. S., Chen, S. R., Lee, C. H., Huang, M. H., ... & Chiou, T. W. (2020). Liposome consolidated with cyclodextrin provides prolonged drug retention resulting in increased drug bioavailability in brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4408.

Liong, M., Lu, J., Kovochich, M., Xia, T., Ruehm, S. G., Nel, A. E., Zink, J. I. (2008). Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano*, 2(5), 889-896.

Liu, D. Z., Chen, W. Y., Tasi, L. M., & Yang, S. P. (2000). Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. *Colloids and* Surfaces *A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 172(1-3), 57-67.

Liu, Y., Jiang, W., Li, S., & Li, F. (2009). Electrostatic self-assembly of Fe_3O_4 nanoparticles on carbon nanotubes. *Applied Surface Science*, 255(18), 7999-8002.

Liu, Y., Li, W., Lao, F., Liu, Y., Wang, L., Bai, R., Chen, C. (2011). Intracellular dynamics of cationic and anionic polystyrene nanoparticles without direct interaction with mitotic spindle and chromosomes. *Biomaterial*s, 32(32), 8291-8303.

Loftsson, T., & Brewster, M. E. (1996). Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(10), 1017-1025.

Lupidi, G. (2016) *New synthetic approach to 1,4-asymmetrically functionalized β-cyclodextrins as drug carriers and receptor mimics via amino acids dipeptides analogues*.

Maeda, H. (2001). The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vascularture: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in Enzyme Regulation*, 41, 1898-207.

Maherani, B., Arab-Tehrany, E., R Mozafari, M., Gaiani, C., & Linder, M. (2011). Liposomes: a review of manufacturing techniques and targeting strategies. *Current Nanoscience*, 7(3), 436-452.

Mahmood, A., & Srivastava, R. (2022). Etiology of cancer. *In Understanding Cancer* (pp. 37-62). Academic Press.

Mahon, E., Salvati, A., Bombelli, F. B., Lynch, I., & Dawson, K. A. (2012). Designing the nanoparticle–biomolecule interface for "targeting and therapeutic delivery". *Journal of Controlled Release*, 161(2), 164-174.

Mahpishanian, S., & Sereshti, H. (2017). One-step green synthesis of β-cyclodextrin/iron oxide-reduced graphene oxide nanocomposite with high supramolecular recognition capability: Application for vortex-assisted magnetic solid phase extraction of organochlorine pesticides residue from honey samples. *Journal of Chromatography A*, 1485, 32-43.

Malik, A., Afaq, S., & Tarique, M. (Eds.). (2021). *Nanomedicine for cancer diagnosis and therapy*. Springer Singapore.

Marqués-Gallego, P., & de Kroon, A. I. (2014). Ligation strategies for targeting liposomal nanocarriers. *BioMed Research International*, 2014.

Martínez-Carmona, M., Lozano, D., Colilla, M., & Vallet-Regí, M. (2016). Selective topotecan delivery to cancer cells by targeted pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles. *RSC Advances*, 6(56), 50923-50932.

Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research*, 46(12 Part 1), 6387-6392.

Mehmood, R., Rashid, F., & Mansoor, Z. (2020). Thermosensitive Liposome Formulation With Topotecan And Doxorubicin As Drug Payload For Delivery Coupled With High Intensity Focused Ultrasound. *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics*, 9(199), 2.

Meure, L. A., Foster, N. R., & Dehghani, F. (2008). Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. *Aaps Pharmscitech*, 9(3), 798-809.

Mi, Z., Malak, H., & Burke, T. G. (1995). Reduced albumin binding promotes the stability and activity of topotecan in human blood. *Biochemistry*, 34(42), 13722-13728.

Minko, T., Dharap, S. S., Pakunlu, R. I., & Wang, Y. (2004). Molecular targeting of drug delivery systems to cancer. *Current Drug Targets*, 5(4), 389-406.

Mishra, N., Yadav, N. P., Rai, V. K., Sinha, P., Yadav, K. S., Jain, S., & Arora, S. (2013). Efficient hepatic delivery of drugs: novel strategies and their significance. BioMed Research International, 2013.

Mohammed, A. R., Weston, N., Coombes, A. G. A., Fitzgerald, M., & Perrie, Y. (2004). Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 285(1-2), 23-34.

Monisha, J., Manimaran, V., & Damodharan, N. (2018). Liposomes as targeted drug delivery system: A review. *Drug Invention Today*, 10.

Monteiro, A. P., Caminhas, L. D., Ardisson, J. D., Paniago, R., Cortés, M. E., & Sinisterra, R. D. (2017). Magnetic nanoparticles coated with cyclodextrins and citrate for irinotecan delivery. *Carbohydrate Polymers*, 163, 1-9.

Morachis, J. M., Mahmoud, E. A., & Almutairi, A. (2012). Physical and chemical

strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 505-519.

Mozafari, M. R. (Ed.). (2007). *Nanomaterials and nanosystems for biomedical applications*. Springer Science & Business Media.

Mozafari, R. M. (2005). *Nanoliposomes: from fundamentals to recent developments*. Trafford.

Mu, L. M., Ju, R. J., Liu, R., Bu, Y. Z., Zhang, J. Y., Li, X. Q., Lu, W. L. (2017). Dual-functional drug liposomes in treatment of resistant cancers. Advanced *Drug Delivery Reviews*, 115, 46-56.

Muhammad, Z. (2011). *Magnetism and thermal stability of thin films of diluted ferromagnetic alloys with variable Curie temperature*.

Mura, S., Nicolas, J., & Couvreur, P. (2013). Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*, 12(11), 991-1003.

Muro, S. (2012). Challenges in design and characterization of ligand-targeted drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 164(2), 125-137.

Nkanga, C. I., Bapolisi, A. M., Okafor, N. I., & Krause, R. W. M. (2019). General perception of liposomes: formation, manufacturing and applications. *Liposomes-Advances and Perspectives*.

Noble, G. T., Stefanick, J. F., Ashley, J. D., Kiziltepe, T., & Bilgicer, B. (2014). Ligand-targeted liposome design: challenges and fundamental considerations. *Trends in Biotechnology*, 32(1), 32-45.

Nordling, C. (1953). A new theory on the cancer-inducing mechanism. *British Journal of Cancer*, 7(1), 68.

Nouri, Y. M., Kim, J. H., Yoon, H. K., Ko, H. K., Shin, J. H., & Gwon, D. I. (2019). Update on transarterial chemoembolization with drug-eluting microspheres for hepatocellular carcinoma. *Korean Journal of Radiology*, 20(1), 34-49.

Padhi, S., Mirza, M. A., Verma, D., Khuroo, T., Panda, A. K., Talegaonkar, S., ... & Iqbal, Z. (2016). Revisiting the nanoformulation design approach for effective delivery of topotecan in its stable form: An appraisal of its in vitro behavior and tumor amelioration potential. *Drug Delivery*, 23(8), 2827-2837.

Pandey, H., Rani, R., & Agarwal, V. (2016). Liposome and their applications in cancer therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, e16150477.

Pantapasis, K., Anton, G. C., Bontas, D. A., Sarghiuta, D., Grumezescu, A. M., & Holban, A. M. (2017). Bioengineered nanomaterials for chemotherapy. *In nanostructures for Cancer Therapy* (pp. 23-49). Elsevier.

Parham, G. P., Mathieu, K. M., YouYou, T. G., Hicks, M. L., Henry-Tillman, R., Mutombo, A., & Kanda, M. (2021). Establishing women's cancer care services in a fragile, conflict and violence affected ecosystem in Africa. *Ecancermedicalscience*, 15, 1231.

Park, J., Choi, Y., Chang, H., Um, W., Ryu, J. H., & Kwon, I. C. (2019). Alliance with EPR effect: Combined strategies to improve the EPR effect in the tumor microenvironment. *Theranostics*, 9(26), 8073.

Patankar, N. A. (2010). *Development and characterization of a lipid-based nanoparticulate formulation of topotecan and its use in combination with DoxilTM for treatment of relapsed ovarian cancer models* (Doctoral dissertation, Unıversıty Of British Columbia (Vancouver).

Patel, D., & Patel, N. (2020). Fabrication and characterization of sterically stabilized liposomes of topotecan. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 1-18.

Pattni, B. S., Chupin, V. V., & Torchilin, V. P. (2015). New developments in liposomal drug delivery. *Chemical Reviews*, 115(19), 10938-10966.

Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R. A., & Huang, P. (2006). Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*, 25(34), 4633-4646.

Perrett, S., Golding, M., & Williams, W. P. (1991). A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: characterization of the liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43(3), 154-161.

Pezeshky, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Moghadam, M., & Babazadeh, A. (2016). Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: Preparation and characterization. *Food Bioscience*, 13, 49-55.

Popr, M. (2017). *Synthesis of cyclodextrin derivatives for practical applications*.

Poulson, B. G., Alsulami, Q. A., Sharfalddin, A., El Agammy, E. F., Mouffouk, F., Emwas, A. H., & Jaremko, M. (2021). Cyclodextrins: structural, chemical, and physical properties, and applications. *Polysaccharides*, 3(1), 1-31.

Putri, D. C. A., Dwiastuti, R., & Marchaban, A. K. N. (2017). Optimization of mixing temperature and sonication duration. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, 14(2), 79-85.

Rahman, S., Cao, S., Steadman, K. J., Wei, M., & Parekh, H. S. (2012). Native and β-cyclodextrin-enclosed curcumin: entrapment within liposomes and their in vitro cytotoxicity in lung and colon cancer. *Drug Delivery*, 19(7), 346-353.

Reyes-Ruiz, J. M., Osuna-Ramos, J. F., De Jesús-González, L. A., Hurtado-Monzón, A. M., Farfan-Morales, C. N., Cervantes-Salazar, M., ... & Del Angel, R. M. (2019). Isolation and characterization of exosomes released from mosquito cells infected with dengue virus. *Virus Research*, 266, 1-14.

Riaz, M. K., Riaz, M. A., Zhang, X., Lin, C., Wong, K. H., Chen, X., Yang, Z. (2018). Surface functionalization and targeting strategies of liposomes in solid tumor therapy: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 195.

Rodpothong, S. (2015). *Nanoencapsulation of eugenol by beta-cyclodextrin* (Doctoral dissertation, Thammasat University).

Rosing, H., Van Zomeren, D. M., Doyle, E., ten Bokkel Huinink, W. W., Schellens, J.

H. M., Bult, A., & Beijnen, J. H. (1999). Quantification of topotecan and its metabolite N-desmethyltopotecan in human plasma, urine and faeces by high-performance liquid chromatographic methods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 727(1-2), 191-203.

Rödel, C. (2019). Development of *proliposomal and liposomal formulations with poorly water-soluble drugs* (Doctoral dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU).

Saenger, W. (1980). Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 19(5), 344-362.

Sala Faig, R. (2020). *Targeted drug delivery for the selective elimination of CXCR4+ cancer cells in metastatic colorectal cancer models* (Doctoral dissertation, Universitat Autònoma de Barcelona).

Sanchez Vazquez, B. (2019). *Advanced polymer-based drug delivery systems for chemotherapy* (Doctoral dissertation, UCL (University College London).

Santos, H. M., Lodeiro, C., & Capelo-Martinez, J. L. (2009). *The power of ultrasound in Ultrasound in chemistry: analytical applications*.

Sawant, R. R., & Torchilin, V. P. (2012). Challenges in development of targeted liposomal therapeutics. *The AAPS Journal*, 14(2), 303-315.

Sayyed-Alangi, S. Z., & Nematzadeh, M. (2019). Formulation, development and evaluation of bifunctionalized nanoliposomes containing trifolium resupinatum sprout methanolic extract: as effective natural antioxidants on the oxidative stability of soybean oil. *BMC Chemistry*, 13(1), 1-11.

Schieren, H., Rudolph, S., Finkelstein, M., Coleman, P., & Weissmann, G. (1978). Comparison of large unilamellar vesicles prepared by a petroleum ether vaporization method with multilamellar vesicles: ESR, diffusion and entrapment analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 542(1), 137-153.

Scholtz, J. C. (2010). *Preparation, stability and in vitro evaluation of liposomes containing amodiaquine* (Doctoral dissertation, North-West University).

Seleci, M., Ag Seleci, D., Scheper, T., & Stahl, F. (2017). Theranostic liposome–nanoparticle hybrids for drug delivery and bioimaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1415.

Sengupta, P. K., Bhattacharjee, S., Chakraborty, S., & Bhowmik, S. (2018). Encapsulation of pharmaceutically active dietary polyphenols in cyclodextrin-based nanovehicles: Insights from spectroscopic studies. *In Design of Nanostructures for Versatile Therapeutic Applications* (pp. 623-645). William Andrew Publishing.

Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 286.

Shah, M. R., Imran, M., & Ullah, S. (2017). *Lipid-based nanocarriers for drug delivery and diagnosis*. UK: Elsevier.

Shah, S. C., Kayamba, V., Peek Jr, R. M., & Heimburger, D. (2019). Cancer control in low-and middle-income countries: is it time to consider screening? *Journal of Global Oncology*, 5, 1-8.

Shaikh, K., Krishnan, S., & Thanki, R. M. (2021). *Artificial intelligence in breast cancer early detection and diagnosis*. Springer.

Sharma, A., & Sharma, U. S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154(2), 123-140.

Sharma, A., & Shepard, J. A. O. (2018). Lung cancer biopsies. *Radiologic Clinics*, 56(3), 377-390.

Shashi, K., Satinder, K., & Bharat, P. (2012). A complete review on: liposomes. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(7), 10-16.

Shelat, R., Chandra, S., & Khanna, A. (2018). Detailed toxicity evaluation of β-cyclodextrin coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 357-365.

Shi, J., Xiao, Z., Kamaly, N., & Farokhzad, O. C. (2011). Self-assembled targeted nanoparticles: evolution of technologies and bench to bedside translation. *Accounts of Chemical Research*, 44(10), 1123-1134.

Shunmugaperumal, T. (2020). *Oil-in-water nanosized emulsions for drug delivery and targeting*. John Wiley & Sons.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. CA: *A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7-34.

Singh, A. P., Biswas, A., Shukla, A., & Maiti, P. (2019). Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4(1), 1-21.

Smolkova, B., Dusinska, M., & Gabelova, A. (2017). Nanomedicine and epigenome. Possible health risks. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 780-796.

Socinski, M. A., Morris, D. E., Masters, G. A., & Lilenbaum, R. (2003). Chemotherapeutic management of stage IV non-small cell lung cancer. *Chest*, 123(1), 226S-243S.

Sriraman, S. K., Aryasomayajula, B., & Torchilin, V. P. (2014). Barriers to drug delivery in solid tumors. *Tissue Barriers*, 2(3), e29528.

Steenpaß, T., Lung, A., & Schubert, R. (2006). Tresylated PEG-sterols for coupling of proteins to preformed plain or PEGylated liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(1), 20-28.

Strebhardt, K., & Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer*, 8(6), 473-480.

Su, Y., Wang, T., Su, Y., Li, M., Zhou, J., Zhang, W., & Wang, W. (2020). A neutrophil membrane-functionalized black phosphorus riding inflammatory signal for positive feedback and multimode cancer therapy. *Materials Horizons*, 7(2), 574-585.

Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., & Nabiev, I. (2018). Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. *Nanoscale Research Letters*, 13(1), 1-21.

Sutradhar, K. B., & Amin, M. (2014). Nanotechnology in cancer drug delivery and selective targeting. *International Scholarly Research Notices*, 2014,1-12.

Swart, M. (2019). *Stability of amorphous forms of roxithromycin when encapsulated in liposomes* (Doctoral dissertation, North-West University (South-Africa)

Sykes, E. A., Chen, J., Zheng, G., & Chan, W. C. (2014). Investigating the impact of nanoparticle size on active and passive tumor targeting efficiency. *ACS Nano*, 8(6), 5696-5706.

Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 98(5), 1743-1754.

Szoka Jr, F., & Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. Proceedings of the National Academy af Sciences, 75(9), 4194-4198.

Tanwar, S. (2018). *Investigation of encapsulation of aromatic polluants by β-Cyclodextrin in presence of linear aliphatic alcohols* (Doctoral dissertation, Sorbonne Paris Cité).

Tarhan, T., Tural, B., & Tural, S. (2019). Synthesis and characterization of new branched magnetic nanocomposite for loading and release of topotecan anti-cancer drug. *Journal of Analytical Science and Technology*, 10(1), 1-13.

Thakare, M., Israel, B. E., Garner, S., Ahmed, H., Elder, D., & Capomacchia, A. (2017). Nonionic surfactant structure on the drug release, formulation and physical properties of ethylcellulose microspheres. *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(3), 418-425.

Thanki, K., Kushwah, V., & Jain, S. (2015). Recent advances in tumor targeting approaches. *Targeted Drug Delivery: Concepts and Design*, 41-112.

Thongdee, S., & Jantaratana, P. (2021). *Effect of iridium manganese corrosion on magnetic properties of exchange bias thin films* (Doctoral dissertation, Kasetsart University).

Tonger, R., Sharma, H., & Setia, M. (2020). A review on development and evaluation of liposomes. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9(5), 223-236.

Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 131-135.

Torchilin, V. P. (2000). Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical*

Sciences, 11, S81-S91.

Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), 145-160.

Torchilin, V. P. (2010). Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Drug Delivery*, 3-53.

Tran, S., DeGiovanni, P. J., Piel, B., & Rai, P. (2017). Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. *Clinical and Translational Medicine*, 6(1), 1-21.

Tural, B., Ertaş, E., & Tural, S. (2016). Removal of phenolic pollutants from aqueous solutions by a simple magnetic separation. *Desalination and Water Treatment*, 57(54), 26153-26164.

Tural, B., Özkan, N., & Volkan, M. (2009). Preparation and characterization of polymer coated superparamagnetic magnetite nanoparticle agglomerates. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 70(5), 860-866.

Tyagi, N., Rathore, S. S., & Ghosh, P. C. (2013). Efficacy of liposomal monensin on the enhancement of the antitumour activity of liposomal ricin in human epidermoid carcinoma (KB) cells. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(1), 16.

van den Boogaard, M. (2003). *Cyclodextrin-containing supramolecular structures: from pseudo-polyrotaxanes towards molecular tubes, insulated molecular wires and topological networks* (Doctoral dissertation, Groningen).

Varun, T., Sonia, A., Bharat, P., Patil, V., Kumharhatti, P. O., & Solan, D. (2012). Niosomes and liposomes-vesicular approach towards transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 1(3), 632-644.

Vemuri, S., & Rhodes, C. T. (1995). Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70(2), 95-111.

Ventola, C. L. (2012). The nanomedicine revolution: part 1: emerging concepts. *Pharmacy and Therapeutics*, 37(9), 512.

Vineis, P., & Wild, C. P. (2014). Global cancer patterns: causes and prevention. *The Lancet*, 383(9916), 549-557.

Virden, J. W., & Berg, J. C. (1992). Sodium chloride-induced aggregation of dipalmitoylphoshpatidylglycerol small unilamellar vesicles with varying amounts of incorporated cholesterol. *Langmuir*, 8(6), 1532-1537.

Volkwyn, M. (2019). *In vitro biocompatibility of transferosomes, ethosomes and transethosomes* (Doctoral dissertation, North-West University (South-Africa).

Wang, Q., Pan, M. H., Chiou, Y. S., Li, Z., & Ding, B. (2022). Surface characteristics and emulsifying properties of whey protein/nanoliposome complexes. *Food Chemistry*, 384, 132510.

Wang, R., Billone, P. S., & Mullett, W. M. (2013). Nanomedicine in action: an overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials. *Journal of Nanomaterials*, 2013.

Wang, W. X., Feng, S. S., & Zheng, C. H. (2016). A comparison between conventional liposome and drug-cyclodextrin complex in liposome system. *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1-2), 387-392.

Wang, X., Liu, Y., Xu, W., Jia, L., Chi, D., Yu, J., & Wang, Y. (2021). Irinotecan and berberine co-delivery liposomes showed improved efficacy and reduced intestinal toxicity compared with Onivyde for pancreatic cancer. *Drug Delivery and Translational Research*, 11(5), 2186-2197.

Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., & Huwyler, J. (2015). Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release*, 200, 138-157.

Wistuba, D., Bogdanski, A., Larsen, K. L., & Schurig, V. (2006). δ-Cyclodextrin as novel chiral probe for enantiomeric separation by electromigration methods. *Electrophoresis*, 27(21), 4359-4363.

World Health Organization (2018) Cancer. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer. (Erişim Tarihi 29 Ağustos 2020)

Wu, H., Peng, J., Wang, S., Xie, B., Lei, L., Zhao, D., & Nie, H. (2015). Fabrication of graphene oxide-β-cyclodextrin nanoparticle releasing doxorubicin and topotecan for combination chemotherapy. *Materials Technology*, 30(sup8), B242-B249.

Wu, S. H., Mou, C. Y., & Lin, H. P. (2013). Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 42(9), 3862-3875.

Yang, W., Yang, Z., Fu, J., Guo, M., Sun, B., Wei, W., Liu, H. (2019). The influence of trapping agents on the antitumor efficacy of irinotecan liposomes: head-to-head comparison of ammonium sulfate, sulfobutylether-β-cyclodextrin and sucrose octasulfate. *Biomaterials Science*, 7(1), 419-428.

Yang, Y. (2019). *Development of a mesoporous silica based nanosystem for safe and efficient therapeutic delivery*.

Yao, Y., Zhou, Y., Liu, L., Xu, Y., Chen, Q., Wang, Y., Shao, A. (2020). Nanoparticle-based drug delivery in cancer therapy and its role in overcoming drug resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 193.

Zaitsev, V. S., Filimonov, D. S., Presnyakov, I. A., Gambino, R. J., & Chu, B. (1999). Physical and chemical properties of magnetite and magnetite-polymer nanoparticles and their colloidal dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 212(1), 49-57.

Zarif, M. E., Florea, D. A., & Grumezescu, A. M. (2019). Introduction to cancer nanotherapeutics. *In Biomedical Applications of Nanoparticles* (pp. 1-29). William Andrew Publishing.

Zhang, M. (2014). *Developments of lipid-based nanoparticles for therapeutic drug delivery*. The Ohio State University.

Zhang, M., Liu, X., Li, J., He, L., & Tripathy, D. (2007). Chinese medicinal herbs to treat the side-effects of chemotherapy in breast cancer patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).

Zhang, X. Q., Xu, X., Bertrand, N., Pridgen, E., Swami, A., & Farokhzad, O. C. (2012). Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(13), 1363-1384.

Zhu, J., He, J., Du, X., Lu, R., Huang, L., & Ge, X. (2011). A facile and flexible process of β-cyclodextrin grafted on Fe_3O_4 magnetic nanoparticles and host–guest inclusion studies. *Applied surface science*, 257(21), 9056-9062.

Zylberberg, C., & Matosevic, S. (2016). Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Delivery*, 23(9), 3319-3329.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyad, Ad Ertaş Erdal

Web sayfası
(Research Gate, Academia, vs.)

Eğitim Bilgileri

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi	2015
Lisans	Dicle Üniversitesi	2010
Lise	Süleyman Demirel	2003

İş Deneyimi

Dönem (Yıl)	Şirket, Kurum	Görev

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1.Tural, B., Ertaş, E., & Tural, S. (2022). Investigation of the arsenic (V) retention performance of the nano-sorbent (M-TACA) synthesized by click chemistry. Journal of Dispersion Science and Technology, 1-11.

2. Bal Ayşe., Özen, H. Ç., Tural, B., & Ertaş, E. (2022). The Effects of Different Concentrations of Foliar Applied Chitosan, Iron Oxide and Chitosan-Coated Iron Oxide Nanoparticles on the Secondary Metabolites of Hypericum triquetrifolium Turra. During Full Bloom. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 25(4), 811-818.

3. Tural, B., Ertaş, E., Güzel, M., & Tural, S. (2021). Effect of structural differences of pumice on synthesis of pumice-supported nFe0: removal of Cr (VI) from water. Applied Water Science, 11(7), 1-11.

4. Tural, B., Ertaş, E., Enez, B., Fincan, S. A., & Tural, S. (2017). Preparation and characterization of a novel magnetic biosorbent functionalized with biomass of Bacillus Subtilis: Kinetic and isotherm studies of biosorption processes in the removal of Methylene blue. Journal of Environmental Chemical Engineering, 5(5), 4795-4802.

5. Tural, B., Ertaş, E., & Tural, S. (2016). Removal of phenolic pollutants from aqueous solutions by a simple magnetic separation. Desalination and Water Treatment, 57(54), 26153-26164.

6. Tural, B., Tural, S., Ertaş, E., Yalınkılıç, İ., & Demir, A. S. (2013). Purification and covalent immobilization of benzaldehyde lyase with heterofunctional chelate-epoxy modified magnetic nanoparticles and its carboligation reactivity. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 95, 41-47.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ	
ADI VE SOYADI	Erdal Ertaş
ÖĞRENCİ NO	15803502
EĞİTİM – ÖĞRETİM YILI	2021-2022
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Kimya
PROGRAM	Doktora
TEZ KONUSU	Manyetik Nano-Siklodekstrin-Lipozom Anti-Kanser İlaç Taşıyıcı Sistem Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Kontrollü Salım Davranışının İncelenmesi
İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ	
RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	164
BENZERLİK ORANI	%6
RAPORLAMA TARİHİ	01 /08 / 2022

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 142 sayfalık kısmına ilişkin, 01/ 08 /2022 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %6' dır.

Uygulanan filtrelemeler:

☐Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒Kaynakça hariç
☐Alıntılar hariç/dâhil
☐Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve bu Uygulama Esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Öğrencinin
Adı ve Soyadı: Erdal ERTAŞ
Tarih: 01.08. 2022
İmza:

Tez Danışmanı	**Anabilim Dalı Başkanı**
Adı ve Soyadı: Prof. Dr. Bilsen TURAL Tarih: 01. 08. 2022 İmza:	Adı ve Soyadı: Prof. Dr. Berrin ZİYADANOĞULLARI Tarih: 01.08.2022 İmza:

Formdaki bilgiler, bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersizdir.