

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOSARKOMA YÖNELİK YENİ BİR POLİMERİK İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMİN SENTEZİ VE SİTOTOKSİK ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İşinsu MUTLU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydan DAĞ

AĞUSTOS 2025

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OSTEOSARKOMA YÖNELİK YENİ BİR POLİMERİK İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMİN SENTEZİ VE SİTOTOKSİK ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İşinsu MUTLU

225309003

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydan DAĞ
İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Ali Demir SEZER

AĞUSTOS 2025

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 225309003 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Işınsoy MUTLU, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “OSTEOSARKOMA YÖNELİK YENİ BİR POLİMERİK İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMİN SENTEZİ VE SİTOTOKSİK ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Aydan DAĞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

İkinci Danışmanı : **Prof. Dr. Ali Demir SEZER**
Marmara Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Dr. Öğr. Üyesi Sezen ATASOY**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Gülşah YİĞİT ERDEM
Fenerbahçe Üniversitesi

Teslim Tarihi : 8 Ağustos 2025

Savunma Tarihi : 04 Temmuz 2025



Aileme ve kıymetli hocalarıma,

ÖNSÖZ

Bu yüksek lisans tez projesi boyunca beni desteklediği için sayın Prof. Dr. Aydan DAĞ'a emekleri için teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tavsiye ve yardımları için sayın Dr. Öğr. Üye. Sezen ATASOY'a, sayın Dr. Öğr. Üye. Pınar Sinem OMURTAG ÖZGEN'e, sayın Prof. Dr. Ali Demir SEZER'e teşekkür ederim. Ek olarak laboratuvarında bana yardımcı olan Tuğba GENÇOĞLU KATMERLİKAYA, Büşra ÇETİN ERSEN, Buse AVCI ve Buse SANCAKLI'ya teşekkür ederim. Tüm bu süreçte bana manevi destek olan sevgili ailem ve değerli arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı 2023/2 kapsamında destek aldığım (Başvuru No: 1649B022314943) ve 2224-B Yurt İçi Bilimsel Etkinliklere Katılımı Destekleme Programı 2024/3 kapsamında destek aldığım (Başvuru No: 1919B022405062) TÜBİTAK Bilim İnsanları Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) na teşekkür ederim. Bu tez çalışması ayrıca 20230620 proje numarası ile Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden ötürü teşekkürlerimi sunarım.

AĞUSTOS 2025

Işinsu MUTLU
Eczacı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Işinsu MUTLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
BEYAN.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xv
SUMMARY.....	xvi
1. GİRİŞ – OSTEOSARKOM VE İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM.....	1
1.1 Tezin Amacı.....	2
1.2 Osteosarkom.....	2
1.2.1 Osteosarkom hakkında genel bilgi.....	2
1.2.2 Patofizyolojisi.....	4
1.2.3 Epidemiyolojisi.....	5
1.2.4 Mevcut tedaviler.....	5
1.2.5 Cisplatin	6
1.2.6 Kemik hedeflendirme.....	6
1.2.7 Osteosarkom hedeflemede kullanılan VNTANST ve benzeri peptidler	13
1.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	21
1.3.1 Nanopartiküller.....	22
1.3.2 Dendrimerler.....	23
1.3.3 Miseller	23
1.3.4 Lipozomlar.....	25
1.3.5 Metalik nanopartiküller	25
1.3.6 Redoks duyarlı nanopartiküller.....	26
1.3.7 İnorganik nanotaşıyıcılar.....	26
1.3.8 Polimerik ilaç taşıyıcı sistemler.....	27
1.3.8.1 Doğal polimerler.....	28
1.3.8.2 Sentetik polimerler.....	29
1.3.8.3 Uyarana duyarlı polimerler.....	30
1.3.8.4 Kemik doku metastazı ve osteosarkoma için polimerik ilaç taşıyıcı sistemler.....	35
1.4 Hipotez.....	37
2. DENEYSEL KISIM.....	39
2.1 Kimyasal Sentezler.....	39
2.1.1 Materyal ve metod.....	39
2.1.2 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (CPADB) RAFT ajanı sentezi.....	40

2.1.3 1,1-Di-tert-butil 3-(2-(metakriloyloksi)etil)- butan-1,1,3-trikarboksilat (MAETC) sentezi.....	41
2.1.4 Homopolimer sentezi, 1,1-di-tert-butil 3-(2-(metakriloyloksi)etil)- butan-1,1,3-trikarboksilat (MAETC) polimerizasyonu.....	42
2.1.5 Diblok Kopolimer Sentezi.....	43
2.1.6 TMSpMA monomerinin koruma gruplarının uzaklaştırılması.....	44
2.1.7 MAETC monomerinin koruma gruplarının uzaklaştırılması.....	45
2.1.8 Tiyol-in 'click' kimyası ile kemik hedefli peptid konjugasyonu.....	46
2.1.9 CDDP yükleme ve misel oluşturma.....	47
2.1.10 Misel karakterizasyonu.....	48
2.2 <i>in vitro</i> değerlendirme.....	48
2.2.1 <i>in vitro</i> ilaç salım deneyi.....	48
2.2.2 Hücre kültürü ve sitotoksite analizi.....	49
2.2.3 MTT testi ile sitotoksitenin incelenmesi.....	49
3. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	51
3.1 Polimerlerin karakterizasyonu.....	51
3.1.1 MAETC monomer sentezi.....	54
3.1.2 P(MAETC) homopolimer sentezi.....	56
3.1.3 P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-TMSpMA)), diblok kopolimer sentezi.....	57
3.1.4 P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA)) TMS gruplarının uzaklaştırılması.....	59
3.1.5 P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA)) tersiyer butil grupların uzaklaştırılması.....	60
3.1.6 P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA@KHP)) tiyol-in click kimyası ile peptid polimer konjugasyonu.....	62
3.1.7 Polimer karakterizasyonlarının karşılaştırılması.....	64
3.2 Misel karakterizasyonu.....	66
3.2.1 Partikül boyutu ve zeta potansiyel analizi.....	66
3.2.2 TEM analizi.....	67
3.2.3 İlaç yükleme kapasitesi.....	68
3.3 <i>in vitro</i> değerlendirme.....	68
3.3.1 <i>in vitro</i> ilaç salım deneyi.....	68
3.3.2 Hücre kültürü ve sitotoksite değerlendirmesi.....	69
3.4 Sonuç.....	71
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	77

KISALTMALAR

CDCl₃	: Dötero kloroform
CDDP	: cis-diamindiklorür platin, Cisplatin
CHCl₃	: Kloroform
CH₃CN	: Asetonitril
CPADB	: 4-siyano-4-(fenilkarbonotiyoiltiyo)pentanoik asit
CVNTANST	: Kemik Hedefli Peptidin Aminoasit Sekansı
DKM	: Diklorometan
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DMF	: Dimetil formamid
DMSO	: Dimetilsulfoksit
DMSO-d₆	: Dötero dimetil sülfoksit
ek.	: ekivalan
GPC	: Jel Geçirgenlik Kromatografisi
g	: gram
FT-IR	: Fouirer Dönüştürücü Kızılötesi Spektrofotometre
KHP	: Kemik Hedefli Peptid
İTS	: İlaç Taşıyıcı Sistem
MAETC	: 1,1-di-tert-butil 3-(2-(metakriloyloksi)etil)-butan-1,1,3 trikarboksilat
M	: Monomer
NP	: Nanopartikül
¹H-NMR	: Proton Nükleer Manyetik Rezonans
OS	: Osteosarkom
P	: Polimer
THF	: Tetrahidrofuran
USS	: Ultra saf su

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 :	Kemik doku üzerindeki çeşitli hedefler.....	8
Tablo 1.2 :	Kemik doku hedeflendirmesinde kullanılan çeşitli ligandlar.....	10
Tablo 1.3 :	Kemik tümörü hedefli ilaç taşıyıcı nanopartiküllere örnekler.....	18
Tablo 1.4 :	Kemik doku için kullanılan taşıyıcı sistemlerin avantaj ve dezavantajları.....	36
Tablo 3.1 :	Polimer serilerinin karakterizasyonu.....	53
Tablo 3.2 :	Misellerin karakterizasyonu.....	67
Tablo 3.3 :	SAOS-2 ve HUVEC için hesaplanan IC ₅₀ değerleri.....	71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	: Osteosarkomun iskelet sisteminde en sık dağılım gösterdiği anatomik bölgeler.....	3
Şekil 1.2	: Cisplatin moleküler yapısı.....	6
Şekil 1.3	: Fosfonat, karboksil ve oksijen gruplarının fizyolojik pH da iyonlaşmasına bağlı kemik dokudaki hidroksiapatit yapıda kalsiyum iyonları ile etkileşimi.....	11
Şekil 1.4	: Osteosarkomu tedavi etmek için tümör hedefleyici peptit ile dekore edilmiş polipeptit nanopartiküllerinin doksorubisin ile uygulanması.....	15
Şekil 1.5	: Sarkom Hedefleyici Peptit ile Dekore Edilmiş Shikonin Yüklü Polipeptit Nanojel: hücre içinde yukarı regüle edilmiş osteosarkom nekrotozu ve azalmış pulmoner metastaz.....	16
Şekil 1.6	: Tümörojenik hücreleri hedeflemek için peptit konjuge klorojenik asit nanomontajlarının geliştirilmesi.....	17
Şekil 1.7	: 1950’den beri kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerin gelişimi.....	22
Şekil 1.8	: Uyarana duyarlı polimerik sistemlerde uyarıların sınıflandırılması.....	33
Şekil 2.1	: 1,4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (CPADB) RAFT Ajanı Sentezi.....	41
Şekil 2.2	: 1,1-di-tert-butil 3-(2-(metakriloyloksi)etil)- butan-1,1,3-trikarboksilat (MAETC) Monomeri Sentezi.....	42
Şekil 2.3	: P(MAETC) homopolimer kimyasal sentez basamakları.....	43
Şekil 2.4	: P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-TMSPMA)), Diblok kopolimer sentezi sentez şeması.....	44
Şekil 2.5	: P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-pMA)), Diblok kopolimerin trimetil sillil koruma gruplarının uzaklaştırılması kimyasal sentez basamakları.....	45
Şekil 2.6	: P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA)), polimerinin hazırlanması.	
Şekil 2.7	: TBOC hidrolizi sonrası diyaliz ile TFA fazlasının uzaklaştırılması aşamaları.....	46
Şekil 2.8	: Tiyoil-in Click kimyası ile peptid polimer konjugasyonu.....	47
Şekil 2.9	: CDDP@P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA@KHP)), polimere CDDP yüklenmesi kimyasal basamakları.....	55
Şekil 2.10	: Cisplatin aktivasyonu.....	55

Şekil 3.1	: 1,1-Di-tert-butil 3-(2-(metakriloyloksi)etil)- butan-1,1,3-trikarboksilat (MAETC) monomerine ait ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	55
Şekil 3.2	: P(MAETC) Homopolimerizasyonuna ait ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	55
Şekil 3.3	: 1,1-di-tert-butil 3-(2-(metakriloyloksi)etil)- butan-1,1,3-trikarboksilat (MAETC) monomerine ait FT-IR analizi.....	56
Şekil 3.4	: Sentezlenen P1: P(MAETC) Homopolimerin THF-GPC analizi ve FT-IR analizine ait grafikler.....	57
Şekil 3.5	: P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-pMA)) Diblok kopolimerizasyonuna ait ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	58
Şekil 3.6	: P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-TMSpMA)) diblok kopolimerine ait THF-GPC analizi ve FT-IR analizine ait grafikler.....	59
Şekil 3.7	: P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-pMA)) Diblok kopolimerin TMS gruplarının kaldırılması reaksiyonuna ait ¹ H-NMR spektrumu (CDCl ₃).....	59
Şekil 3.8	: P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-pMA)) polimerine ait koruma DMF-GPC ve FT-IR analizine ait grafikler.....	60
Şekil 3.9	: P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA)) polimerin TBOC gruplarının kaldırılması reaksiyonuna ait ¹ H-NMR spektrumu (DMF-d ₇).....	61
Şekil 3.10	: P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA)) polimerinin TBOC koruma gruplarının kaldırılması reaksiyonuna ait H ₂ O-GPC ve FT-IR analizlerine ait grafikler.....	61
Şekil 3.11	: P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA@KHP)) Peptid- Polimer konjugasyonuna ait FT-IR analizi.....	62
Şekil 3.12	: CVNTANST peptidi ve P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA@KHP)) Peptid - Polimer konjugasyonuna ait ¹ H-NMR spektrumları (DMF-d ₇).....	63
Şekil 3.13	: Sentezlenen Polimerlerin FT-IR analizleri karşılaştırması. P1.2: Homopolimer, P2.2: Diblok kopolimer P3.2: Trimetilsilil koruma gruplarının hidrolizi, P4.2: Tersiyer butil koruma gruplarının hidrolizi.....	64
Şekil 3.14	: Sentezlenen P1: P(MAETC) Homopolimer ve P2: P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-TMSpMA)) Diblok kopolimerlerin THF-GPC analiz grafiği.....	65
Şekil 3.15	: A) P3: P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-pMA)), Diblok kopolimerin TMS gruplarının kaldırılması reaksiyonuna ait DMF-GPC analiz grafiği. B) P4.2: : P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA)) polimerin TBOC gruplarının kaldırılması reaksiyonuna ait H ₂ O-GPC analiz grafiği.....	66
Şekil 3.16	: CDDP@P4 ve CDDP@P5 için TEM görüntüleri.....	68
Şekil 3.17	: CDDP yüklü hedeflendirilmiş misel (CDDP@P5) için 48 saatlik %kümülatif ilaç salım grafiği.....	69
Şekil 3.18	: SAOS-2, HUVEC hücre hatlarında M1, M2, M3 ve serbest CDDP için antikanser aktivitenin incelenmesi.....	70

Şekil 3.19	:	SAOS-2, HUVEC hücre hatlarında M1, M2, M3 ve serbest CDDP için %Canlılık hesaplaması ve değişen konsantrasyona göre karşılaştırmalı grafiği.....	70
-------------------	---	--	----

OSTEOSARKOMA YÖNELİK YENİ BİR POLİMERİK İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMİN SENTEZİ VE SİTOTOKSİK ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Osteosarkom, gençlerde görülmesi, sağkalım süresinin düşük olması ve kullanılan antikanser ilaçların yan etki profilinin yüksek olması sebebiyle çoğunlukla tedavisi zor bir hastalıktır. Mevcut kemoterapötiklerin kullanımındaki sınırlamaları aşmak amacıyla bu proje bilinen antineoplastik bir ajan olan cisplatin içeren bir ilaç taşıyıcı sistem (İTS) formülasyonunun geliştirilmesi üzerine yapılacaktır. İTS'ler son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılan, multidisipliner bir alan olarak, akıllı ilaç tasarımlarında önemli rol oynayan teknolojilerdir. Özellikle kanser çeşitlerine yönelik konvansiyonel ilaçların tedavi başarısını arttırmak için lipozom, misel, polimer, jel, altın nanoparçacık, niozom, katı lipid nanopartikül, dendrimer, nanokapsül gibi çeşitli sistemler geliştirilebilmektedir.

Bu çalışmada tasarlanan ilaç taşıyıcı sistem için kopolimerik misel yapısı oluşturacaktır. Polimerde 1,1-di-tert-butil-3-(2-(metakriloyloksi)etil)-butan-1,1,3-trikarboksilat (MAETC) monomeri aracılığıyla hem ilacın biyoyararlanımının arttırılması hem de cisplatin ilaç molekülünü taşıması, ikinci monomer olan 3-(trimetilsillil) prop-2-in-1-il polimetakrilat (TMSpMA) monomeri ucuna hedeflendirici peptid molekülü eklenmesi, 2-hidroksi etil metakrilat (HEMA) ile hidrofilik özellik kazandırılması ve neticede kendiliğinden misel oluşturacak bir sistemin geliştirilmesi planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: cisplatin, ilaç taşıyıcı sistem, kemik hedefli peptid, misel, osteosarkom

SYNTHESIS OF A NEW POLYMERIC DRUG DELIVERY SYSTEM FOR OSTEOSARCOMA AND EVALUATION OF ITS CYTOTOXIC ACTIVITY SYNTHESIS OF A NEW POLYMERIC DRUG DELIVERY SYSTEM FOR OSTEOSARCOMA AND EVALUATION OF ITS CYTOTOXIC ACTIVITY

SUMMARY

Osteosarcoma is a difficult disease to treat due to its occurrence in adolescents, low survival time and high side effect profile of anticancer drugs used. In order to overcome the limitations in the use of existing chemotherapeutics, this project will be carried out on the development of a drug delivery system (DDS) formulation based on cisplatin, a wellknown antineoplastic agent. DDSs, as a multidisciplinary field that has been studied intensively in recent years, are technologies that play an important role in smart drug designs. Various systems such as liposomes, micelles, polymers, gels, gold nanoparticles, niosomes, solid lipid nanoparticles, dendrimers, nanocapsules can be developed to increase the treatment success of conventional drugs, especially for cancer types. The drug designed in this study will create a copolymeric micellar structure for the delivery system. It is planned to increase the bioavailability of the drug and carry the cisplatin drug molecule through the 1,1-di-tert-butyl-3-(2-(methacryloyloxy)ethyl)-butane-1,1,3-tricarboxylate (MAETC) monomer in the polymer, to add a targeting peptide molecule to the end of the second monomer, 3-(trimethylsilyl) prop-2-in-1-yl polymethacrylate (TMSpMA), to gain hydrophilic properties with 2-hydroxy ethyl methacrylate (HEMA), and ultimately to develop a system that will form micelle with self-assembly.

Keywords: cisplatin, drug delivery system, bone targeting peptide, micelle, osteosarcoma,

1. GİRİŞ – OSTEOSARKOM ve İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER

Çağımızın en önemli sağlık problemlerinden biri olan kanser, uzun zamandır tıp ve ilaç araştırmalarının odak noktası olmuş ve multidisipliner bir çalışma alanı olarak yerini korumaktadır. Kemik kanserlerine yaygın olarak miyeloma, lenfoma ve lösemi gibi kemik iliği odaklı veya sekonder kanser olarak başka bölgelerden metastaz olmuş tümörler şeklinde rastlansa da, nadir olarak osteosarkom, Ewing sarkoma ve kondrosarkomanın arasında bulunduğu primer kemik kanserlerine de rastlanmaktadır. Diğer kanser tipleri arasında %1-2 lik bir dilimi kaplayan ender bir tür olan primer kemik kanserleri yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir [1]. Sarkomalar genel olarak kemik, kıkırdak ve bağ dokularından köken alan çeşitli mezenkimal maligniteleri içerir. Hastalarda ağrısız ve hafif bir tablodan çok daha agresif ve metastatik karakterli geniş bir skalada görülebilen oldukça heterojen yapıları bir tümör grubunu temsil eder [2].

Bir primer kemik kanseri olan osteosarkom tüm kemik kanserleri arasında her üç vakadan ikisinde görülmesi ile en sık rastlanandır. Büyüme çağındaki çocuklarda daha yüksek oranda rastlansa da daha ileri yaşlarda ve çeşitli sendromlar eşliğinde de görülebilmektedir. Çocuk kanserlerinin yaklaşık üçte biri osteosarkomdur. Kötü huylu primitif mezenkimal hücrelerin osteoblastlara diferansiye olmasına bağlı olarak kötü huylu kemik matriksi oluşur. Bu neoplazmik oluşumlara bağlı olarak kemik fizyolojisinin ve kemik yapım-yıkım döngüsünün bozulması hematolojik sistem, mineral homeostazisi, anatomik denge ve hayat kalitesi gibi çeşitli faktörlere direkt etkisinden ötürü oldukça ciddi riskler taşımaktadır. Herhangi bir kemikte ortaya çıkabilse de %60 oranında distal femur, proksimal tibia ve proksimal humerusta görülür. Bunun sebebi ise büyüme plakalarının bu kemiklerde aktif olarak boy uzaması ve yeni kemik oluşumundan sorumlu olmasıdır. Gene aynı sebeple kız çocuklarında

12 yaş, erkek çocuklarında 16 yaş civarı bu büyüme plakalarındaki hücrelerin çoğalma hızındaki artışa bağlı olarak mutasyona açık bir yapı meydana gelir ve osteosarkom insidansı bu yaşlarda en büyük piki yapar [1].

Geleneksel olarak cerrahi müdahale ile tedavisi şart olsa da neoadjuvan tedavinin gerekliliği kabul edilmektedir. Bu amaçla neoadjuvan olarak kullanılan klasik doksorubisin, cisplatin, ifosfomid ve yüksek doz metotreksatlı tedavi şemaları ne kadar tümör dokuyu küçülme ve metastazı önleme açısından başarılı olsa da, yan etki profilinin ciddi kalıcı komplikasyonlara sebep olmasından ötürü kemoterapide doz kısıtlayıcı bir faktördür. Bunun önüne geçmek amacıyla geliştirilen ve üzerinde çalışılmaya devam eden, akıllı sistemler ile ilaçlar daha etkili bir şekilde hastalıklı dokulara ulaştırılmakta ve tedavi başarısı arttırılmaya çalışılmaktadır.

1.1 Tezin Amacı

Mevcut konvansiyonel tedavilerin hasta sağkalım süresini yeterince uzatamaması, hastada yüksek yan etki ve organ yetmezliği oranları görülmesi ve hastalığa yeni bir çözüm sunmamasından ötürü osteosarkom ile başa çıkmakta yetersiz kalmaktadır. Mevcut engelleri aşmak, bilinen kemoterapötikleri iyileştirmek amacıyla tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemler bilinen moleküllerin farmakokinetik performansını arttırmak açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada yenilikçi bir ilaç taşıyıcı sistem ile mevcut kemoterapötik ajanların daha etkili bir şekilde hastalığa yönlendirilmesi, bu şekilde ilaç yan etkilerinin azaltılması ve tedavi başarısının arttırılması amaçlanmaktadır.

1.2 Osteosarkom

1.2.1 Osteosarkom hakkında genel bilgi

Osteosarkoma çoğunlukla büyüme çağındaki genç bireyleri etkileyen mezenkimal doku kökenli malign bir kemik tümörüdür. Tüm primer kötü huylu kemik tümörleri arasında %20 lik dilimi kapsayan en sık rastlanan çeşitlerindendir. En sık görüldüğü dokular uzun tübüler kemiklerden proksimal humerus, distal femur, proksimal tibia, diz eklemi çevresi iken, nadiren de daha ölümcül seyreden aksiyal iskelet osteosarkomu olmak üzere omurga pelvis veya sakrum bölgelerinde de rastlanabilir (Şekil 1.1). Hastalık lokalize olmuş ağrı, yan bölgelerde şişlik ve eklemden hareket zorluklarıyla ve patolojik kırıklarla karakterize birtakım semptomlar ile başlangıç

gösterir. Mikrometastazın çok sık görülmesinden ötürü vakaların yaklaşık tamamında bu semptomlar görülmeden önce zaten kemik dokudan akciğer, lenf nodları ve diğer kemiklere metastaz yapmaktadır [3,4].



Şekil 1.1 : Osteosarkom iskelet sisteminde en sık dağılım gösterdiği anatomik bölgeler. Büyümenin yoğun olduğu Femur ve humerus başı başta olmak üzere mandibular, ve pelvis bölgesi kemiklerinde de rastlanabilir.

Hastalığın sebepleri kesin olmamakla birlikte ilintili bulunduğu temel patolojik durumlar sıklıkla kompleks genetik mutasyon kaynaklıdır. Genom bozukluğu, anöplöidik kromozomal değişimler, tümör baskılayıcı genlerinin azalması, DNA onarım mekanizmasındaki bozukluklarda kansere dönüşüm sıklıkla görülür [4]. Buna ek olarak retinoblastoma ile ortak olan 13q14 geninde ve Li-Fraumeni sendromunda görülen 17p13 gen mutasyonlarının birikiminin osteosarkoma sebebiyet verdiği bilinmektedir [3].

Kemik histolojisi ve kemik hastalıkları çalışmalarında kullanılan in vitro hücre kültürü modelleri, kemik tümörü hatları (ROS 17 / 2.8 veya UMR 106; insan MG-63 veya SAOS-2) veya primer kemik hücre kültürleri (MC3T3-E1, UMR 201 ve RCJ hücre hatları) kökenli klonal hücre hatlarından oluşur. İnsan osteosarkomlarından türetilen

osteoblastik hücre modelleri arasında SAOS-2, OHS-4, TE-85, MG-63, KPDXM ve TPXM bulunur [5]. Literatürde en sık çalışılan osteosarkom hücre hattı SAOS-2, diğer adıyla sarkom osteojenik, 1973 yılında Fogh ve arkadaşları tarafından primer osteosarkomundan türetilen bir hücre hattıdır. Bu hücre hattı, kemik kanseri tedavisine yönelik yeni araştırmaları test etmek için kullanılan yaygın *in vitro* modelidir.

1.2.2 Patofizyolojisi

Kemik doku genel olarak organların korunması, kan hücreleri üretilmesi ve çeşitli hormonların regülasyonu ile görevli protein (ör: kolajen), lipid ve çeşitli minerallerden oluşan bir matriksten meydana gelen kompozit yapıda özelleşmiş bir bağ dokusudur. İçerisinde kalsiyum ve fosfattan oluşan hidroksiapatit isimli mineral yapı mevcuttur. Temel olarak kemik dokuda üç tip hücre bulunur: osteosit, kolajen üretiminden sorumlu osteoblast, kemik dokunun yıkımından sorumlu olan osteoklast. Osteoblast ve osteoklast arasında RANKL nükleer faktör kappa-B ligandı aracılığıyla tetiklenen kemik matrisin yapım ve yıkım döngüsü (bone remodelling) meydana gelir. RANKL proteininin aşırı ifade edilmesi durumunda genellikle dejeneratif kemik hastalıkları meydana gelmektedir [6].

Osteoblast, mineralize olacak matriksi üretir. Daha sonra mineralize matriks, programlı bir şekilde osteoklast tarafından yıkılır. Bu döngü lokal faktörler ve sistemik hormonlar tarafından kontrol edilir. Hormonlar, sentezi başlatır, hücre metabolizmayı kontrol ederler ve hücre yüzeyindeki reseptörler üzerinden osteoblast ve osteoklastların replikasyonunu düzenlerler. Mekanik stresleri de içeren lokal faktörler ise parakrin salgılar sayesinde osteoklastogenezisi indükleyerek remodelasyon işlevini başlatırlar. Remodelasyonun sonucunda kemiğin mineral komponentinin ve organik matriksinin homeostazı sağlanır.

Osteosarkomun sınıflandırılması kanserin lokasyonunu hücre tiplerini ve tümörün derecesine göre değişmektedir.

Kemik dokuya yönelik nanosistemler arasında dokuya uyumluluğu açısından en yaygın olarak iskeleler, kemik dolguları, hidrojel, kompozitler, metal veya polimer bazlı nanoparçacıklar tercih edilmektedir [6].

1.2.3 Epidemiyolojisi

OS 'un yıllık ölüm oranının 25 yaş altı bireyler için milyonda 4,4 ve tüm yaşlar için milyonda 3,1 olduğu tahmin edilmektedir. Hastaların %35'inde teşhis sırasında lokalize OS gözlenirken metastaz riski geç teşhis edilmiş olan hastalarda daha yüksektir. Çeşitli radyografik teknikler arasında X-ışını bilgisayarlı tomografi manyetik rezonans görüntüleme, pozitron emisyon tomografisi sıklıkla kullanılırken bilgisayarlı tomografi en çok tercih yöntemdir [4].

1.2.4 Mevcut tedaviler

1970'lere kadar rutin tedavi uzuv amputasyonu iken, operasyon sonrası 5 yıllık sağ kalım %20'den azdı. 1980'lere doğru cerrahi tekniklerin gelişmesi, neo ve adjuvan tedavi olarak kemoterapötik ilaçların ve radyoterapinin eklenmesi ile kayda değer gelişmeler yaşanmıştır. Şimdilerde tam amputasyon yerine eklem kurtarma tedavisi yeni cerrahi yaklaşım olarak klinikte yerini almıştır ve 5 yıllık sağkalım %80'lere ulaşmıştır. 1990'lara geldiğinde yeni bir yaklaşım olan gen terapisi yükselişe ve kök hücre tedavileri ise popüler bir tedavi araştırma konusu olmaya devam etmektedir.

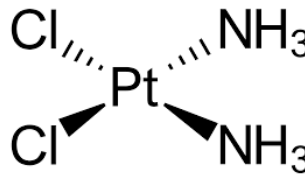
Tedavi stratejileri genellikle operasyon öncesi kemoterapi operasyonla etkilenen bölgenin veya uzvun kısmi/tam amputasyonu ile tümör bölgenin alınması ve devamında kemoterapi ve radyoterapi ile desteklenmesiyle tümörü önlenmesine dayanır. Kemoterapi alınmadan yapılan cerrahi girişimlerin başarı yüzdesi %20 iken kemoterapi ile kombine edildiğinde %70'lere ulaşmaktadır. Ancak kemoterapinin bu başarısı ciddi kardiyotoksik, nefrotoksik ve ototoksik yan etkilerinden ötürü gölgelenmekte, dolayısıyla tedavi sıklıkla yarım kalmaktır [4].

Meme ve prostat kanseri gibi belirli bazı kanserlerde kemik dokuya metastazla sıklıkla karşılaşılır. Diğer kanserlerin kemik dokuya metastazı şiddetli ağrı, patolojik kırıklar, kemik iliği aplazisi, hiperkalsemi ve morbiditeye sebebiyet veren majör risk taşıyan bir durumdur. Tedavide kemoterapi tercihi olarak en sık kullanılan ajanlar bifosfonatlar, tetrasiklinler, denosumab, cabozantinib iken bir diğer tedavi seçeneği de radyoterapi veya ablasyondur. Cerrahi tedavi tümörün hayati risk oluşturması gibi istisnai durumlar haricinde nadiren tercih edilir. Konvansiyonlar kemoterapötiklerin

yetersiz kaldığı noktada nanoteknolojik gelişmeler teşhis ve tedaviye destek sağlayabilmektedir.

1.2.5 Cisplatin

Metalik yapılu ilaçlar, özellikle platin bileşikler, yumurtalık, meme, mesane, baş, boyun, testis ve akciğer gibi çeşitli tümörlere karşı yaygın klinik kullanımı olan antikanser ajanlardır (Şekil 1.2). Cis-diklorodiaminplatin (II) (CDDP) ve karboplatin gibi platin bazlı ilaçlar tedavide tek başına veya diğer kemoterapötiklerle kombine olarak uygulanabilir. Konvansiyonel CDDP uygulaması kanser dokularında düşük ilaç dağılımına, sağlıklı dokularda ise istenmeyen birikime yol açmaktadır. Bu nedenle, CDDP'nin yan etkilerini ortadan kaldırmak ve mevcut farmakokinetik özelliklerini iyileştirmek için etkili stratejiler gerekmektedir. CDDP'nin ilaç taşıyıcı sisteme entegre edildiği literatür çalışmalarında çoğunlukla, polimerik nanopartikül formülasyonlarına odaklanıldığı görülmektedir. Biyouyumlu polimerik bir sistemle taşındığında CDDP'in hedefe yönelik, yan etkileri minimuma indirilmiş, daha efektif bir antikanser ilaç tedavisi olması mümkün görünmektedir [6].



Şekil 1.2 : Cisplatin moleküler yapısı.

Halihazırda cisplatin ile yapılan birçok nanoformülasyon çalışmasında önceki başlıklarda da bahsedildiği üzere, farmakokinetik özellikleri iyi bilinen bir ilaç üzerinden yeni sistemlerin tasarlanmasının başarılı olma potansiyeli yüksektir [8 -13].

1.2.6 Kemik hedeflendirme

Kemik tümörleri metastaz yapma meyilli, yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olan bir kanser olarak bilinir. Çeşitleri çok olmakla birlikte hepsi benzer mekanizmalarla tümörleşen osteoklast ve osteoblast hücreleri barındırır. Hastalığın ilerlemesini ve yayılmasını durdurmak için hem bu hücrelerin özelliklerini ve metastaz altında yatan mekanizmalarını, hem de tümör bölgesine ait mikro-çevre koşullarını iyi anlamak gerekmektedir. Tüm bu parametrelerin değerlendirilmesiyle tedavi amacıyla

hedeflenecek noktalara karar verilmesi ve bunlara yönelik stratejiler geliştirilmesi gerekmektedir. Tablo 1.1’ de kemik dokudaki hedef yapılar ve bunlara karşı aktif ligandların bir listesi bulunmaktadır [14]. Bu ligandlardan bazıları kendi başına da ilaç etkin maddesi olarak klinikte kullanılabilir veya sadece hedeflere afinite gösterdiği için bir ilaç taşıyıcı sistemi oraya yönlendirmek amacıyla kullanılabilir.



Tablo 1.1: Kemik doku üzerindeki çeşitli hedefler.

Hedef	Görev	Özellik	Ajan
kalsiyum fosfat kristalleri (hidroksiapatit)	Hücre dışı matriks	Kemik dokuya özgü mineral	Bifosfonatlar (Alendronat, Zolendronat vb.)
RANK Proteini	Transmembran proteini	osteoprotegerin ligandı ve osteoklast farklılaşma faktörü	Denosumab (Anti RANKL antikoru)
mTOR	Enzim	Kinaz proteini	Rapamisin
c-Src (tirozin kinaz)	Hücreler arası sinyal iletimi	Membran Proteini	-
Androjen	Hücre içi sinyal iletimi	Steroida Hormonlar	Enzalutamid (inhibitör)
Proteozom	-	Enzim	Bortezomib (inhibitör)
Katepsin K	Enzim	Osteoklast aktivitesi için gerekli bir enzim	Balicatib (inhibitör)
İntegrin	Hücreler arası bağlantı proteini	Hücre bağlayıcı membran proteini	-
Vimentin	Interprotein filamenti	Sitoskeletal protetin	Çeşitli peptidler
Tümöral DNA	Genetik mutasyona bağlı tümör oluşumu	Mutasyon	DNA sentezini inhibe eden ajanlar (Antrasiklinler, Platin grubu ajanlar vb.)

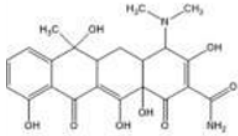
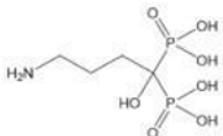
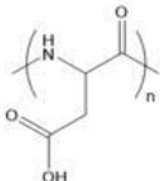
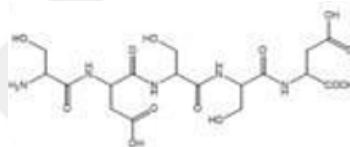
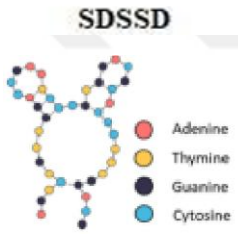
Kemik hastalıklarına uyarlanan nanosistemler geniş bir çalışma alanı olmakla birlikte ilaç taşıyıcı sistemler açısından önemli bir araçtır. Kemik dokuya spesifik organik ve inorganik yapısal özelliklerden ötürü özgün sistemler tasarlanabilmekte, ilaç farmakokinetiği düzeltilebilmekte ve doku hedeflendirme yapılabilmektedir. Nano boyutlu sistemler hücre zarından kolay geçiş özelliği göstermek, ilaçların etkili taşınması, absorpsiyonu arttırmak, ilaç çözünürlüğünü arttırmak, kimyasal stabiliteyi arttırmak, yüzeyi modifiye edilebilir olmak gibi birtakım özelliklere sahiptir. İlgili hastalığa göre istenen özelliklerde bir yapı tasarlanabilir.

Nanoteknoloji ve nanomalzeme biliminin gelişmesi ile medikal ve farmasötik uygulamalarla ilgili araştırmalar hızlı bir şekilde devam etmektedir. Ancak bu çalışmaların klinik uygulamaları halen oldukça sınırlıdır. Avrupa (EMA) ve Amerika (FDA) sağlık otoriteleri tarafından onaylanan bazı nanoformülasyon örnekleri arasında ilaç yüklü lipozomal veya polimer bazlı formülasyonlar ile kemik dokuda dolgu görevi gören mineral bazlı çimento materyalleri mevcuttur.

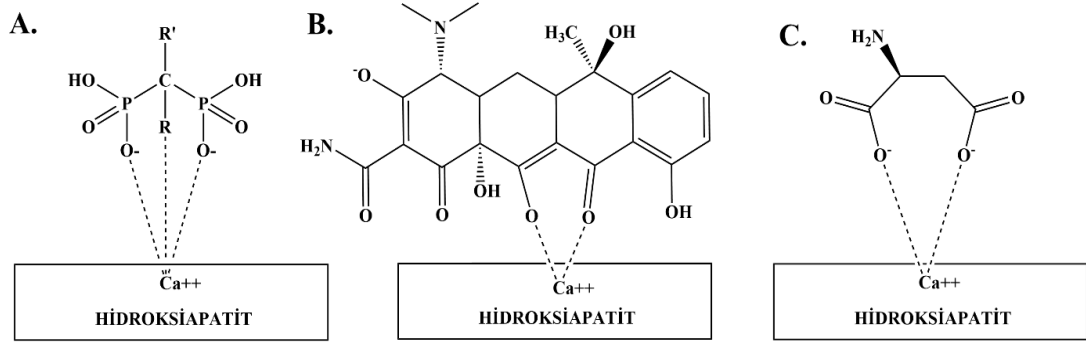
Yeni formülasyon çalışmalarının kliniğe uygulanmasında karşılaşılan en büyük engeller üretim aşamasında yaşanan ya da yaşanacak olan ölçek büyütme (*scale up*) ve maliyet problemleri, biyolojik ortam stabilitesi veya biyogüvenlikle ilgili bilgilerin yeterli olarak aydınlatılamaması, klinik çalışmaları ciddi yatırım gerektirmesi ve ruhsatlandırma çalışmalarının uzun sürmesidir [6].

Teşhis veya tedavi amacıyla kemik doku hedeflendirme basit veya karmaşık moleküler yapılar aracılığıyla yapılması mümkündür. Bu yapılar klinikte kullanılan ilaç moleküllerinden, aminoasit ve peptid yapılarından, daha büyük aptamer ve monoklonal antikor gibi yapılara kadar çeşitlilik gösterir (Tablo 1.2).

Tablo 1.2 Kemik doku hedeflendirmesinde kullanılan çeşitli ligandlar.

Ligand	Yapı
Tetrasiklinler	
Bifosfonatlar	
Aspartik Asit (Lineer veya Dendrimer)	
Peptid	
Aptamer CH6	

Örneğin tetrasiklin aslında bir antibiyotik olmasına rağmen yan etki olarak kemik dokuya bağlanma meyillidir. Dolayısıyla tetrasiklin ve analogları potansiyel hedeflendirici moleküllerdir. Aspartik asitçe zengin peptid yapılarının kemik dokuya ilgi gösterdiği bilinmektedir. Kemik rejenasyonu etkili ilaç grubu bifosfonatlar, pirofosforile kolesterol, poli(fosfoester) ler, poli(etilen sodyum fosfat) ve bitkisel kökenli bir molekül olan fitik asit fosfat yapıları barındırır. Fizyolojik pH'da, fosfat grupları kısmen iyonize olur ve bu da kemikteki kalsiyum mineraline afinite gösterir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 : Fosfonat, karboksil ve oksijen gruplarının fizyolojik pH da iyonlaşmasına bağlı kemik dokudaki hidroksiapatit yapıda kalsiyum iyonları ile etkileşimi. A. Bifosfonat analoglarının iyonlaşmış yapısı ve hidroksiapatit içindeki kalsiyum ile etkileşmesi B. Tetrasiklin iyonlaşmış yapısı ve hidroksiapatit içindeki kalsiyum ile etkileşmesi C. Aspartik asit amino asidinin iyonlaşmış yapısı ve hidroksiapatit içindeki kalsiyum ile etkileşmesi.

Bifosfonat molekülleri çift fosfonat grupları sayesinde, HA üzerindeki iki dışlı kalsiyum iyonlarına bağlanma için kritik öneme sahiptir. Bunlar arasında alendronat, nanopartiküle entegre edildiğinde kemikteki hidroksiapatit yapısına in vitro bağlanma özelliği bakımından ve in vivo kemik doku birikimi değerlendirmelerinde 2,5 ile 10 kat arası artış ortaya koymaktadır. Zoledronik asit yüklü nanopartiküller ile yapılan çalışmada ise doku birikiminin 50 kata yakın artış gösterdiği gözlenmiştir. Bifosfonatların taşıyıcı yapıya yüzey konjugasyonu ile kazandırılması neticesinde hem hedeflendirme özelliğinin hem de bifosfonatın kemik rezorpsiyonunu önleyici aktivitesinin korunduğu gözlenmiştir.

Bifosfonatlar haricinde fosforca zengin diğer bileşikler de kemik hedefli ajan olarak kullanılabilir. Özellikle bifosfonik üniteler barındıran dendrimerler gibi polimerik yapılar güçlü potansiyel göstermektedir. Ek olarak monofosfat yapılar da yoğun olarak polimer yüzeyine tutundurulduğunda bifosfonatlarda görülen güçlü afiniteye yakın performans göstermektedir.

Fosforlu bir diğer yapı olan pirofosforile kolesterol de kemik hedefli lipozom oluşturmada, kullanılabilir. Fosfat monomerli polimerlerin (polifosfoester ve polietilen sodyum fosfat) ise kendi başına kemik dokuyu hedeflediği bildirilmiştir. Bu bağlamda fosfonatlı çeşitli bileşiklerin iyi bir seçenek olduğu görülmektedir.

Kemik doku hedeflendirmede kemik oluşumu için hücre yüzeyini hedefleme, kemik iliği hedefleme, tümör hücrelerini hedefleme gibi çeşitli taktikler peptit ve aptamer gibi biyolojik moleküllerle de sağlanabilmektedir. Bu amaçla kullanılan aptamerlere

örnek olarak CH6; peptidlere RGD, (DSS)6 oktapeptidi , SDSSD, VATANST, VNTANST, HA Pep1, 2 ve3 sayılabilir.

Kemik yüzeyini hedefleme amacıyla, kullanılan bazı peptidler serin (Ser, S) ve aspartik asit (Asp, D) açısından zengindir. Örneğin, kemik oluşum yüzeyini hedeflemek için bir oktodekapeptid (DSS)6 veya SDSSD gibi küçük peptid sekansları tasarlanmıştır. Kemik dokuda hücreseel düzeyde osteoblastları hedeflemek de kemik heefleme için alternatif bir seçenektir. Örneğin kemik yüzeyinde osteoblastlara yüksek seçicilik gösteren bir aptamer olan CH6' nın gen taşıyıcı sistemlerde kullanılabildiği bildirilmiştir. Bir başka osteoblast seçici peptid ise pentapeptit SDSSD'dir [15]. Bu peptid spesifik olarak osteoblast hücrelerini hedeflemek açısından oktodekapeptidden (DSS) daha yüksek hedefleme kabiliyetine sahiptir ve daha düşük toksisite göstermiştir [16].

Kemik iliği hedefleme de başka bir ligand yönlendirme stratejisidir. Nötr yüzey yüküne ve küçük parçacık boyutuna sahip olan nanopartiküllerin kemik iliğinde birikme eğiliminin yüksek olduğu zaten bilinmektedir. Bunun haricinde, vasküler endotel hücre (EC) ile salgılanan eksozomların da yüksek kemik bağlama özelliği olduğu bildirilmiştir. 1484 amino asitlik gebelik zonu proteini (PZP), EC tarafından salgılanan bu eksozomlarca aşırı ifade edilir ve kemik iliğindeki ilgili reseptörlere bağlanabilir. Bu nedenle, PZP, malign kemik tümörlerine karşı bir kemik hedefleyici olarak kullanılabilir. E-selektin, 610 amino asitten oluşan, kemik iliği endotelyumunda eksprese edilen bir hücre adezyon molekülüdür. Spesifik olarak tümör mikrobölgelerinde ifade edildiğinden, ilaçların kemik iliği endotelyumuna verilmesi için kullanılabilir.

Tümör hücrelerini direkt hedefleyen stratejiler tümör spesifik over-eksprese biyomarkerler ile mümkündür. Bu biyomarkerlerin primer hücrelerden bulunması yeterlidir çünkü sekonder kanserlerde de eksprese olmaya devam ettiğinden tümörün bulunduğu tüm dokulara hedefleyebilir. Örneğin kemik metastatik prostat kanserini hedeflemek için prostat spesifik membran antijenini (PSMA) hedefleyen aptamerler kullanılabilir. Benzer şekilde, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 kemik metastatik meme kanserlerinde, HER2'ye karşı monoklonal bir antikor olan trastuzumab kullanılarak hedeflenebilir. Çoğu kanser hücresinde integrin transmembran reseptörleri aşırı ifade edilir. Integrin $\beta 3$, kemik metastatik meme tümörleri için spesifik bir biyobelirteç olabilir. İntegrin $\beta 3$ ile spesifik olarak bağlanmış bir ligand olan kinolon, metastatik kemik tümörlerine nanopartiküller

vermek için kullanılabilir. Ayrıca Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD) ve siklik RGD (cRGD), güçlü integrin bağlayıcı ligandlardır [15].

Osteosarkom gibi ortotopik kemik tümörleri için özgün biyomarkerlar arasında aktive edilmiş lökosit hücre adezyon molekülü (ALCAM), farklılaşma kümesi 44 (CD44), efrin alfa 2 reseptörü (EphA2), sialik asit, östrojen reseptörü gibi aşırı ifade edilmiş yapıların ligandları hedefleyici olarak kullanılabilir. Osteosarkoma yönelik nanopartiküller tasarlanan çeşitli çalışmalarda kullanılan hedefleyicilere örnek olarak anti-ALCAM, CD44 ligandı hyaluronik asit EphA2 ligandı dodekapeptid YSAYPDSVPMMS verilebilir. Literatürde, osteosarkom hücrelerine yönelik hazırlanan östrojen ve lektin konkanav alin A ile dekore edilmiş nanopartiküller mevcuttur [15]. Osteosarkomun metastaz ve nüksetmesine katkıda bulunan kök hücreler, osteosarkom tedavisi için kritik öneme sahiptir. Diferansiyasyon kümesi 133 (CD133), osteosarkom kök hücreleri üzerinde aşırı ifade edilen spesifik bir biyobelirteçtir. Nanoyapılar ile birleştirildiğine CD133 aptamer, osteosarkom kök hücrelerine başarılı bir şekilde terapötik etki ortaya çıkarabilmekte ve proliferasyonu inhibe edebilmektedir [18-20]. Dolaşımdaki osteosarkomda hücreleri, kemorezistans ve tümör metastazından sorumlu olan bir fenotip olan CXCR1'i aşırı ifade eder. Bir çalışmada cisplatini *in vivo* olarak dolaşımdaki tümör hücrelerine iletmek için CXCR1 hedefleme peptidi olarak SAKELRCQCIKTYSKPFHPK tasarlanmıştır. Altın parçacıklarına konjuge edilmiş PB aptamerinin hedefleme etkinliği *in vivo* olarak da doğrulanmıştır [20]. Ayrıca yakın zamanda da iki yeni osteosarkom hücre hedefleme peptidi PPTHPPP ve PPSHTPT tanımlanmıştır, ileri çalışmalarda kullanılma potansiyeli mevcuttur [17].

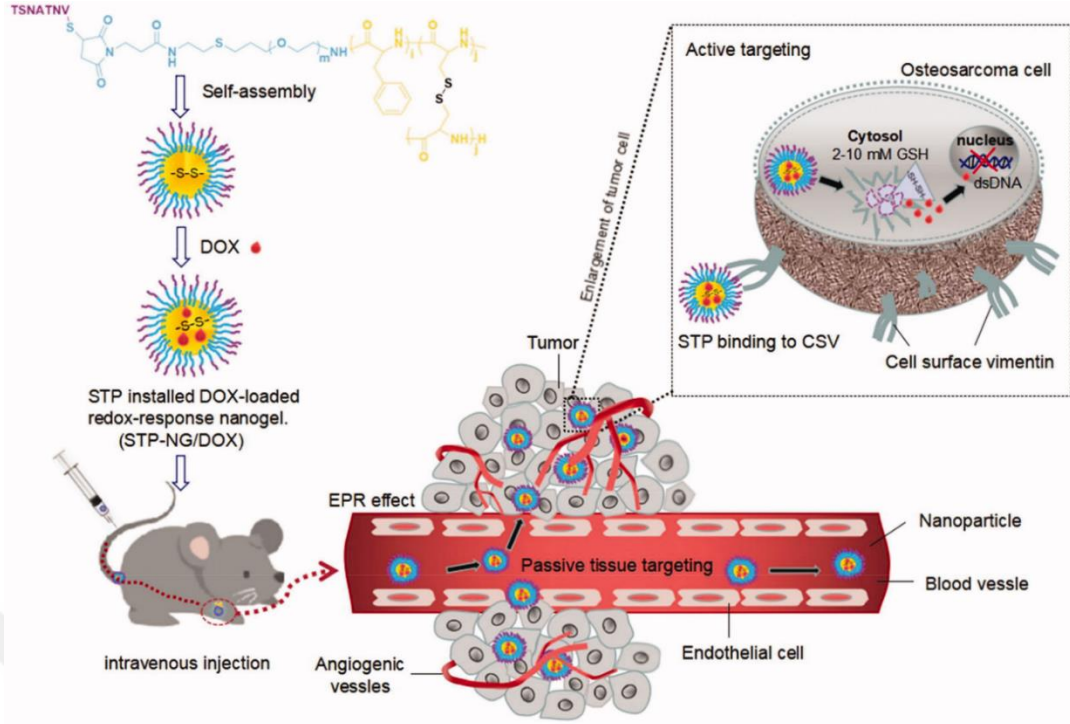
1.2.7 Osteosarkom hedeflemede kullanılan VNTANST ve benzer peptidler

Vimentin proteininin birçok tümör tipinde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir ve doğrudan epitelyal-mezenkimal (EMT) dönüşümde rol oynamaktadır [22]. Tümörlerde vimentin ekspresyonu ayrıca artmış malignite ve tümör metastazı ile de ilişkilidir [23]. Osteosarkom hücrelerinin yüzeyinde de yaygın olarak eksprese edilen vimentin, tümör hedefleme özelliklerine sahip olan peptitler tarafından seçici olarak bağlanabilir. Literatürde tümör hedefleme amacıyla kullanılan farklı peptid yapıları arasında nispeten küçük koyutlu bir yapı olan VATANST ve VNTANST sekansını içeren peptidler çeşitli tümör tiplerinde yukarı regüle edilen vimentine bağlanır. VNTANST gibi peptidler kullanılarak yapılan kemik hedefli ilaç taşıyıcı sistem sayısı

az olmakla beraber bu stratejinin etkili olduğu da ortaya konmuştur. Bu peptidler polimer yapısına sıklıkla maleimid bağı, tiyo-eter bağı gibi kimyasal bir bağlanma yolu ile katılmıştır.

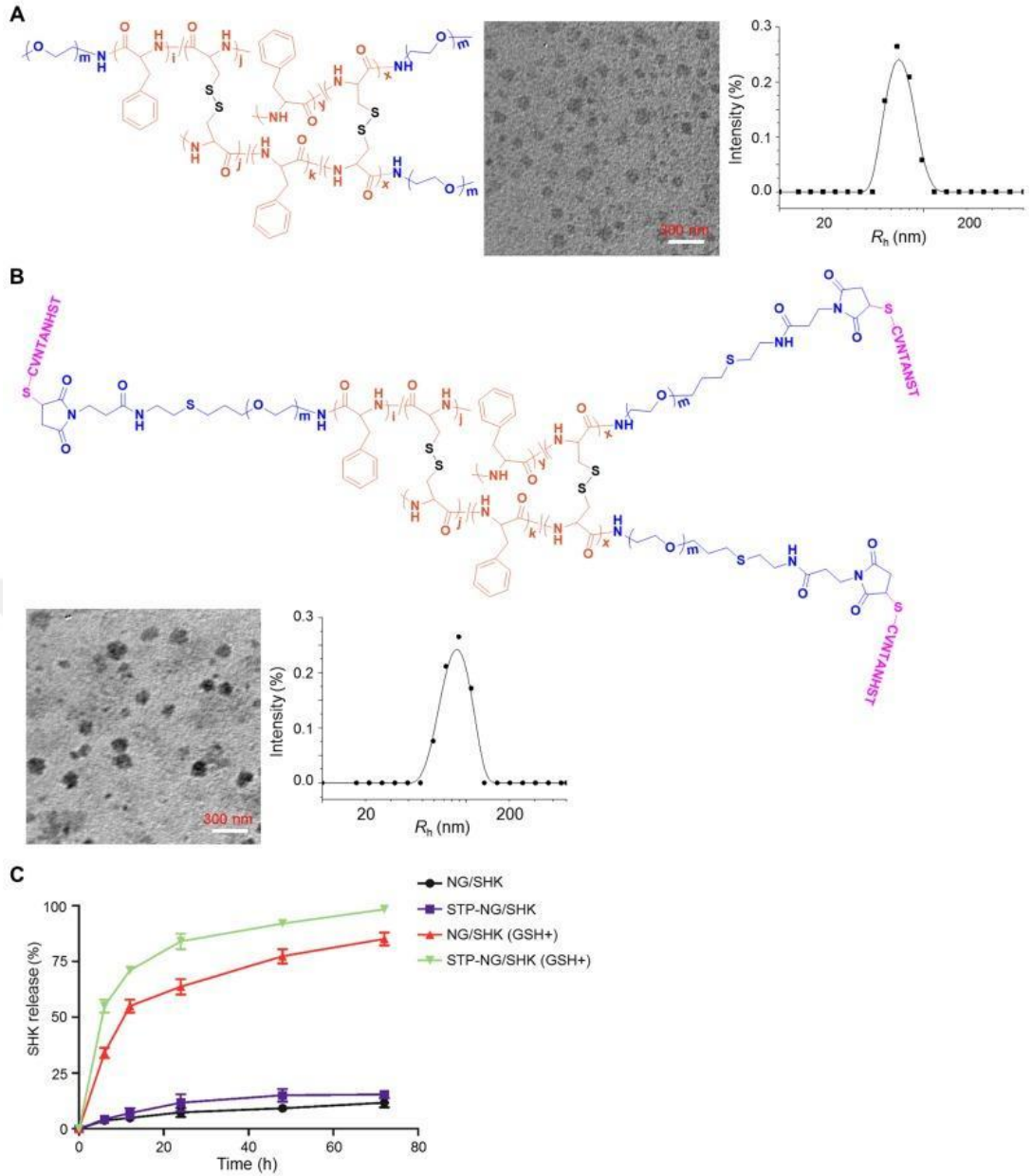
Liu ve arkadaşları, tümör hedefleyici peptit takılı, doksorubisin (DOX) yüklü mPEG-P (Phe-co-Cys) nanopartiküllerini, fenilalanin ve sistein amino asidinin halka açma polimerizasyonu yoluyla oluşturulmuştur. Sentetik kopolimerlerin su ortamında poliamino asitlerle kendi kendine birleşmesiyle bu nanopartiküller oluşturulmuştur. Yeterli parçacık boyutuna, iyi biyouyumluluğa, biyogüvenliğe ve stabilizeye sahip küresel nanoparçacıklar elde edilmiştir. İlaç salım stratejisi olarak nanopartiküldeki difülfid bağlarının osteosarkom mikro ortamındaki yüksek glutatyon (GSH) seviyelerinde parçalanması planlanmıştır. Hazırlanan serbest DOX, mNPs/DOX ve STP-mNPs/DOX'un sitotoksitesi, MTT testinde CT26 hücreleri kullanılarak gösterilmiştir. mNP'ler/DOX ve STP-mNP'ler/DOX ile tedavi edilen grupta, GSH içeren PBS çözeltisi ile kültüre edilen hücrelerin hücre canlılığı, tek başına PBS veya BSO PBS çözeltisi ile kültürlenen hücrelerinkinden önemli ölçüde daha düşük gözlenmiştir. Bu durum indirgeyici ortamda disülfid bağının başarıyla kırıldığı ve sitotoksitenin arttığı şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca tüm gruplara kıyasla STP-mNPs/DOX, GSH içeren PBS ortamında CT26 hücrelerine karşı en iyi sitotoksiteyi göstermiştir. In vivo çalışmalarda ise in situ kolon kanseri fare modeli üzerinde denenen nanopartiküllerde STP-mNPs/DOX ile tedavi edilen farelerin tümör boyutunun diğerlerinden önemli ölçüde daha az olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma neticesinde VATANST ile dekore edilmiş DOX yüklü nanopartiküllerin, gelişmiş geçirgenlik, uzun dolaşım süresi ve aktif tümör hedefleme özelliklere sahip olduğu ve gelişmiş geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisine de bağlı seçici olarak tümör dokularında biriktiğine karar verilmiştir [24].

Aynı sistemin osteosarkomda kullanıldığı bir başka çalışma ise Qui ve arkadaşları tarafından yapılmıştır [25]. 143B osteosarkom hücrelerinde denenen serbest DOX, NPs/DOX ve STP-NPs/DOX'un in vitro sitotoksite etkileri MTT analizi ile değerlendirilmiştir. F-DOX grubu ile karşılaştırıldığında, NPs/DOX ve STP-NPs/DOX gruplarının IC₅₀'si daha düşük (p<0.5) bulunmuştur. NP'ler/DOX ve STP-NP'ler/DOX grupları arasında IC₅₀'de anlamlı bir fark bulunmamıştır, aynı konsantrasyonda NP'lerin/DOX ve STP-NP'lerin/DOX'un 143B osteosarkom hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etme yeteneklerinde çok az fark yarattığı göstermiştir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 : Osteosarkomu tedavi etmek için tümör hedefleyici peptit ile dekore edilmiş polipeptit nanopartiküllerinin doksorubisin ile uygulanması [25].

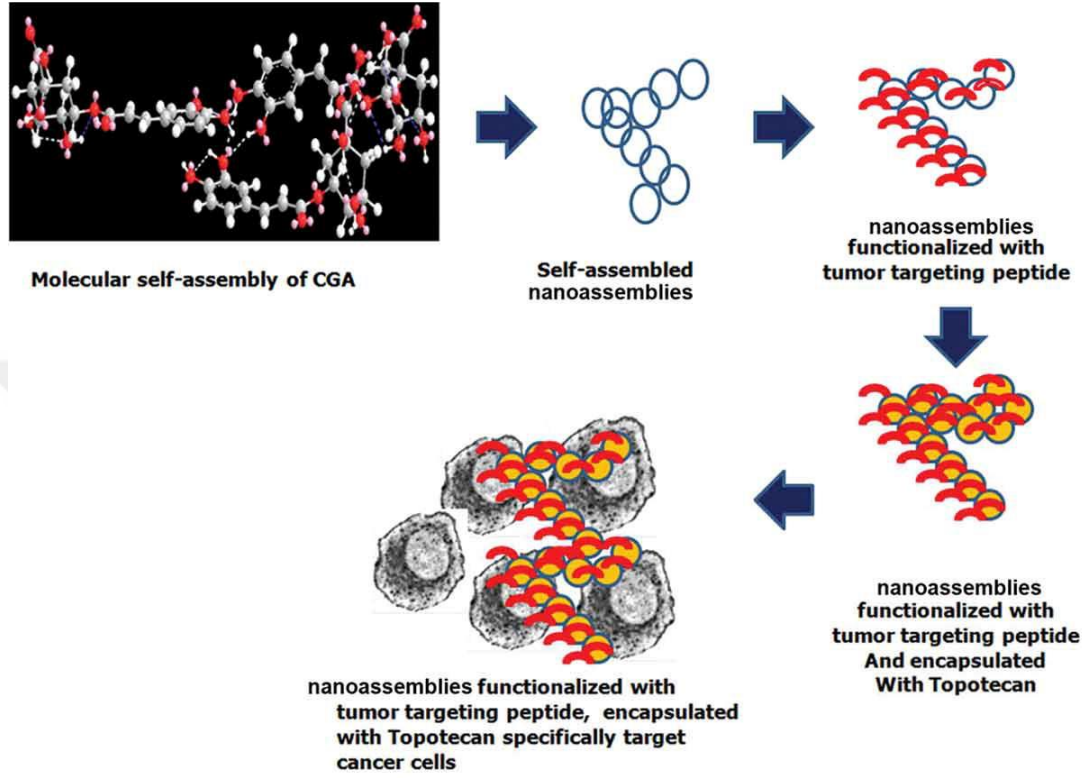
Li ve ark. Şikonin yüklü maleimid ile hedefleyici peptid bağlanmış STP-NG / SHK polipeptid nanojel formülasyonu geliştirmişlerdir (Şekil 1.5) [26]. Yapıdaki peptid maleimid bağı ile kimyasal olarak bağlanırken, SHK maddesi sıralı dispersiyon ve diyaliz yöntemi kullanılarak nanojellere gömülmüştür. Antikanser mekanizmanın nekrotoz üzerinden yürümesi için aşırı toksisitenin önüne geçmek hedeflenmiştir. İntravenöz enjeksiyondan sonra, STP-NG/SHK, tümör büyümesini etkili bir şekilde baskılamış ve pulmoner metastazı azaltmış, serbest SHK veya hedeflenmemiş NG/SHK'ya kıyasla daha fazla tümör nekrozu ortaya koymuştur. Ayrıca, NG / SHK veya STP-NG / SHK uygulaması, serbest SHK'nın aksine düşük sistemik toksisiteyi gösteren sağlıklı organlar için toksisite göstermemiştir. Sonuç olarak tasarlanan sistem, STP nin nekrotoz mekanizmasına dayalı etkisiyle hücre içi ilaç taşınmasını, akciğer metastazlarının in vivo azaltılmasını sağlamış ve güçlü anti-osteosarkom aktivite göstermiştir [26].



Şekil 1.5 : Sarkom Hedefleyici Peptit ile Dekore Edilmiş Shikonin Yüklü Polipeptit Nanojel: hücre içinde yukarı regüle edilmiş osteosarkom nekrotozu ve azalmış pulmoner metastaz [26].

Sortino ve arkadaşlarının çalışmasında kullandığı VNTANST sekansının içeren (tam sekans: AVNTANSTGSLVHC) daha uzun peptid zincirinde polimere bağlamak için farklı bir strateji izlemiştir (Şekil 1.5). Peptide sistein uç amino asidi eklenmiş, tiyol grup aracılığıyla bağlanma gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı sistemler nanoveziküller ve nanofibriller olmak üzere farklı yapılardan oluşmaktadır. Son aşamada yapıya topotekan enkapsüle edilerek karakterize edilmiştir. İlaç salım deneyine göre, başlangıçta patlama ile ilaç serbestleşmesi ve ardından oluşan nanofibriller yapılar için 140 dakika boyunca sürekli serbestleşme gözlenmiştir. Nanoveziküller ise ilacı daha

yavaş serbestleştirmiştir. Hücre proliferasyon çalışmalarında, kondrositler büyümeye devam ederken, tümör hücrelerinin kabarcıklanma gösterdiği ve ilaç yüklü nanoyapıların varlığında proliferasyonlarının önemli ölçüde azaldığını göstermiştir [27].



Şekil 1.6 : Tümörojenik hücreleri hedeflemek için peptit konjuge klorojenik asit nanomontajlarının geliştirilmesi [27].

Tüm bu hedefleyici moleküller incelendiğinde bazılarının ilaç taşıyıcı sistemlerde daha çok tercih edildiğini ve çalışmalarını bu yönde yoğunlaştığını görmekteyiz. Bu noktada bu moleküllerin taşıyıcı sistemlere uygunluğu, amino asit sekansı ve peptid boyutu, sentezlenme veya izolasyon maliyeti ve biyolojik moleküllerin stabilite problemlerinin olduğu göz önünde bulundurmaktadır. Tablo 1.3, Gao ve arkadaşlarının derlediği çeşitli kemik hedefleme stratejilerine yönelik tasarlanmış olan nanotaşıyıcı ilaç sistemlerine ait bir özeti içermektedir [15]. Orjinal tabloyu geliştirmek adına ayrıca çeşitli özgün çalışmalardan örnekler de eklenmiştir.

Tablo 1.3 Kemik tümörü hedefli ilaç taşıyıcı nanopartiküllere örnekler [15].

Hedefleme ligandı	İlaç	Nano taşıyıcı	Terapötik ajan	Uygulama ve model	Hedefleme verimliliği	Ref
Bifosfonat	Alendronat (ALN)	PLGA	Bortezomib	Farelerde multipl miyelom kemoterapisi	9.6 kat artmış kemik birikimi	[15]
		PLGA	Kurkumin ve bortezomib	Farelerde meme kanseri kemik metastazı kombinasyon tedavisi	~5 kat artmış omurga birikimi	[15]
		Lipozom	Doksorubisin	Farelerde meme kanseri kemik metastazı kemoterapisi	3.7 kat artmış tümör birikimi	[15]
		PDA	SN38 ve PDA	Farelerde meme kanseri kemik metastazı kombinasyon tedavisi	tümörlü tibiada ~ 3 kat artmış birikim	[15]
		katmanlı nanokapsül	Doksorubisin	Farelerde osteosarkom kemoterapisi	–	[15]
	Zolendronat (ZOL)	PLGA	Dosetaksel	Farelerde kemik metastazı kemoterapisi	50 kat artmış tümörlü kemik birikimi	[15]
		MSN	Altın nanoçubuklar ve ZOL	Farelerde meme kanseri kemik metastazı kombinasyon tedavisi	4 saat içinde hızlı bir şekilde kemik bölgelerine hedefleme	[15]
		MSN	Plumbagin ve ZOL	Farelerde meme kanseri kemik metastazı kombinasyon tedavisi	–	[15]
	Pamidronat	PLA	Doksorubisin	Farelerde ve köpeklerde osteosarkom kemoterapisi	~2 kat artmış intratümöral birikim	[15]
	Bp analogları	DendritikALN	Paklitaksel	Farelerde meme kanseri kemik metastazı kemoterapisi	~ 2 kat artmış tümör birikimi	[15]
			Fitik asit ve platin nano partikülleri	Farelerde akciğer kanseri kemik metastazı kombinasyon tedavisi	tümöröz tibiada 5 kat artmış birikim	[15]

Tablo 1.3 (devam) Kemik tümörü hedefli ilaç taşıyıcı nanopartiküllere örnekler [15].

Hedefleme ligandı	İlaç	Nano taşıyıcı	Terapötik ajan	Uygulama ve model	Hedefleme verimliliği	Ref
Karboksilat bakımından zengin peptitler ve malzemeler	D8	–	DPCN	Farelerde meme kanseri kemik metastazının fototermal tedavisi	tümöröz tibiada 5 kat artmış birikim	[15]
	Karboksil sonlu dendrimer	Dendrimer	Platin nano partiküller	Farelerde meme kanseri kemik metastazının fototermal tedavisi	tümöröz tibiada 10 kattan fazla birikim	[15]
Antikor	ALCAM antikoru	Lipozom	Doksorubisin	Osteosarkom hücrelerinin in vitro kemoterapisi	–	[15]
	EphA2 hedefli peptit	Lipozom	Doksorubisin ve JIP1 siRNA	Osteosarkom hücrelerinin in vitro kombinasyon tedavisi	–	[15]
	CXCR1 hedefleme peptidi)	MSN	Cisplatin	Farelerde osteosarkom kemoterapisi	Hedeflenmemiş kontrole kıyasla tümörler içinde daha yüksek dağılımlar (% 10.04'e karşı% 7.42)	[15]
	SDSSD	Misel	anti-miR-214	Farelerde osteoporoz tedavisi	Kemik mikromimarisinde düzelme ve kemik oluşumunda artış	[16]
	VATANST	Nanopartikül	Doksorubisin	Farelerde ortotopik kolon kanseri kemoterapisi	Hedeflenmiş nanopartiküllerin tümör doku birikimi kontrole kıyasla daha yüksek	[21]
	VNTANST	Nanojel	Shikonin	143B osteosarkom taşıyan fareler	Hedeflenmemiş kontrole kıyasla etkili tümör supresyonu, daha az akciğer metastazı, daha düşük sistemik toksisite	[26]
Aptamerler	PSMA aptamer	Atelo-kollajen	miR-15a ve miR-16-1	Farelerde prostat kanseri kemik metastazının gen tedavisi	PSMA aşırı eksprese eden hücrede 5.4 kat artmış lusiferaz aktivitesi	[15]

Tablo 1.3 (devam) Kemik tümörü hedefli ilaç taşıyıcı nanopartiküllere örnekler [15].

Hedefleme ligandı	İlaç	Nano taşıyıcı	Terapötik ajan	Uygulama ve model	Hedefleme verimliliği	Ref
Diğer	CD133 aptamer	Lipozom	All-trans retinoik asit	Farelerde osteosarkom kemoterapisi	CD133+ hücrelerinde ~ 2 kat artmış lusiferaz aktivitesi	[15]
		PLGA	Salinomisin	Farelerde osteosarkom kemoterapisi	CD133+ hücrelerinde ~ 2 kat artmış lusiferaz aktivitesi	[15]
	CD133 aptamer ve EGFR aptamer ALN ve	Lipozom	Salinomisin	Farelerde osteosarkom kemoterapisi	Osteosarkom hücrelerinde 3-4 kat artmış lusiferaz aktivitesi	[15]
	hyaluronik asit (CD44'ü hedefleyen)	Polimer	Doksorubisin	Farelerde meme kanseri kemik metastazı kemoterapisi	~4 kat artmış tümör birikimi	[15]
		Lipozom	Doksorubisin	Farelerde osteosarkom kemoterapisi	–	[15]
	Hyaluronik asit	Polimer	Doksorubisin ve sisplatin	Farelerde osteosarkom kemoterapisi	1.6-1.7 kat artmış tümör birikimi	[15]

1.3 İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaç taşıyıcı sistem (İTS), insanlarda görüntüleme, teşhis ve tedavi amacıyla çeşitli organik/inorganik bileşiklerin etkili ve verimli bir şekilde uygulanması için kullanılan son teknoloji yöntemlerdir. Geçmişten bugüne kontrollü ilaç salım sistemleri ve genel olarak ilaç taşıyıcı sistemler hızla değişmekte, günümüzde ve gelecekte kişiye özgü tedavilerin odak noktası olduğu görülmektedir (Şekil 1.6) [28]. Bu sistemler, ilaçların vücutta belirli bölgelere salınmasını ve hedeflenmesini sağlamanın yanı sıra ilaç terapötik dozunu optimize etmek, hasta uyuncunu arttırmak ve yan etkileri minimuma indirmek için tasarlanmaktadır. Çeşitli İTSler oral, parenteral, inhalasyon, transdermal gibi uygulama yollar ile implant gibi uzun süre kullanıma uygun şekilde uyarlanabilen çeşitli formülasyonlardan oluşur. Bu formülasyonlara örnek olarak misel, lipozom, nanopartikül, iskeleler ve polimerik sistemler verilebilir. Bir İTS tasarlarken amaç genellikle ilacın terapötik aralıkta istenilen yerde, istenilen zamanda salım yapması iken, yan etkilerin azaltılması, uygulama sıklığının azaltılması ve daha az etkin madde ile konvansiyel tedaviye göre daha etkili bir tedavi ortaya koyması beklenir. En sık tercih edilen uygulama alanları kronik hastalıkların uzun süreli tedavisinde, biyoteknolojik ilaçların ve aşılarda uygulanması sayılabilir. Kanser kemoterapisinde uzun yıllardır kullanılan ancak yan etkilerinden ötürü doz kısıtlaması bulunan konvansiyonel ilaçların yeniden formüle edilmesi, hassas ve pahalı biyolojiklerin (protein, peptid, gen vb.) tedavi amacıyla kullanımının kolaylaştırılması, RNA bazlı aşılama çalışmalarda İTSler özellikle odak noktasındadır. İTSlerin vadettiği tüm bu potansiyel uygulamalar öncelikle küçük ölçekli değerlendirmeli biyoyoumluluk, etkin madde taşıma kapasitesi, ilaç salım profili ve in vitro değerlendirme (vd.) analizler kapsamlı bir şekilde yapılmalı ve formülasyonun uygulanabilirliği de iyi anlaşılmalıdır [29].

Farklı kaynaklara göre farklı şekilde kategorize edilebilen İTSlerde öncelikle kontrollü ve kontrolsüz olarak bahsedilebilir [30]. Kontrolsüz salım yapanlar için salım hızı, taşıyıcı malzemenin fiziksel ve kimyasal özellikleri belirleyicidir. Kontrollü salım yapan sistemlerde ise taşıyıcının yapısı haricinde ortam pH'sı, sıcaklık, ışık şiddeti gibi çevresel koşullarla etkileşimi de salım hızı üzerinde etkilidir. Kontrolsüz salım yapan bir sistem kontrollü salım yapan bir sisteme dönüştürülebilir.

Yeni gelişmelerle birlikte taşıyıcı sistemler diagnostik ve terapötik amaçlarla çeşitli hastalıklara klasik ilaçlı tedavilerden daha etkili olma potansiyeli göstermektedir. Yüzey alanı geniş ve stabil taşıyıcı yapıların hidrofilik/hidrofobik ilaçların aynı anda taşınması, ilaç biyoyararlanımını ve ilaç salım profilini arttırmak gibi etkileri mevcuttur. Yaygın bilinen nanopartiküller, dendrimerler, miseller, lipozomlar, karbon bazlı nanotaşıyıcılar ve metalik nanopartiküller sıklıkla kullanılmaktadır [4].



Şekil 1.7 : 1950'den beri kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerin gelişimi [28].

1.3.1 Nanopartiküller

Nanopartiküller(NP) çok çeşitli yapılardan oluşturulabilen (metalik, polimerik, silika, katı lipid vb.) 100 nm den küçük nano boyutlu parçacıklardır. Sıklıkla kovalent bağlanmış ilaç moleküllerinin hedeflenen bölgelere taşınması, kontrollü ilaç salımı veya biyoyararlanımının artırılması amacıyla kullanılırlar [31].

İstenen dokuda maksimum ilaç salınımının sağlanması, farmakokinetik parametreler üzerindeki olumlu etkisi, hassas ilaç moleküllerinin stabilitesinin artırılması, aynı anda farklı yapıdaki moleküllerin birden taşınabilir olması, istenmeyen hedeflerden uzak durması gibi avantajları mevcuttur. Ayrıca çeşitli dış uyaranlara cevap vererek kontrollü ilaç salımı sağlaması da sıklıkla nanopartiküllerin tercih edilme sebebidir. Klinik kullanımda olan terapötikler arasında Abraxane® (paklitaksel yüklü albumin NP, Celgene, Summit, NJ), AmBisome® (lipozomal amfoterisin B, Gilead, Foster City, CA), ve Doxil® (PEGlenmiş, l® doksorubisin-yüklü lipozom, Janssen Biotech, Inc., Horsham, PA) sayılabilir [32].

1.3.2 Dendrimerler

Dendrimerler, arboroller veya kaskad molekülleri, farmasötik, biyomedikal uygulamalarda kullanılan monodispers, küresel şekilli, yüksek derecede dallanmış, yüzeyi modifiye edilebilir yapılara sahip polimerlerdir ve özellikle hedefe yönelik ilaç, DNA veya biyomolekül taşıma için kullanılan bir yöntemdir [33,34].

Üç yapı biriminden oluşurlar: merkezde tek veya çok atomlu bir çekirdek, ortada tekrar eden monomerleri üniteleri ve yüzeyde fonksiyonel gruplar. Çekirdek, çok parçalı dendrimer yapısını içeriden sabitleyen amino, hidroksi veya karboksi fonksiyonel gruplara sahip bir moleküldür. Her dallanma ile tekrarlanan monomer tabakası numaralandırılır ve 'jenerasyon' olarak adlandırılır. Dallanma birimleri en az üç fonksiyonel gruba sahip organik bileşiklerdir. Birimler bir uçtan çekirdeğe veya bir önceki jenerasyona bağlanır. Diğer iki koluyla da bir sonraki nesli oluşturmak için dallanarak polimerleşir. Çekirdek ile monomer arasındaki her bağlantı noktası kaskad olarak kabul edilir ve bu kaskad numaraları ile jenerasyon sayısı belirlenir. Bazı kaynaklar çekirdeği 'sıfır' (G0) nesli olarak tanımlar, çünkü merkezde kaskad noktası yoktur. İstisnai olarak peptit dendrimerlerinde (MAP'ler) polimerizasyon başlangıcı olarak Lizin ve aPAMAM 'Stardust' dendrimerinin amin grupları kullanılır ve sıfırıncı jenerasyon olarak numaralandırılır. Dendronlar, çekirdek içermeyen bir dendrimer parçasıdır, bunun yerine dallanma üniteleri yüzey modifikasyonları ile tek yönlü büyüme oluşturur [31,34,36].

1.3.3 Miseller

Miseller, genellikle amfifilik polimerlerin su ortamında kendiliğinden miselleşmesi ile oluşan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Polimerik miseller bir çekirdek ve kabuk kısmından oluşur. Çekirdek kısmı genellikle hidrofobik yapıda iken ve hidrofobik ilaçları enkapsüle edebilir. Dış kabuk ise misellerin sulu ortamda kararlı olması adına genellikle hidrofilik yapıdadır. Miseller bir veya birden fazla ilaç molekülünü aynı anda taşıyabilirken, çevresel uyaranlara duyarlı kontrollü salım mekanizmalarına uyarlanabilir veya doku hedefleyici ajanlarla modifiye edilebilir. Bu kendiliğinden birleşen misellerin boyutu, hidrofobik blokların uzunluğu değiştirilerek ayarlanabilir. Lipozomlarla karşılaştırıldığında, zayıf çözünen ajanlar için miseller daha uygun bir seçenek olabilir [37].

Osteosarkom tedavisi için farklı türde misellerin kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Fang ve arkadaşları, doksorubisin (DOX) taşıyan RGD peptidi ile modifiye

edilmiş PEG-blok-poli(trimetilen karbonat) (RGD-PEG-PTMC) amfifilik biyoparçalanabilir blok kopolimerlerini sentezlemiştir. Bu polimer kendiliğinden misel oluşturarak osteosarkom hedefli bir ilaç taşıyıcı sistem olarak misel karakterizasyonu, *in vitro* salım deneyleri yapılmış ve sitotoksitesi MG-63 ve MNNG/HOS osteosarkom hücre hatlarında denenmiştir. %57-73 ilaç yükleme kapasitesi hesaplanmış, DOX yüklenme miktarına bağlı olarak 46 - 73 nm arasında değişen ortalama boyuta sahip dar bir boyut dağılım ($PDI=0.05-0.12$) gözlenmiştir. RGD-DOX-PM'den DOX salınım miktarı, fizyolojik koşullar altında 60 saat içinde %63 olmuştur. MTT analizleri neticesinde, RGD-DOX-PM'nin yarı-maksimum inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değerinin, RGD siz (DOX-PM)'den çok daha düşük bulunmuştur. Bu veriler neticesinde RGD peptidle modifiye edilmiş nanopartiküllerin hücre hedefleme yeteneğini artırdığını ve daha etkili anti-tümör etkisine yol açtığını göstermektedir [38].

Stewart A. Low ve arkadaşları, osteosarkom tedavisi için gene DOX yüklü ancak bu sefer kemik hedefleme ajanı olarak hidrofilik D-aspartik asit oktapeptit kullanmıştır. DOX, asit duyarlı bir hidrazon bağı yoluyla yüklenmiştir ve hidrofobik yapısı sayesinde misel çekirdeğinde konumlanmıştır. DOX ile aspartik asit oktapeptit arasına 11-aminoundekanoik asit (AUA) eklenerek hidrofobik/hidrofilik denge üzerine farklı miseller oluşturulmuş ve karakterize edilmiştir. Misellerin hidroksiapatite hızlı bir şekilde adsorbe olduğu gözlenmiş, pH 5.5'te ilaç salımı mevcutken pH 7.4'te gözlenmediği, ve bununla ilişkili olarak da SAOS-2 osteosarkom hücre hattında benzer sonuçlar elde edilmiştir [39].

Uchino ve arkadaşlarının çalışmasında polimer-metal kompleksi oluşturmak suretiyle cisplatin yüklü polietilen glikol poli(glutamik asit) blok kopolimer miselleri sentezlenmiştir. Elde edilen bu misellerin karakterizasyonu neticesinde 30 nm parçacık boyutu ve dar bir boyut aralığı olduğu gözlenmiştir. Miseller daha sonra *in vivo* çalışmalarda sıçanlar üzerinde denendiğinde, yapıdaki CDDP'nin antitümör aktivitesini koruduğunu, bir miktar karaciğer toksisitesi olsa da CDDP'ye bağlı nefrotoksosite ve nörotoksiteyi azalttığını göstermiştir [8].

Tüm bu örnekler ve literatürdeki sayısız diğer çalışma değerlendirildiğinde osteosarkoma yönelik olarak misel formülasyonlarının olumlu sonuçlar vadettiği, hazırlanmasının nispeten kolay oluşu bu alanda yapılacak çalışmaların yoğunlaşma sebeplerindendir.

1.3.4 Lipozomlar

Lipozomlar birkaç lipit çift tabaka ile çevrili, ortasında hidrofilik bir boşluk bulunan küresel veziküler makromoleküler taşıyıcılardır. Lipozomlar tümöral doku damarlarındaki ekstrasvazasyon ile 'artmış geçirgenlik ve tutunma' etkisinden yararlanarak bu alanlarda lokalize olabilirler. Klinik kullanımda olan lipozomal doksorubisin örneği DOXIL de olduğu gibi, antikanser aktivitesinin korunması, kardiyotoksisite gibi yan etkilerde azalma, büyük ölçüde uzun kan dolaşımında kalma gibi avantajları mevcuttur. Yeni nesil lipozomlar ise biyolojik bileşenlerin taşınması veya ek hedeflendirme ünitelerinin eklenmesi gibi noktalara odaklanmaktadır [40].

Lipozomlar, katmanlı tabakası sayesinde farklı çözünürlüğe sahip ilaçların birlikte enkapsüle edilmesini mümkün kılarlar. Lipozom yapısındaki lipit çift tabaka hidrofobik ilaçların taşınması için idealken hidrofilik ilaçlar da merkezdeki sulu çekirdekte enkapsüle edilebilir. FDA tarafından kanser tedavisi için onaylanmış birçok lipozom formülasyonu osteosarkom da dahil olmak üzere farklı klinik denemelerden geçmiştir. Lipozomların avantajları arasında biyoyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirlik sayılabilir. Bunun haricinde çeşitli yüzey modifikasyonlarıyla hedefe spesifik, sistemik klirensi azalmış, dolaşım süresi uzatılmış ve kontrollü ilaç salımı gibi özellikler de kazandırılabilir [37].

1.3.5 Metalik nanopartiküller

Metalik nanotaşıyıcılar altın, gümüş ve bakır gibi saf metalik parçacıklar, çeşitli metal oksitler gibi metal iyonlarından veya kümelerden oluşan yapıların organik polimerler ile birleştirildiği hibrit yapılardır. Osteosarkoma yönelik ilaç taşıyıcı sistemlerde saf metalik nanopartiküller (genelde altın ve gümüş) sıklıkla tercih edilir. Bu partiküllerin yüzey alanı / hacim oranının büyük olması, stabil yapısı, kolay fonksiyonellendirme, kolay sentezlenebilme, yüksek geçirgenlik ve ilaç tutma kapasitesi dışında özgün olarak fototermal dönüşüm kabiliyetine bağlı fotodinamikterapi (PDT) mekanizmalarına elverişli olması nedeniyle özellikle altın nanopartiküllerin (AuNP'ler) kanser tedavisinde sıklıkla araştırıldığı görülmektedir [37].

Osteosarkom tedavisinde kullanılan bir diğer grup ise metalik oksit nanopartikülleridir. Bunlar kendi başına da kemoterapötik işlev gösterebilirler. Örneğin, titanyum dioksit (TiO_2), terbiyum oksit (Tb_2O_3), çinko oksit (ZnO) ve seryum oksit (CeO_2) nanopartiküllerinin anti-kanser etkisi osteosarkom hücrelerinde doğrulanmış olarak değerlendirilmiştir [41-43]. Ferroferrik oksit (Fe_3O_4) gibi demir

oksit nanopartikülleri de osteosarkomda superparamanyetik kabiliyeti nedeniyle osteosarkomda kullanılmaktadır [44]. Demir oksidin manyetizmaya bağlı ısı üretme özellikleri, harici bir manyetik alan altında yüklü kargoların hücresel alımını artırabilir. Ancak Fe₃O₄ nanopartiküllerinin biyolojik koşullarda topaklanma eğilimi gösterdiği bildirilmiştir, dolayısıyla nanopartiküllerinin yüzeyini değiştirmek gerekmektedir [4,37].

1.3.6 Redoks duyarlı nanotaşıyıcılar

Osteosarkom tedavisinde uyaranla cevap veren ilaç taşıyıcı sistemler antikanser ilaç taşıyıcı sistem tasarımları arasında en çok rağbet gören redoks duyarlı sistemlerdir. Bu sistemlerde tümör mikroçevre asiditesi veya enzimler gibi çeşitli dış faktörler uyaran olarak kullanılabilir [4].

Örnek bir çalışmada Feng ve ark. ikili hedefleme stratejisine sahip redoks parçalanabilir, kemik ve farklılaşma kümesi 44 (CD44) hedefli bir lipozom sistemi ortaya koymuşlardır. Burada, RGD peptidi ile tümöre nüfuz etme, hyaluronik asit eklenmesi ile CD44 ligandı olma özelliği kazandırılmıştır. Daha sonra doksorubisin yüklenmiş DSPE-PEG2000- COOH ile bu hedefleyici gruplar (-SS-) disülfid bağı ile birleştirilmiştir. Bu parçaların çeşitli kombinasyonları ile elde edilen parçacıklar arasında ALN-HA-SS-L-L, -26.07 ± 0.32 mV'luk bir zeta potansiyeli değeri gözlenirken ve kanser hücrelerindeki indirgeyici 10 mM glutatyon varlığında seçici olarak parçalanmıştır.

ALN-HA-SS-L-L / DOX diğer lipozomlar ile karşılaştırıldığında, insan OS MG-63 hücrelerinde önemli ölçüde daha yüksek sitotoksik etki oluşturmuştur. *Yapılan in vivo* çalışmalarda ise ortotopik OS nude fare modellerinde, aynı parçacık tümör büyümesi baskılanması ve sağkalım süresi üzerinde dikkate değer bir artış göstermiştir. Hedefleyici iRGD peptid de yapıya dahil edildiğinde bu sonuçların daha da iyileştirilebildiği gözlenmiştir [45].

1.3.7 İnorganik nanotaşıyıcılar

Antikanser tedavisinde inorganik ve/veya organik maddelere dayalı ilaç taşıyıcı sistemler de diğerlerinde olduğu gibi biyoyararlanımın, farmakokinetiğin iyileştirilmesi ve tümör bölgesinde yüklü bir antikanser ajanının özel olarak salınması, ilaçların terapötik etkinliğinin artması gibi amaçlarla sentezlenmektedir. Kemik doku için, kalsiyum fosfat (CaP), kalsiyum karbonat (CaCO₃), mezogözenekli silika (MS)

ve seryum oksit (CeO_2), bazlı taşıyıcı sistemlerin en çok kullanılan inorganik malzemelerdir [4].

CaCO_3 mineralinin mikropartikül, nanopartikül veya mikroküre şeklindeki formülasyonları ve çeşitli hibrit teknolojiler de dahil özellikle biyolojik bozunması yavaşlamış, pH duyarlılığı yüksek, iyi biyouyumluluk gösteren, osteoiletken ve kontrolü ilaç salınımı gibi özelliklere sahiptir.

CaP/CaCO_3 hibrit nanomalzemeleri çeşitli özgün karakteristikleri sayesinde çeşitli üstünlükler taşıyabilir. Bu özelliklerden biri de Ca^{2+} iyonlarının tümör mikro çevresine özgü asidik pH değerinde hassas hale gelirken fizyolojik koşullarda stabilitesini korumasıdır, böylece mikro ortamda iyonları ve CO_2 'yi serbest bırakır.

Başka bir norganik materyal olan CeO_2 , hücre içi ve hücre dışı düzeyde pH değişimine bağlı olarak ROS temizleme ve üretme etkisi gösterir. CeO_2 fizyolojik pH'ta (7.4) ROS'u temizleme yeteneğine sahipken, tümör mikro çevresindeki asidik pH'da (6.0) ROS üretir bu sebeple de kansere yönelik çalışmalarda tercih edilebilir.

Mezoporöz silika nanopartikülleri (MSN) ise, tek tip morfolojisi, ayarlanabilir partikül ve gözenek boyutu, büyük yüzey alanı, yüzey modifikasyonuna açık olması ve FDA tarafından biyogüvenli olarak tanınması nedeniyle iyi bir taşıyıcıdır. Gözenekli yapı, yüksek ilaç yükleme kapasitesi ve modifiye edilebilirlik kazandırır. Gözenekler, çeşitli uyarılara (sıcaklık, enzim, ışık, pH vb.) duyarlı olarak hedef bölgeye ulaştığında açılabilir. pH'a duyarlı MSN'ler, özellikle antikanser ilaçları tümör dokuda salmak için idealdir [37, 46].

Xu ve ark. HA-PEG den oluşan polimer kabuk ve nano hidroksiapatit çekirdekten oluşan zolendronik asit yüklü hibrit nanopartiküller sentezlemiştir. Bu hibrit nanopartiküller, yüksek ilaç yükleme kapasitesi, özel ilaç salınımı ve mükemmel biyouyumluluk göstermiştir. Ayrıca, *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar, normalde yan etki profili yüksek olan zolendronik asidin, düşük dozda yüklü olduğu nanopartikül formülasyonunun düşük sitotoksite göstermiştir. Zolendronik asidin hücrelere zarar vermeden kemik dokuyu desteklemesi açısından bu istenilen bir durumdur [47].

1.3.8 Polimerik ilaç taşıyıcı sistemler

Polimerik ilaç taşıyıcı sistemler kontrollü salım sistemi olarak küçük boyutta olması, dokularla biyouyumluluk, biyobozunur özellik gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Bunların yanı sıra dolaşım sisteminde stabilitesini koruması, toksik olmayan, bağışıklık sistemini aktive etmeyen, retiküloendotelial sisteme takılmayan,

nötrofilleri aktive etmeyen polimerler de geliştirilebilmektedir. Bu sistemlerde ilaç molekülleri genellikle ya çeşitli modifikasyonlarla yapının yüzeyine yerleştirilir ya da yapının içine/ortasına enkapsülasyon ile hapsedilir [48].

1.3.8.1 Doğal polimerler

Kitozan deniz kabuklularından elde edilen kitin doğal karbonhidrat polimerinin modifiye edilmiş şeklidir. kitozan nanopartiküllerin eldesinde kullanılan yöntemlere iyonik jelleşme yöntemi, mikro emülsiyon yöntemi, emülsiyon solvent difüzyon yöntemi ve polielektrolit kompleksi yöntemidir.

İyonotropik jelleşme yöntemi için, Kitozan yapısındaki amin grubu ile tripolifosfat gibi negatif yüklü diğer polianyon grupları arasında elektrostatik etkileşimden faydalanılır. Kitozan, bir stabilize edici yardımıyla asetik asit içinde çözülür. Daha sonra polianyon ilave edilir, solüsyon uygun sıcaklıkta ve mekanik olarak karıştırılır. Bir süre sonra nanopartikül kendiliğinden oluşur. Mikroemülsiyon yönteminde, bir yüzey aktif madde n-hekzan gibi organik bir çözücü içinde çözülür. Daha sonra asetik asit çözeltisi içinde kitozan ve glutaraldehit, oda sıcaklığında sürekli karıştırılarak yüzey aktif madde/hekzan karışımına ilave edilir ve nanopartikül elde edilir. Polielektrolit kompleksi (PEC) veya kendi kendine birleşen polielektrolit, katyonik yüklü polimer ve plazmit DNA'nın kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluşan kompleksleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir. PEC oluşum mekanizması, katyonik polimer ve DNA arasında yük nötralizasyonunu içerir ve bu da polielektrolit oluşumu neticesinde hidrofilik özellik azalır. Yapılışı için asetik asit çözeltisi içinde kitozan çözülür. Daha sonra uygun sıcaklıkta mekanik olarak karıştırılırken içine DNA çözeltisi eklendiğinde nanopartiküller kendiliğinden oluşur [48].

Jelatin hem gıda hem de ilaçlarda kullanımı olan hayvansal kaynaklı bir polimer olan jelatin non-toksik biyobozunur biyoaktif ve ucuz olması sebebiyle tercih sebebidir. Poliiyonik yapısı, şişme ve termal özelliklerine ek olarak çapraz bağlanma yapar. Genelde iki şekilde elde edilir: Çözme/koaservasyon yöntemi veya emülsiyon yöntemi. İlk yöntemde homojen bir solüsyon içerisindeki polimer sıvı-sıvı faz ayrışmasına gider. Polimerce zengin faz altta toplanırken solüsyon üstte toplanır. Tuz veya alkol eklenmesiyle koaservasyon meydana gelir ve polimerin çapraz bağlanması suretiyle nanopartikül oluşur [48].

Biyomimetik stratejiler biyoyumlu iskeleler kurulması için oldukça önem arz etmektedir. İskelelerin morfolojisi ve kimyasal yapısı dışında mikro ortamdaki

moleküler etkileşimleri biyomimikriye etki eder. Hyaluronik asit, çapraz bağlama yaparak biyoaktif faktörleri enkapsüle etmek için sıklıkla tercih edilen bir doğal polimerdir. Biyoaktif moleküllerle yüklenme ve jelleşme kabiliyeti, metakrilat ile modifiye edilebilir veya diğer bileşenlerle çapraz bağlanarak yapısı değiştirilebilir. İlaç taşıyıcı özelliğinin yanı sıra kendi başına da hasarlı dokunun rejenerasyonu için de klinik kullanımı halihazırda mevcut olduğundan, iyi bir biyopolimer malzeme olarak yeni formülasyonlarda da kullanılabilir [4, 49].

Kemik ekstraselüler maktriksinin temel yapıtaşı olan tip I kollajenin, OS MG-63 hücrelerinde osteoblast ekspresyonunu teşvik etmektedir. Bu da kemik hastalıklarında görülen bozulmuş kemik yapım-yıkım döngüsüne olumlu bir yaklaşım sağlar. Kemik kanseri tedavisi özelinde kolajen bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı uzun zamandır çalışılmaktadır. İlaç yüklü formülasyonların efektif sonuçlar alındığı çeşitli makalelerle raporlanmaktadır [50].

Aljinik asit, karboksil grupları (COOH-) açısından zengin, doğal olarak oluşan bir polisakkarit polimer molekülüdür. Medikal uygulamaları arasında 3D biyobaskı teknolojisi, ilaç dağıtım sistemleri, tıbbi pansumanlar, hücre ve doku mühendisliği bulunur. Aljinat, belirli ligandları (peptitler ve şeker molekülleri) stabilize etmek, düşük/yüksek moleküler ağırlıklı molekül taşımak, yara iyileşmesini hızlandırmak, diğer biyomalzemeler ile çapraz bağlanmak suretiyle mekanik mukavemet, jelleşme özellikleri ve hücre afinitesi dahil olmak üzere yapısını ve özelliklerini değiştirebilir, bunun yanı sıra efektif bir taşıyıcı sistem görevi görebilir [51]. Örneğin Liu ve ark. geliştirdikleri sıcaklığa duyarlı aljinat-izopropil akrilamid (aljinat-PNIPAAm) hidrojeline DOX yüklü misellerle birleştirmişlerdir. Jelden misellerin in vitro salım verilerine göre, PBS tamponlu çözeltilerde devamlı ilaç salımı gözlenmiş, Aljinat-PNIPAAm enjekte edilebilir hidrojeller, in vitro hücresel deneylerde ilaca dirençli AT3B-1 hücreleri tarafından DOX alımını önemli ölçüde artırabilmiştir, kanser tedavisi bağlamında çoklu ilaç direncinin çözümü için bir alternatif sunmuştur [52].

1.3.8.2 Sentetik polimerler

FDA EMA gibi dünyadaki çeşitli sağlık otoritelerince onaylanmış olan çeşitli polimerler medikal teşhis ve tedaviler için geliştirilmekte ve güncel olarak nanoteknolojik ilaç sistemlerinde de kullanılmaktadır. En çok kullanılan fiziksel, kimyasal özellikleri ve biyolojik sistemlerdeki davranışları iyi bilinen sentetik polimerler poli(etilenglikol)(PEG), poli(laktik-co-glikolik asit)(PLGA),

poli(kaprolakton)(PCL), poli(laktik sit)(PLA) dır [48,9]. Bu polimerler ile tasarlanmış ilaç yüklü sistemler hali hazırda piyasada mevcuttur. Ayrıca yeni biyoyumlu polimerlerin geliştirilmesi ile bu alan büyümeye devam etmekte, yenilikçi tedavi yöntemleri ile birleştirilebilmekte dolayısıyla önemini korumaktadır.

1.3.8.2.1 Poli(etilen glikol) (PEG): PEG - ilaç ve peg- protein konjugatları

1990 larda piyasaya çıkan 3 ilaç Zinostatin stimalmer, PEG-adenozin deaminaz(Adagen®) ve PEG-asparaginaz (Oncaspar®) polimer terapötik ilaçlarda öncü kabul edilir. Daha sonra gelen PEG-interferon konjugatları PEG-Intron ve PEG-ASYS, hepatit C tedavisinde geniş bir yankı uyandırmıştır. Bu ilaçlardan sonra PEGilasyon çalışmaları, çoğunlukla iyi anlaşılmış ve günümüzde kabul gören bir polimer bazlı taşıma yöntemi olmuştur. Genelde 1:1'lik sabit bir ilaç-polimer yükleme oranı uygulanır. Geniş bir hastalık skalasında çalışılabilir olduğundan hem yaygın tedavileri iyileştirmek hem de yeni tedaviler geliştirmek amacıyla sıklıkla tercih edilir. Uygulama yolları da (parenteral transdermal oral vb.) çeşitlilik göstermektedir.

Poli-d,l-laktid-co-glikolid (PLGA) FDA onaylı insanda ve nanoilaç kullanıma uygun bir polimerdir. Biyobozunur özellik göstermesi beklenen polimerik sistemlerde en çok kullanılan polimerlerden birisidir. İlaç/protein/peptid taşıma ve hedeflendirme, nano-aşı uygulaması, polimerik taşıyıcılı gen tedavisi gibi amaçlarla yaygın kullanılan bir nanotaşıyıcıdır. Vücutta metabolize olduğunda doğal amino asitler olan laktik asit ve glikolik asit ürünlerini verdiğinden biyolojik ortam ile geçimlidir ve toksisite gelişme riski çok düşüktür. PLGA geliştirilirken yöntem üzerinde yapılan yüzey modifikasyonu ilaç yükleme yöntemi partikül boyutu yardımcı maddeler ilaın moleköl ağırlığı ve monomer (laktik asit, glikolik asit) oranı polimerin ilaç salım profili üzerinde değişiklik yapılmasına olanak verir. Asidik yapıdaki monomerlerinden ötürü düşük pH ya hassas ilaçların ve biyolojik moleküllerin taşınmasında sorun yaratabilir. Buna da çözüm olarak farklı polimerlerle (aljinat, kitozan, pektin, polivinilalkol, poliortoester, polipropilenfumarat gibi) kombine edilmesi bir çözüm olabilir. Elde edilme yöntemleri arasında emülsiyon-difüzyon yöntemi, çözücü-emülsiyon buharlaştırma, arayüzey birikimi, nanoçöktürme sıklıkla kullanılır. Çözücü buharlaştırma metodunda uygun solventte çözölen polimer karışmakta olan su fazına aktarılır ve sonike edilir. Su fazına stabilizatör veya emülsifiye edici eklenir. Emülsiyon-difüzyon metodu, polimer organik solventlerde çözöldükten sonra stabilizanlar aracılığıyla sulu fazda toplanır ve homojenizatör aracılığıyla emülsifiye

edilir. Arayüzey birikimi metodu ise genellikle nanokapsül ve küre yapımında kullanılır. Nanopartiküller su fazı ile su ile karışabilen organik solvent arasındaki arayüzeyde oluşur. Oluşan nanopartiküller santrifüj ile ayrılarak toplanır. En çok kullanılan yöntem ise nanoçöktürme yöntemidir. Polimerler asetonunda çözüldükten sonra devamlı olarak karışan su fazına damlatılır. Devamında organik faz buharlaştırılarak istenilen nanoyapı elde edilir [48].

PLGA-Cisplatin enkapsülasyonu bu iyi bilinen ilacın yaygın toksik etkilerini ortadan kaldırmak veya tolere edilebilir seviyelere indirmek amacıyla bir polimerik sisteme yerleştirilmesine bir örnektir. Hatalarda cisplatin kullanımda böbrek toksisitesi ve işitme kaybı sık rastlanan ve terapötik indeksinin dar olmasında rol oynayan faktörlerdir. Kemik hedefli cisplatin yüklü polimerik sistemler tasarlayan Si ve ark., Jing ve ark. ve Gao ve ark. çalışmalarında yalnız ilaç ile kıyaslandığında uzatılmış salım yapan sistem içerisinde CDDP' nin daha az toksisite gösterirken daha uzun süre tümör dokuyu baskıladığı gözlemlenmiştir [9,10,11].

PLGA-PEG-PLGA triblok kopolimer hidrojel sisteminde, SN(Oct)₂ katalizli halka açılma kopolimerizasyonu kullanılmıştır. CDDP ve doksorubisin birlikte yüklenen sistem için yapılan *in vitro* salım değerlendirmesinde ilk 2 gün patlama ile salım, takip eden 10 günde ise uzatılmış salım yaptığı gözlenmiştir. *in vivo* deneylerde de uzatılmış salım yapan hidrojeller uzun süreli tümör doku büyümesinde süpresyon etkisi göstermiştir [10].

Titanyum alüminyum alaşımlı PLGA-PEG-PLGA hidrojele yüklenmiş CDDP nin osteosarkoma karşı değerlendirildiği bir çalışmada ilk önce yapılan *in vitro* değerlendirmede 0.8-1.6 mg/ml lik ilaç konsantrasyonu sağlanmıştır. Ardından *in vivo* CDDP uygulaması ise tümör hacminde önemli üçte ikilik bir azalmaya (641.1 mm³'ten 201.4 mm³'e) yol açmış, minimal organ toksisitesi görülmüştür. Böylece cisplatinin sistemik verilmesiyle ilişkili zararlı etkiler ortadan kaldırılabilirken antitümöral etkisinin de korunabildiği kanıtlanmıştır [53].

CDDP-PLGA-PEG 4000 implantları direkt baskı yöntemi ile kuru tozların 4:5:1 oranında karıştırılması ile hazırlanmış, HPLC analizine göre %37.7 oranında CDDP yüklenmiştir. Hazırlanan *in vitro* salım deneyine göre ilk 10 saatte ilaç miktarının %25'i, 200 saat sonra %95 i salınmıştır. İmplantlar ayrıca fare kemik sarkoma modelinde denenmiş ve 1. gün %23, 5 gün %53, 25. gün %94 salım yapmıştır. Farelerde tümör dokudaki değişiklik polimer implant ve tek başına CDDP uygulaması

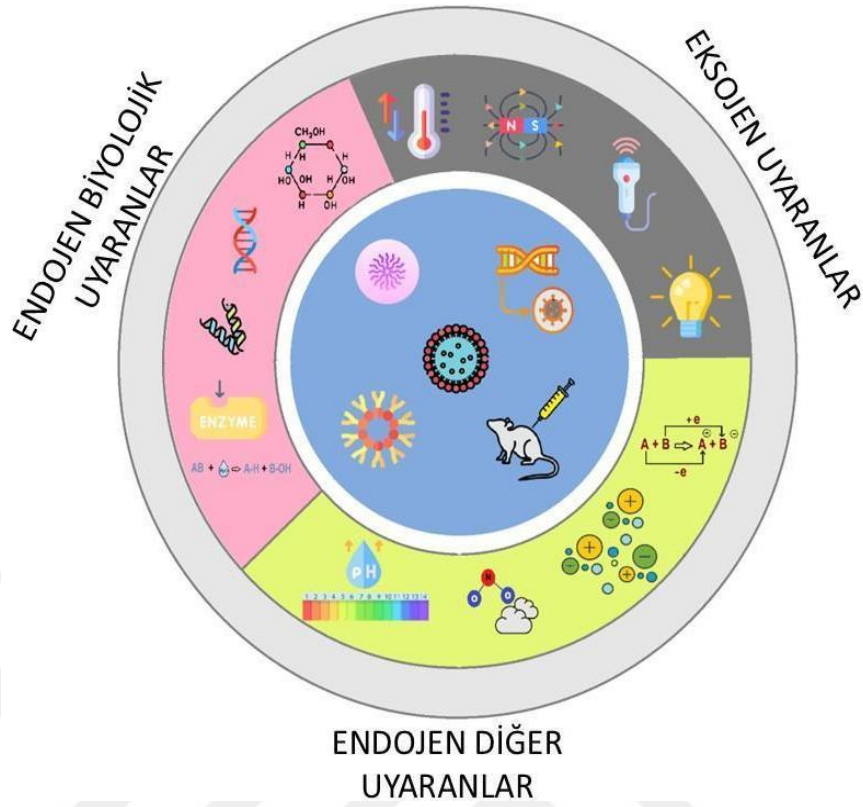
ile ayrıca karşılaştırıldığında, IV ilaç uygulanan tüm fareler ölürken, implant uygulananlarda 25. gün sonunda 1 fare hariç hepsi hayattadır [11].

Polilaktik asit (PLA) toksik olmayan laktik asit monomerlerine parçalanabilen biyouyumlu ve biyobozunur bir polimerdir. Açığa çıkan laktik asit daha sonra vücutta karbonhidrat metabolizmasında kullanılır. Üretim yöntemleri çözücü buharlaştırma, solvent uzaklaştırma, tuz ile çöktürme ve çözücü difüzyonu olmak üzere dört çeşittir. En sık kullanılan tuz ile çöktürme yöntemidir. Suda karışan çözücü ve su karışımına tuz eklendiği takdirde ayrılmakta ve nanosistem oluşmaktadır.

Polikaprolakton (PCL) hidrolize edildiğinde ester bağları kopar ve biyobozunur bir polimer olarak özellikle uzun dönem ilaç salım yapması istenen medikal cihaz gibi sistemlerin tasarlanmasında tercih edilir. Genellikle nanoçöktürme çözücü uzaklaştırma ve çözücü buharlaştırma yöntemleri ile hazırlanır [48].

1.3.8.3 Uyarı duyarlı polimerler

İlaç taşıyıcı sistemlerde hedefli ve kontrollü salım yapan biyomateryallerin kullanılması uyarılara duyarlı ilaç salım mekanizmaları ile mümkündür. Bunu sağlamak için ilaç molekülleri, polimere kimyasal, fiziksel veya biyolojik uyarılarla parçalanabilecek bir fonksiyonel grupta bağlanır. Sıcaklık, pH, çözücü, ultrasonik, elektrik alanı ve manyetik alan, duyarlı taşıyıcı sistemlerinin duyarlı olabildiği dış uyarılara örnektir (Şekil 1.7) [31, 54].



Şekil 1.8 : Uyarana duyarlı polimerik sistemlerde uyarıların sınıflandırılması. Ekzojen uyarılar: ışık, sıcaklık, manyetik alan, ultrason dalgaları. Endojen uyarılar ayrıca ikiye ayrılır. Biyolojik Uyarılar: DNA mekanizmaları, Şeker, Proteinler, Enzimatik aktivite, hidroliz. Diğer Uyarılar: pH değişikliği, Gazlar (nitrik oksit vs.), İyonlar, Redoks reaksiyonları. Bu sistemler biyolojik aktif maddeler, protein, genetik materyaller gibi çeşitli molekülleri taşıyabilir ve hedeflenen şekilde ve konumda aktive olarak salım yapabilirler.

Kimyasal uyarıların en başında sıklıkla kullanılan biyolojik ortamdaki pH değişiklikleri gelir. Bu değişikliklere bağlı olarak polimer zincirlerinde ilaç salımı tetikleyerek hedefli bir ilaç salımı gerçekleşir. Geleneksel olarak mide ve bağırsak ortamında radikal pH değişimleri gözlemlendiğinden ilacın veriliş yoluna ve etki göstermesi beklenen dokuya göre farklı stratejiler izlenebilir. Ayrıca iskemik tümör bölgeleri ve inflamatuvarlı dokular da düşük pH değerlerinin gözlemlendiği patolojik lokasyonlardır. Poliasit ve polibaz temelli polimerik sistemler asidik/bazik değişikliklerde kendiliğinden ilaç salması amacıyla kullanılmaktadır. Normal dokulardaki ekstrasellüler boşluğun pH değeri 7.4'tür. Katı tümörlerde ise kanserli hücrelerin hızlı bölünmesi ve büyümesi sırasında artan metabolizmayı karşılamak için artan glikoliz oranındaki yükselişe bağlı olarak pH 7.0'a düşer. Dolayısıyla kontrollü ilaç dağıtım sistemleri için, asidik pH, ilaç salımı için bir tetikleyici görevi görür [55].

pH uyarını, kullanıldığı polimerin özelliklerine göre hassas ilaç salınımı elde etmek için redoks ve sıcaklık dahil olmak üzere diğer uyaranlarla birleştirilebilir [31].

Antikanser ilaçların etkili bir şekilde verilmesi için, pH'a duyarlı nano sistemlerin fizyolojik pH'ta yapısında ilacı tutması ve stabilize etmesi, pH değeri istenen değişikliğe ulaştığında ise ilacı hızla serbest bırakması ve hücre içi ilaç konsantrasyonunun terapötik doza ulaşmasını sağlaması beklenir. Bunu sağlamak için yaygınca kullanılan iki yaklaşım mevcuttur. Bunlardan birisi iyonlaşabilir kimyasal gruplar (aminler, fosforik asitler ve karboksilik asitler gibi), diğeri ise asit duyarlı kimyasal bağlar (asetal, ortoester, hidrazon, imin ve cis-akonil bağları) dır. İyonlaşabilir kimyasal gruplar proton alıp verebilir, şişme oranı veya çözünürlük gibi fiziksel veya kimyasal özelliklerde değişikliklere uğrayabilir. Asit duyarlı kimyasal bağlarda ise ilaç molekülleri doğrudan mevcut nanotaşıyıcıların yüzeylerine kovalent olarak bağlanır. Bu asit-duyarlı kimyasal bağlar fizyolojik pH'ta stabildir, ancak tümör mikroçevresi gibi asidik bir ortamda bozunur veya hidrolize edilir [56].

Redoks reaksiyonlarına duyarlı polimateriyaller özellikle hücre içine ilaç taşınması amacıyla tasarlanan polimerler için idealdir. Özellikle hücre içi indükleyici glutatyona duyarlı mekanizmalarda, normal glutasyon hücre içi seviyesi 2-20 μM arası iken kanser hücrelerinde 2-10 μM arası seyretmesi etkilidir. Bir başka strateji ise hastalıklı dokularda biriken reaktif oksijen türlerinin konsantrasyonuna bağlı olarak doku hedefli ilaç salımı mümkün olabilir.

Enzimler inflamasyon bölgesinde enzim aracılı ilaç salınımının sağlanmasında kimyasal uyaran olarak kullanılabilir. Enzime duyarlı ilaç salım sistemlerini kullanırken karşılaşılan en büyük zorluk, sistemlerin ilk salınımının hassas bir şekilde kontrol edilmesi gerektiğidir. Bu noktada polimerin kimyasal yapısının iyi tasarlanması ve tümör spesifik enzimlerin antikanser ilaç salım stratejilerinde tercih edilmesi fayda gösterebilir.

Fiziksel uyaranlar arasında dışarıdan gelen bir ışık kaynağı ve buna bağlı başlayan bir ilaç salım kinetiği yer ve zaman planlı bir salım sistemine örnektir. Işığa duyarlı kimyasal bağlar aracılığıyla polimere bağlanan ilaç molekülleri ışık varlığında koparak ilacın serbestleşmesini sağlar. Bu yöntemde kısıtlayıcı bazı faktörler de mevcuttur. Bunlar arasında dokulardaki ışık geçirgenliğinin değişken olması, bazı koşullarda invaziv olarak derine inilmesi suretiyle ışıma yapılmasının gerekliliği sayılabilir.

Sıcaklık duyarlı polimerlerde LCST yani düşük kritik solüsyon sıcaklığı kavramından bahsedilir. Bu sıcaklık altında polimer çözünür, şişme eğiliminde ve ilaç yüklü

konumdadır. Bu sıcaklığın üstünde ise polimer büzüşür, yüklü olduğu ilacı ortama salar. Isıya duyarlı polimerler doğada toksik olan herhangi bir organik çözücünden kaçınabilir, hidrofilik/lipofilik ilaçları taşıyabilirler. Örnekler arasında poli(N-izopropil akrilamid) ve poli(metil vinil eter) verilebilir.

Manyetik duyarlı nanopartiküllerde polimere entegre edilmiş demir bazlı manyetik bir çekirdek kullanılır (ör: Fe_3O_4 ve $CoFe_2O_4$) Bu çekirdek, istenen dokuya hedeflenmiş ekstrenal bir yüksek frekanslı manyetik alan altında ısı açığa çıkartarak taşıyıcıdaki ilacın salınmasını tetikler [31].

1.3.8.4 Kemik doku metastazı ve osteosarkoma için polimerik ilaç taşıyıcı sistemler

Kanser hücreleri yakın dokulardaki uygun mikroçevrelere doğru metastaz yapma eğilimindedir. Kemik doku metastazları yaygın olarak, omurlar, pelvis bölgesi, kaburgalar ve uzun kemiklerin meta-epifiz bölgeleri gibi yüksek derecede vaskülarizasyon, trabeküler kemik içeriği ve kırmızı ilik aktivitesine sahip kemiklerde gözlenir. Özellikle kemik iliği, tümör hücresinin çoğalmasını kolaylaştıran büyüme faktörleri ve spesifik biyolojik komponentlerce zengin, metabolik olarak aktif bir dokudur [46].

Kemik dokusu meme, akciğer ve prostat kanseri için metastaza yatkın bir bölgedir. Bu durum primer kanserin yerine göre tam tersi yönde de olabilir: kemikten akciğere vb. [57]. İlerlemiş kanserli meme ve prostat kanseri hastalarının yaklaşık %70-80'inde kemik metastazı görülür [58].

Kemik dokuya yönelik kullanılabilecek nanotaşıyıcı sistemlerin çeşitliliği ortaya çok farklı stratejilerle donatılmış, özgün fiziksel ve kimyasal özellikleri olan yapılar koymaktadır. Bu yapıların birbirinden farklı avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Kemik dokuda sağlanmak istenen terapötik etki için en uygun konumun seçilmesi gerekmektedir. Kemik tümörleriyle birlikte kemik yapım-yıkım döngüsünün bozulmasına bağlı oluşan deformasyonu gidermek, kemik tümör hücrelerinde sinyal yollarının modifiye edilmesi, tümöral hücrelerde kimyasal veya fiziksel olarak sitotoksik etki gösterecek tedavi stratejileri gibi birçok strateji aslında taşıyıcı sistemin ekstraselüler matriks, intraselüler ortam, çekirdek veya tümör vasküler dokusu gibi noktalardan hangisine gideceğini önceden karar vermek gerekmektedir. Bu noktada kullanılan sistemin uygulama yolu, partikülün karakteristik özellikleri, boyutu, iyonik

yükü, ortam ile geçimliliği ve salım farmakokinetiği kritik önem taşımaktadır. Farklı taşıyıcı sistemlerin avantajları Tablo 1.4'te özetlenmiştir.

Tablo 1.4 : Kemik doku için kullanılan taşıyıcı sistemler [29].

Taşıyıcı Sistem	Avantajlar	Dezavantajlar
Lipozom	Hücre zarına benzerlik, hidroforik/hidrofilik ilaç, uzun sirkülasyon süresi, uzun dozlama aralığı, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, hücrelere yüksek adezyon	Hidrofobik ilaç kapasitesi az, hipersensitivite, Hızlı biyodegradasyon
Misel	Az çözünen ilaçlar, kendiliğinden oluşum, yüksek stabilite, yüksek ilaç yükleme kapasitesi, 100 nm altında hazırlanabilir, iyi biyodağılım	Enjeksiyon sonrası stabilite problemleri
Hidrojel	biyouyumluluk, hidrofiliklik	Zor parçalanma, yavaş/hızlı ilaç salım
Dendrimer	in vivo kararlılık, uzun sirkülasyon süreleri, daha yüksek yükleme kapasiteleri ve lipozomlara kıyasla daha kontrollü ve hedefli ilaç salınım profilleri	Sentez zorlukları, yapı boyutunda sınırlamalar

Tablo 1.4 (devam) : Kemik doku için kullanılan taşıyıcı sistemler [29].

Taşıyıcı Sistem	Avantajlar	Dezavantajlar
Hyaluronik asit	İyi biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, yüksek viskoelastisite, hidrofilik, modifikasyon yeteneği, sürekli ilaç salınımı	Düşük mekanik ve fiziksel özellikler, hızlı bozulma oranı, karmaşık çapraz bağlamalar
Jelatin	Biyoparçalanabilir, hidrofilik, non- toksik	Antijenik yanıt, saflaştırma zorluğu
Metalik Nanopartiküller	Altın naonopartiküllerde minimal sistemik toksisite, fototermal terapi, radyosensitizasyon	Agregasyon, reaktif oksijen türleri oluşturma riski
İnorganik Nanotaşıyıcılar	Kemik mineral doku benzerliği, fotodinamik terapi, biyouyumluluk	Mekanik dayanımının düşük olması, vücutta bozunurluğun düşük olması, fonksiyonellendirme kısıtlılığı

1.4 Hipotez

Mevcut osteosarkom tedavisinin klinikte ortaya çıkan çeşitli engellerden ötürü hastaların tedavisinde yaşanan zorluklar, iyileştirilmiş bir kemoterapi stratejisinin zorunluluğunu ortaya koymaktadır. Güncel literatür çalışmalarının ortaya koyduğu sonuçlar doğrultusunda sentezlenebilirlik, stabilite, parçacık boyutu, taşıyıcı sistem toksisitesi, uygulama yolu, maliyet, farklı kimyasal yapıdaki ilaçlara uyarlanabilirlik gibi faktörler göz önüne alındığında bazı ilaç taşıyıcı sistemler öne çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında misel formülasyonu ile hazırlanacak kemiğe hedeflendirilmiş bir

sistemin tasarlanması planlanmıştır. Daha önce kullanılmış kemik hedeflendiricilerden farklı olarak nispeten az denenmiş bir peptid molekülü ile özgün bir ilaç taşıyıcı polimer üzerinden gidilmesi halinde konvansiyonel cisplatin etkin maddesinin biyoyararlanımının iyileştirileceği ve kontrollü salım sistemi içerisinde daha üstün bir farmakokinetik ortaya koyacağı öngörülmektedir.



2. DENEYSEL KISIM

2.1 Kimyasal Sentezler

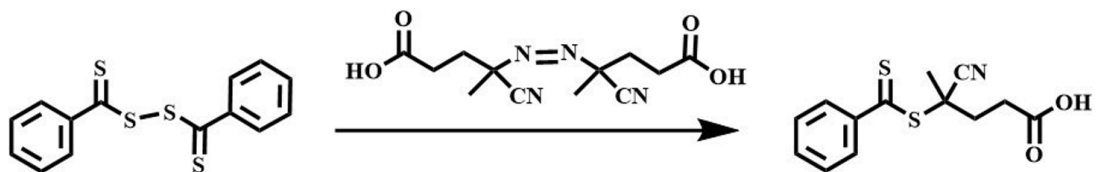
2.1.1 Materyal ve metod

Floresin O-metakrilat (FMA, Sigma-Aldrich, %95), tetrahidrofuran anhidroz (THF, Sigma-Aldrich), trifloroasetik asit (TFA, Sigma-Aldrich), dimetilsülfoksit (DMSO, Merck, %98.9), petrol eteri (BR 40-60 °C, Merck, %90), dietil eter (Merck, %99), THF (Merck, %99.7) diklorometan (CH_2Cl_2 , anhidroz, >% 99.8, Aldrich), di(tiyobenzoyil) disülfid, 4,4'-azobis (4-siyano pentanoik asit), etilasetat (Merck), kloroform (Merck), hekzan, etilen glikol dimetakrilat (EDMA)(Sigma-Aldrich), potasyum karbonat (Sigma-Aldrich), 18-crown-6 (Sigma-Aldrich), di-tert-butil malonat (Sigma-Aldrich), 3- (trimetilsilil) 1-propanol, metakriloil klorür, tolüen (Merck) alındığı şekilde kullanılmıştır. 4-siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (CPADB) RAFT ajanı ve 3- (trimetilsilil) prop-2-in-1-il metakrilat TMSpMA daha önceki çalışmalarda sentezlendiği şekliyle kullanılmıştır [7]. 2,2'-azobi(isobutironitril) (AIBN, Fluka, %98) metanolde kristallendirilmiştir. Aksi belirtilmediği sürece tüm kimyasallar olduğu gibi kullanılmıştır. Ultra saf su (USS) Milli-Q ters ozmos sistemi ile 19.6 M.Ωcm özdirenç değeri ile üretilmiştir. Dulbecco' Eagel medium/nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) besiyeri, fetal bovine serum (FBS), %0.25 tripsin / %0.20 etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), phosphate buffered saline (PBS), penisilin/streptomisin, L-glutamin (Thermo Fisher Scientific), MTT test kiti (Sigma Aldrich), T flasklar, 96 well-plate ve hücre kültürü malzemeleri Invitrogen'den temin edilmiştir. Kemik hedefli peptid (CVNTANST) sipariş üzerine Elabscience tarafından sentezlenmiştir.

Kullanılan cihazların listesi ve özellikleri şu şekildedir; Kimyasal reaksiyonların kurulumunda kullanılan manyetik karıştırıcılar (IKA ısıtıcılı manyetik karıştırıcı),

döner buharlaştırıcılar (BUTCHI Labaroto), vakum inkübatörü (VACUCELL), fotoreaktör (KERMAN Lab fotoreaktör, lambda özellikleri: 365 nm, 15mW cm⁻²), FT-IR Spektrometre cihazı (ALPHA Bruker, platin-ATR aksesuarlı ZNSe kristalli), ¹H Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi cihazı (Bruker Avance NEO NMR spektrometresi, ¹H (500 MHz)) kullanılmıştır. Tüm kimyasal kaymalar, Si(CH₃)₄ dahili standart (δ = 0 ppm) olmak üzere ppm (δ) cinsinden belirtilmiştir. Veriler çözücü kalıntısı rezonanslarının (δ ¹H ve ¹³C) kimyasal kaymaları referans alınarak değerlendirilmiş ve hesaplanmıştır. NMR çözücülerini CDCl₃-d, DMSO-d₆ ve DMF-d₇ (Sigma-Aldrich), jel geçirgenlik kromatografisi (GPC)(Cihaz: TOSOH ECOSEC HLC-8320GPC, kolon: 7.8mm I.D x 30 cm x 8 (Tasah product) dedektörler: Kırılma İndisi Dedektörü (RI), UV Dedektörü, Işık Saçılma Dedektörü (Light Scattering)), kullanılmıştır. GPC Analizlerinin akış hızı 1.0 ml/dk, 35 °C olarak belirlenmiş, kalibrasyon için dar molekül ağırlığı dağılımına sahip PS standartı, veri analizi için Viscotek OmniSEC 4.7.0 yazılımı kullanılmıştır. Parçacıkların boyut dağılımı ve zeta potansiyel analizi için 173 ölçüm açısı, 633 nm dalga boyu, 25 °C, dispersant olarak distile su olacak şekilde parametrelerinde ayarlanmış Malvern NanoZSP dinamik ışık saçılım (DLS) spektrometresi ile karakterize edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında, mikropipet seti (Thermo Scientific Finnpiette F2, 0.2- 2 µL, 1-10 µL, 2-20 µL, 10-100µL, 100-1000 µL) inkübatör (Mettler CO150med, %5 CO₂ inkübatör) biyogüvenlik kabini (Faster SafeFAST Premium 218, sınıf IIA2), invert mikroskop (Isolab Neubauer Improved, Sayım Lamı ve Carl Zeiss Primovert), hücre canlılık tayini için 12 kanallı mikropipet (Thermo Scientific™, Finnpiette™ F1 Multichannel Pipet, 30-300 µL), ELISA okuyucu (BioTek, Synergy H1 hibrid multi-mod) ile gerçekleştirilmiştir. CDDP miktar tayini, indüktif eşlenmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS, Agilent 7800 ICP-MS) ile yapılmıştır. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile nanoparçacıkların görüntü analizi (FEI TALOS F200S TEM 200 kV) mikroskobu ile yapılmıştır.

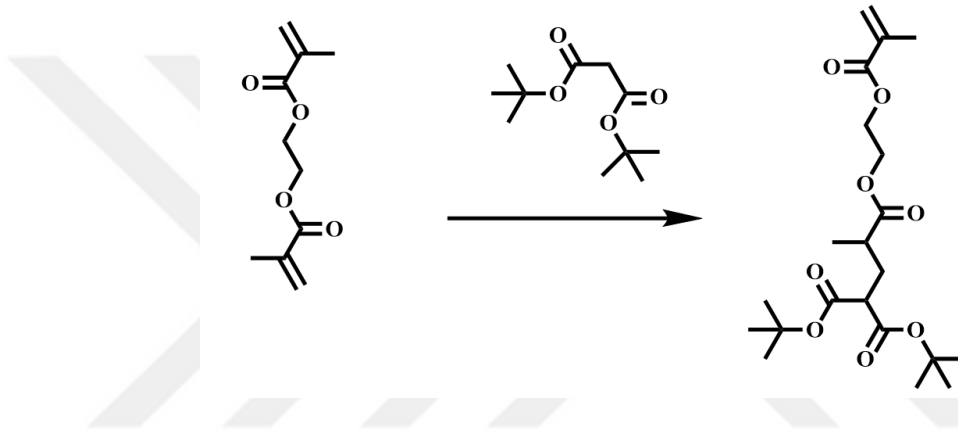
2.1.2 4-Siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (CPADB) RAFT ajanı sentezi



Şekil 2.1: 1 4-Siyanopentanoik asit ditiyobenzoat (CPADB) RAFT ajanı sentezi.

RAFT polimerizasyon ajanı önceden sentezlenmiş olduğundan hazır stoktan kullanılmıştır. Sentez prosedürü şu şekildedir, di(tiyobenzoyil) disülfid (1 ek.) ve 4,4'-azobis (4-siyano pentanoik asit) (1.5 ek.) etilasetat (EtOAc) içinde çözülerek 18 saat 80 °C'de inert atmosferde reaksiyon gerçekleştirilir. Daha sonra çözücü uçurularak kolon kromatografisi (hekzan/ EtOAc, 3/2) ile saflaştırılır. Elde edilen pembe renkli RAFT ajanı hekzan/EtOAc (3/2) karışımında kristallendirilerek tekrar saflaştırılır. (Verim: %68) (Şekil 2.1).

2.1.3 1,1-di-tert-butil 3-(2-(metakriloyloksi)etil)- butan-1,1,3-trikarboksilat (MAETC) sentezi

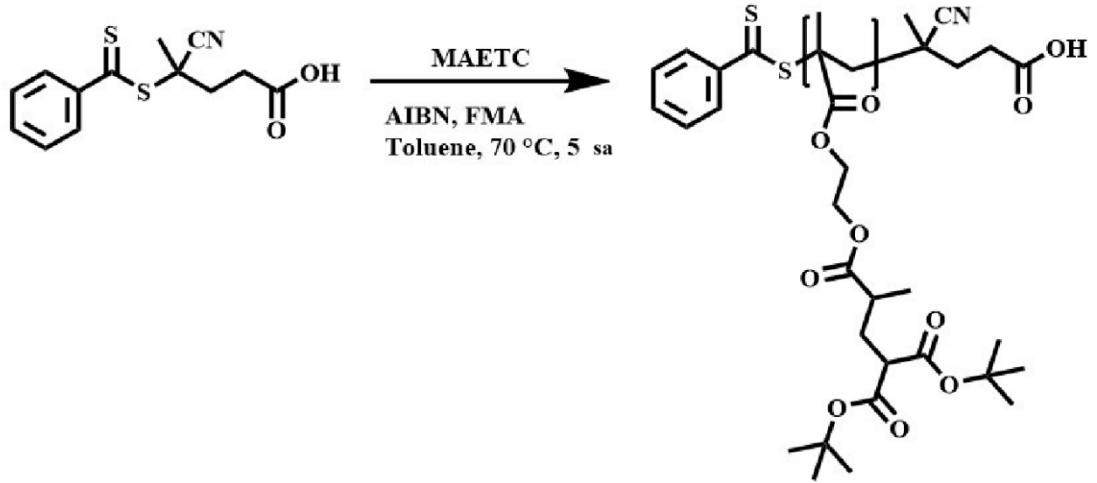


Şekil 2.2: 1,1-di-tert-butil 3-(2-(metakriloyloksi)etil)- butan-1,1,3-trikarboksilat (MAETC) Monomeri Sentezi.

Etilen glikol dimetakrilat (EDMA, 5.5 g, 27.7 mmol, 3 ek.), potasyum karbonat (1.405 g, 10.17×10^{-3} mol, 1.1 ek.), ve 18-crown-6 (0.080 g, 3.05×10^{-4} mol, 0.033 ek.) katalizör 1.4 mL susuz THF e eklenir ve karışım 30 dakika boyunca azot altında gazdan arındırılmadan önce bir buz banyosunda 0°C'ye soğutulur. Di-tert-butil malonat (2 g, 9.24×10^{-3} mol, 1 ek.) manyetik karıştırıcıda karışan karışıma damla damla eklenir. Bulanık görünümlü süspansiyon, sıcaklığı 0 °C' de tutarken 30 dakika karıştırılır daha sonra 40 °C'de 48 saat daha karıştırılır. Karışım başlangıçta renksizken reaksiyon sonunda sarımsı bir renk alır. Deiyonize (DI) su (30 mL) karışıma ilave edilir ve bir ayırma hunisi kullanılarak dietil eter (3×60 mL) ile 3 kez yıkanır. Dietil eter fazları birleştirilir ve döner buharlaştırıcı kullanılarak buharlaştırılır. Kalan yağimsı ham ürün silika jel kolon kromatografisi ile saflaştırılır. Bu aşamada petrol eteri/etil asetat karışımı gradyan eluent olarak, 100:1'den 8:1 v/v'ye değişen oranla kullanılır. Toplanan fraksiyonlar TLC (permanganat çözeltisi ile boyanmış) ile incelenir. Monomer ($R_f = 0.3$) viskoz sıvı olarak elde edilir (%42 verimde) ve ^1H -

NMR ile karakterize edilir. Sıvı, gece boyunca bir dondurucuda bırakıldığında kristallenir (Şekil 2.2).

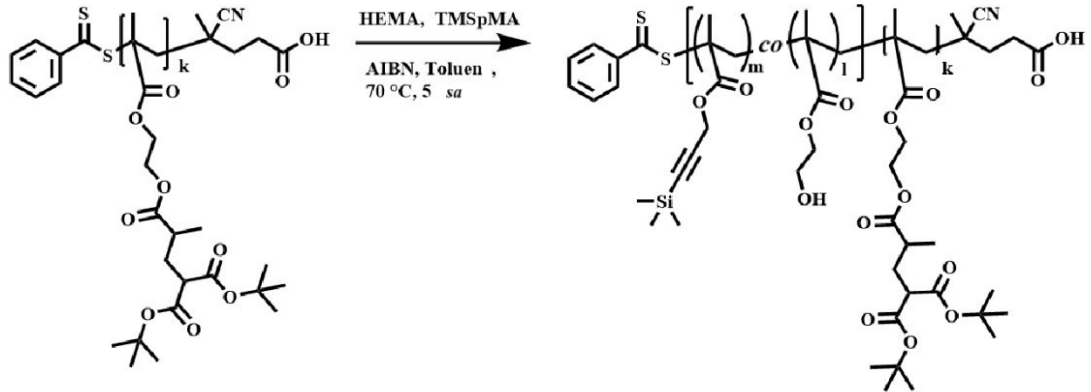
2.1.4 P(MAETC) Homopolimer sentezi



Şekil 2.3 : P(MAETC) homopolimer kimyasal sentez basamakları.

Homopolimer sentezi (Şekil 2.3) [7] için CPADB RAFT ajanı (0.009 g, 3×10^{-5} mol, 1 ek., $Mn_{NMR} = 297.37$ g/mol), MAETC (1 g, 2.4×10^{-3} mol, 80 ek., $Mw = 414.50$ g/mol), FMA (10^{-3} g, 0.08 ek. 2.4×10^{-6} mol, $Mw = 400.386$ g/mol), AIBN (6.19×10^{-4} g, 3.7×10^{-6} mol, 0.125 ek., $Mw = 164.21$ g/mol) ve 6 mL tolüen sırasıyla içerisinde manyetik karıştırıcı olan 10 mL lik reaksiyon vialine koyulur. Hemen ardından septa ile kapatılır ve parafinlenerek azot gazı altında 45 dk buz banyosunda karışmaya bırakılır. Polimerizasyon için buz banyosundan alınan vial 70 °C sıcaklıktaki silikon yağ banyosuna aktarılarak reaksiyon başlatılır ve 5 saat karışmaya bırakılır. Süre sonunda vial yağ banyosundan alınarak inert ortam bozular. Ardından döner buharlaştırıcıda çözücü uçurulur, homopolimer önceden soğutulmuş hacimce 10 kat metanolde 2 defa çöktürülerek saflaştırılır. Çökelti vakum altında 25 °C de gece boyu kurumaya bırakılır. Kurutma sonunda açık pembe renkli, viskoz sıvı bir ürün elde edilir. Saf polimer 1H -NMR (Şekil 4.2), THF-GPC (Şekil 4.8) ve FT-IR (Şekil 4.7) ile karakterize edilir. Monomer ünite sayısı ve molekül ağırlığı hesabı 1H -NMR spektrumunda 4.15 ve 4.31 ppm deki etilen protonları (4H, $-OCH_2CH_2O-$) ile hesaplanmıştır.

2.1.5 Diblok kopolimer sentezi

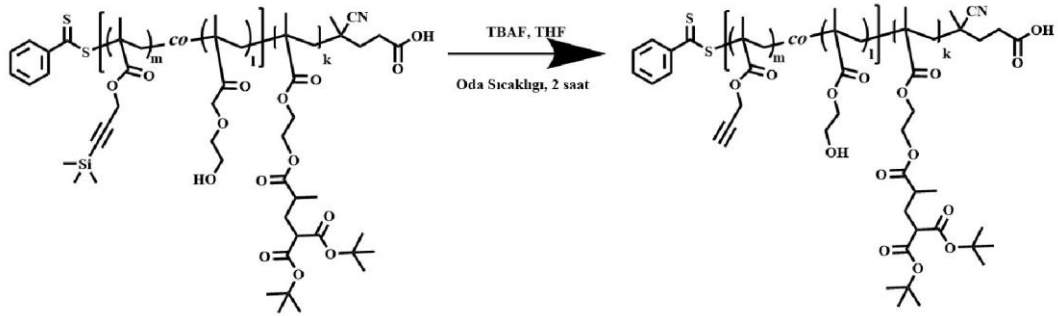


Şekil 2.4 : P(MAETC-*b*-(HEMA-TMSpMA)), Diblok kopolimer sentezi şeması.

Önceden sentezlenmiş olan P(MAETC) ($M_{n,NMR} = 22.66$ kDa) homoblok polimeri (Şekil 2.4). makroRAFT ajanı olarak (0.24 g, 3.2×10^{-5} mol) içerisinde manyetik karıştırıcı olan bir vial alınır. Ortam konsantrasyonu $[0.6]$ M olacak üzere polimer 6 mL toluende çözülür. HEMA (0.10 g, 8×10^{-4} mol, 25 ek.) ve TMSpMA (0.0250 g 1.28×10^{-3} mol, 2 ek.) monomerleri eklendikten sonra başlatıcı olarak AIBN (0.788×10^{-3} g, 4.8×10^{-3} umol) eklenmiş ve vial ağzı septa ile sıkıca kapatılarak 0 °C de bir saat azot gazından geçirilir. Daha sonra silikon yağ banyosuna aktarılan vial 70 °C de 8 saat karışmaya bırakılır. Süre sonunda septa delinerek inert ortam bozularak reaksiyon sonlandırılır ve toluen döner buharlaştırıcıda buharlaştırılır. Polimer soğuk hekzanda 2 kere çöktürülerek safsızlık uzaklaştırılmış ve elde edilen diblok kopolimer 25 °C vakum etüvünde 1 gece kurutulur. Kurutma sonrası açık pembe renkli viskoz sıvı ürün (0.3202 g) elde edilir. THF GPC (Şekil 4.8), FT-IR (Şekil 4.7), $^1\text{H-NMR}$ (Şekil 4.3) ile karakterize edilir. $^1\text{H-NMR}$ sonucuna göre HEMA monomerinin verimi %88, TMSpMA için %75 hesaplanmıştır

$^1\text{H-NMR}$ analizinde TMSpMA monomerinin polimer yapıya katılması ($-\text{OCH}_2\text{CHCH}-$, 5.03 ppm) de metilen piklerinin varlığı ile tespit edilmiştir ve dönüşüm hesabı polimerden gelen tek protonlu b karbonuna ($-\text{OCH}_2$ 3.16 ppm) göre yapılmıştır. HEMA monomeri için ise 5 adet l,m,n kodlu protonlarının ($-\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, 3.79 ppm) sinyali görülmüştür.

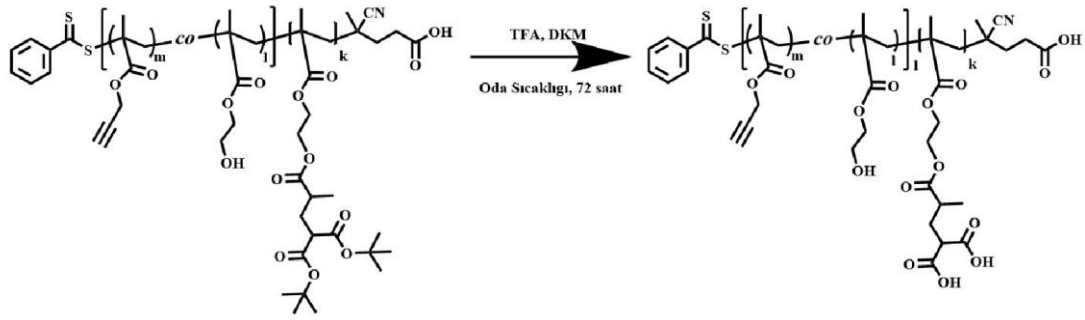
2.1.6 TMSpMA monomerinin koruma gruplarının uzaklaştırılması



Şekil 2.5 : P(MAETC-*b*-(HEMA-pMA)), kopolimerinin trimetil sillil koruma gruplarının uzaklaştırılması kimyasal sentez basamakları.

P(MAETC-*b*-(HEMA-TMSpMA)) diblok kopolimeri (Şekil 2.5). ($M_{n,NMR} = 24.44$ kDa, 0.3202 g, 2.95×10^{-5} mol, 1 ek.) içerisinde manyetik karıştırıcı olan bir vialle alınarak THF (10 mL) içerisinde çözüldükten sonra 0 °C de azot gazından geçirilir. Daha sonra az miktar BHT (1 kristal tanesi), THF de çözülmüş TBAF (0.0347 g, 1 M, 4.5 ek. (trimetil sillil grubu başına 1.5 ek. mol/mol)) cam şırınga ile 2-3 dakika boyunca damlatılarak vialle eklenir. Damlatma başlangıcında renksiz olan karışım sarı renk alır. Reaksiyon karışımı buz banyosunda 30 dakika karışmaya bırakılır. Daha sonra oda sıcaklığına alınan karışım 2 saat karışmaya bırakılır. Reaksiyonu sonlandırmak için çözücü rotary buharlaştırıcı ile ortamdan uzaklaştırılır. Karışım THF/Metanol (2/1mL) de çözüldükten sonra 50 mL lik falkon tüp içindeki 10 kat hacimde soğuk hekzanda 2 kere çöktürülür. Dekante edildikten sonra falkon tüpte kalan çökelti 24°C sıcaklıktaki vakum etüvüne alınır ve 1 gün kurutulur. 0.326 g madde elde edilmiştir. 0.11 ppm de trimetil sillil gruplarının kaybolması $^1\text{H-NMR}$ ile doğrulanmıştır (Şekil 3.4). DMF-GPC ile boyut dağılımı analizi yapılmıştır.

2.1.7 MAETC monomerinin koruma gruplarının uzaklaştırılması



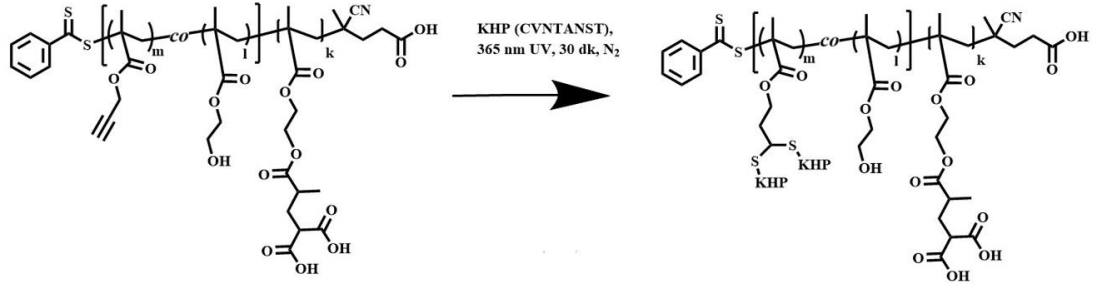
Şekil 2.6 : P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA)), polimerinin hazırlanması.

MAETC monomerindeki tersiyer butoksil grupların uzaklaştırılması reaksiyonu (Şekil 2.6) asidik ortamda yapılır. Kopolimer ($M_{n,NMR}=24.26$ kDa 0.06 g) ve TFA/H₂O (4 mL, 9:1, v/v) içinde manyetik karıştırıcı bulunan 25 mL’lik reaksiyon balonuna azot gazı altında konur. Solüsyon oda sıcaklığında azot gazı altında, 0°C de berrak bir renk alana kadar karıştırılır. 2 saat sonunda reaksiyon tamamlanır ve önceden soğutulmuş hacimce 10 kat hekzanda çöktürülür. Polimer solüsyonu ultra saf su ile 3500 MWCO Da luk diyaliz membranında 2 gün diyaliz edilir. Liyofilize ederek kurutulduktan sonra kabarık katı haldeki nihai madde elde edilir (Şekil 2.7). Saflaştırılmış polimer ¹H-NMR (Şekil 3.5), FT-IR (Şekil 3.7) ve H₂O-GPC (Şekil 3.9) yöntemleri ile karakterize edilmiştir.



Şekil 2.7: TBOC hidrolizi sonrası diyaliz ile TFA fazlasının uzaklaştırılması aşamaları. Soldan sağa doğru polimerin başlangıçta açık sarı olan renginin 2 saat sonra süt beyazına, 48 saat sonra ise mat beyaz renk alarak diyaliz membranı içine çöktüğü gözlenmiştir. Liyofilize edildikten sonra ise pamuksu beyaz renkli bir katı malzeme elde edilir.

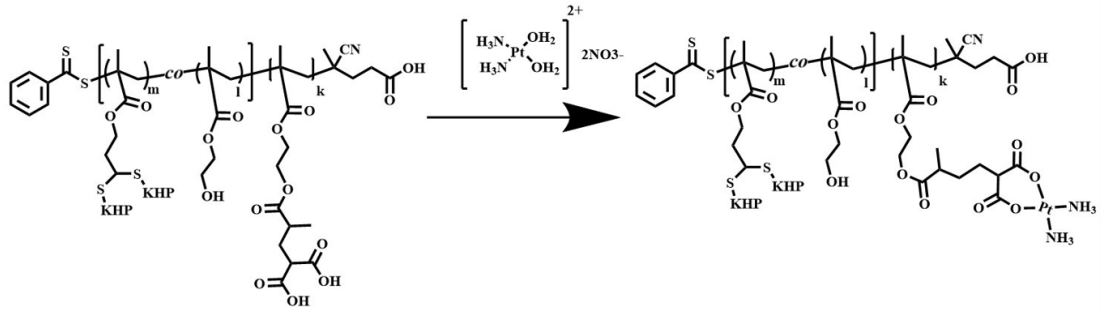
2.1.8 Tişol-in 'click' kimyası ile kemik hedefli peptid konjugasyonu



Şekil 2.8 : Tişol-in Click kimyası ile peptid polimer konjugasyonu

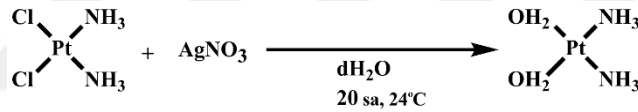
Polimerin tüm koruma grupları kaldırıldıktan sonra alkin monomerine tişol-in Click kimyası ile peptid konjugasyonu literatürden uyarlanarak yapılmıştır (Şekil 2.8) [58,59]. SH- grubu içeren sistein aminoasit uçlu peptit CVNTANST (20 mg) ve alkin uçlu monomer barındıran polimer (11 mg) ısıya dayanıklı uygun boyutta uzun beyaz camlı bir vialle eklenerek 2 mL DMF' de çözölür (reaksiyon ortamı yaklaşık 0.2 M, [SH]: [alkin], 4: 1). Fotobaşlatıcı olarak 2,2-dimetoksi-2-fenil asetofenon (DMPA) [SH]:[başlatıcı]=50:1 molar oranında reaksiyon vialine eklenir ve vial septa ile kapatılarak parafinlenir. Reaksiyon karışımı nitrojen gazı altında 15 dk bekletildikten sonra ve 40 dakika boyunca içini 360 derece çevreleyen ışıklandırma kurulu fotoreaktörde (365nm, 15mW cm⁻²) içinde ışınlanır. Daha sonra karışım saflaştırılmak amacıyla 3500 MWCO diyaliz membranında 2 gün boyunca ultra saf suya karşı diyalize edilir. En son P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA(KHP))) deki diyalizden kalan solventi uzaklaştırmak için liyofilize edilir. Nihai ürün ¹H-NMR ile karakterize edilir (Şekil 3.6).

2.1.9 Polimere CDDP yükleme ve misel oluşturma



Şekil 2.9 : CDDP@P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA@KHP)), polimere CDDP yüklenmesi kimyasal basamakları.

Koruma grupları kaldırılmış diblok kopolimere cisplatin yüklenirken misel oluşturmaları sağlanır (Şekil 2.9). Bunun için polimer ($M_{n,NMR}=18.22$ kDa, 0.01 g, 1.3 μ mol, 1 ek.) içerisinde manyetik karıştırıcı olan bir viale tartıldıktan sonra 1 mL DMF, 6 mL ultra saf su eklenerek ultrasonikasyon yardımıyla çözünür. Ortam pH değeri 8-9 arası bir değere gelene kadar damla damla NaOH (1M, yaklaşık 75 μ L) eklenir. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılır.



Şekil 3.10 : Cisplatin aktivasyonu.

CDDP solüsyonu literatürden uyarlanarak hazırlanır [11]. Prosedüre göre öncelikle CDDP (0.01 g) tartılır ve 10 mL damıtılmış su içinde süspanse edilir. Sulu kompleks oluşturmak için gümüş nitrat ($[AgNO_3] / [CDDP] = 1.955$) ile karıştırılır. Çözelti karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 4 saat karıştırılır. Reaksiyonun gerçekleştiği beyaz gümüş klorür çökeltisinin gözlenmesi ile tespit edilir. Karışım daha sonra AgCl çökeltisini uzaklaştırmak için 20 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüjlenir ve süpernatant 0.22 μ m'lik bir naylon filtreden geçirilerek saflaştırılır. Santrifüj ve filtreleme işlemi üç kere tekrarlandıktan sonra aktive edilmiş CDDP solüsyonu elde edilir (Şekil 2.10).

Misel oluşturmak için polimer/ solvent konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde hesaplanmıştır. Bunun için aktive edilmiş 4.4 mL CDDP solüsyonu (4.4 mg, 1.67×10^{-5} mol, MAETC karboksilik asit grupları başına 0.55 ek. olacak şekilde) şırıngaya alınarak, 0.85 mL DMF de çözünmüş polimer solüsyonu bulunan septalı viale (0.053

g, 2.87×10^{-7} mol, Mw:18,426 g/mol, 1 ek.) şırınga pompası yardımıyla 2 damla/dk hızla damlatılır. Vial manyetik karıştırıcıya alınarak etrafı alüminyum folyo ile sarılır ve oda sıcaklığında 12 saat karışmaya bırakılır. Daha sonra orbital karıştırıcıya alınır ve 37 °C de 2 gün daha karıştırıldıktan sonra distile su ile 2 gün diyaliz (MwCO 3500 Da) edilir. Diyaliz sonrası son hacim 8 mL ölçülmüştür. [7].

Peptid bağlı misel ve ilaç yüklenmemiş boş misel de polimer miktarı sabit tutularak aynı prosedürle oluşturulur. Peptid bağlı polimer (0.053 g, Mw:20,043 g/mol) 0.85 mL DMF içinde çözüldükten sonra üzerine aktive edilmiş 4.4 mL CDDP solüsyonu damlatılır. Boş misel için polimer (0.053 g) ultra saf suya (5.3 mL) damlatılır yarım saat karışmaya bırakıldıktan sonra misel oluşması beklenir. Her üç misel için de boyut ve zeta potansiyel analizi DLS cihazı ile beklenmeden yapılmıştır.

2.1.10 Misel karakterizasyonu

İlaç yüklü, boş ve ilaç-peptid yüklü polimerlerin karakterizasyonu DLS yöntemi ile boyut ve zeta potansiyeli analizine dayanılarak yapılmıştır.

2.2 *in vitro* Değerlendirme

2.2.1 *in vitro* ilaç salım deneyi

CDDP'nin misellerden *in vitro* ilaç salımı deneyi iki farklı pH tampon çözeltisinde (pH = 5.5 ve pH 7.4) diyaliz yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kısaca, CDDP yüklü polimerler, M1 ve M3, diyaliz membranına (MWCO 2000 Da, genişlik:9 mm) yerleştirilir. Miselleri içeren membranlar, fizyolojik (pH 7.4) ve tümöral interstiyel pH'da (pH 5.5) denenmek üzere ayrı ayrı 15 mL tampon içeren 50 mL'lik falkonlara alınır. 37 °C'de 90 rpm karıştırma hızına sahip sıcaklık kontrollü bir çalkalayıcıda diyalize edilir. Belirlenen aralıklara salım ortamından 1 mL numune toplanır, yerine uygun olan (pH 5.5 veya 7.4) taze tampon çözeltisi eklenerek 4 gün boyunca salım deneyi devam ettirilir. Numunelerin ilaç etkin madde miktar tayini için, kantitatif platin element konsantrasyonu, indüktif eşlenmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS, Agilent 7800 ICP-MS) kullanılarak ölçülmüştür. ICP-MS analizi için tüm numuneler konsantre *aqua regia* çözeltisi içinde sindirilmiştir. *Aqua regia* çözeltisi, %2 nitrik asit %2 hidroklorik asit sulu çözeltisi şeklinde hazırlanmıştır. Analiz öncesi hazırlık olarak 30 uL numuneye 4.97 mL *aqua regia* eklenir, 90 °C'de 4 saat bekletilir.

Belirlenen zaman aralıklarında ortama salınan ilaç miktarı, başlangıçtaki ilaç miktarına göre yüzde değer olarak hesaplanmıştır.

3.2.2 Hücre kültürü

Çalışmada HUVEC (ATCC CRL-1730) ve SAOS-2 (ATCC HTB- 85) hücre hatları kullanılmıştır. HUVEC 1.19 insan osteoblast hücre hattı D-MEM / F-12 (1:1) (1X) besiyeri, 2.5 mM L-glutamin, 0.3 mg/mL G418, %1 Penisilin/Streptomisin (P/S) ve %10 fetal bovine serum (FBS) ile, SAOS-2 insan OS hücre hattı ise McCoy's 5A besiyeri, %1 P/S ve %10 FBS ile kültüre edilmiştir. Hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'li ve nemli inkübatörde, 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda çoğaltılmıştır. İki günde bir invert mikroskopta kontrol edilecek olan hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında Trypsin/EDTA kullanılarak pasajlanmıştır. Trypsinizasyon işlemi sonunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µL endorf tüpe alınarak eşit oranda üzerine %0.5 Tripan mavisi eklenmiştir. Pipetaj sonrasında karışımdan 7 µL alınarak hemositometreye konulacak ve mikroskopta 5 farklı alanda hücre sayımı yapılmıştır. Sayımın ortalaması alınıp sulandırma katsayısı ile çarpıldıktan sonra 1 mL'deki hücre miktarı saptanmıştır.

3.2.3 MTT testi ile sitotoksitenin incelenmesi

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) tuzları kullanılması esasına dayanmaktadır. Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (sarı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan gruplar: İlaç miktarı sabit tutulmuş CDDP solüsyonu, CDDP yüklü misel, Boş Peptidli misel ve CDDP yüklü Peptidli misel formülasyonlarıdır (sırasıyla: CDDP, M1, M2, M3). Boş peptidli misel (M2) için polimer miktarı yüklü misel (M3) ile eşitlenmiştir. Misel formülasyonlarının CDDP miktarı 100 µg/mL den başlayarak 0.0975, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 şeklinde 10 konsantrasyon şeklinde hazırlanmış, her konsantrasyon 3 tekrarlı olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır.

Deney prosedüründe ilaç formülasyonlarımız değişik konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinde test edilmiştir. İlgili hücre hatları 96 kuyucuklu plakaya 5x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilerek 37 °C, %5 CO₂'li inkübatörde gece boyu

bekletilmiştir. Ertesi gün hücelere farklı konsantrasyonlardaki taşıyıcılar eklenerek MTT analizine uygun şekilde müdahale edilecek ve inkübasyon sonrası spektrofotometre ile ölçümü yapılmıştır. Her bir konsantrasyon için ölçüm en az 3 kere tekrar edilmiş olan veriler kıyaslanarak konsantrasyona bağlı grafiği çizilecek ve relatif %hücre canlılığı ve IC₅₀ değeri tespit edilmiştir. Uygulama yapılmamış kontrol hücrelerinin canlılığı %100 kabul edilerek, uygulama yapılan hücrelerdeki canlılık oranları alttaki formül ile hesaplanmıştır;

$$\% \text{ Canlılık} = [100 \times (\text{Uygulama yapılan hücre absorbans ortalaması-kör ortalama}) / (\text{Kontrol hücre absorbans ortalaması-kör ortalama})]$$



3. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada kemik hedefleme özelliği ön planda olan yenilikçi bir ilaç taşıyıcı sistem sentezlemek amacıyla yola çıkılmış ve araştırma ekibinin geçmiş çalışmaları modifiye edilerek ilerlenmiştir. Osteosarkom tedavisinde halihazırda kullanımda olan ve farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri iyi bilinen cisplatin model ilaç olarak tercih edilmiştir. RAFT polimerizasyonu yöntemi ile hazırlanan polimerde MAETC monomerine ait iki koldaki karboksilik asit uçları ve cisplatin arasında kompleks oluşturmak suretiyle ilaç konjuge edilerek polimere yükleme yapılmıştır. Ayrıca sistemin hidrofobik - hidrofilik dengesini sağlamak amacıyla hidroksil uçlu ticari HEMA monomeri tercih edilmiştir. Yapının kemik dokuya özgünlük göstermesi için kemik hedeflendirici bir peptid seçilmiş (CVNTANST) ve peptidi taşıyacak monomer olarak da elimizde önceki çalışmalardan hazır bulunan TMSpMA monomeri ile çalışılmıştır. TMSpMA monomerinin trimetilsilil koruma grupları kaldırıldığında, açığa çıkacak olan alkin ucu, peptid molekülündeki sistein amino asidine ait tiyol grubu ile tiyol – alkin ‘klik’ (Click) reaksiyonu vermeye yatkındır. Cisplatin yüklü peptidlendirilmiş polimer, kemik hedefleme görevi görerek sağlıklı hücrelere kıyasla osteosarkom hücrelerinde daha seçici bir sitotoksosite ortaya çıkarması beklenmektedir.

4.1 Polimerlerin Karakterizasyonu

Osteosarkom tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanan polimerin sentezi için reaksiyon parametrelerinden sıcaklık ve süre üzerinde değişiklik yapılmak suretiyle iki seri polimer (Kodları Px.1 ve Px.2 serisi olmak ifade edilmiştir) sentezlenmiştir. Serilerin karakterizasyon analizlerine ait veriler Tablo 3.1’de bulunabilir. GPC analizinden elde edilen veriler neticesinde molekül ağırlığı dağılımının daha düzgün

olmasından ötürü ikinci seri ürünü olan P4.2 polimeri üzerinden çalışmalara devam edilmesine karar verilmiş, peptid bağlama, *in vitro* ilaç salım deneyi ve antikanser etkinlik için hücre kültürü çalışmaları için P4.2 kodlu koruma grupları kaldırılmış diblok kopolimer ile devam edilmiştir. Bu polimerlere ait polimerizasyon oranları, reaksiyon süresi, dönüşüm oranı, GPC ölçüm sonuçları ve ¹H-NMR analizleri ve hesaplanan molekül ağırlığı verileri tablodaki gibidir (Tablo 3.1). Ayrıca sentezlenen polimerlerin ayrıntılı karakterizasyon sonuçlarının değerlendirilmesi için ilgili başlık (bkz.3.1.7) ve karşılaştırmalı grafikler Şekil 3.8, 3.13, 3.15 ten incelenebilir.

Tablo 3.1 : Polimer serilerinin karakterizasyonu P1: Homopolimer, P2: Diblok kopolimer, P3: TMS koruma grupları kaldırılmış polimer, P4: TBOC koruma grupları kaldırılmış polimer.

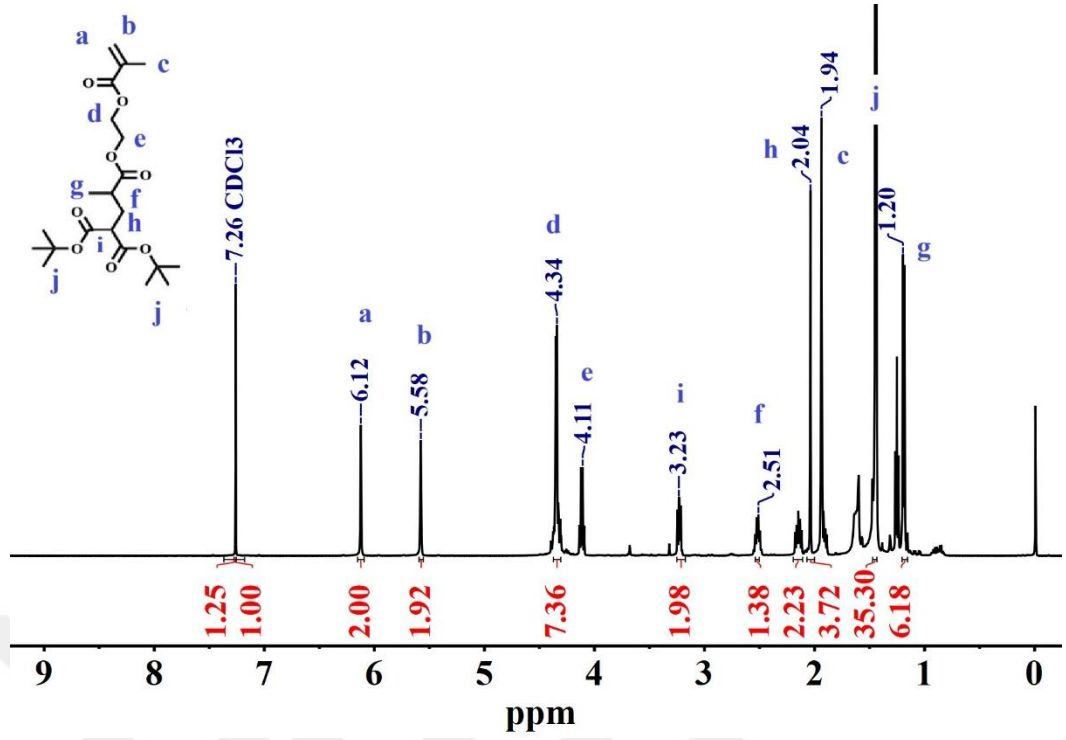
Kod	Polimer	[M]:[RAFT]:[I]	Süre (h)	Dönüşüm (%)	$M_{n,GPC}$ (kDa)	$M_{n,NMR}$ (kDa)
P1.1	P(MAETC)	[80]:[1]:[0.125]	6	31.25	14.75	7.40
P2.1	P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-TMSpMA))	[25]:[4]:[1]:[0.15]	8	HEMA 88 TMSpMA 75	15.25	10.85
P3.1	P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-pMA))	[P2]:[TBAF] [1]:[4.5]	2	100	13.5	10.63
P4.1	P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA))	[P3]:[TFA] [1]:[0.5]	2	100	20.8	7.78
P1.2	P(MAETC)	[80]:[1]:[0.125]	16	66	17.75	22.66
P2.2	P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-TMSpMA))	[25]:[4]:[1]:[0.15]	5	HEMA 48 TMSpMA 25	25.44	24.44
P3.2	P(MAETC- <i>b</i> -(HEMA-pMA))*	[P2]:[TBAF] [1]:[4.5]	2	100	24.3	24.36
P4.2	P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA))**	[P3]:[TFA] [1]:[0.5]	2	100	14.08	18.42
P5	P(MAEMA- <i>b</i> -(HEMA-pMA@KHP))**	[P4]:[KHP]:[DMPA] [1]:[4]:[0.08]	40 dk	100	-	20.04

*DMF-GPC ile karakterize edilmiştir.

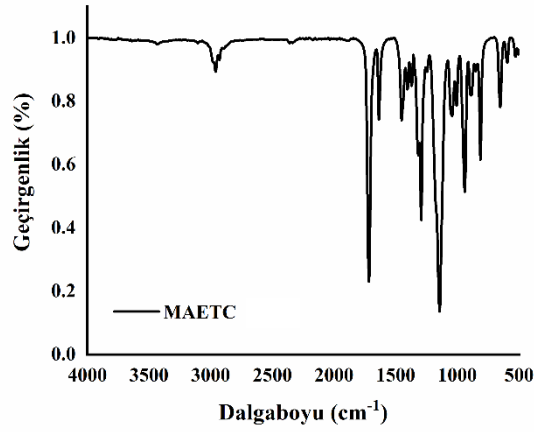
** H₂O-GPC ile karakterize edilmiştir.

3.1.1 MAETC monomer sentezi

Michael katılma reaksiyonu ile etilen glikol dimetakrilat çapraz bağlayıcı ve di-ter-siyer-butil malonat birleşerek iki dişli karboksilat kolları taşıyan bir monomer (MAETC) sentezlenmiştir. (Şekil 3.1). Di-ter-butil malonat güçlü baz varlığında proton kaybederken, potasyum karbonat da 18-crown-6 varlığında THF de çözünürlüğü arttırılarak reaksiyon ortamı kurulmuştur. Reaksiyonun ardından kolon kromatografisi ile saflaştırma işlemi 100:1 petrol eteri:etilasetat'lık yoğun bir mobil faz gradyanında başlayıp 2 günde tamamlanmıştır. Solvent gradyanını ayarlarken polarite daha hızlı artıldığı takdirde başarılı bir ayırma işlemi yapılamadığı görülmüştür. FT-IR analizi ve ¹H-NMR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir (Şekil 3.1, 3.2). ¹H-NMR analizi neticesinde hesaplanan reaksiyon verimi literatürde %56 civarı olduğu belirtilirken çalışmamızda %42 verimde ürün elde edilmiştir. ¹H NMR spektrumunda, iki karboksilat arasındaki metin grubu 3.23 ppm'de bir çift dublet pik olarak görülmüştür. Coupling modeli, yan yana bulunan metilen gruplarının her iki protonunun kimyasal kaymasındaki farklılıklardan kaynaklanmıştır (1.94 ve 2.04 ppm) [7, 12, 13].



Şekil 3.1: 1,1-Di-tert-butil 3-(2-(metakriloyloksi)etil)- butan-1,1,3-trikarboksilat (MAETC) monomerine ait ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃).

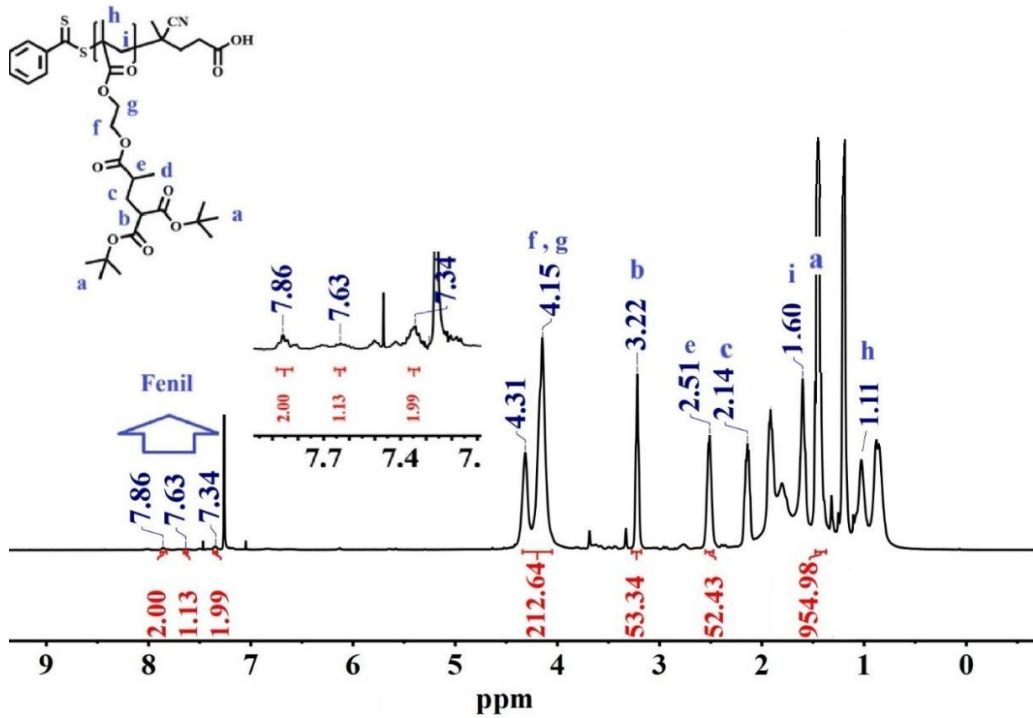


Şekil 3.2 : 1,1-di-tert-butil 3-(2-(metakriloyloksi)etil)- butan-1,1,3-trikarboksilat (MAETC) monomerine ait FT-IR analizi.

3.1.2 P(MAETC) Homopolimer sentezi

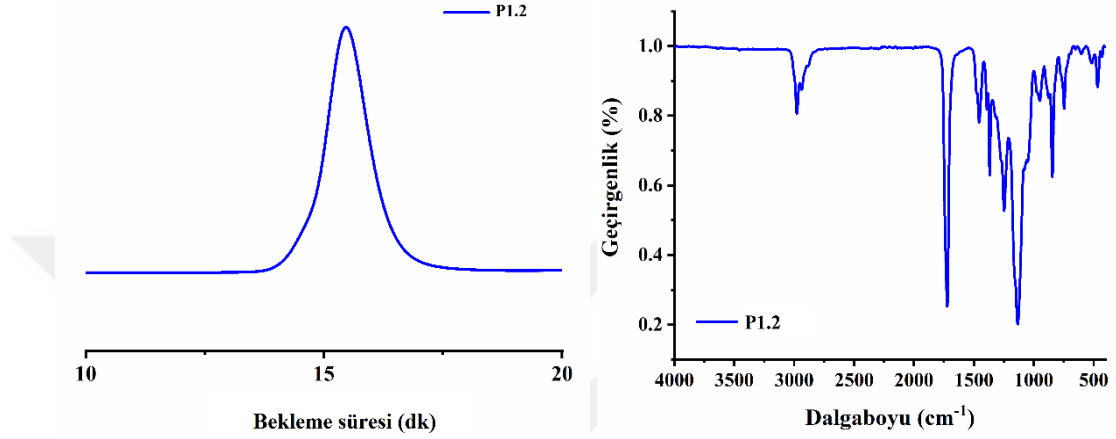
P(MAETC)'nin homopolimerizasyon reaksiyonunda, CPADB RAFT ajanı kullanılarak literatüre göre iki farklı deneme yapılmıştır [7]. Ayrıca reaksiyon karışımına, ileri çalışmalarda kolaylık olması adına nanopartikülleri etiketlemek için FMA floresein boyası olarak eklenmiştir. Reaksiyon ortamında tamamen aynı ekipmanlar ve malzemeler kullanılarak, sıcaklık sabit tutulmak suretiyle reaksiyon süresi 6 saatten 16 saate çıkartıldığında verim %31.25 ten %66 ya, yani yaklaşık 2 katına çıkmıştır. ^1H NMR a göre hesaplanan reaksiyona giren monomer sayısı 53 ünedir. Ünite hesabı 4.15 ve 4.31 ppm deki MAETC monomerine ait f ve g olarak isimlendirilen 4 protona göre integralin 212.64 bulunması ile hesaplanmıştır. Molekül ağırlığı hesabı için 53 adet tekrarlanan monomer ünitesi, FMA ve CPADB molekül ağırlıkları toplanarak nihai $M_{n,\text{NMR}}$ 22.66 kDa bulunmuştur (Şekil 3.3).

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 7.86–7.34 ppm (5H, CPADB ye ait aromatik protonlar), 4.31-4.15 ppm (4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.22 ppm (1H, $\text{OOCCHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOBu-tert})_2$), 2.51 ppm (1H, $\text{OOCCHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOBu-tert})_2$), 2.14- 1.00 ppm (2H + 3H, $\text{OOCCHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{COOBu-tert})_2$ ve MAETC nin ana zincirdeki $-\text{CH}_3$, grubu), 1.60 ppm (2H, MAETC ana zincirdeki $-\text{CH}_2$ -grubu), 1.45 ppm (18nH, $\text{OOCCHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{COO}(\text{CH}_3)_3)_2$),



Şekil 3.3 : P(MAETC) Homopolimerizasyonuna ait ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3).

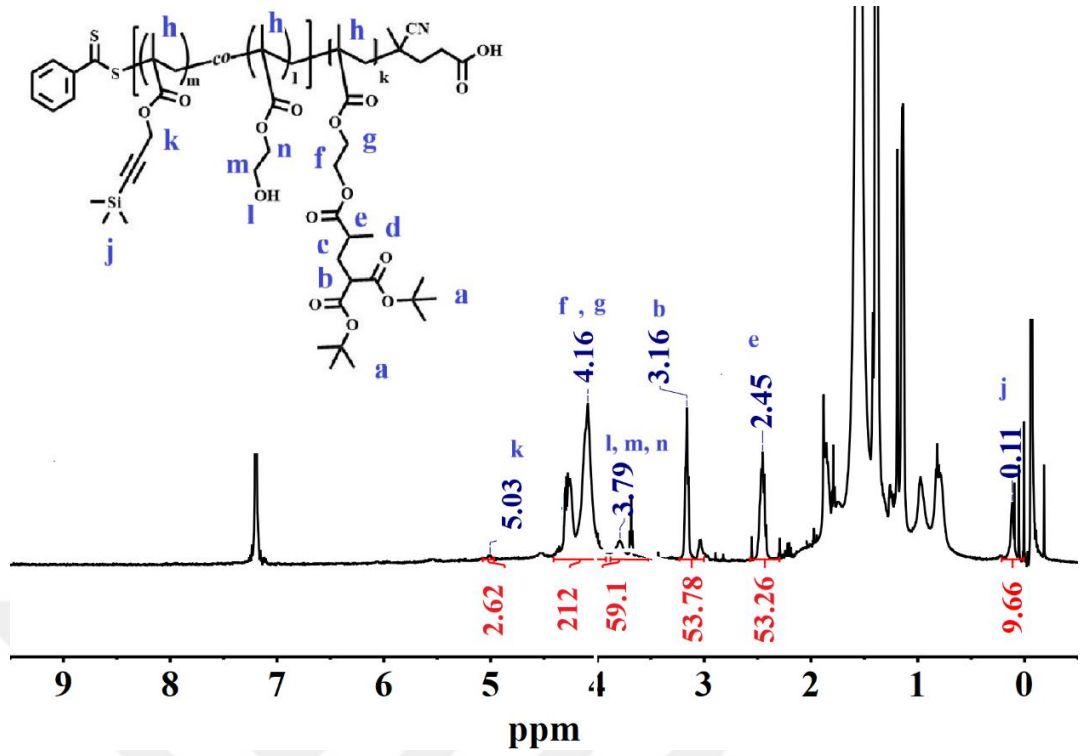
Daha sonra homopolimerin THF-GPC ve FT-IR karakterizasyonları yapılmıştır (Şekil 4.4). $M_{n\text{GPC}}$ sonucu 17.75 kDa, polidispersitesi $M_w/M_n= 1.15$ olarak hesaplanmıştır. P(MAETC) homopolimeri için RAFT ajanına ait ester grubunun C=O çift bağı gerilmesi 1760 cm^{-1} de ve C-O bandından gelen sinyal 1210 cm^{-1} de gözlenmiştir.



Şekil 3.4 : Sentezlenen P1: P(MAETC) Homopolimerin THF-GPC analizi ve FT-IR analizine ait grafikler.

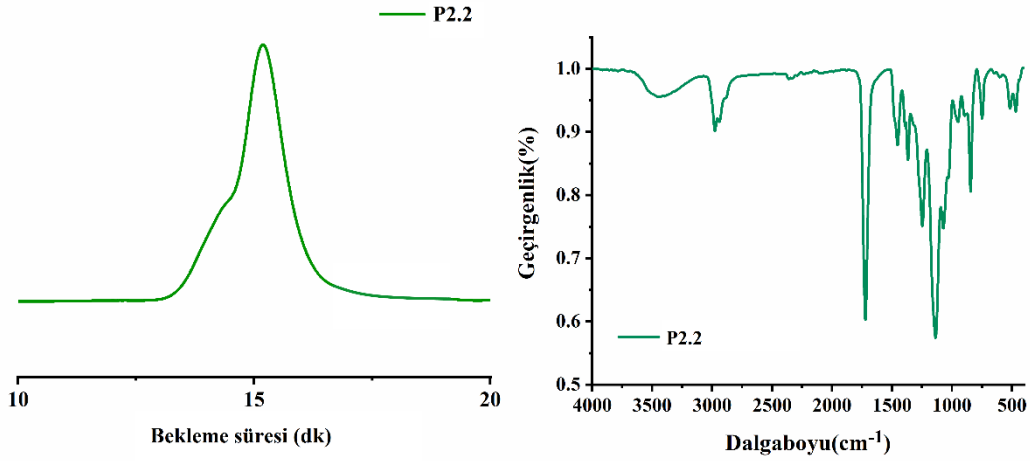
3.1.3 P(MAETC-*b*-(HEMA-TMSpMA)), Diblok kopolimer sentezi

P(MAETC) makroRAFT ajanına, AIBN başlatıcı yardımıyla HEMA monomeri ve TMSpMA monomerleri kopolimerizasyon ile katılmıştır. İlk reaksiyon serisinde reaksiyon süresi 8 saat iken HEMA monomeri %88 reaksiyon verimi ile 22 ünite, TMSpMA ise %75 verim ile 3 ünite olarak polimerleşmiştir. İkinci seri polimerde sıcaklık sabit tutulmak suretiyle süre 5 saate indirildiğinde sırasıyla %48 verim ile 12 ünite ve %25 verim ile 1 ünite polimerleşmiştir. (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 : P(MAETC-*b*-(HEMA-*p*MA)) Diblok kopolimerizasyonuna ait ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃).

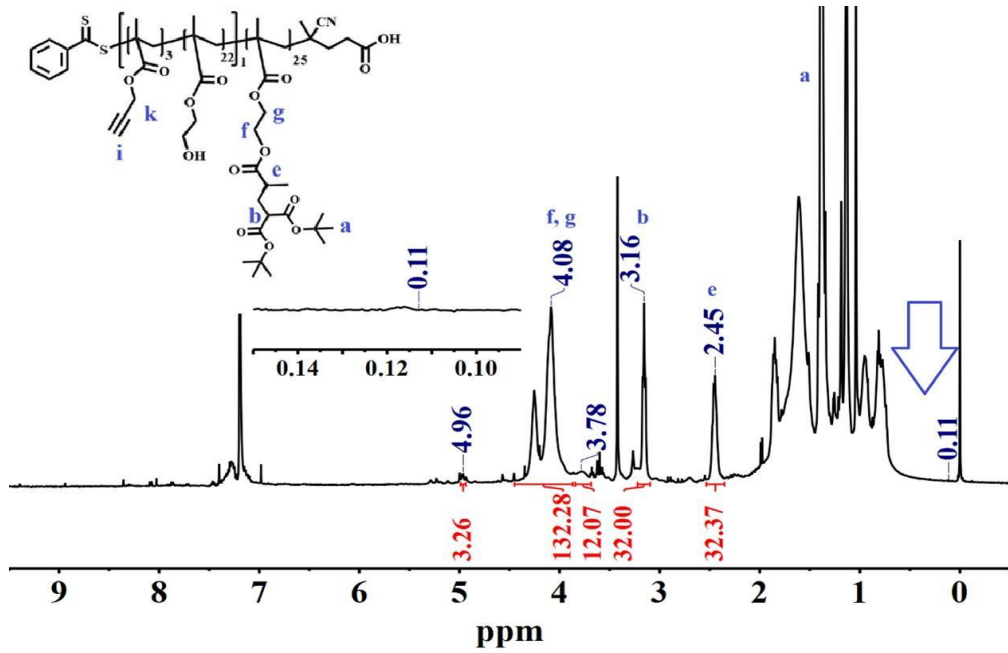
Diblok kopolimerin ayrıca THF-GPC ve FT-IR karakterizasyonları yapılmıştır (Şekil 3.6). Beklenildiği üzere 2 farklı monomer yapısının da polimer zincirine eklenmesiyle molekül ağırlığı 17.75 ten biraz daha yükselerek $M_{n\text{GPC}}$ sonucu olan 25.44 kDa'a ulaşmış, polidispersitesi $M_w/M_n = 1.31$ olarak hesaplanmıştır. P(MAETC-*b*-(HEMA-TMSpMA)) triblok kopolimerizasyonu sonunda eklenen HEMA ünitelerinden gelen hidroksil gruplarından ötürü 3000-3500 cm⁻¹ civarı geniş sinyalde O-H bandı gerilmesi görülmektedir. Sadece 1 ünite polimerize olduğundan TMSpMA monomerinden gelen ayırt edici bir sinyal görülememiştir.



Şekil 3.6 : P(MAETC-*b*-(HEMA-TMSPMA)) diblok kopolimerine ait THF-GPC analizi ve FT-IR analizine ait grafikler.

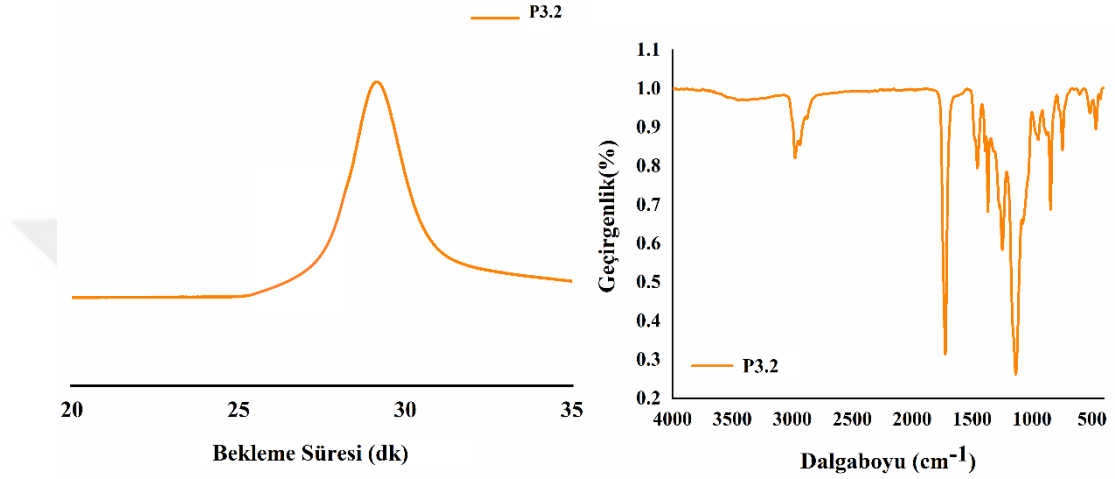
3.1.4 P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA)), TMS gruplarının uzaklaştırılması

P(MAETC-*b*-(HEMA-TMSPMA)) polimerinin HEMA ve TMSPMA koruma gruplu monomerlerinin sırayla koruma gruplarının kaldırılması gerekmektedir. Bu sebeple önce alkinil gruplarını açığa çıkarmak amacıyla TBAF varlığında trimetilsillil deprotection reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun başarısı koruma gruplarının tamamen kaldırıldığı ile ölçülmüş, $^1\text{H-NMR}$ analizleri ile 0.11 ppm deki TMS piklerinin kaybolduğu görülmüştür (Şekil 3.7)



Şekil 3.7 : P(MAETC-*b*-(HEMA-pMA))- deprotection TMS, Diblok kopolimerin TMS gruplarının kaldırılması reaksiyonuna ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (CDCl_3).

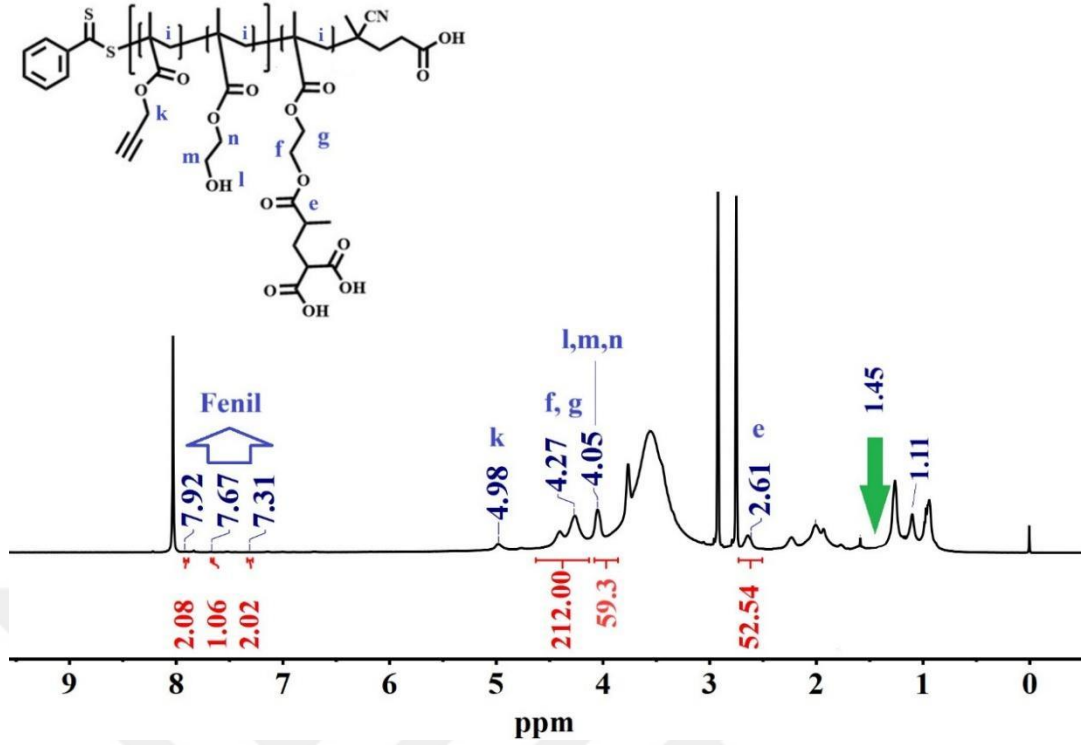
Diblok kopolimerin TMS koruma gruplarının kaldırılması reaksiyonu için DMF-GPC ve FT-IR karakterizasyonları yapılmıştır (Şekil 3.8). Trimetilsillil gruplarının yapıdan uzaklaşması ile molekül ağırlığı M_N GPC:25.44 kDa'dan biraz azalarak 24.30 kDa'a inmiş, polidispersitesi $M_W/M_N= 1.27$ olarak hesaplanmıştır. P(MAETC-*b*-(HEMA-pMA)) trimetilsillil gruplarının hidroliz reaksiyonu neticesinde oluşan yeni alkin uç grup için 2260 cm^{-1} de küçük bir sinyal ile CEC üçlü bağ gerilmesi görülmüştür.



Şekil 3.8: P(MAETC-*b*-(HEMA-pMA)) polimerine ait koruma DMF-GPC ve FT-IR analizine ait grafikler.

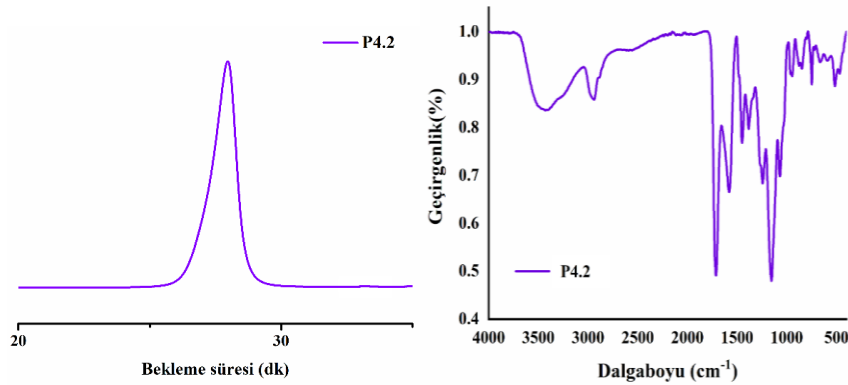
3.1.5 P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA)), Tersiyer butil gruplarının uzaklaştırılması

P(MAETC-*b*-(HEMA-pMA)) polimerinin konsantre trifloroasetik asit ortamında hızlı bir şekilde uzaklaştırılması için 2 saatlik bir reaksiyon yeterli olmuştur. Reaksiyon karışımı hızlıca diyalize alınmış ve ilk 6 saat saat başı su değişimi ile, asit ortamdan hızlıca uzaklaştırılmıştır. TFA kokusu 1 gün sonunda kaybolursa da kesin sonuç için 2 gün boyunca diyaliz devam etmiştir. Diyaliz sonrası liyofilize edilen bileşik, DMF- d_7 $^1\text{H-NMR}$ ile karakterize edilmiştir. Reaksiyonun başarıyla gerçekleştiği MAETC monomerinin tersiyer butil gruplarına ait 1.45 teki güçlü sinyalin tamamen kaybolduğu ile gözlenmiştir. Yeni molekül ağırlığı 18.42 kDa olarak hesaplanmıştır (6 x 53 ünite tersiyel bütıl yerine hidrojen atomu gelmiştir). (Şekil 3.9)



Şekil 3.9 : P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA)) polimerin TBOC gruplarının kaldırılması reaksiyonuna ait ^1H -NMR spektrumu (DMF- d_7).

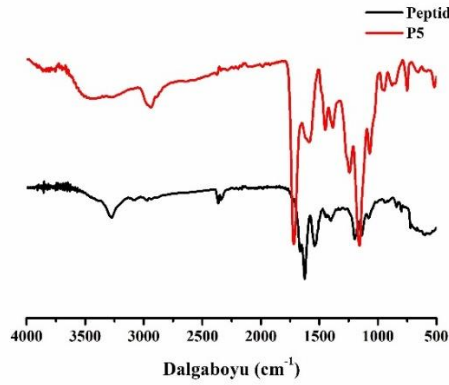
Diblok kopolimerin TBOC koruma gruplarının kaldırılması reaksiyonu için H_2O -GPC ve FT-IR karakterizasyonları yapılmıştır (Şekil 3.10). GPC analizi neticesinde molekül ağırlığında radikal bir iniş görülmüş 24.36 kDa olan bir önceki polimerden 14.08 kDa a düştüğü ölçülmüştür. Polidispersitesi $M_w/M_n = 1.07$ hesaplanmıştır. P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA)) için yapılan FT-IR analizinde ise MAETC monomerinin tersiyer butil gruplarının kaldırılması ve yerine karboksilik asit oluşmasıyla $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ arası belirgin O-H bandı gerilmesi olduğu görülmüştür.



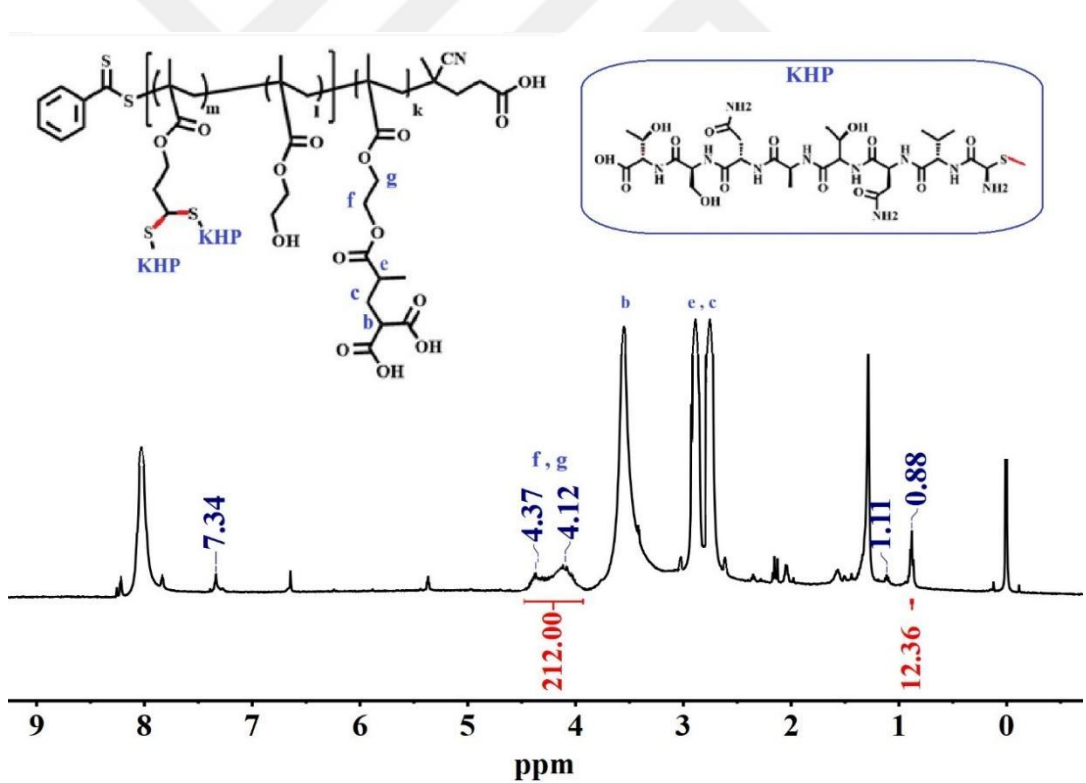
Şekil 3.10 : P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA)) polimerinin TBOC koruma gruplarının kaldırılması reaksiyonuna ait H_2O -GPC ve FT-IR analizlerine ait grafikler.

3.1.6 P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA@KHP)) Tiyol-alkin ‘click’ kimyası ile peptid polimer konjugasyonu

P(MAETC-*b*-(HEMA-PMA@KHP)) polimerinin sentezinde 365nm ışık altında gerçekleştirilen tiyol alkin click kimyası ile reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Peptid yapısına ve polimer-peptid konjugasyonuna ait DMF-d₇ ¹H-NMR spektroskopileri kıyaslandığında görüldüğü üzere peptide ait -SH gruplarından gelen proton sinyalinin (4.24-4.26 ppm'deki 2 adet dublet sinyal) MAETC den gelen f,g protonlarıyla aynı aralıkta çıktığı görülmüştür (Şekil 3.12). Bu durumda peptid bağlanma yorumu karşılaştırmalı FT-IR analizinden yapılmıştır. S-C bağının gerilmesine bağlı 650-750 cm⁻¹ arası ve 1000-1100 cm⁻¹ arası yeni oluşan sinyaller mevcuttur (Şekil 3.11).Yapıda 1 ünite bulunan pMA monomerinin 1 ek. alkin grubuna 2 ek. tiyol uçlu peptid bağlanmasına istinaden yeni molekül ağırlığı 20.04 kDa olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.11 : P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA@KHP)) Peptid - Polimer ile peptid karşılaştırmalı FT-IR analizi.



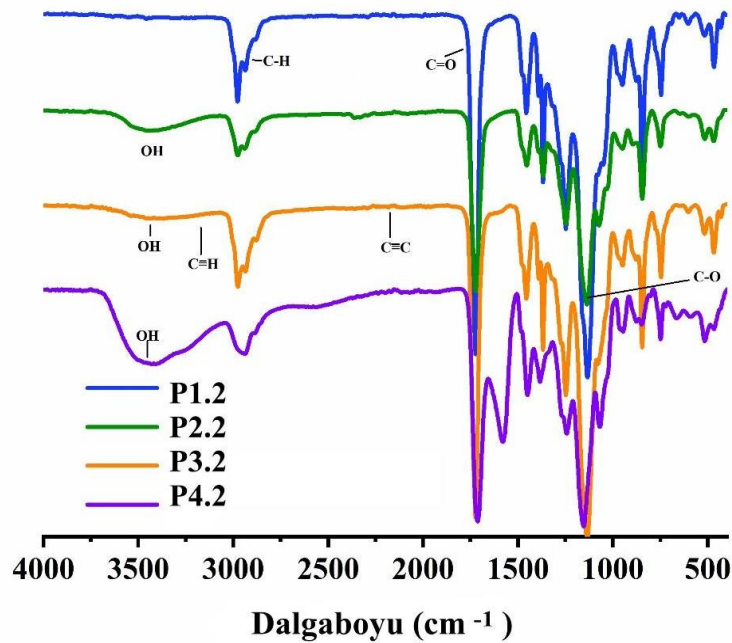
63

3.1.7 Polimer karakterizasyonlarının karşılaştırılması

FT-IR Karakterizasyonlarının Karşılaştırması

Monomerlerin polimerize olduğunu kanıtlamak ve yeni oluşan bağları karakterize etmek için FT-IR spektroskopisi kullanıldı (Şekil 3.13). Analizlerde zayıflatılmış toplam yansıtma (ATR) cihazı ve germanyum kristali ile donatılmış bir Bruker Alpha kızılötesi spektrometresi kullanıldı. Numunelerin FT-IR spektrumları, iletim modunda 16 taramadan 4 cm^{-1} çözünürlükte 400-4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında kaydedildi. Spektrumlar "OPUS" ve Origin Pro 8.5 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

Sentezlenen polimerlerin aşama aşama FT-IR analizlerinin karşılaştırıldığı Şekil 3.13'te de görüldüğü gibi P1.2 (mavi) homopolimerinden P2.2 (yeşil) diblok kopolimere geçerken HEMA monomerinden gelen 3000-3500 cm^{-1} civarı geniş sinyalde O-H bandı gerilmesine bağlı sinyal alınmaya başlanmıştır. Bu sinyalin P4.2 (mor) karboksil uçlu polimer ile çok daha güçlenmesi, fonksiyonel gruplardaki istenen değişimi ortaya koymaktadır. TMS gruplarının kaldırıldığı P3.2(turuncu) polimerde 1 ünitelik pMA monomerinde 2260 cm^{-1} de küçük bir sinyal ile yeni oluşan C $\equiv$ C üçlü bağ gerilmesi gözlenmiştir.

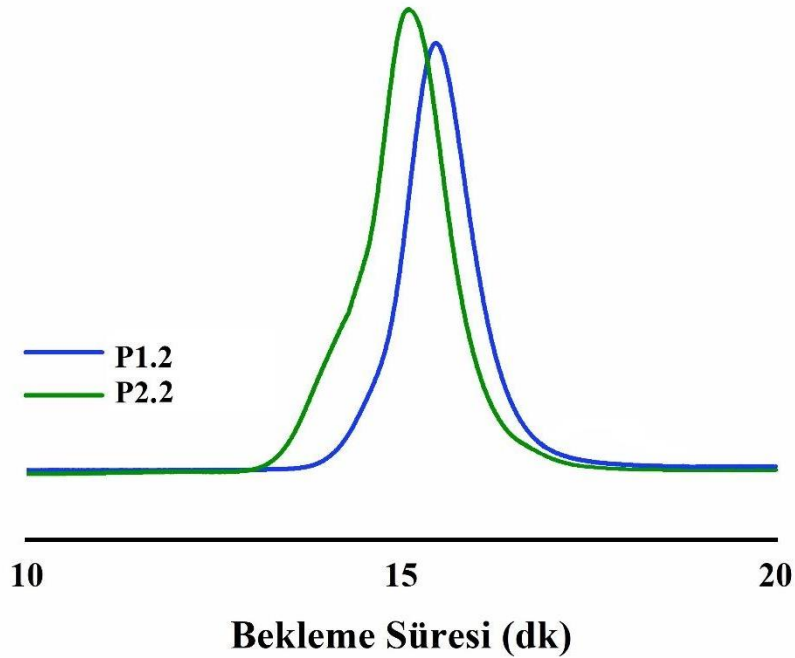


Şekil 3.13 : Sentezlenen Polimerlerin FT-IR analizleri karşılaştırması. P1.2: Homopolimer, P2.2: Diblok kopolimer P3.2: Trimetilsillil koruma gruplarının hidrolizi, P4.2: Tersiyer butil koruma gruplarının hidrolizi.

GPC Analizlerinin Karşılaştırması

İlk sentezlenen polimer serisinin THF-GPC ve DMF-GPC karakterizasyonlarında görülmüştür ki polimerizasyon istenildiği gibi kontrollü olmamış ve boyut dağılık gözlenmiştir. İkinci polimer serisinde THF-GPC, DMF-GPC ve H₂O-GPC analizleri neticesinde daha düzgün bir molekül ağırlığı dağılımı gözlenmiş dolayısıyla peptid konjugasyonu, ilaç yükleme ve misel oluşturmak, *in vitro* salım deneyi ve hücre kültürü çalışmalarına devam etmek için bu seri tercih edilmiştir. Polimer serilerinin karşılaştırmalı grafikleri alttaki gibidir. (Şekil 3.14, 3.15).

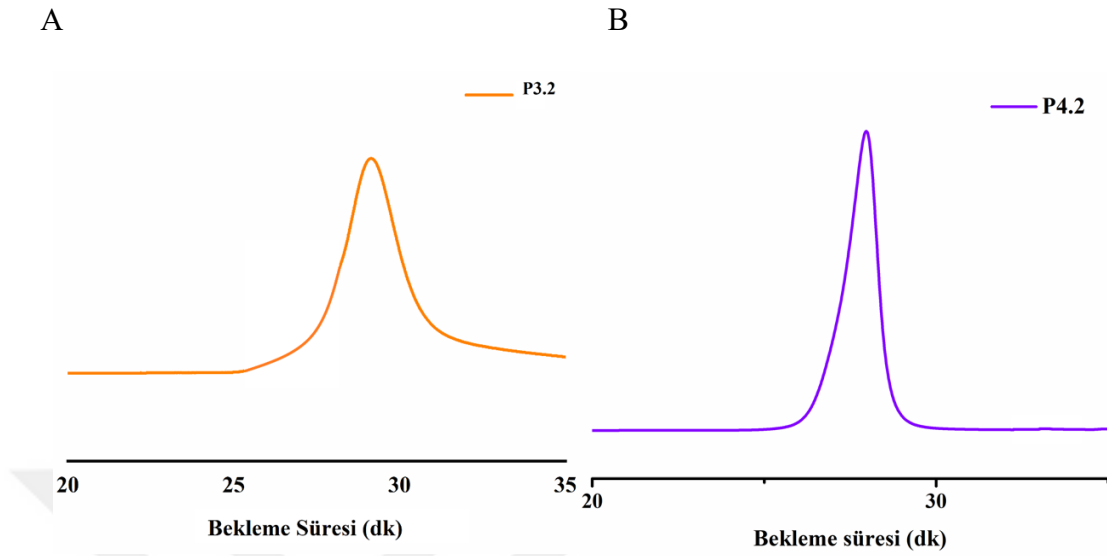
Homopolimer ve diblok kopolimerin birlikte gözlenebildiği alttaki grafikte diblok kopolimerin sola kayması molekül ağırlığı dağılımındaki artışı göstermektedir.



Şekil 3.14 : Sentezlenen P1: P(MAETC) Homopolimer ve P2: P(MAETC-*b*-(HEMA-TMSpMA)) Diblok kopolimerlerin THF-GPC analiz grafiği.

İki aşamalı koruma gruplarını kaldırma reaksiyonlarında farklı mobil fazlar kullanılarak GPC analizleri yapılmıştır (P3.2 için DMF-GPC, P4.2 için H₂O-GPC). Normalde her ikisinin de DMF -GPC ile analizi yapılmak istenirken, P4.2 için ¹H-NMR ile kıyaslandığında tutarsız GPC verileri alınması üzerine polimerin suda çözünürlüğünün daha iyi olduğu H₂O-GPC ile daha gerçekçi sonuçlara ulaşıldığından bu yöntem tercih edilmiştir. Grafiklerin karşılaştırılması yerine sayısal değerlerin değerlendirilmesi yapıldığında görülmüştür ki, diblok kopolimerden (P2.2) TMS grupları çıkarılmış polimere (P3.2) geçerken küçük bir molekül ağırlığı değişimi

olmuştur. Ancak molekül ağırlığı TMS grupları çıkarılmış polimerden (P3.2) TBOC gruplarının kaldırıldığı polimere (P4.2) geçerken ciddi düşüş göstermiştir. (Şekil 3.15)



Şekil 3.15 : A) P3: P(MAETC-*b*-(HEMA-pMA)), Diblok kopolimerin TMS gruplarının kaldırılması reaksiyonuna ait DMF-GPC analiz grafiği. B) P4.2: : P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA)) polimerin TBOC gruplarının kaldırılması reaksiyonuna ait H₂O-GPC analiz grafiği.

3.2 Misel Karakterizasyonu

3.2.1 Partikül boyutu ve zeta potansiyel analizi

Dinamik ışık saçılımı (DLS), sıvı bir ortamda dağılmış farklı türdeki parçacıkların karakterizasyonu için kullanılan bir tekniktir. Cihazdan gelen lazer ışığı berrak bir küvet içerisindeki numuneden geçerken, süspansiyondaki parçacıklar veya moleküller Brown hareketine bağlı olarak, farklı yoğunluklarda saçılmasına neden olur. Bu yoğunluk dalgalanmalarının analizi, Brown hareketinin hızını ve dolayısıyla Stokes-Einstein denklemini kullanarak parçacık boyutunu verir: $RH = kBT/6\pi\eta D$, burada RH nanoparçacığın hidrodinamik yarıçapıdır, kB Boltzmann sabitidir, T Kelvin cinsinden sıcaklıktır, η numunenin viskozitesi ve D difüzyon katsayısıdır (Tablo 3.2).

Oluşturulan misellerin DLS ölçümü neticesinde peptidsiz misellerde 53-85 nm arası boyut ve 0.39-0.603 arası pDI görülürken, peptidli misellerde 234-437 nm arası boyut 0.771-0.740 arası pDI görülmüştür. Tüm miseller için polidispersitesinin kabul edilebilir aralıkta olması istenilen bir sonuçtur. Hem peptidli hem de peptidsiz miseller CDDP yüklenmesi ile boyutunun küçüldüğü gözlenmiştir. CDDP yüklenmesi durumunda peptidsiz misel %37.4 küçülmeye giderken, peptidli misel %46,43

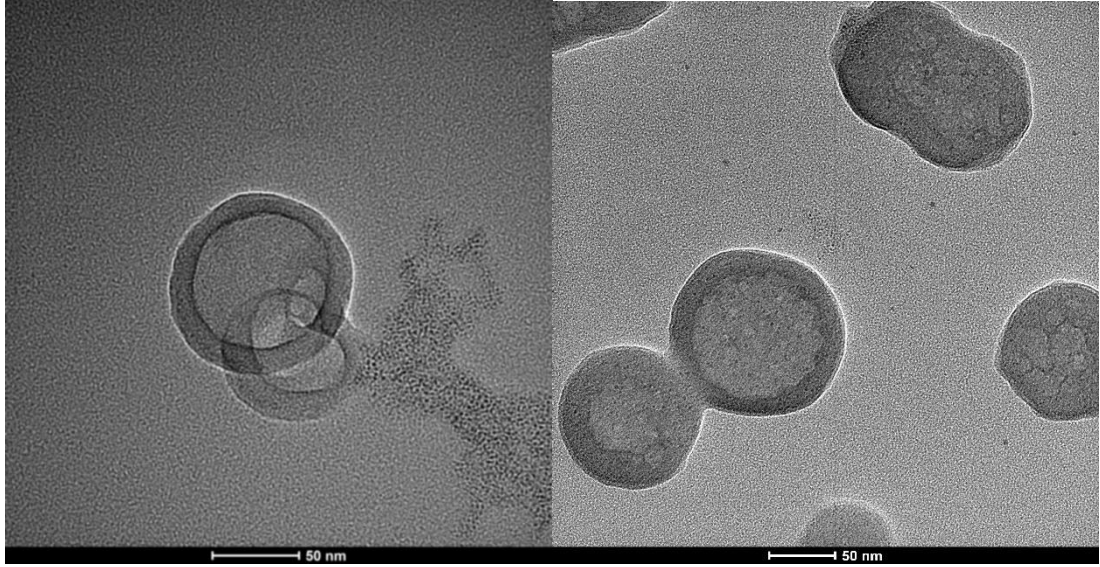
oranında küçülmüştür. Peptidsiz miseldeki ideal parçacık boyutunun peptidli miselde çok daha büyük çıkması, ölçüm sırasında peptidli süspansiyonun çok hızlı agrege olup çökmesi ve DLS cihazının yeterince hızlı analiz edememesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Gerçekteki boyut verileri TEM görüntülerinde verilmiştir (Şekil 4.16) Partiküllerin yüzey yükü açısından değerlendirmek gerekirse, ilaç yüklendikten sonra negatiften pozitif doğru bir kayma olduğu görülmektedir. Bunun +2 değerlikli platin iyonlarının misel oluşumuna dahil olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Tablo 3.2 : Misellerin karakterizasyonu. Miseller için hidrodinamik boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeksi karakterizasyonu DLS cihazı ile analiz edilmiştir.

Kod	Nanoparçacık	Hidrodinamik boyut (d.nm)	Đ	ζ-potansiyel (mV)
M0	P4.2	85.38	0.39	-23.6 ± 3.66
M1	CDDP@P4	53.44	0.603	-14.12±1.68
M2	P5	437.25	0.740	-27.2±1.28
M3	CDDP@P5	234.2	0.771	-24.4±0.64

3.2.2 TEM analizi

TEM analizi FEI TALOS F200S TEM 200 kV mikroskobu ile yapılmıştır. Ultra saf su içinde hazırlanmış yaklaşık 0.75mg/mL konsantrasyondaki derişik miseller ile ölçüm yapılmıştır. M1 (CDDP@P4) için partiküllerin ortalama çapı 74.61 nm hesaplanırken, M3 (CDDP@P5) için hesaplanan değer 117.68 nm dir (Şekil 3.17). Misel yapılarının küresel ve birbirine yakın boyutta olduğu, istenilen unimodal dağılım özelliklerini sağladığı görülmektedir. TEM görüntülerinde gözlenen partiküllerin boyutunun birbirine olan yakınlığı DLS sonuçlarındaki polidispersite verilerini de doğrulanmıştır. (Tablo 3.2)



Şekil 3.16 : CDDP@P4 ve CDDP@P5 için TEM görüntüleri.

3.2.3 İlaç yüklenme Kapasitesi

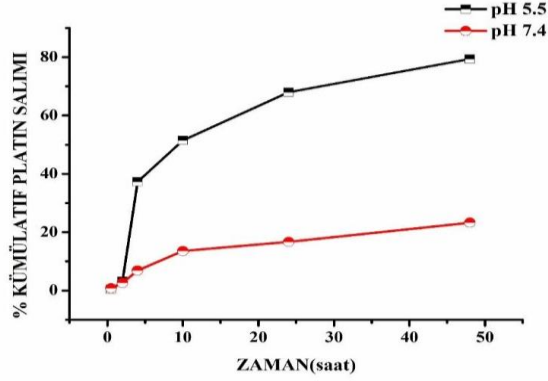
Hazırlanan ilaç yüklü miseller için (M1 ve M3) ilaç yükleme kapasitesi kantitatif ICPMS elemental platin tayini yöntemiyle ölçülmüştür. Misel oluşturmada kullanılan CDDP miktarına göre peptidli misel %16.24 yüklenmişken, Peptidsiz misel %24.17 yüklenmiştir. M1 ve M3 hazırlanmasında kullanılan polimerlerde CDDP ile kompleks oluşturan MAETC ünite sayısı birebir aynıdır (53 ünite).

3.3 *in vitro* Değerlendirme

3.3.1 *in vitro* ilaç salım deneyi

Fizyolojik pH(7.4) ile kıyaslandığında tümör mikroçevresine özgü asidik pH(5.5)'te seçici olarak kontrollü ilaç salımı yapması beklenerek tasarlanan bu çalışmadaki misel sistemi için CDDP ilaç salım deneyi prosedürü ayrıntılı olarak ilgili başlıkta anlatılmıştır. Belirlenen saat aralıklarında toplanan numuneler, içeriğindeki platin elementinin miktar tayininin yapılması amacıyla kantitatif elemental tayin yöntemi ICP-MS ile analiz edilmiştir. Bunun için numuneler önce aqua regia (kral suyu) çözeltisi ile muamele edilmiş, daha sonra ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak, analize alınmıştır. Analiz sonuçları doğrultusunda hesaplanan değerler doğrultusunda oluşturulan % kümülatif salım grafiği alttaki gibidir (Şekil 3.17). Saatlik olarak % kümülatif ilaç salım değerleri ise sırasıyla pH: 5.5 için 0. saat, 30 dk, 2 saat, 4 saat, 10 saat, 24 saat, 48 saat olmak üzere %0.39, 3.20, 37.31, 51.49, 68, 79.38 ve pH:7.4 için

%0.78, 2.60, 6.87, 13.55, 16.67, 23.27 dir. Tasarlanan pH duyarlı polimerik misel sistemin istenildiği gibi asidik pH da fizyolojik pH'ya karşı zamana bağlı olarak ilacı daha hızlı saldıgı görülmektedir.



Şekil 3.17 : CDDP yüklü hedeflendirilmiş misel (CDDP@P5) için 48 saatlik %kümülatif ilaç salım grafiği.

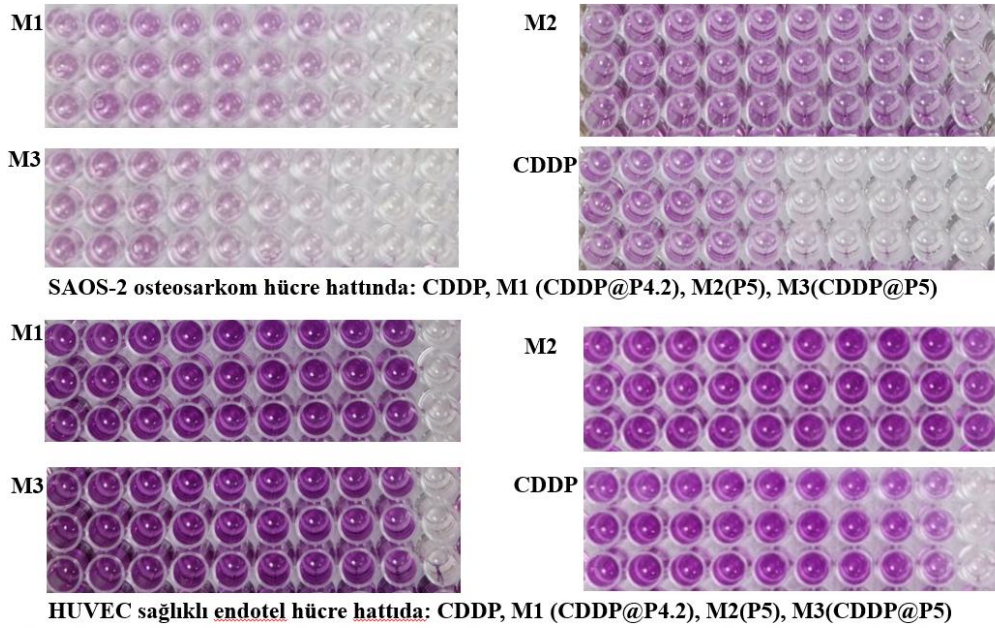
3.3.2 Hücre kültürü ve sitotoksisite değerlendirmesi

Hazırlanan misel formülasyonlarından serbest CDDP, M1(CDDP@P4.2), M2(P5) ve M3(CDDP@P5) için *in vitro* sitotoksisite çalışmaları SAOS-2 ve HUVEC hücre hatlarında MTT sitotoksisite testi ile değerlendirilmiştir. Serbest CDDP, M1 ve M3 eşit ilaç konsantrasyonu içerecek şekilde hazırlanmış, M2 için ise polimer miktarı M3 ile eşitlenerek ana örnekler hazırlanmıştır. Daha sonra 10 farklı konsantrasyonda 200 µM'dan başlayarak yarılanarak azalan 10 konsantrasyon için ardından test kuyularına eklenmiş, her grup 3 tekrarlı olacak şekilde 2 farklı hücre hattında denenmiştir. 24 saat kimyasal muamelesinden sonra kuyulara MTT reaktifi eklenerek 3 saat beklenmiştir. Daha sonra her kuyuya DMSO eklenmesinin ardından 20 dk sonra ELISA Reader cihazı ile ölçümler alınmıştır. Analiz neticesinde hazırlanan nihai misellerin sağlıklı hücrelerde daha az sitotoksisite gösterirken, kanserli kemik hücrelerinde daha çok toksik etki gösterdiği görülmüştür (Şekil 3.18-3.19). %Canlılık hesaplaması için öncelikle sadece DMSO eklenmiş olan kuyulardaki yansıma payı tüm değerlerden çıkartılmıştır. Daha sonra $n=3$ tekrarlı olan değerlerin ortalaması alınmıştır. Son olarak alttaki formül uygulanarak hesaplama yapılmıştır. 96-well plate fotoğrafları ve hesaplama ait grafik Şekil 3.18 ve 3.19'dan incelenebilir.

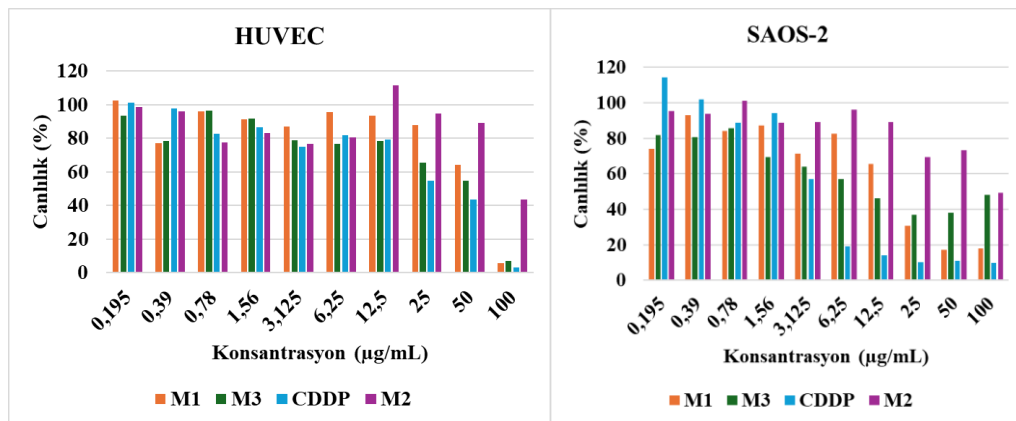
$$\%Canlılık = \frac{\text{Kimyasal Uygulanan Hücreler}}{\text{Kontrol Grubu}} \times 100$$

%Canlılık üzerinden IC_{50} değerleri de hesaplanmış (Tablo 3.3), neticede SAOS-2 için serbest CDDP için 3.103 µg /mL iken M3 için 3.234 µg/mL bulunmuştur. Bu değerler

yakın olsa da daha azalan konsantrasyonlarda M3 ün daha çok sitotoksosite gösterdiği Şekil 3.18 de görülmektedir. Bu durum hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin daha geniş bir konsantrasyon aralığında etki gösterdiğini kanıtlamaktadır. Ayrıca yeni formülasyonun kanserli SAOS-2 sağlıklı ve HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi serbest CDDP ile kıyaslandığında hedefleyici taşıyıcı sistemin daha az sitotoksik olduğu ve ilacın yan etki profilini azaltabileceği düşünülebilir.



Şekil 3.18 : SAOS-2, HUVEC hücre hatlarında M1, M2, M3 ve serbest CDDP için antikanser aktivitenin incelenmesi. Soldan sağa giden kuyularda ilaç konsantrasyonu artmaktadır. Antikanser etkinlik değerlendirmesi kimyasal varlığında azalan hücresel metabolizmaya bağlı olarak azalan mor renk ile ilişkilidir.



Şekil 3.19 : SAOS-2, HUVEC hücre hatlarında M1, M2, M3 ve serbest CDDP için %Canlılık hesaplaması ve değişen konsantrasyona göre karşılaştırmalı grafiği.

Tablo 3.3: SAOS-2 ve HUVEC için hesaplanan IC₅₀ değerleri.

Kod	İçerik	IC ₅₀ µg/mL	IC ₅₀ µg/mL
		HUVEC	SAOS-2
M1	CDDP@P4.2	72.7	16.7
M2	P5	111.3	268
M3	CDDP@P5	333.4	3.2
CDDP	Serbest Cisplatin	196.9	3.1

3.4 Sonuç

Bu tez çalışmasında osteosarkom tedavisine yönelik yeni bir polimer olan P(MAEMA-*b*-(HEMA-pMA@KHP)) polimeri RAFT polimerizasyonu ve tiyol-allkin click kimyası yöntemiyle başarıyla sentezlenmiş ¹H-NMR spektroskopisi, GPC kromatografisi ve FT-IR spektroskopisi analizleri ile karakterize edilmiştir. Daha sonra hafif bazik (pH:8-9) ortamda CDDP ile yüklenirken, kendiliğinden misel oluşturması sağlanmış ve parçacık boyutu, zeta potansiyel ve TEM görüntü analizleri yapılmıştır. Daha sonra serbest ilaç, boş misel, peptidli ilaç yüklü misel ve peptidsiz ilaç yüklü miseller için (M0, M1, M2, M3) iki farklı pH'da (5.5. ve 7.4) ilaç salım deneyi ve kanserli SAOS-2 osteosarkom sağlıklı HUVEC göbek kordonu endotel hücrelerinde sitotoksosite analizi yapılmıştır. Tüm bu değerlendirmeler neticesinde elde edilen elde edilen polimerlerin kendiliğinden sulu ortamda küresel nanometre 117.68 nm boyutlarında misel oluşturduğu TEM analizinde görülmüştür. Ultra saf su ile hazırlanan misellerden CDDP@P4 ile kıyaslandığında peptidli CDDP@P5 hızlı bir şekilde agregre olmaktadır. Sağlıklı HUVEC hücreleri ve SAOS-2 osteosarkom hücrelerinde yapılan MTT sitotoksosite analizinde, peptidli olan CDDP@P5'in serbest ilaç ve peptidsiz CDDP@P4 ile kıyaslandığında daha yüksek sitotoksosite gösterdiği ölçülmüştür. Yapılan bu çalışmada görülmüştür ki, seçici hedefleme amacıyla peptid kullanılarak yapılan polimerik miseller ile konvansiyonel ilaçların performansı arttırılabilmektedir. Daha ileri çalışmalar ile bu çeşit sistemler mevcut tedavilere gelişmiş bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Ferguson, J. L., & Turner, S. P.** (2018). Bone cancer: diagnosis and treatment principles. *American family physician*, 98(4), 205-213.
- [2] **Scotlandi, K., Hattinger, C. M., Pellegrini, E., Gambarotti, M., & Serra, M.** (2020). Genomics and therapeutic vulnerabilities of primary bone tumors. *Cells*, 9(4), 968.
- [3] **Zhao, X., Wu, Q., Gong, X., Liu, J., & Ma, Y.** (2021). Osteosarcoma: a review of current and future therapeutic approaches. *Biomedical engineering online*, 20, 1-14.
- [4] **Barani, M., Mukhtar, M., Rahdar, A., Sargazi, S., Pandey, S., & Kang, M.** (2021). Recent advances in nanotechnology-based diagnosis and treatments of human osteosarcoma. *Biosensors*, 11(2), 55.
- [5] **Kartsogiannis, V., & Ng, K. W.** (2004). Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and cellular endocrinology*, 228(1-2), 79-102.
- [6] **Chindamo, G., Sapino, S., Peira, E., Chirio, D., Gonzalez, M. C., & Gallarate, M.** (2020). Bone diseases: Current approach and future perspectives in drug delivery systems for bone targeted therapeutics. *Nanomaterials*, 10(5), 875.
- [7] **Dag, A., Omurtag Ozgen, P. S., & Atasoy, S.** (2019). Glyconanoparticles for targeted tumor therapy of platinum anticancer drug. *Biomacromolecules*, 20(8), 2962-2972.
- [8] **Uchino H, Matsumura Y, Negishi T, Koizumi F, Hayashi T, Honda T, Nishiyama N, Kataoka K, Naito S, Kakizoe T.**(2005) Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Br J Cancer*. 2005 Sep 19;93(6):678-87. doi: 10.1038/sj.bjc.6602772. PMID: 16222314; PMCID: PMC2361620.
- [9] **Si, M., Xia, Y., Cong, M., Wang, D., Hou, Y., & Ma, H.** (2022). In situ co-delivery of doxorubicin and cisplatin by injectable thermosensitive hydrogels for enhanced osteosarcoma treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 1309-1322.
- [10] **Jing, Z., Ni, R., Wang, J., Lin, X., Fan, D., Wei, Q., ... & Liu, Z.** (2021). Practical strategy to construct anti-osteosarcoma bone substitutes by loading cisplatin into 3D-printed titanium alloy implants using a thermosensitive hydrogel. *Bioactive Materials*, 6(12), 4542-4557.
- [11] **Gao, L., Cai, S., Cai, A., Zhao, Y., Xu, T., Ma, Y., ... & Hu, Y.** (2019). The improved antitumor efficacy of continuous intratumoral chemotherapy with cisplatin-loaded implants for the treatment of sarcoma 180 tumor-bearing mice. *Drug delivery*, 26(1), 208-215.
- [12] **Huynh, V. T., Quek, J. Y., de Souza, P. L., & Stenzel, M. H.** (2012). Block copolymer micelles with pendant bifunctional chelator for platinum drugs: effect of spacer length on the viability of tumor cells. *Biomacromolecules*, 13(4), 1010-1023.

- [13] **Babiuch, K., Dag, A., Zhao, J., Lu, H., & Stenzel, M. H.** (2015). Carbohydrate-specific uptake of fucosylated polymeric micelles by different cancer cell lines. *Biomacromolecules*, 16(7), 1948-1957.
- [14] **Sousa, S., & Clézardin, P.** (2018). Bone-targeted therapies in cancer-induced bone disease. *Calcified tissue international*, 102, 227-250.
- [15] **Gao, X., Li, L., Cai, X., Huang, Q., Xiao, J., & Cheng, Y.** (2021). Targeting nanoparticles for diagnosis and therapy of bone tumors: Opportunities and challenges. *Biomaterials*, 265, 120404.
- [16] **Sun, Y., Ye, X., Cai, M., Liu, X., Xiao, J., Zhang, C., ... & Wang, X.** (2016). Osteoblast-targeting-peptide modified nanoparticle for siRNA/microRNA delivery. *Acs Nano*, 10(6), 5759-5768.
- [17] **Sheng, G., Gao, Y., Yang, Y., & Wu, H.** (2021). Osteosarcoma and Metastasis. *Frontiers in oncology*, 11, 780264. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.780264>
- [18] **Gui, K., Zhang, X., Chen, F., Ge, Z., Zhang, S., Qi, X., ... & Yu, Z.** (2019). Lipid-polymer nanoparticles with CD133 aptamers for targeted delivery of all-trans retinoic acid to osteosarcoma initiating cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 751-764.
- [19] **Ni, M., Xiong, M., Zhang, X., Cai, G., Chen, H., Zeng, Q., & Yu, Z.** (2015). Poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles conjugated with CD133 aptamers for targeted salinomycin delivery to CD133+ osteosarcoma cancer stem cells. *International journal of nanomedicine*, 2537-2554.
- [20] **Chen, F., Zeng, Y., Qi, X., Chen, Y., Ge, Z., Jiang, Z., ... & Yu, Z.** (2018). Targeted salinomycin delivery with EGFR and CD133 aptamers based dual-ligand lipid-polymer nanoparticles to both osteosarcoma cells and cancer stem cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(7), 2115-2127.
- [21] **Chen, L., He, W., Jiang, H., Wu, L., Xiong, W., Li, B., ... & Qian, Y.** (2019). In vivo SELEX of bone targeting aptamer in prostate cancer bone metastasis model. *International journal of nanomedicine*, 149-159.
- [22] **Amaral, C. B., Leite, J. D. S., Fonseca, A. B. M., & Ferreira, A. M. R.** (2018). Vimentin, osteocalcin and osteonectin expression in canine primary bone tumors: diagnostic and prognostic implications. *Molecular biology reports*, 45(5), 1289-1296.
- [23] **Cutrer, J.** (2010). Identification of a tumor-targeting-peptide and development of a tumor-targeted-cytokine vector for systemic treatment of primary and metastatic malignancies. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College.
- [24] **Liu, G., Wang, M., He, H., & Li, J.** (2021). Doxorubicin-loaded tumor-targeting peptide-decorated polypeptide nanoparticles for treating primary orthotopic colon cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 744811.
- [25] **Qiu, R., Sun, D., Bai, Y., Li, J., & Wang, L.** (2020). Application of tumor-targeting peptide-decorated polypeptide nanoparticles with doxorubicin to treat osteosarcoma. *Drug Delivery*, 27(1), 1704-1717.
- [26] **Li, S., Zhang, T., Xu, W., Ding, J., Yin, F., Xu, J., ... & Hua, Y.** (2018). Sarcoma-targeting peptide-decorated polypeptide nanogel intracellularly delivers shikonin for upregulated osteosarcoma necroptosis and diminished pulmonary metastasis. *Theranostics*, 8(5), 1361.
- [27] **Sortino, R. M., Romanelli, S. M., Knoll, G. A., & Banerjee, I. A.** (2015). Development of peptide conjugated chlorogenic acid nanoassemblies for targeting tumorigenic cells. *Soft Materials*, 13(3), 150-159.

- [28] **Park, K.** (2014). Controlled drug delivery systems: past forward and future back. *Journal of Controlled Release*, 190, 3-8.
- [29] **Park, H., Otte, A., & Park, K.** (2022). Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond. *Journal of Controlled Release*, 342, 53-65.
- Ogay, V., Mun, E. A., Kudaibergen, G., Baidarbekov, M., Kassymbek, K., Zharkinbekov, Z., & Saparov, A.** (2020). Progress and prospects of polymer-based drug delivery systems for bone tissue regeneration. *Polymers*, 12(12), 2881.
- [30] **Adepu, S., & Ramakrishna, S.** (2021). Controlled drug delivery systems: current status and future directions. *Molecules*, 26(19), 5905.
- [31] **Hegde, M., Naliyadhara, N., Unnikrishnan, J., Alqahtani, M. S., Abbas, M., Girisa, S., ... & Kunnumakkara, A. B.** (2023). Nanoparticles in the diagnosis and treatment of cancer metastases: Current and future perspectives. *Cancer Letters*, 556, 216066.
- [32] **Xie, F., Li, R., Shu, W., Zhao, L., & Wan, J.** (2022). Self-assembly of Peptide dendrimers and their bio-applications in theranostics. *Materials Today Bio*, 14, 100239.
- [33] **Sapra, R., Verma, R. P., Maurya, G. P., Dhawan, S., Babu, J., & Haridas, V.** (2019). Designer peptide and protein dendrimers: a cross-sectional analysis. *Chemical reviews*, 119(21), 11391-11441.
- [34] **Crespo, L., Sanclimens, G., Pons, M., Giralt, E., Royo, M., & Albericio, F.** (2005). Peptide and amide bond-containing dendrimers. *Chemical Reviews*, 105(5), 1663-1682.
- [35] **Niederhafner, P., Šebestík, J., & Ježek, J.** (2005). Peptide dendrimers. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 11(12), 757-788.
- [36] **Wang, S. Y., Hu, H. Z., Qing, X. C., Zhang, Z. C., & Shao, Z. W.** (2020). Recent advances of drug delivery nanocarriers in osteosarcoma treatment. *Journal of Cancer*, 11(1), 69.
- [37] **Fang, Z., Sun, Y., Xiao, H., Li, P., Liu, M., Ding, F., Kan, W., & Miao, R.** (2017). Targeted osteosarcoma chemotherapy using RGD peptide-installed doxorubicin-loaded biodegradable polymeric micelle. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 85, 160-168. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.132>
- [38] **Low, S. A., Yang, J., & Kopeček, J.** (2014). Bone-targeted acid-sensitive doxorubicin conjugate micelles as potential osteosarcoma therapeutics. *Bioconjugate chemistry*, 25(11), 2012-2020. <https://doi.org/10.1021/bc500392x>
- [39] **Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Bannerjee, S. K.** (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation*, 2(1), 2.
- [40] **Sha, B., Gao, W., Han, Y., Wang, S., Wu, J., Xu, F., & Lu, T.** (2013). Potential application of titanium dioxide nanoparticles in the prevention of osteosarcoma and chondrosarcoma recurrence. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 13(2), 1208-1211.
- [41] **Iram, S., Khan, S., Ansary, A. A., Arshad, M., Siddiqui, S., Ahmad, E., ... & Khan, M. S.** (2016). Biogenic terbium oxide nanoparticles as the vanguard against osteosarcoma. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 168, 123-131.
- [42] **Sisubalan, N., Ramkumar, V. S., Pugazhendhi, A., Karthikeyan, C., Indira, K., Gopinath, K., ... & Basha, M. H. G.** (2018). ROS-mediated cytotoxic

- activity of ZnO and CeO₂ nanoparticles synthesized using the *Rubia cordifolia* L. leaf extract on MG-63 human osteosarcoma cell lines. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 10482-10492.
- [43] **Duncan, R.** (2014). Polymer therapeutics: Top 10 selling pharmaceuticals—What next?. *Journal of Controlled release*, 190, 371-380.
 - [44] **Feng, S., Wu, Z. X., Zhao, Z., Liu, J., Sun, K., Guo, C., ... & Wu, Z.** (2019). Engineering of bone-and CD44-dual-targeting redox-sensitive liposomes for the treatment of orthotopic osteosarcoma. *ACS applied materials & interfaces*, 11(7), 7357-7368.
 - [45] **Ambrosio, L., Raucci, M. G., Vadalà, G., Ambrosio, L., Papalia, R., & Denaro, V.** (2021). Innovative biomaterials for the treatment of bone cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 8214.
 - [46] **Xu, Y., Zhang, Z., Wang, H., Zhong, W., Sun, C., Sun, W., & Wu, H.** (2021). Zoledronic Acid-loaded hybrid hyaluronic acid/polyethylene glycol/nano-hydroxyapatite nanoparticle: novel fabrication and safety verification. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 629928.
 - [47] **Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C.** (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 75(1), 1-18.
 - [48] **Zhai, P., Peng, X., Li, B., Liu, Y., Sun, H., & Li, X.** (2020). The application of hyaluronic acid in bone regeneration. *International journal of biological macromolecules*, 151, 1224-1239.
 - [49] **Amiryaghoubi, N., Fathi, M., Barar, J., Omidian, H., & Omid, Y.** (2023). Advanced nanoscale drug delivery systems for bone cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1869(6), 166739. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166739>
 - [50] **Zhang, S., Dong, J., Pan, R., Xu, Z., Li, M., & Zang, R.** (2023). Structures, Properties, and Bioengineering Applications of Alginates and Hyaluronic Acid. *Polymers*, 15(9), 2149. <https://doi.org/10.3390/polym15092149>
 - [51] **Liu, M., Song, X., Wen, Y., Zhu, J. L., & Li, J.** (2017). Injectable thermoresponsive hydrogel formed by alginate-g-poly (N-isopropylacrylamide) that releases doxorubicin-encapsulated micelles as a smart drug delivery system. *ACS applied materials & interfaces*, 9(41), 35673-35682.
 - [52] **Osorno, L. L., Brandley, A. N., Maldonado, D. E., Yiantsos, A., Mosley, R. J., & Byrne, M. E.** (2021). Review of contemporary self-assembled systems for the controlled delivery of therapeutics in medicine. *Nanomaterials*, 11(2), 278.
 - [53] **Patra, J.K., Das, G., Fraceto, L.F. et al.** (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnol* 16, 71
 - [54] **Deirram, N., Zhang, C., Kermaniyan, S. S., Johnston, A. P. R., & Such, G. K.** (2019). pH-Responsive Polymer Nanoparticles for Drug Delivery. *Macromolecular rapid communications*, 40(10), e1800917. <https://doi.org/10.1002/marc.201800917>
 - [55] **Liu, J., Huang, Y., Kumar, A., Tan, A., Jin, S., Mozhi, A., & Liang, X. J.** (2014). pH-sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy. *Biotechnology advances*, 32(4), 693-710.
 - [56] **Sheng, G., Gao, Y., Yang, Y., & Wu, H.** (2021). Osteosarcoma and metastasis. *Frontiers in oncology*, 11, 780264.
 - [57] **Hegde, M., Naliyadhara, N., Unnikrishnan, J., Alqahtani, M. S., Abbas, M., Girisa, S., ... & Kunnumakkara, A. B.** (2023). Nanoparticles in the diagnosis

and treatment of cancer metastases: Current and future perspectives. *Cancer Letters*, 556, 216066.

- [58] **Aimetti, A. A., Feaver, K. R., & Anseth, K. S.** (2010). Synthesis of cyclic, multivalent Arg-Gly-Asp using sequential thiol-ene/thiol-yne photoreactions. *Chemical communications*, 46(31), 5781-5783.
- [59] **Fisher, S. A., Baker, A. E., & Shoichet, M. S.** (2017). Designing peptide and protein modified hydrogels: selecting the optimal conjugation strategy. *Journal of the American Chemical Society*, 139(22), 7416-7427.



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Işınsu MUTLU
Doğum Tarihi ve Yeri :
E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2020, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2020-2021 Yardımcı Eczacı, Historia Eczanesi
- 2021-2023 Eczacı, Liv Hospital Hastanesi
- 2024-... Araştırma Görevlisi, Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Biyoteknoloji Anabilimdalı

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- IX. Polymer Science and Technology Congress with International Participation POLİMER 2024 Kongresi, ‘Synthesis Of A Novel Polymeric Drug Delivery System For Osteosarcoma Treatment’ başlıklı poster sunumu
- Ulusal Eczacılık Kongresi’nde (MÜEFKON’25) ‘Osteosarkoma Yönelik Sentezlenen Yeni Bir Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemin in vitro Değerlendirilmesi’ başlıklı poster sunumu