

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PLGA NANOPARTİKÜLLERİ ve ÇEŞİTLİ KARBONHİDRATLARLA
BİRLEŞMESİNDEN OLUŞAN TÜREVLERİNİN HÜCRE İÇİNE GİRİŞ
YOLAKLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Abdülkadir Bahadır ALKAN

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ

TEMMUZ 2020

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PLGA NANOPARTİKÜLLERİ ve ÇEŞİTLİ KARBONHİDRATLARLA
BİRLEŞMESİNDEN OLUŞAN TÜREVLERİNİN HÜCRE İÇİNE GİRİŞ
YOLAKLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Abdülkadir Bahadır ALKAN
(175309003)

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ
İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

TEMMUZ 2020

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 175309003 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Abdülkadir Bahadır ALKAN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “PLGA NANOPARTİKÜLLERİNİN ve ÇEŞİTLİ KARBONHİDRATLARLA BİRLEŞMESİNDEN OLUŞAN TÜREVLERİNİN HÜCRE İÇİNE GİRİŞ YOLAKLARININ İNCELENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORI

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Eş Danışmanı : Prof. Dr. Fahri AKBAŞ

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. İlhan ONARAN

İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Ahmet ÖZAYDIN

İstanbul Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Birsen Elibol

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi :

Savunma Tarihi : 9 Temmuz 2020



Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tezimin yazım ve deney sürecinde bana desteklerini eksik etmeyen, süreçte bulunduğum durumu kontrol eden ve beni gerekli şekilde yönlendiren danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Fatemeh BAHADORİ'ye ve süreçte yardımcı olan eş danışmanım Doç. Dr. Fahri AKBAŞ'a;

Tez sürecimde laboratuvar imkanlarını kullanmamı sağlayan Biyoteknoloji Bölümü Ana Bilim Dalı başkanı Doç. Dr. Binnur TEMEL'e;

Süreçte bana fazladan destek veren Esmâ DEVELİ, Seda SÜSGÜN, Fatma KAZDAL ve Zehra ESKANDARİ'ye

Tez çalışmasında kullanılan Levan biyo-polimerinin temini için yardımcı olan Prof. Dr. Ebru Toksoy Öner'e

Ayrıca bu meşakkatli dönemde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyip bana yardımcı ve motivasyon kaynağı olan saygıdeğer ve sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Birimi 8.2019/15 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tarih: Ağustos 2020

Abdülkadir Bahadır ALKAN

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 çalışmasında 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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Abdülkadir Bahadır ALKAN

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	iv
BEYAN	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nano Taşıyıcı Sistemler	5
2.1.1. Nano küreler.....	6
2.1.2. Dendrimerler	7
2.1.3. Miseller	9
2.1.4. Polimerik Miseller.....	10
2.1.5. PLGA	11
2.1.6. PEG	12
2.1.7. Nano Kristaller.....	12
2.1.8. Nano Tüpler	14
2.1.9. Nano Emülsiyonlar.....	14
2.1.10. Nano Jeller	15
2.1.11. Niozomlar.....	16
2.1.12. Lipozomlar	17
2.1.13. Nano Süngerler.....	18
2.2. Hedefli Kanser Tedavisi	19
2.3. Hücre İçine Giriş Yolakları	20
2.3.1. Fagositoz	21
2.3.2. Pinositoz.....	21
2.3.3. Kaveola Aracılıklı Endositoz	22
2.3.4. Klatrin Aracılıklı Endositoz	23
2.3.5. Hücre İçine Giriş Yolaklarının Önemi.....	24
2.4. İNHİBİTÖRLER	25
2.4.1. Dynasore	25
2.4.2. Genistein	25
2.4.3. EİPA	25
2.4.4. Cyclodextrin.....	25
2.4.5. Chlorpromazine.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereçler	27
3.1.1. İnhibitörler.....	27
3.1.2. Kimyasallar	27
3.1.3. Cihazlar	27

3.1.4 Hücre Kültürü.....	28
3.2. Yöntemler	28
3.2.1. PLGA Hazırlanışı	28
3.2.2. FITC İşaretli PLGA Hazırlanışı	28
3.2.3. Levan Kaplı PLGA Hazırlanışı	29
3.2.4. Selüloz Kaplı PLGA Hazırlanışı	29
3.2.5. İnhibitör Hazırlanışı	29
3.2.6. Nano Taşıyıcı Sistemlerin Hücre İçine Giriş Miktar Tayini	30
3.2.7. ELISA	30
3.2.8. DLS	31
3.2.9. Zeta Potansiyel Tekniği.....	32
3.2.10. Nano Taşıyıcı ve İnhibitörlerin Hücrelere Verilmesi.....	32
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	34
4.1. Nano Taşıyıcı Sistemlerin Madde Miktar Tayini	34
4.1.1. Boş PLGA Nano Taşıyıcısının Karakterizasyonu	34
4.1.2. FITC işaretli PLGA Nano Taşıyıcısının Karakterizasyonu	36
4.1.3. Levan Kaplı PLGA Nano Taşıyıcısının Karakterizasyonu	37
4.1.4. Selüloz Kaplı PLGA Nano Taşıyıcısının Karakterizasyonu	39
4.3. Nano Taşıyıcı Sistemlerinin Toksikite Çalışmaları	41
4.3.1. Levan Kaplı PLGA, Selüloz kaplı PLGA ve FITC işaretli PLGA Zamana Bağlı Hücre İçine Giriş Çalışması.....	42
4.3.2. İnhibitörlerin Toksikite Çalışmaları.....	43
4.3.2.1. Dynasore İnhibitörünün Toksikite Çalışması.....	43
4.3.2.2. Genistein İnhibitörünün Toksikite Çalışması.....	44
4.3.2.3. Chlorpromazine İnhibitörünün Toksikite Çalışması	44
4.3.2.4. Cyclodextrin İnhibitörünün Toksikite Çalışması	45
4.3.2.5. EİPA İnhibitörünün Toksikite Çalışması	46
4.4. İnhibitörlerin Her Bir Nano Taşıyıcının Hücre içine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizleri	47
4.4.1. Dynasore İnhibitörünün Her bir Nano Taşıyıcının Hücre İçine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizi.....	47
4.4.2. Genistein İnhibitörünün Her bir Nano Taşıyıcının Hücre İçine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizi.....	48
4.4.3. Chlorpromazine İnhibitörünün Her bir Nano Taşıyıcının Hücre İçine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizi.....	48
4.4.4. EİPA İnhibitörünün Her bir Nano Taşıyıcının Hücre İçine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizi.....	49
4.4.5. Cyclodextrin İnhibitörünün Her bir Nano Taşıyıcının Hücre İçine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizi.....	50
4.5. Farklı İnhibitörlerin Aynı Nano Taşıyıcılara Etkisi	51
4.6. Nano Taşıyıcı ve İnhibitörlerin Floresan Mikroskop Görüntüleri	53
4.7. Tartışma.....	56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ.....	68

KISALTMALAR

CME : Clatrin Mediated Endocytosis

DLS : Dynamic Light Scattering

FDA : Food and Drug Administration

NP : Nano partikül

PCL : Polycaprolactone

PEG : Poly Ethylene Glycol

PGA : Polyglycolide

PLA : Poly lactic acid

PLGA: Poly lactlc-co-glycolic Acid

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1: Nano Taşıyıcıların DLS Değerleri	41
Tablo 4.2: Nano Taşıyıcıların Zeta Değerleri	41
Tablo 4.3: Tüm inhibitörlerin non-toksik dozlarının sonuçları.....	46
Tablo 4.4: İnhibitörler ve Etki Ettiği Yolakların Özeti	56
Tablo 4.5: Çalışmamız Sonucunda Elde Edilen Nano Taşıyıcılar ve İnhibitör İlişkisi ..	57



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Nano Taşıyıcıların Boyutları [11]	6
Şekil 2.2: Nano Boyut Yelpazesi [14]	6
Şekil 2.3: Dednimer yapısı [21]	9
Şekil 2.4: Misel yapısı [26].....	10
Şekil 2.5: Nano jel [52].....	16
Şekil 2.6: Lipozom şekli	18
Şekil 2.7: Nano sünger [59]	19
Şekil 4.1: PLGA DLS sonucu (yoğunlukça).	34
Şekil 4.2: PLGA DLS sonucu (sayıca).	35
Şekil 4.3: PLGA DLS değeri (hacimce).	35
Şekil 4.4: PLGA Nano Taşıyıcısının Zeta Potansiyel Sonucu	35
Şekil 4.5: FITC İşaretli PLGA DLS sonucu (hacimce).	36
Şekil 4.6: FITC İşaretli PLGA DLS sonucu (sayıca).	36
Şekil 4.7: FITC İşaretli PLGA DLS sonucu (yoğunlukça).	37
Şekil 4.8: FITC İşaretli Nano Taşıyıcısının Zeta Potansiyel Sonucu.....	37
Şekil 4.9: Levam 20 mg DLS sonucu (yoğunlukça).....	38
Şekil 4.10: Levam 20 mg DLS sonucu (sayıca).	38
Şekil 4.11: Levam 20 mg DLS sonucu (hacimce).	38
Şekil 4.12: Levam Kaplı PLGA Nano Taşıyıcısının Zeta Potansiyel Sonucu.....	39
Şekil 4.13: Selüloz 7,5 mg DLS sonucu (yoğunlukça).....	39
Şekil 4.14: Selüloz 7,5 mg DLS sonucu (sayıca).	40
Şekil 4.15: Selüloz 7,5 mg volume DLS sonucu (hacimce).....	40
Şekil 4.16: Selüloz Kaplı PLGA Nano Taşıyıcısının Zeta Potansiyel sonucu	40
Şekil 4.17: Çeşitli nano taşıyıcıların toksisitesi	42
Şekil 4.18: Levam kaplı PLGA (L), selüloz kaplı PLGA (S), FITC işaretli PLGA (F) ve işaretsiz PLGA (P) nano taşıyıcılarının hücre içine giriş grafiği (nano taşıyıcı ile muamele edilmeyen hücreler kontrol (K)). Her harf önündeki rakam deney süresini saat olarak göstermektedir.....	42
Şekil 4.19: Dynasore inhibitörünün toksisite grafiği.	43
Şekil 4.20: Genistein inhibitörünün toksisite grafiği.	44
Şekil 4.21: Chlorpromazine inhibitörünün toksisite grafiği.	45
Şekil 4.22: Cyclodextrin inhibitörünün toksisite grafiği.	45
Şekil 4.23: EİPA inhibitörünün toksisite grafiği.	46
Şekil 4.24: Dynasore inhibitörünün 24 saat bekleme sonucu ELİSA sonucu.	47
Şekil 4.25: Genistein inhibitörünün 24 saat bekleme sonucu ELİSA sonucu.	48
Şekil 4.26: Chlorpromazine inhibitörünün 24 saat bekleme sonucu ELİSA sonucu.	49
Şekil 4.27: EİPA inhibitörünün 24 saat bekleme sonucu ELİSA sonucu.....	50
Şekil 4.28: Cyclodextrin inhibitörünün 24 saat bekleme sonucu ELİSA sonucu.....	50
Şekil 4.29: Dynasore(D), genistein(G), cyclodextrin(C), chlorpromazine(K) ve EİPA(E) inhibitörlerinin PLGA(P) nano taşıyıcısı üzerindeki etkisi.....	51

Şekil 4.30: Dynasore(D), genistein(G), cyclodextrin(C), chlorpromazine(K) ve EİPA(E) inhibitörlerinin FITC işaretli PLGA(F) nano taşıyıcısı üzerindeki etkisi	52
Şekil 4.31: Dynasore(D), genistein(G), cyclodextrin(C), chlorpromazine(K) ve EİPA(E) inhibitörlerinin levanlı PLGA(L) nano taşıyıcısı üzerindeki etkisi	52
Şekil 4.32: Dynasore(D), genistein(G), cyclodextrin(C), chlorpromazine(K) ve EİPA(E) inhibitörlerinin selülozlu PLGA(S) nano taşıyıcısı üzerindeki etkisi	53
Şekil 4.33: Dynasore eklenmiş levanlı PLGA nano taşıyıcısı görüntüsü.....	54
Şekil 4.34: Genistein inhibitörü eklenmiş levanlı PLGA nano taşıyıcısı görüntüsü...	54
Şekil 4.35: Chlorpromazine inhibitörü eklenmiş levanlı PLGA nano taşıyıcısı görüntüsü.....	55
Şekil 4.36: Cyclodextrin eklenmiş levanlı PLGA nano taşıyıcısı görüntüsü.	55
Şekil 4.37: Sadece levanlı PLGA nano taşıyıcısı görüntüsü.	56



PLGA NANOPARTİKÜLLERİ VE ÇEŞİTLİ KARBONHİDRATLARLA BİRLEŞMESİNDEN OLUŞAN TÜREVLERİNİN HÜCRE İÇİNE GİRİŞ YOLAKLARININ İNCELENMESİ

ÖZET

Kanser hastalığı, hücrelerin kontrolünü kaybederek aşırı şekilde bölünmesidir. Kontrolsüz olarak çoğalan bu hücreler bulunduğu bölgede birikmeye başlarlar ve tümör denilen yapıyı oluştururlar. Nano taşıyıcı kullanarak geleneksel tedavilere nazaran daha iyi tedavi sonuçları elde edilmişken, nano taşıyıcının içinde taşıdığı kemoterapi ajanıyla birlikte hücre içine girişi büyük önem taşımaktadır. Bu tezde hücrelerin maddeleri hücre içine alım yollarından ve kanser hücrelerinin hızlı metabolizmalarından yararlanılarak laboratuvarında hazırlanan PLGA nano taşıyıcısının kanserli hücreler tarafından nasıl alındığı incelenmiştir. Böylelikle ileriki çalışmalarda tespit edilen hücre içine giriş yolağı daha çok kullanarak daha etkin tedaviler elde edilebilir. Kanser hücreleri beslenmek açısından alternatif enerji kaynakları bulsa da öne çıkan en büyük değişiklik glikoliz mekanizmasındaki değişikliklerdir. Kanser hücreleri Warburg etkisi ile hızlıca glikoz kaynağına ulaşmak ister. Bu isteğı kullanarak nano taşıyıcı sistem olarak kullanılacak olan PLGA (poli laktik asit ko glikolik asit), glikoz ve früktoz türevi olan selüloz ve levan ile kaplanarak MCF-7 meme kanserli hücre ortamına verilmiştir. Böylelikle MCF-7 meme kanseri hücrelerinin PLGA nano taşıyıcısına olan ilgisinin artırılması planlanmıştır. Ayrıca, nano taşıyıcı hücre giriş yolları olan klatrin aracılıklı endositoz, klatrinden bağımsız endositoz, makro pinositoz ve fagositoz yollarını inhibe edecek gerekli inhibitörlerle beraber verilerek nano taşıyıcının giriş yolları incelenmiştir. Her bir hücre için giriş yolağının literatürde mevcut olan farmakolojik veya kimyasal inhibitörü mevcuttur. Bu amaç için MCF-7 meme kanseri hücreleri kullanılmıştır. PLGA nano taşıyıcısı FITC işaretli olacağından floresan mikroskopu ile takip edilebilmiştir, detaylı ölçümler ELISA cihazı ile gerçekleşmiştir. Kullanılacak selüloz kaplı PLGA, levan kaplı PLGA, FITC işaretli PLGA ve PLGA nano taşıyıcılarının boyut analizleri DLS cihazıyla ve yükleri Zeta potansiyeli ile analiz edilmiştir. İnhibitör ve nano taşıyıcıların toksisite çalışmaları da Sulforhodamine B canlılık testi ile kontrol edilmiştir. Tüm nano taşıyıcı sistemler, buharlaştırma ve çöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır. FITC işaretli PLGA levan ve selüloz ile kaplanmıştır ve bunun FITC işaretli ve işaretsiz kaplanmamış PLGA nano taşıyıcıları hazırlanmıştır. İnhibitörlerin ve nano taşıyıcıların toksik olmayan dozları ölçülmüştür. Hücreler önce inhibitörlere maruz bırakılmış, aha sonra nano taşıyıcılar ile muamele edilmiştir. İnhibitöre maruz kalmayan hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. İnhibitörler en çok, kaplanmamış PLGA nano taşıyıcılarının hücre içine girişini etkilemiştir bu da kaplanmamış nano taşıyıcının hücre içine girişi için daha çok yolak kullandığını göstermektedir. Selüloz ile kaplanmış PLGA ve levan ile kaplanmış PLGA açısından, chlorpromazine en yüksek oranda hücre içine giriş engellemiştir bu da kaplanan nano taşıyıcıların hücre içine giriş için klatrinden bağımsız endositozu kullandığını göstermektedir.

Anahtar kelime: PLGA, MCF-7, ELİSA READER, levan, selüloz

STUDYING THE CELL INTERNALIZATION PATHWAYS OF PLGA NANOPARTICLES AND THE DERIVATIVES OBTAINED FROM ITS INCORPORATION WITH CARBOHYDRATES

SUMMARY

Cancer is a disease that cells lose control of division and have excessive division due to the mutations. These cells that reproduce uncontrollably begin to accumulate in the region where they are located. While using the nano carrier, better treatment results are obtained compared to traditional treatments. It is very important to enter the cell with the chemotherapy agent it carries in the nano carrier. In this thesis, it was investigated how the PLGA nano carrier which is prepared in the laboratory is uptaken by cancerous cells due to the fast metabolism of cancer cells. Thus, more effective treatments can be obtained by knowing more about the relationship between cellular uptake pathway and nano carriers. Although cancer cells find alternative energy sources in terms of nutrition, the major change is the changes in the glycolysis mechanism. Cancer cells want to quickly reach the source of glucose with the effect of Warburg. Using this request, PLGA (polylactic acid co glycolic acid), which will be used as a nano carrier system, is coated with cellulose and levan, which is a derivative of glucose and fructose, and introduced into the MCF-7 breast cancer cell environment. Thus, it is planned to increase the interest of MCF-7 breast cancer cells to PLGA nano carrier. In addition, the cellular uptake pathways of the nano carrier were examined by giving nano carrier and inhibitors together. With usage of inhibitors, clathrin independent endocytosis, macropinostosis and phagocytosis pathways are inhibited. There is a pharmacological or chemical inhibitor of the entry pathway available in the literature for each cell. For this purpose, MCF-7 breast cancer cells have been used. Since the PLGA nano carrier will be fluorescently labeled, it can be followed with a fluorescence microscope, detailed measurements were made with the ELISA device. Dimensional analysis of cellulose PLGA, levan PLGA, fluorescent PLGA and PLGA nano carriers were analyzed with DLS device and their loads with Zeta potential, and toxicity studies of inhibitors and nano carriers were checked with Sulforhodamine B viability test. All nano carrier systems are prepared by evaporation and precipitation method. The fluorescence labeled PLGA is covered with levan and cellulose, and its fluorescence labeled and unmarked PLGA nano carriers are prepared. Nontoxic doses of inhibitors and nano carriers were measured. Cells were first exposed to inhibitors, then treated with nano carriers. Cells that are not exposed to the inhibitor were used as a control. Inhibitors mostly affected the penetration of uncoated PLGA nano carriers into the cell. That suggests that the uncoated nano carrier could easily be uptaken by the cells. In terms of PLGA coated with cellulose and PLGA coated with levan, chlorpromazine prevented the highest rate of entry into the cell, indicating that the coated nanocarriers use clathrin independent endocytosis for entry into the cell.

Key words: PLGA, ELISA, MCF-7

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nanoteknoloji, günümüzden 20 yıl öncesinden bu yana hızla gelişmeye başlamış olup, eğitimden sağlığa, iletişimden savunma ve üretime birçok alanda önemli değişikliklere neden olmuştur. Bu alanların dışında ilaç ve tıp alanları da büyük ölçüde paylarını almışlardır. Nanoteknoloji, araçlar ve sistemler kullanılarak nanometre boyutunda maddelerin üretilmesi ve kullanılmasıdır [1]. Yunanca ‘nanos’ yani ‘cüce’ anlamına gelmektedir. Bu anlamdan yola çıkılırsa, nanoteknolojide çok küçük yani nanometre boyutundaki maddelerin bilimi olarak adlandırılabilir [1]. Nanoteknoloji alanı multidisipliner bir alandır. Fizik, biyoloji, biyokimyasal toksikoloji, ilaç bilimi, mühendislik gibi birçok farklı alanın bir arada çalışmasını gerektirir [2]. Böylelikle birçok farklı alandan uzman kişiler bir araya gelebilir. Bu bir araya geliş, farklı bakış açılarının ortaya çıkmasına ve nanoteknolojinin ilgili alanlarına daha iyi ve verimli şekilde uygulanmasına vesile olabilir. Böylelikle eksikliklerin giderilmesi daha verimli ve daha etkili şekilde gerçekleştirilebilir. Nanoteknoloji alanında geleneksel olarak boyutlar, 1 nanometre(nm) ile 100 nanometre(nm) arasındadır. Bu boyutların anlaşılabilmesi için şu şekillerde kıyaslama yapılabilir; bir protein molekülünün boyutu 1-20 nm arasında değişmektedir. DNA'nın genişliği ise yaklaşık 2,5 nm'dir. 1 nm de metrenin milyarda biri kadardır [1]. FDA (Food and Drug Administration), NNI (National Nanotechnology Initiative) ve OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) kuruluşları, nano büyüklük için alt sınırı 1 nm ve üst sınır 100 nm olarak fikir ortaklığına gitmişlerse de bazı Avrupalı kuruluşlar, tıpta kullanım amaçlı kullanılacak maddelerin büyüklük aralığını 1-1.000 nm olarak kabul etmişlerdir. Her ne kadar yaygın olarak 1-100 nm arası büyüklükteki maddeler kabul edilse de bu aralıkta olan bütün maddelere “nano” demek doğru bir tutum değildir. Zira büyüklüğün yanı sıra maddenin kazandığı özelliklerde önemlidir [3]. Nanoteknoloji, var olan birçok alana uygulanabilmektedir. Eğitimden sağlığa, iletişimden savunma ve üretime birçok alanda kadar çeşitli birçok alanda kullanımı vardır. Örneğin nano boyutla yapılan bazı ilk aletlerden bir tanesi de biyoloji alanında, virüsleri hücrel yaşamlardan ayırabilmek amacı ile kullanılan seramik filtrelerdir. Ayrıca

nanoteknoloji, hücreyel sinyalleşme, hücre döngüsü gibi olaylar açısından tıp ile büyük bir bağlantı içerisindedir. Nano boyut anlamında dokuların analiz edilmesini sağlayacak cihazların yapılması, tedavi ve replasman açısından yeni biyosentetik maddelerin yapılmasının sağlanması bunlara örnektir. İncelememiz gereken bir diğer terim olan nanofarmasötik, ilaç taşıyıcı sistemlerini, bu sistemlerin araçlarını ve nano boyutta olan toz ilacı kapsar [4]. İlaç taşıyıcı sistemlere nanopartiküller, nanokapsüller, katı-lipit nano partiküller, nano lipozomlar ve bunlar gibi birçok madde örnek olarak verilebilir. Nano aygıt olarak nano robotlar, nano ilaç kaplı stentler ve nano sensörler örnek verilebilir [4]. Nano boyutta büyüklüğe sahip ilaç partiküllerinin kullanımında elde ettiğimiz avantajlar vardır. Bunlardan bir tanesi; nano partiküller boyutları gereği damarlardan kolaylıkla geçebilir ve böylelikle sirkülasyona katılabilir [5]. Kullanılan partiküllerin boyutu nanometre olunca, partiküllerin yüzey alanları ile çözünürlükleri arasında doğru orantılı bir ilişki vardır. Yani, nanometre boyutta partiküllerin yüzey alanları arttıkça çözünürlükleri de artmaktadır [5]. Nano boyutta hazırlanan partikül formülasyonların çözünürlükleri artmaktadır. Böylelikle partikülün absorpsiyonu artmaktadır. Absorpsiyonun artması biyoyararlanımı artırır. Bir nano taşıyıcıya sadece bir tane değil birden fazla etkin madde yüklenebilir [2]. Nano partiküllere PEG (Poly ethylene Glycole) veya başka bir adıyla POE (Poly oxyethylene) molekülü bağlayarak dolaşımda daha uzun süre kalabilmeleri mümkün hâle getirilebilir [2]. Nanofarmasötikler temelde yukarıdan aşağı metodu ve aşağıdan yukarı metodu olmak üzere iki yöntem ile hazırlanmaktadır. Yukarıdan aşağı metodu, maddenin büyük hâlinde yola çıkarak nano boyuta ulaşmaktır. Yani büyük madde küçültülüyor. Aşağıdan yukarı metodunda ise en küçük nano boyuttan yola çıkılarak yeni bir nano madde elde edilmektedir. Yukarıdan aşağı metodunda, elde var olan ilaçların boyutu küçültülerek ve vücuda verilmiş şekillerinde değişikliğe gidilerek denemeler yapılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu metotta öğütme, yüksek enerji uygulama, litografik yöntemler, kimyasal yöntemler gibi farklı yöntemler kullanılabilir. Böylelikle büyük boyuttaki maddelerimiz nano boyuta getirilebilir. Aşağıdan yukarı metodunda ise kimyasal sentez, kolloit kimya, supramoleküler sentez gibi farklı yöntemler kullanılarak nano boyuttaki maddelerden farklı nano maddeler elde edilebilmektedir. Her ne kadar nanoteknoloji, nanobilim gibi alanlarda önemli ve ümit vadeden gelişmeler ve çalışmalar olsa da olay nanofarmasötik kısmına geldiğinde önemli bir sıkıntı gözükmektedir. Bu sıkıntı toksik etkidir. Solunum ve deri yolları, oral

enjeksiyon gibi yollarla verilen nanofarmasötikler, immünotoksik etki, genotoksik ve sitotoksik etki gösterebilmektedir. Bu etkilerin kaynağı nano taşıyıcı sistemlerden, bu sisteme yüklü olan nano ilaçlardan ve yardımcı maddelerden kaynaklanıyor olabilir. Bu sebeple ki nanofarmasötik sistemlerin ve bu sistemleri oluşturan tüm maddelerin toksisitesinin incelenmesi büyük önem arz etmektedir [2]. Uygulanan ilaçların etkili olması için, istenen etki bölgesine ulaşabilmeli, istenilen ve belirlenen konsantrasyonlarda o bölgede istenilen süre boyunca kalabilmelidir. Ancak, ilaç etkin maddenin kimyasal özelliklerine bağlı olarak parçalanması, zor penetrasyon gibi bazı kısıtlamalar sebebiyle yeni formülasyonlar araştırılmaktadır. Böylelikle ilaçtan daha yüksek etki elde edilebilsin. Bunun içinde en yaygın yaklaşım nano taşıyıcılarıdır. Kanser, gene ifadesinde meydana gelen birçok mutasyonun sebep olduğu ve bu mutasyonların hücre çoğalması ve ölümündeki dengesizliklerin meydana gelmesi olayıdır. Bu dengesizlik sonucu hücreler gereğinden fazla bölünüp çoğalarak başka bölgelere yayılmasıyla sonuçlanınca konağın ölümüne sebep olmaktadır. Başlangıç yerine göre carcinoma ve sarcoma olarak iki başlıkta değerlendirilir. Carcinoma'nın başlangıcı epitel doku iken sarkoma'nın başlangıcı ise mezankimal dokudur. Kanserli hücrelerin 6 farklı özelliği vardır. Bunlar, güçlendirilmiş çoğalma, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümünden kaçınma, anjiyogenez, metastaz ve ölümsüzlüktür. Anjiyogenez; kanserli hücrelerin gerekli besin ve oksijene ihtiyacı olduğu gibi atıklarını da sisteminden uzaklaştırma ihtiyaçları için damarlaşma yapmasıdır. Metastaz; kanserli hücrelerin kan sistemine karışarak başka bölgelere göç etmesidir ki bu özelliği gösteren tümör çeşitleri tehlikeli olanlardır ve 'malignant' olarak adlandırılırlar. Apoptoz olayından kaçabildikleri için kontrollü olarak ölememektedirler. Büyüme baskılayıcı genlerden kaçabilmesi ve bir nevi kendi büyüme sinyallerini üretmesi de onun normal hücrelerden daha fazla çoğalmasında etki göstermektedir [6]. Bu tezin amacı, PLGA gibi uluslararası kabul gören bir nano taşıyıcının hücre içine giriş yolağını MCF-7 hücre hattına vererek tespit etmek, mümkün olursa hücre içine giriş oranını arttırmaktır. Kanser hücrelerinin yaşamını sürdürmek için glikoz ve früktoz gibi bazı maddelere özel reseptörleri yüzeyinde sağlıklı hücrelere nazaran daha fazla bulundurmaktadır. Bu reseptörlerin ligandını yani karbonhidratları misellerin yüzeyinde bulundurma, misellerin hücre içine girişini arttırabilir. Ancak, başlıca karbonhidratlar olan glikoz ve früktozun bu açıdan etkinliğinin farkı bilinmemektedir. Bu tezin ikincil amacı bu farkı açığa çıkarmaktır.

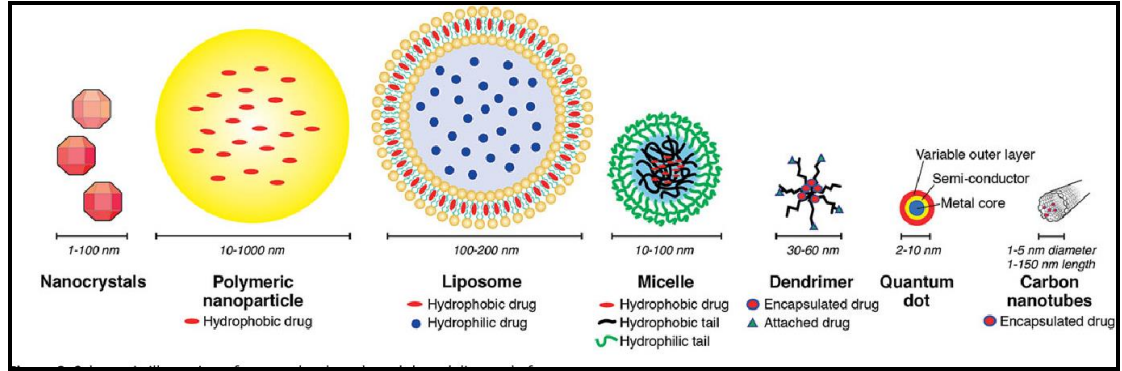
2. GENEL BİLGİLER

Tezde hücre hattı olarak MCF-7 yani meme kanseri hücreleri nano taşıyıcı olarak da PLGA kullanılacaktır. Biyouyumluluk, uygun çözünme oranı, FDA tarafından onaylanmış olması gibi birçok özellik PLGA'nın kullanılmasında tercih nedenidir. Ayrıca PLGA hidrofilik yapıdadır. Böylelikle sulu ortamlarla temasında ilaç moleküllerini içerisine hapsedebilecektir [7]. Kanserli hücrelerinin normal hücrelere kıyasla daha hızlı metabolizmaya sahip olmaları, onların enerjiye daha ihtiyaçlı olmalarını sağlamaktadır. Enerji kaynağı olarak karbonhidrat kullanacak olan kanserli hücreler, hızlıca genel olarak şeker türevlerine ulaşmak isteyeceklerdir [8]. Ayrıca normal hücrelerde şeker kullanımı normal döngülerde yıkılarak kullanılsa da kanserli hücrelerde bu döngünün bazı etapları es geçilmektedir. Bu olaya "Warburg etkisi" denmektedir [9]. Kanserli hücrelerin şeker kaynaklarına olan zaafından yararlanılarak nano taşıyıcımızın daha kolaylıkla hücre içine alınması için nano taşıyıcımız glikoz ve früktoz türevi ile kaplanacaktır. Hücre içine madde alımı yollarının gerekli inhibitörler ile inhibe edilmesi sonucu nano taşıyıcının kanserli hücrelere giriş olayları incelenecektir. Nano taşıyıcımız, FITC etiket ile etiketleneceğinden floresan mikroskopu ile takibi yapılabilecektir. Hücrenin madde alışverişi klatrin aracılıklı endositoz, klatrinden bağımsız endositoz, makropinositoz ve fagositoz olarak 4 ana başlıkta olmaktadır [10]. Bunlardan klatrin bağımlı endositoz da kendi içinde 3 çeşide ayrılmaktadır. Bunlar vakuol, vezikül ve klatrin'dir. Vakuol; bazı protistlerde, hayvansal ve bakteriyal hücrelerde, fungal hücrelerde ve tüm bitki hücrelerinde bulunan membran bağlı organeldir [11]. Klatrin, klatrin kaplı çukurlarda toparlanan proteinlerdir ve 3 ağır 3 hafif zincir olmak üzere toplam 6 zincirden oluşur (64). Vezikül, lipid tabakanın kaplamış olduğu akışkan maddenin oluşturduğu keseciktir ve dışarı atım ve hücre içine giriş gibi yollarda doğal olarak oluşabildiği gibi, laboratuvar ortamında da oluşturulabilir. Laboratuvar ortamında oluşturulan bu yapılara da lipozom denmektedir.

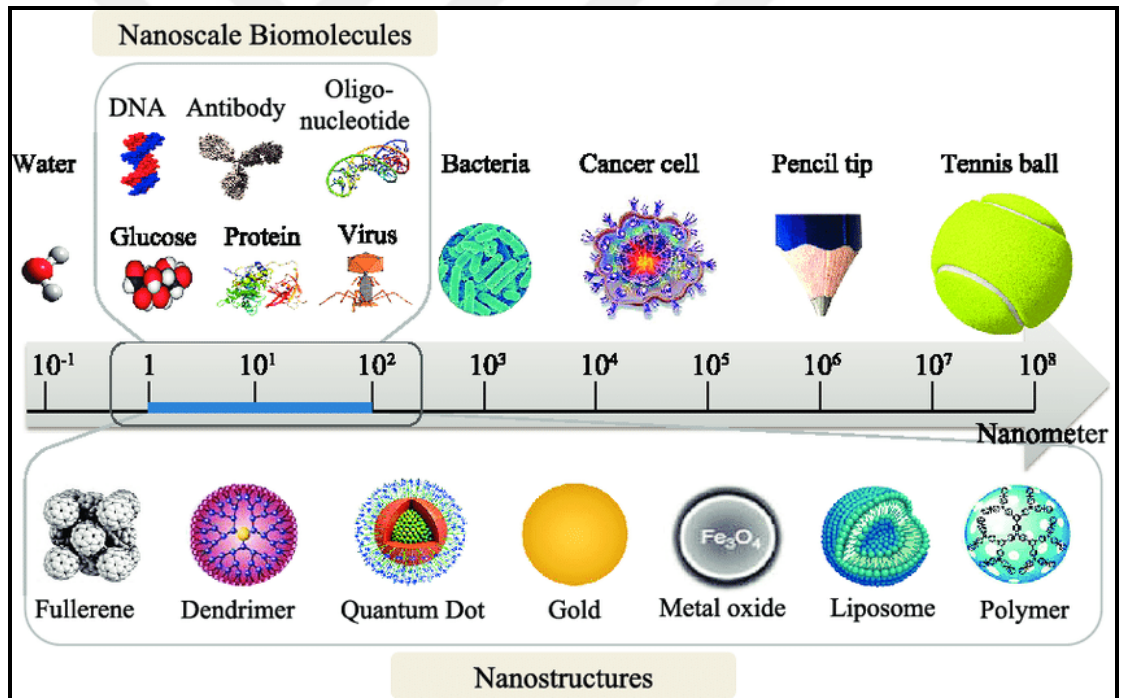
2.1. Nano Taşıyıcı Sistemler

Taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında bitkiler ve hayvanlarda bulunan doğal polimerler ya da sentetik polimerler kullanılmaktadır. Doğal polimerler protein ya da polisakkaritlerdir ve çoğunluğu hidrofilik yani suyu seven özelliktedirler. Suda çözünmeyen bir ağ oluşturmak, çapraz bağlanma yapılarak oluşturulabilir. Bu çapraz bağlanmanın derecesine bağlı olarak ilacın salım özellikleri değişmektedir. Kullanılacak polimerler, “akıllı polimerler” yani bir uyarıya cevap verebilen polimerler, yapay olarak oluşturulmuş sentetik polimerler, biyoparçalanır polimerler ve doğal polimerler olarak çeşitlendirilebilir. Akıllı polimerlerin kullanımı, hastalığın olduğu bölgenin kimyasal yapısı, sıcaklığı, asit seviyesi yani pH’ı gibi özelliklerden yola çıkılarak hedefli tedavi alanında kullanılabilir. Böylelikle tasarlanan polimer, istenilen bölgenin özelliklerine tepki verecek, bu vesile ile de taşıdığı ilacı o bölgeye salacaktır. Nano taşıyıcı kullanılarak tedavi, kemoterapi gibi vücudun tamamını etkilemek yerine sadece hedeflenen bölgeyi etkileyecektir. Bu bize kemoterapinin hastalıklı bölgelere etkisinin dışında kalan kimyasalların vücuda vereceği zararı en aza indirmemize vesile olacaktır. İlaç taşıyıcı sistemlerde geleneksel yöntemler yerine nano partikül kullanımı birçok açıdan daha üstünlük sağlamaktadır. En önemli üstünlüklerden biri de ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan nano partiküllerin boyutlarının istenilen oranda ayarlanabilir olmasıdır ki ilaç taşıyıcı sistemlerde partiküllerin boyutları bayağı önemlidir. Bu boyut, kan damarlarından kolaylıkla sızmayacak kadar büyük, fagositik sistemlerden kaçabilecek kadar da küçük olmalıdırlar [12]. Eğer yeteri kadar küçük olmazlarsa kan damarlarını tıkararak kan dolaşımını bozarak sisteme zarar verebilir. Olması gerekenden küçük olurlar ise de fagositik elemanlar tarafından fagosite edilerek sistemden atılır. Partikül büyüklüğündeki farklılık, taşıyıcı sistemlerin vücutta farklı organ ve dokularda birikmesine neden olmaktadır [13]. Ayrıca kanser hücreleri, çok hızlı büyümelerinden dolayı kanserli bölgelerdeki kan damarlarının dengesizce yeniden şekillenmesine ya da yeni damarlanmalar oluşmasına gerek duyarlar. Bu dengesizce anjiyojenik düzenleyicilerin sonucu olarak tümör damarlarının karışık şekillenmesi ve ara bağlantıların büyümesi gerçekleşir ve bu olay Enhanced Permeability and Retention (EPR) yani güçlendirilmiş geçirgenlik ve alıkonum etkisi olarak adlandırılır [20]. Kanser terapisinde de ulaşılmak istenilen amaç en az yan etki ile en fazla ilaç etkin maddesini hedefli bölgeye ulaştırmak olduğundan, uygun şekilde

tasarlanmış nano taşıyıcıların bu etki sayesinde kanserli bölgelere geçişi sağlanabilir. Şekil 2.1 de gösterildiği üzere nano taşıyıcı sistemler tasarlanmasına ve kullanım alanlarına göre farklı boyutlara sahip olabilirler.



Şekil 2.1: Nano Taşıyıcıların Boyutları [11].



Şekil 2.2: Nano Boyut Yelpazesi [14].

2.1.1. Nano küreler

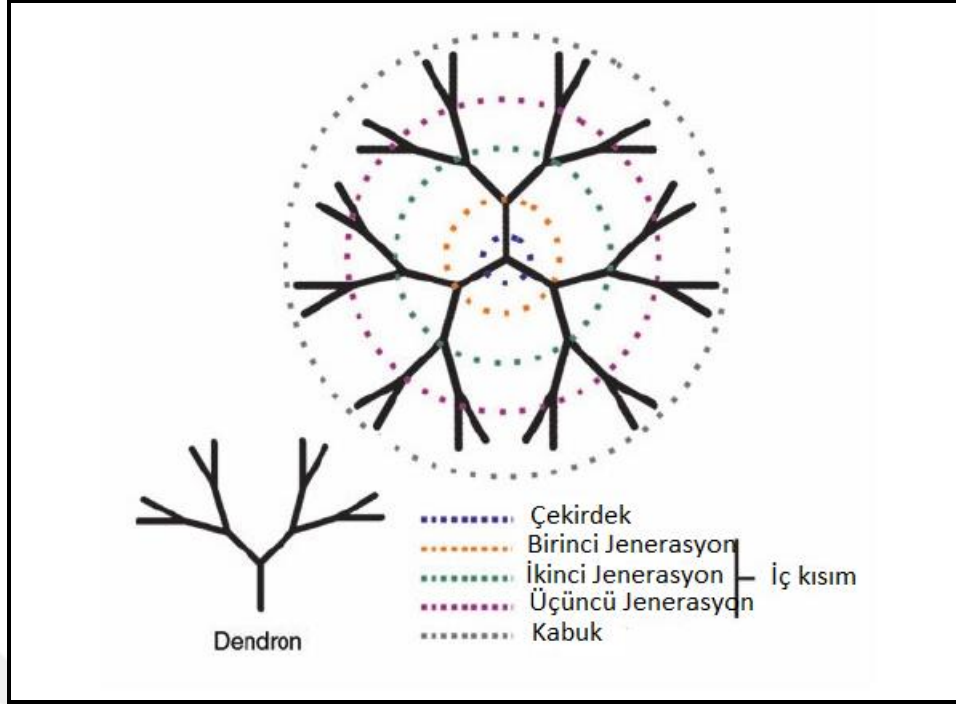
Nano küre taşıyıcı sistemlerini oluşturan matriksler polimerik bir matrikstir ve görünüm olarak ipten oluşmuş bir yumağa benzemektedirler. Bu sistemde ilaçlar küre içerisinde farklı şekillerde bulunabilmektedir. Bu bulunma şekilleri küre içine dağılmış ya da yüzeye adsorbe yani yüzeyine yapışmış şeklindedir. Nano küreler, yapılması bakımından farklı çeşitlere sahiptir. Polimerik nano küreler, doğal

polimerlerden oluşan nano küreler, sentetik polimerlerden hazırlanmış nano küreler bu çeşitlere örnektir. Doğal polimerlerden hazırlanan nano kürelerde kullanılan maddeler, genellikle protein bazlı veyahut polisakkarittir. Albümin, jelatin, agaroz, dekstran, siklodekstrin gibi maddeler kullanılarak hazırlanan bu nano küreler, genellikle biyoparçalanır ve yüksek seviyede biyoyumlu oldukları ve ayrıca toksik olmamaları, nano kürelere oldukça üstünlük sağlamaktadır. Ancak nano küreler hakkındaki az sayıda sıkıntılarında bazıları, kendi içinde fazla çeşitliliğe sahip olması ve bazı polimerlerin, taşınması için verilen ilaçlar ile çapraz bağ yapmalarındır [15]. Sentetik polimerler kullanılarak hazırlanan nano kürelerde kullanılan sentetik polimerler, biyoparçalanabilir sentetik polimerlerdir. Biyoparçalanmayan polimerlerle hazırlananlar olsa da biyoyumluluk miktarının fazla olması ve sitotoksik etkilerinin yeterince az olması biyoparçalanabilir polimerleri tercih sebebidir. PLA, PLGA ve poli- ϵ -kaprolakton (PCL), FDA onaylı olup tıbbi anlamda sıklıkla tercih edilen polimerler, nano kürelerin bu alt sınıfına dahil olmaktadır [15, 16].

2.1.2. Dendrimerler

Dendrimer yapılar, kendisini oluşturan monomerlerin birbirlerini tekrarlaması ve bu monomerlerin basamak hâlinde birbirlerine eklenmeleriyle oluşur. Polimer linear çekirdek kısmında veyahut küçük molekül etrafında dallanan kısımlar barındıran ve neredeyse monodispers yapı gösteren makro yapılardır [17]. Ayrıca monomerler, iç kısımdan yani merkezden yüzey kısma doğru eklenirler. Simetrik dallanma yapısı gösteren, dendrimerler; dallar, çekirdek ve reaktif ve fonksiyonel gruplar olmak üzere üç gruptan oluşur. Dendrimerler, sentezlenme bakımından bakılınca hem moleküler hem de polimerik kimyada yer alır. Kendini tekrar eden monomerlerin bir araya gelmesinden dolayı polimerik kimya da değerlendirilmesine rağmen adım adım kontrol edilmesi bakımından da moleküler kimyaya da dokunmaktadır [17]. Dendrimerlerin sentezlenmesinde izlenen iki önemli yöntem vardır. Bunlar; ıraksak yöntem ve yakınsak yöntemdir. İraksak yöntemde üretim işlemi çekirdek kısmından başlar ve adım adım dallanmalar yerleştirilir. Yakınsak yaklaşımında ise diğerinin tam tersi yol izlenir. Sentez bittiğinde dallanmaların olmasını istenilen şekilde oluşturacak yapı taşlarını dışarıdan birleştirerek çekirdeğe ulaşılır [17]. Dendrimer yapıların, insan yapısı üzerinde kullanılmasına dair pek bilgi bulunmamasına karşın birçok sağladığı yarar bulunmaktadır. Bu yararlardan bazıları; stabiliteyi, isteğe

göre işlevselleştirilebilmesi, ilaç yükleme kapasitelerinin yüksek olmasıdır. Ayrıca dendrimer yapılar proteinlerin küresel şekillerde olanlarına benzerlikleri, onları tercih edilebilir olmasındaki etkenler içerisinde yer almaktadır. Ayrıca bunlara ilaveten farmakokinetik özellikleri açısından değerlendirilmesi dendrimerlerin uygulanması bakımından önemli rol oynar. Farmakokinetik açıdan bakıldığında ilaç taşıması, fotodinamik terapi, nötron yakalama terapisi gibi alanları içerebilir. Bu özelliklerin yanında elektrostatik etkileşimleri dendrimerleri daha da ilgi çekici hâle getirebilir. Fazla uçlara sahip olması ve her bir ucun farklı şekilde yüklenebilmesi dendrimerlerin başka maddelerle etkileşimini de etkileyecektir [17]. Ayrıca Roberts ve arkadaşlarının PAMAM yani Poliamidoamin dendrimerleri üzerinde yaptığı çalışmalarda, sadece jenerasyon dendrimerlerde ve maddenin yüksek konsantrasyonlarında sıkıntılar gözlemlemişlerdir [18]. Buna karşı yapılan başka çalışmada PAMAM dendrimerlerinin yüzey modifikasyonları ile daha da geliştirilebileceği ve böylelikle dendrimerlerin sitotoksitesinde kayda değer azalmalar gerçekleştiği bildirilmiştir [19]. Dendrimerlerin uygulama alanlarının belirlenmesi, onların fonksiyonel gruplarının veyahut dalları arasındaki boşlukların yapısına göredir. Örneğin taşıdıkları pozitif yükler sebebiyle DNA molekülleriyle fiziksel olarak uyumlu olmalarından ve yapısı gereği peptit ve proteinler gibi yaşamsal önemli moleküllere benzemelerinden dolayı PAMAM'lar, gen taşımasında kullanılma potansiyeline sahiptirler. Dendrimerler, ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanıldığında ilaç ile dendrimer etkileşiminde üç farklı yaklaşım vardır. Birinci olarak, ilaç etki yerinde serbestleşerek etkinleşmesi amacıyla dendrimerin yüzeyine kovalent olarak bağlanarak inaktif duruma getirilir. İkinci olarak ilaç maddesi, dendrimerin yüzey grupları ile iyonik olarak bağ kurar. Üçüncü olarak ise dendrimerler, ilaç moleküllerini içerisine alarak içerisinde hapseder ve bir molekülmüşçesine hareket eder kompleks bir yapı oluştururlar [5]. Yüksek aktiviteye sahip biyolojik bileşikler için hidrofobik yani suyu sevmeyen enkapsülasyon ile taşıyan dendrimerler diğerlerine göre daha yüksek potansiyele sahip taşıyıcılardır. Bunların yanı sıra dendrimerleri önemli ve kullanışlı kılan özelliklerden biri de küresel proteinleri taklitçilik özelliğidir. Bu özelliklerini de başka biyomimetik özellikleri, elektroporetik ve boyutsal uzunluk yelpazesine borçludur. Bundan dolayı yapay proteinler olarak da isimlendirilirler [20]. Ayrıca PAMAM ailesi sitokrom, hemoglobin ve insüline oldukça benzemektedir [20]. Sadece PAMAM dendrimeri değil genel anlamda dendrimerler birçok farklı alanda kullanılmaktadır.

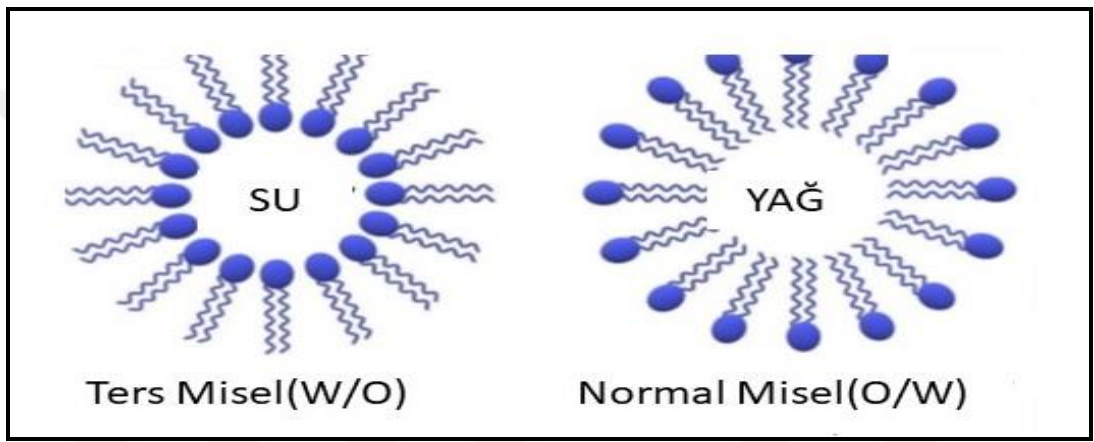


Şekil 2.3: Dednimer yapısı [21].

2.1.3. Miseller

Miseller, biyoyumlulukta gösterdiği mükemmellik ve partikül boyutunun küçüklüğü ile önem seviyesini oldukça arttırmıştır. Ayrıca kan dolaşımında uzun süre kalabilen bu nano boyuttaki taşıma sistemleri, lipozomlarda olduğu gibi çekirdek ve kabuk kısımdan oluşmaktadır. Ancak lipozomda çift katman varken miselde tek katman vardır. Miseller, ortamın değişen değerlerinden dolayı ortamdaki amfifilik yapıya sahip taşıyıcı maddelerin toparlanarak bir yapı oluşturması sonucu meydana gelir. 5-100 nm boyut aralığında olan miseller, hidrofobik iç kısım ve hidrofilik dış kısımdan oluşur. Dış kısım, hidrofilik özelliğinden dolayı sulu ortamlarda çözünebilirlik özelliği sağlarken, hidrofobik iç kısımlar ise hidrofob ilaçlar için bir korunma alanı ve depo görevi görmektedir [22, 23]. Kritik misel konsantrasyonu (CMC), misellerin oluşumunda ve kararlı stabilite tayini için kullanılan ana parametredir. CMC noktasında, misellerin kendiliğinden oluştuğu sürfaktan konsantrasyonudur [24]. Sürfaktant maddeler yüzey gerilimini azaltmakta önemli rol oynarlar. Böylelikle ilaç maddeleri ortama daha kolaylıkla verilebilir ve miseller ilacı içerisine alabilirler. Bu konsantrasyondan sonra ortama verilen amfifilik maddeler misel oluşumu için birleşerek sistemin yüzey gerilimini düşürürler. Misellerin çeşit olarak tercihinde CMC önemli bir rol oynar. CMC değeri yüksek miseller, daha düşük değere sahip misellere nazaran kanda daha çabuk

şekilde birimlerine ayrılır ve istenmeyen yerlerde çökelek oluşturarak emboli riski oluştururlar. Ancak CMC değeri düşük miseller daha fazla kan miktarında çözülmektedirler. Böylelikle kanda daha uzun süreli stabil kalabilmektedirler [24, 25]. Miseller oluşturulurken dikkat edilmesi gereken bazı konular vardır. Vücut savunmasında rol oynayan Retiküloendotelyal Sistem (RES) tarafından yakalanmayacak ve hücrelere giriş yapabilecek kadar küçük boyutlara sahip olmalıdırlar. CMC değeri düşük olan miseller tercih edilerek kan dolaşımında daha uzun süre kalabilmeli ve yapısının yavaş yavaş bozulması vesilesiyle ilacı daha uzun sürede gerekli bölgeye salmalıdır [5].



Şekil 2.4: Misel yapısı [26].

2.1.4. Polimerik Miseller

Polimerik misellerin tanımını yapmadan önce, blok kopolimerin bilinmesi gerekmektedir. Blok kopolimer, su ortamında kendiliğinden toparlanarak misel yapısını oluşturmaktadırlar. Polimerik miseller ise, boyutları 20 ile 50 nm arasında değişen çaplara sahip yüzlerce kopolimerlerden meydana gelirler. Normal misellerde de olduğu üzere polimerik misellerde de dış taraf hidrofilik kabuktan ve iç kısım da hidrofilik kısımdan oluşmaktadır [27, 28]. Boyutlarından dolayı emboli riski azdır, dış tarafında bulunan hidrofilik yapıdan dolayı içerisinde taşıdığı suda çözünürlüğü pek iyi olmayan ilaçların biyoyararlanımını arttırmaları. Ayrıca hedefli tedavi anlamında kabuk kısmına, özelleştirilmiş ligantlar eklenerek istenilen bölgeye hedefleme yapılabilir [5]. Polimerik miseller konvansiyonel, poliyon kompleks ve kovalen olmayan miseller olmak üzere üç çeşittir. Konvansiyonel misellerin iç kısmında bulunan çekirdek kısım ile sulu ortamla temas hâlinde bulunan kabuk kısmı

arasında bulunan bağlar hidrofobik bağlardır [27, 29]. Zıt elektriksel yüklere sahip olan polielektrolitlerin arasındaki elektrostatik etkiler vesilesiyle oluşan misellere poliyon kompleks miselleri denir. Bu misellerin, ortama zıt yüklere sahip polimerlerin ortama eklenmesi sonucu polimerlerin kabuk kısma nüfuz ederek kabuk kısmını oluşturması sonucu oluşan bağlardır [27, 29]. Nonkovalen yani kovalen olmayan miseller ise destekçi ya da itici güç olarak hidrojen bağını kullanılarak homopolimer, oligomer ya da rastgele polimerlerin kendi kendilerine toplanmasıyla oluşurlar.

2.1.5. PLGA

PLGA açılım olarak Poly lactic-co-glycolic Acid'i temsil etmektedir ve poly lactic acid (PLA) ile poly glycolic acid (PGA) polimerlerinin birleşmesi sonucu meydana gelir. Dolayısıyla kendisini oluşturan polimerler hakkındaki bilgiler kendisinin anlaşılmasına yardımcı olacaktır. PLA açısından bakıldığında, yapısında asimetrik α -C atomu vardır ve D veya L formlarında bulunabilmektedir [30, 31]. Yani enantiyomer olarak PLDA ve PLLA olarak bulunabilirler. Yapısında düzensiz olarak bulunan polimer zincirlerinden dolayı PLLA olarak yüksek kristal form ve PLDA olarak amorf formda bulunabilmektedir [30]. Öte yandan PGA tarafından bakılırsa, yapısında metil yan gruplarına sahip değildir. Böylelikle PLA'ya kıyasla yüksek kristal yapı gösterir. PLGA, şekil ve boyut anlamında birçok farklı türevde oluşturulabilir. Hidrofobik özelliğe sahiptir ve yapısındaki ester bağlarının hidrolize uğraması sonucu biyoçözünürdür [30]. Bunun yanı sıra genel çözücü ailesinde bulunan geniş yelpazedeki birçok çözücüye rahatlıkla çözünebilmesi büyük kolaylık ve yarar sağlamaktadır. Toksikite anlamında ılımandır ve oldukça güvenlidir [30]. Vücutta hidroliz işlemine maruz kalarak kendisini oluşturan laktik asit ve glikolik asit monomerlerine ayrışırlar ve bu monomerler, Krebs döngüsü ile karbondioksit ve suya dönüştürülür [4, 31]. Dolayısıyla vücuttaki toksisite bakımından yüksek tehlike içermez ve FDA tarafından kullanım onaylıdır [31]. Bu özelliklere ek olarak, hücre içine giriş olaylarında maddenin sahip olduğu yük, girişe etkili olan başka etkenlerden biridir. Madde katyonik ise alımda daha tercih edilebilir olmaktadır ve PLGA yapısında negatif yüklü elemanlara sahiptir. Ancak PEGilasyon veya chitosan kaplama gibi farklı yöntemler kullanılarak PLGA'nın yük değişimi yapılabilmektedir [31, 32].

2.1.6. PEG

Poly-ethylene glycol (PEG), polieter grubuna ait olup oldukça biyouyumlu bir maddedir. Anyonik polimerizasyon mekanizmasıyla etilen oksid'in bir araya gelmesiyle meydana gelmiştir [33]. Ayrıca sulu solüsyonlarda ve organik çözücülerde oldukça çözünür yapıya sahiptir. Bu özellikler, PEG'in biyouyumlu ve işlenebilir özelliklerine destek olmaktadır. Moleküler ağırlığının az olması ve toksisite seviyesinin düşük olması, PEG'in popüler seçeneklerden biri hâline getirmiştir [34]. Hidrofilik yapıya sahiptir. Yapısında etilen oksid gibi bazı toksik maddeler ihtiva ettiğinden potansiyel toksisite içermektedir. Başka taşıyıcı sistemlerle bağlanabilirler. Eğer protein veya peptitlerle bağlanarak yüksek dozajda verilirse renal tubular ephitelial vakulasyona neden olabilmektedirler [35]. Farklı moleküler ağırlıklarına sahip formlarda üretilebilmektedir. Ayrıca geometrik yapı olarak da Y şekilli, çok kollu, çizgisel gibi farklı şekillerde de sentezlenebilmektedir [18]. Birçok teröpatik maddenin PEG ile kaplanması, canlı yapısının içerisinde geçirdiği zamanın uzatılmasında ve in vivo olarak potansiyellerinin artırılmasına vesile olur. Ayrıca PEG'in bu kadar tercih edilebilir olması, sahip olduğu hidrofilite, kan bileşenleriyle temasa girmesinin düşük olması ki böylelikle immün sistemi uyarmaz ve yüksek seviyede biyouyumlu olmasıdır [36]. Kristalite seviyesi, yapısında bulunan çapraz bağlanmaların kontrolü ile ayarlanabilmektedir [37]. Toksik anlamda FDA onayı almış olduğundan kullanılması pek sıkıntı yaratmaz [37]. PEG'in zincir uzunluğu, kaplanıldığı taşıyıcı ya da maddenin hücre içine girişinde etkilidir [38]. Ayrıca PEG taşıyıcı maddesinin tercih edilme nedenleri olarak, kokusuz olması toksik etkisi olmayan ve insana zararlı etki bulundurmaması ve en önemlilerinden biri olan suda çözünebilir olması gösterilir [39-41].

2.1.7. Nano Kristaller

Son zamanlardaki çalışmalara ve geliştirilen görüntüleme metotlarıyla bakıldığında az çözünebilir ilaçlar artmış bulunmaktadır. Suda az çözünürlük, ilaçların vücuttaki biyoyararlanımı ile doğrudan alakalıdır ki yararlanımın artması için suda çözünmesinin artması gerekmektedir. Çeşitli yollarla ilaçlar çözünebilir hâle getirilebilir olsa da ilaçların bazı özelliklerinden dolayı bu metotlar sınırlıdır. Bunların yanı sıra sürfaktant gibi maddeler de eklenebilir ve çözünme oranı artırılabilir ancak bu da bazen yan etkilerin artmasına sebep olabilmektedir. İlaç

tozlarının mikrometre seviyesine küçültülerek yüzey alanının artırılması ve böylelikle çözünmesi sağlanması uygulanabilse de biyofarmasötik spesifikasyon sınıf 2 de yer alan ilaçların çözünmesinde çok etkili değildir. Bu yüzden mikrometre yerine nanometre boyutu tercih edilmektedir. 90'lı yıllarda Elan Nano sistemler firması, mikro kristaller yerine nano kristalleri biyoyararlanımı arttırmak ve intravenöz veya akciğerle ilgili ilaç taşıma da kullanım amacıyla yaymaya başladı. Bunların dışında mikrometre boyutunda çalışmalar ile nanometre boyutunda çalışmalar karşılaştırıldığında nanometrik boyutlara inildiğinde boyut bir hayli küçüleceğinden temas edilen yüzey alanı da artmış olacaktır. Yüzey alanı ile çözünme hızı arasındaki ilişki Noyes-Whitney denklemiyle ele alındığında, ters orantı çıktığı anlaşılmaktadır. Yani yüzey alanı azaldıkça çözünme hızı artmaktadır [41]. Kitapsal bilgilere bakıldığı zaman Cs'in çözünürlüğü, çözücü ortam, sıcaklık ve bileşenlere bağlıdır. Bu olay günlük zamanda kullandığımız toz hâline getirilmiş tozlar içindir ki bu tozlar mikro boyut yelpazesi içerisinde. Ancak anlatıldığı gibi, mikro boyuttan nano boyut seviyesine inildiğinde yani 1-2 mikrometrenin altına inildiği zaman doymuş çözünürlük parçacık boyutunun da bir fonksiyonu olduğundan nano kristallerin çözünürlüğü artmaktadır [41]. Bunu formülasyon olarak göstermeye çalışırsak $Sw=6/\rho d$ olacaktır. Burada Sw spesifik yüzey alanı, ρ partiküllerin gerçek yoğunluğunu ve d ise partiküllerin çapını simgelemektedir. Nano kristaller, kullanılan diğer formülasyonlarla karşılaştırıldığında pek çok üstünlüklere sahiptir. Bu üstünlüklerden en öne çıkanlardan biri yüzey alanının çok daha küçük olmasından dolayı çözünürlüğünün yüksek olması diğerinin de çözünürlüğe bağlı olarak biyoyararlanım bakımından çok daha iyi olmasıdır. Biyoyararlanımın artırılması kullanılacak ilacın dozunu azaltmamıza olanak sağlar. Böylelikle vücuttan atılacak maddeler azalacaktır. Nano kristal formülasyonu kullanılarak hazırlanıldığında etkin madde, etkisini çok daha hızlı şekilde gösterebilecektir. Sterilizasyon bakımından termal, ışın gibi farklı sterilizasyon teknikleri kullanılarak steril hâle getirilebilen nano kristaller, oral yolun dışından da pulmoner ve parenteral gibi farklı yollarla alınması için hazırlanabilmektedir [5]. Ayrıca kullanım bakımından ilaç nano kristallerinin genellikle güvenli seviyede olduğu ve verilen canlıların nanokristali iyi tolere edebildiği bildirilmiştir [42].

2.1.8. Nano Tüpler

Karbon nano tüpler, yapısal olarak silindirik olan ve karbon plakalarının yuvarlanmasından oluşturulurlar. Ayrıca proteinler, ilaç, nükleik asit gibi farklı maddelerle farklı işlevsel hâle getirilebilirler. Bu şekilde terapötik moleküllerin taşınmasında kullanılabilirler. Karbon nano tüpler tek duvarlı, çift duvarlı ve çok duvarlı olarak üç farklı formda bulunabilmektedirler. Tek duvarlı karbon nano tüpler, tek tabaka karbonun yuvarlanması sonucu elde edilir ve tekli grafen tabakadan oluşur [43]. Adlarından da anlaşılacağı üzere iki duvarlı ve çok duvarlı olan karbon nano tüpler, iki veyahut çok daha fazlasından meydana gelir. Farklı maddelerle işlevsel hâle getirilen nano tüpler, antibiyotik ile bağlı hâle getirilerek vücuda verilebilir. Bunun yararları herhangi bir toksik etki göstermeden ve kolaylıkla memeli hücresi tarafından alınabilmesidir [44]. Bunun yanı sıra DNA ve protein biyo sensörleri yapımında kullanılabilirler. Nano tüplerin bir diğer yararı ise hücre membranlarından daha fazla geçme eğilimleridir [45]. Nano tüp başlığının altında sadece karbon nano tüp değil ayrıca nano lifler ve nano kafesler de bulunmaktadır. Karbon dışında titanyum nitrit, titanyum dioksit, alüminyum oksit gibi farklı maddeler kullanılarak oluşturulan nano lifler, tıpta ve yapay organ üretiminde destek materyali olarak tercih edilmektedirler. Nanokafesler ise inorganik maddeler kullanılarak yapılmış olup poröz ve boş altın nano parçacıklarından hazırlanmıştır. 10 ile 100 nm arasında değişen boyutlara sahiptirler. Toksikite bakımından hücre kültürü ve in vivo çalışmaları yapıldığında, eğer karbon nano tüpler düzgün ve uygun şekilde fonksiyonel hâle getirilirse açıkça bir toksik olaya rastlanmayacağını belirtmiştir [46].

2.1.9. Nano Emülsiyonlar

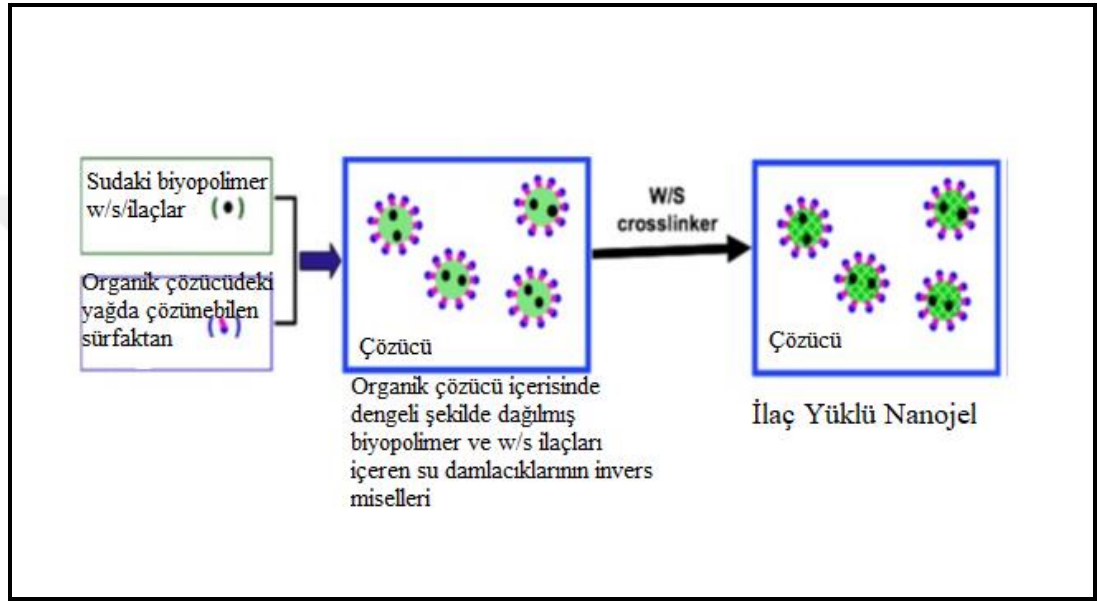
Emülsiyonlar, yağ ve su gibi birbirleriyle ortak yere konulsa da birbirlerinde çözülmeyen yapılardır. Su ve yağ fazlarının yüzey etkin ve/veya yardımcı yüzey etkin maddelerinin varlığında oluşan yapılardır. Nano emülsiyon yapılarında oluşan yağ ve su fazlı ortamda dağılan fazın nanometre boyutunda damlalar hâlinde bulunur. Adından da anlaşılacağı üzere damla boyutları 1.000 nm'nin altında boyutlara sahiptir [47]. Her ne kadar 1.000 nm'nin altında bir boyuta sahip denilse de literatür taraması yapıldığında bilim camiası tarafından kabul edilebilir boyutlara sahip değildirler. Buna rağmen damla boyutu olarak 20-200 nm arasındaki boyutlar

kabul edilebilir boyutlardır [48]. Damla boyutları açısından bakıldığında görülen benzerlik, nano emülsiyonlar ile mikro emülsiyonlar terimlerinin birbirleri yerine kullanılabilirdiği görülmektedir. Her ne kadar adlandırılmasında ‘mikro’ ifadesi geçse de mikro emülsiyonlar da nano boyutlarda olabilmektedir [49]. Bu terimlerin birbirleri yerine kullanılsa da birbirleri arasında önemli farklılıklar vardır. Nano emülsiyonlar için, seyreltme, pH ve sıcaklık meseleleri etkili değildirler. Bu etkilenmeme nano emülsiyonların özellikle damar içine uygulanmalarında önemli destek sağlamaktadır. Nano emülsiyon damlaları, fizyolojik ortamların değişen pH ve sıcaklık gibi etkilerinden etkilenmeyerek ve damarlarda seyrelmesine karşın bütünlüklerini korurlar. Bu da hedefli ilaç taşınması açısından önemlidir. Ancak her ne kadar avantajlı bir taşıyıcı sistem olsa da, faz ayrışmaları görünmesi dolayısıyla stabilite bakımından sıkıntı arz etmektedirler [19, 48]. Stabilite bakımından dezavantajlı olsa da nano emülsiyon damlalarının boyutları dolayısıyla sterilizasyon filtrelerinden kolaylıkla geçebilir ve steril hâle getirilebilir. Şeffaf veyahut yarı şeffaf çeşitliliklerinde olmaları bakımından estetik bir yapı kazanmaktadırlar. Ayrıca krem, köpük gibi farklı farklı şekillerde sunulabilmektedirler. Mikro emülsiyonlarla karşılaştırıldığında hazırlanma aşamasında çok daha az miktarda yüzey aktif madde gerektirmektedirler. Çok geniş bir yüzey alanına sahip olmaları nano emülsiyonların taşıdığı ilaç etkin maddelerin emilim oranını arttırmaktadır.

2.1.10. Nano Jeller

Nano jeller, belirli polianyonların katyonik polimerlerle bağlanması veyahut çapraz bağ kurması ile oluşan polimerik yapıları taşıyıcı sistemlerdir. Şişme özelliği olan ağsı yapıya sahip bu taşıyıcı sistemler, moleküller arasında fiziksel ya da kimyasal bağ oluşturur. Böylelikle biyolojik yapıların içinde çözünmeden kendi kuru ağırlıklarının yaklaşık %10-20 kadarından fazla miktarda su emebilen suyu seven yani hidrofilik yapılar meydana gelir. Nano jel taşıyıcı sistemlerinin en önem arz eden özellikleri şişme özellikleridir. pH, sıcaklık, yapıları, polimerik kimyasal yapısı gibi yapısal ve çevresel etkenler, nano jellerin şişme özelliğine etki etmektedirler. Sadece şişme özelliğinden dolayı değil, aynı zamanda ilaç taşıma kapasitesi ve stabilitesi bakımından da tercih sebebidir [50]. Diğer sistemlerde olduğu gibi nano jeller de dezavantajlara sahiptir. Ancak çökmesi, birbirlerine yapışarak agregat oluşturmaları gibi dezavantajlar, nanojel süspansiyonu içerisinde PEG gibi suyu seven maddeler kullanılması gibi yöntemler ile giderilebilmektedir [5]. Ayrıca bu polimerik yapılar,

ilaç-nano jel yapısının etrafını sararak partikülün etrafında koruyucu bir tabaka oluşturmaktadırlar. Böylelikle faz ayrışmasının önüne geçilmektedir. Nano jeller, boyutları sebebiyle hücre içerisine alınabilmekte ve hücre içi ilaç salınımı yapabilmektedirler. İlaç etkin maddeleri, dış mekanizmanın etkilerine karşı korunabilmektedirler. Yapısına ligantlar yani kovalent bağlı yapılar eklenerek hedefli ilaç taşıma sistemleri olarak kullanılabilirler. Bunların yanı sıra taşınmaları istenilen ilaçların kan beyin bariyerini aşmalarını kolaylaştırabilmektedirler [51].



Şekil 2.5: Nano jel [52].

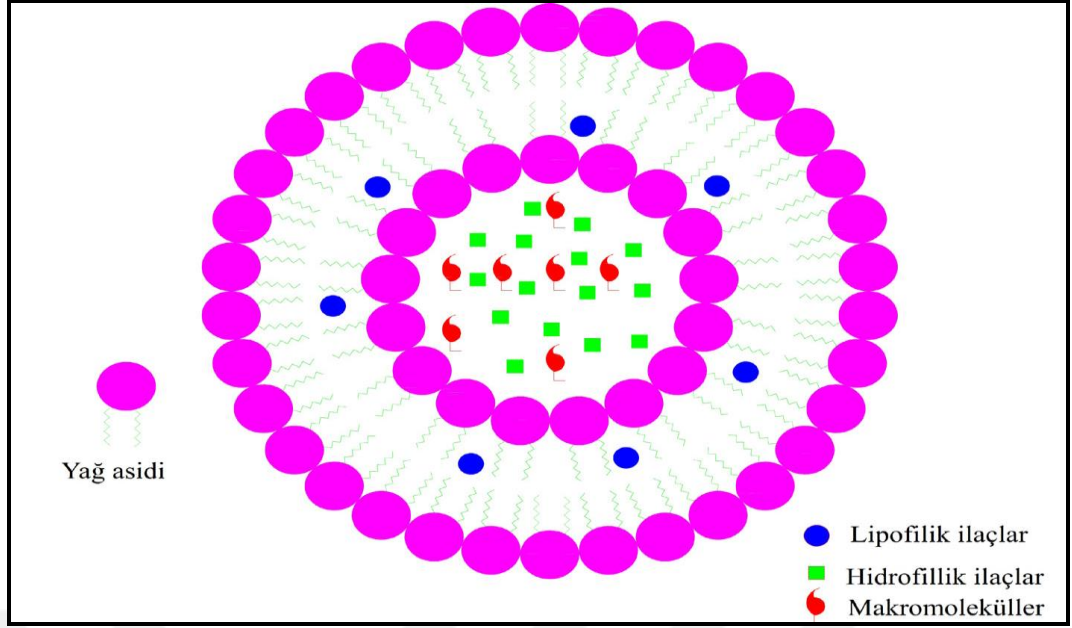
2.1.11. Niozomlar

Niozomlar, yapısında bulunan fosfolipitlerin pahalı olması, oksidasyon gibi kimyasal stabilite açısından problemlere sahip olmaları, etkin maddelerin sızması gibi olayların yanı sıra fosfolipazlara ve safra tuzlarına karşı dayanıksız olmalarından dolayı oral yolla uygulanmada çıkan sıkıntılara sahip olan lipozomlara alternatif olarak geliştirilmiştir [53, 54]. Niozomlar, iyonik olmayan yüzey etkin maddelerin sulu ortamlarda kapalı çift tabakalı olarak meydana getirdiği nanometrik yapılardır [55]. Tanımda çift tabakalı olarak anlatılmış olsa da hazırlanma şekline göre tek tabakalı ve çok tabakalı olarak olabilirler. Hidrofilik, hidrofobik yani lipofilik ve amfifilik özelliklere sahip çeşitli etken maddeleri taşıyabilmektedir. Hazırlanma aşamasında düşük sıcaklık gibi özel koşullara ihtiyaç duymaması ve kimyasal olarak stabil olması tercih edilmesinde etkindir. Biyouyumlu ve biyoparçalanır olmalarının yanında nantoksiktirler. Hazırlanmasında çok sayıda noniyonik yüzey etkin madde

seçeneğine sahip olmaları, endüstriyel anlamda üretim açısından uygundur. Her ne kadar böyle avantajlara sahip olsa da niozomların sulu süspansiyonlarında raf ömürlerinin sınırlı olmalarına neden olacak agregasyonlar ve tutulan etkin maddenin sızması ve hidrolize uğraması dezavantajları olabilir. Ayrıca çok tabakalı niozomların sonikasyon gibi hazırlama yöntemleri zaman alıcıdır ve özel aletlere ihtiyaç duyulabilir. Niozomların hazırlanması için etkin maddenin olmasının yanında sulu ortamında olması gerekmektedir. Bu sulu ortamın pH değeri, niozomun içerisinde tutulacak maddenin çözünürlüğüne bağlıdır.

2.1.12. Lipozomlar

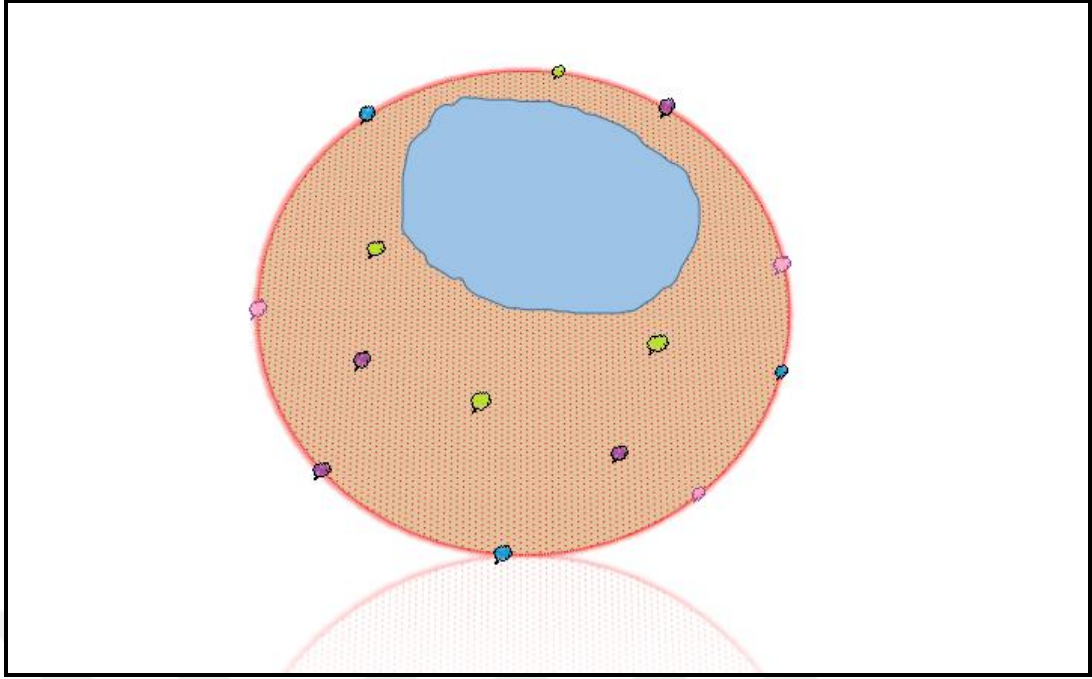
Lipozomlar, temel bileşen olarak fosfolipitlerden oluşan çift tabaka lipit ve bu iki tabaka arasında sulu faza sahip kapalı yapılardır. Lipozomların önemli özelliklerinden biri amfifilik yapılardır. Bunun nedeni yapısını oluşturan fosfolipitlerin hem suyu seven hidrofilik baş kısımlarının olması hem de suyu sevmeyen diğer deyişle hidrofobik uç kısımlara sahiptir. Hidrofobik kısımlar, lipofilik yani yağ seven ya da yağda çözünen kısımlar olarak karşımıza çıkabilir. Kuyruk kısım yani uç kısım açıl zincir, tekli bağdan başka bağ barındırmıyor ise doymuş fosfolipit, eğer yapısında en az bir adet çift bağ bulunduruyorsa, bu fosfolipit doymamış fosfolipit olarak adlandırılmaktadır. Lipozomların hazırlanmasında kimyasal açıdan daha dengeli olmasından ötürü doymuş fosfolipitler tercih edilmektedirler [56]. Ayrıca lipozomlar, nanometreden mikrometre boyutuna kadar farklı farklı boyutlarda hazırlanabilmesine karşın, nanometre boyutundaki lipozomlar artmış biyoyararlanım ve hedeflendirilebilme gibi özelliklerinden dolayı mikrometre boyutundakine göre daha tercih edilmektedirler. Bunların yanı sıra lipozomların tercih sebepleri arasında çok iyi stabiliteye sahip olması, tümörlü bölgelerde yüksek miktarda birikebilmesi, toksisite bakımından güvenli olması gibi özellikler sayılabilir [38].



Şekil 2.6: Lipozom şekli.

2.1.13. Nano Süngerler

Genellikle topikal yani cilt üzerine sürülerek tedavi edilmesi amaçlanan uygulama kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlere dahildir. Nano süngerler, hastaya verilmek istenen ilaçların özelliklerini arttırmak amacıyla kullanılır ki bu özellikler ilaçların sudaki çözünürlüğünü arttırmak, salınım süresi uzun sistemler oluşturulması, ilaçların parçalanma gibi etkilere karşı korunması, biyoyararlanımın artırılması ve yan etkilerin azaltılmasıdır. İnorganik ve organik maddelerden hazırlanan nano süngerler, 1µm altında boyutlara sahiptirler. Nano süngerlerin tercih edilme sebeplerinden en önde geleni nano boyutlu gözeneklerinin olmasıdır ki bu gözenekler sayesinde hidrofobik ve hidrofilik maddeleri hapsetme özelliğine sahip olmaktadır. Nano süngerler, yapısına farklı moleküllerin katılmasıyla daha elverişli ve daha yararlı hâle gelebilmekte ve toksik ve alerjik olmaması, yan etkilerinin azalması ve stabilitesinin artması gibi avantajlara sahip olabilmektedirler [57, 58].



Şekil 2.7: Nano sünger [59].

2.2. Hedefli Kanser Tedavisi

Hedefli kanser tedavi yöntemleri, hâli hazırda kullanılan kemoterapi gibi tekniklere alternatif ve daha iyi bir yöntem olarak gelişmekte ve sağlık alanında yerini almaktadır. Kemoterapide kanserli dokuları yok etmek amaçlı vücuda verilecek kimyasallar yan etkiler gösterebilir. Kemoterapi uygulanması ilaç vasıtasıyla büyüyen ve bölünme yeteneği gösteren hücrelere karşı etki gösterip onları öldürdüğünden, sağlıklı hücrelere de saldırıp zarar verme olanağı yüksek hâle gelir [31, 60]. Üreme ve sindirim sistemine etki edebildiği gibi kemik iliği gibi farklı alanlara da zarar verebilmektedir. Diğer önemli bir etkisi de bağışıklık sistemine de etki edebileceği için vücut başka hastalıklara da açık hâle gelebilmektedir. Bu ve diğer tedavi çeşitlerinin yan etkileri sebebiyle tedavi ederken başka hastalıklara sebep olabilecek tedaviler yerine daha aza zararlı ve hedefe yönelik tedavi çeşitleri geliştirilmektedir. Bu yüzden hedefli kanser tedavi yöntemleri önem kazanmaktadır. Nanoteknoloji, kimya ve başka bir sürü alanlardan elde edilen tecrübeler ve bilgiler, daha verimli kanser tedavileri geliştirilmesine ve sağlıklı bölgelere de zarar verilmesine engel alınmada rol oynamaktadır [61]. Hedefli kanser tedavisi, içerisinde birçok farklı metot barındırmaktadır. Kanserli hücrelerin metabolik yaşantılarını

kendilerine karşı kullanılmasına dayanarak, ilaç etkin maddenin karbonhidrat gibi maddelerle kaplanarak ortama verilmesi, monoklonal antikorlarla konjuge hâle getirilip ortama verilmesi gibi olabileceği gibi, tezin önceki kısımlarında anlatıldığı gibi PEG ile kaplanan ilaç maddeleri de ortama verilebilir [61]. Bunların dışında kanserli hücreler anjiyogenez yani damarlanma yapacağından ilaçların bu damarlara verilerek kanserli hücrelere ulaşması da sağlanabilir. Bunların dışında ilaçlar ısıya ve asitlik bazlık seviyesine duyarlı nano taşıyıcılar, PEG, antikor bağlanması gibi eklemeler yapılmış nano taşıyıcılar gibi farklı özelliklere sahip nano taşıyıcılar kullanılarak hedeflenen bölgeye ulaştırılabilirler [61]. Böylelikle kemoterapi veya radyoterapi gibi farklı metotların göstereceği yan etkilerden uzaklaşmış, nano taşıyıcılar kullanılarak da kullanılan ilaçların toksik etkileri daha az hâle getirilebilir. Ayrıca, Beachy ve arkadaşlarının tartışmalarına göre kanserli hücreler, kök hücre benzeri bir ana hücreden köken almaktadırlar [62]. Hedefli kanser tedavisi yöntemleriyle bu köken alınan hücreler hedeflenerek tedavi geliştirilebilir. Kanserli hücrelerin ihtiyaç duyduğu kan maddeleri, antianjiyogenik ajanlar vesilesiyle yapılabilmektedir. Bu olay, monoklonal antikorların vasküler endotelial büyüme faktörleri (VEGF)'ne hedeflendirilmesiyle olmaktadır [62].

2.3. Hücre İçine Giriş Yolakları

Nanoparçacıkların sisteme verilmesinden sonra epitel doku ile olan etkileşiminin anlaşılması önem arz etmektedir çünkü epitel doku vücuda giriş için bir kapı vazifesi görmektedir. Nano boyuttaki taşıyıcıların kullanılması da son zamanlarda önemli miktarda artmaktadır. Nano boyuttaki maddelerin etkileşime girecek yüzey alanı daha geniş olacağından ve daha birçok özelliğinden dolayı biyolojik bariyerleri geçebilme ve taşıdığı etkin maddeleri hedeflenen bölgede biriktirebilmesi, tercih edilmesinde büyük etkenlerdendir [63]. Nano taşıyıcıların önem kazanmasında karşın, hücrenin maddeleri içerisine alma mekanizmalarının bilinmesi gerekmektedir. Böylelikle nano taşıyıcılar, hücre içerisine giriş mekanizmalarının işleyiş şekillerine uygun olarak tasarlanabilir. Hücre içine giriş derişimin farkına göre difüzyonla ya da bazı proteinler yardımıyla aktif taşıma gibi yollarla ve yüksek boyutlara sahip maddelerin endositoz yolula alınmaları gibi yollarla hücre içine alınabilmektedir. Nano boyuttaki maddeler, bağırsak epitelyumu, pulmoner epitelyumu, makrofajlar ve endotel hücreleri gibi yollarla alınabilmektedir [10]. Endositoz, hücre dışında

bulunan maddelerin sitoplazmik membranından kopan veziküller veya vakuollerle içerisine aldığı ve enerjinin harcandığı bir mekanizmadır [10]. Bu enerji harcanarak hücre içerisine alınma mekanizması kendi içerisinde fagositoz, pinositoz, kaveola aracılıklı veyahut klattrin aracılıklı olmak üzere dört dala ayrılır [64, 65].

2.3.1. Fagositoz

Fagositoz, 500 ya da 750 nm boyutundan daha büyük molekülleri, makrofaj ve nötrofil gibi özelleşmiş yapıların vesilesiyle lizozoma verilmesi olayıdır ve çok hücrelilerde fagosit adı verilen özelleşmiş hücrelerde olur [10, 65, 66]. Katı maddelerin alınmasının dışında mikropsal patojenleri de içeri alınması görevini üstlenmiştir, böylelikle bir nevi savunma mekanizması olarak da iş görmektedir [67]. Fagositler, çok fazla ve farklı çeşitlerde maddeler tanınması gerekmektedir. Bu tanınmaları, yapısında sahip olduğu ayırık reseptörler vesilesiyle yapmaktadır. Bu reseptörler opsonik ve opsonik olmayan reseptör olarak ikiye ayrılır ve her iki reseptör çeşidi de farklı şekilde tanıma işlemini gerçekleştirir [67]. Opsonik olmayan reseptörler, fagositik hedeflerin yüzeyinde bulunan moleküler gruplardan tanıma yaparlarken, opsonik olan reseptörler, konak tarafından türetilmiş opsoninlerin hedefe bağlanması sonucu tanınır. Tanıma sonucu oluşan sinyaller ile membran tekrardan şekillenmeye başlar. Tekrardan şekillenmeye başlayan membran ile tanınan molekül içeri alınmaya başlar [67]. Sonuç olarak fagositoz, patojenlerinde dahil olduğu ve belirli boyuttan büyük olan maddeleri hücre içerisine alınmasında rol almaktadır. Böylelikle alınan maddeler gerekli yerlere gönderilerek sindirilir ve savunma mekanizması olarak da kullanılabilir.

2.3.2. Pinositoz

Pinositoz ve fagositoz arasında, dışarıdan alınan maddelerin lizozoma aktarılması ve dışarıdan içeriye madde alınması için membran düzeninin yeniden şekillenmesi gibi bazı ortak özellikler vardır. Ancak fagositoz katı maddelerin alınmasında görev alırken, pinositoz çözünür ve jelatinimsi maddelerin içeri alınmasında görev yapmaktadır ve bu solüsyonumsu maddeleri membrana adsorbsiyonu veya akışkan hâlde içeri alabilmektedir. Bunu yanı sıra fagositoz gibi bir uyarana genel anlamda gerek duymaz. Bu anlamda da kendi aralarında farklılıklar gözükmektedir [66]. Önemli farklılıklardan biri de fagositoz, makrofaj gibi daha özelleşmiş hücrelerde de olmaktadır.

2.3.3. Kaveola Aracılıklı Endositoz

Kaveola, kolesterol ve spingolipit açısından zengin olan yapılardır ve diğer plazma membran üyelerinden daha fazla yağ yoğunluğuna sahiptir [68, 69]. Boyut bakımından yaklaşık 50 ile 100 nm boyutlara sahip bu yapılar flask şeklide olabilirler [70, 71]. Aktin sitoskeleton bozulması, starosparin ve genistein ile baskılanan ve okadaik asit ve vanadat ile fosfataz inhibitörleri yardımıyla güçlendirilmesiyle içeri alınır [68]. Her bir kaveola yaklaşık 144 adet kaveolin içermektedir [72]. Endositoz yapıları vesilesiyle hücre sinyalleşmesinden yağ düzenlenmesine birçok farklı görevde yer almaktadır ve birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir [70]. Kaveolin-1, kaveolin-2 ve kaveolin-3 olarak 3 proteinde sahiptir ve kaveolin-1 diğerlerine göre daha ön plandadır ve kaveolin-1 morfolojik olarak kaveola'nin oluşumunda önemli rol oynar [71, 73]. Daha önce de bahsedildiği üzere kaveolin-1 kaveola'nin morfolojik oluşumunda önem arz etmektedir çünkü membranın yer tayininde ve kaveolin-2'nin stabilizasyonunda etkilidir [69]. Ancak kaveolin-2'nin detaylı olarak ne iş yaptığı açıklanamamış olsa da kaveolin-1 için destekçi bir yapı görevi görmektedir ve diğer sonuçlara göre kaveolaya bağlı membranların oluşmasında rol oynar. Endoplasmik retikulum organelindeyken kaveolin-1 ve kaveolin-2 birleşerek daha yüksek moleküler kütleyle sahip heterooligomerik yapı oluşturmaktadırlar ancak kaveolin-2'nin tek başına ifadesi oligometrik yapı oluşturmamaktadır [69, 70]. Bunun yanı sıra, kaveole'nin toplanmasında, şekil ve boyut bakımından ayarlanmasında da kaveolin-2 görev almaktadır [69]. Ayrıca kaveolin-1 ve 2 aynı zamanda her yerde bulunan ama fibroblastlarda, adipsitlerde, endotel hücrelerinde ve pnemositlerde daha fazla bulunan proteinlerdir [69]. Kaveolin 1 ve 2'den bağımsız olarak ifade edilen kaveolin 3, iskeletsel kasların fiberlerinde ve kalp miyositlerinde ifade edilir [69]. Kaveolin-1, 21 kDa ağırlığına sahip olup hem C hem de N terminalleri sitoplazmik olarak yönlendirilmiş ve hidrofobik alan ile birbirlerine bağlanmış şekildedir [69]. Bunun dışında kaveolin-1 ile karmaşık bir ilişkiye sahip olan kolesterol, kaveolin-1'in transkripsiyonel ve translasyonel ifadesel seviyelerini ayarlamakta görev alır. Bu ayarlamayı da ya proteinin kendisine bağlanarak ya da kaveolin-1 promoterindeki steroid düzenleyici elementlere bağlanarak yapmaktadır [69]. kaveole ile yapılan endositoz, çoklu alanda etki gösteren GTPaz olan dynamin'e büyük oranda dayanmaktadır [69]. Bunun yanı sıra kaveolin-1 başka maddelerle iletişime geçse de diğer önemli bir eleman da filaminlerdir. Filaminler,

aktin sitoiskeletin düzenlenmesinde rol aldığından kaveola aracılıklı endositozda ve haberleşmede önemli rol oynamaktadır [69]. Madde girişinin yanı sıra bu yolağı kullanan virüslerde bulunmakta olup bu virüslerden ismi duyulmuş ve başka çalışmalarda da kullanılan SV40 yani simian virüs 40'tır. Sadece SV40 değil son zamanlarda üzerlerine ilgi çekmeye başlayan poliyoma virüsleri de bu yolağı tercih edenler arasındadır [69, 70]. Kaveole, endositozun önemli yanlarından biri de ligand tetikli olduğundan belirli maddeleri alımda daha seçici ve daha düzenli alım sağlamasıdır [74]. Bunun yanı sıra kaveola aracılıklı endositozu kinazlar ve fosfatazlar tarafından düzenlenmekte olup, kaveolin-1'in tirozin fosforilasyonu tomurcuklanmayı ve kaveolanın alımını başlatabilmektedir [74].

2.3.4. Klatrin Aracılıklı Endositoz

Klatrin aracılıklı endositoz, klatrin kaplı veziküller kullanılarak maddelerin hücre içerisine alınması olayıdır. Ancak yanlış veyahut farklı anlaşımaların önüne geçilmesi için şöyle bir bilgi verilmelidir; klatrin kaplı veziküller, membranın başka bileşenlerinden de oluşturulabilse de klatrin aracılıklı endositozdaki terimi sadece klatrin kaplı veziküllerle maddenin içeriye alınmasını anlamına gelmektedir [75, 76]. Bu yolak, bilinen bütün ökaryotik hücreler tarafından kullanılmaktadır. Hücre içerisine madde alımı ilk kez elektron mikroskopu kullanılarak görüntülediğinde, farklı birçok dokuda protein kaplı veziküller görünmüştür. Bundan sonra klatrin, veziküllerin etrafında kafes gibi görünümü kılıf hâlini alan asıl protein olarak tanımlanmıştır [76]. Transmembran proteinleri, oluşan çukurların etrafındaki bu kılıfı oluşturmak için klatrin adaptörlerine veya diğer kılıfla bağlantılı proteinlere bağlanarak işe alınır. Daha sonra oluşan bu kılıflı çukur membrandan kopar ve kılıflı vezikülleri oluşturarak hücrenin içine girer [75]. Polihedral kafes şeklinde olan klatrin, 3 ayaklı şekilde yani triskelyon yapıda olup, birbirlerine bağlanan 192 kDa ağırlığa sahip 3 ağır ve 25 ile 29 kDa arasında değişen 3 hafif zincirden oluşur [77]. Bazı bakteriler, kaveola aracılıklı endositozda olduğu gibi klatrin aracılıklı endositoz yolunu kullanarak hücre içerisine girebilmektedirler. Önceden de bahsedildiği üzere 3 ağır zincir ve 3 hafif zincirden oluşan klatrin, triskelyon yapı oluşturmaktadır ve plazma membran üzerine klatrin kaplı çukurlar oluşturmaktadır. Membranın dış yüzeyinde oluşan bu kılıf, AP proteinleri adlı bir dizi başka proteinlerden destek almaktadır. AP2, epsin, AP-180, endofilin, auxilin, intersectin, amphiphysin, syndapin gibi birçok proteinin görev aldığı AP proteinlerinin kendilerine uygun

görevleri vardır. Bunlardan AP2, membranın iç kısmı ile kltrin arasında bağlantı görevini üstlenirken, epsin, AP180 ve diğer proteinler de protein-protein ve protein-ligant düzenleyen katlanır alanlardan oluşmaktadır. Kltrin kaplı vesikülün oluşma süreci kltrin kaplı çukurların oluşması ve bu çukurların tomurcuk hâlini almasıyla başlar. Daha sonra dynamin GTPazı bu tomurcuğun membrandan kopmasını sağlar. Son olarak da auxilin ve Hsc70 enerji harcanarak kltrin kılıfı katalizler [78].

2.3.5. Hücre İçine Giriş Yolaklarının Önemi

Hücre içine giriş yolaklarının bilinmesi ve gözlemlenmesi, hangi maddelerin hangi yolaklarla hücre içine alındığını anlamak açısından önem arz etmektedir. Bu yolakların ve ilişkili maddelerin anlaşılması gerekli tedavilerde ve çalışmalarda önemli bir yol gösterici görevi görecektir. Önceki bölümlerde anlatıldığı üzere 4 farklı hücre içine giriş yolağı mevcuttur ve her bir yolak benzerlik gösterse de madde ve alım sırasında kullanılan şekiller açısından farklılıklar göstermektedir. Hücre içine giriş yolaklarının iyi anlaşılması, tercih edilecek olan nano taşıyıcıların tasarlanmasında önem arz eder. Böylelikle hedefli tedavilerde daha etkin çözümler geliştirilebilir. Nano partiküllerin hücre içerisine alımı, kullanılan yöntem ve hedeflenen çalışmaya göre farklılıklar gösterebilmektedir. Jayanth Panyam ve Vinod Labhasetwar'ın yaptığı çalışma PLGA nano taşıyıcı üzerine yaptığı bir çalışmada, nano taşıyıcıları görüntüleyebilmek için transmission electron microscopy kullanmışlardır [79]. Azzah M. Bannunah ve arkadaşlarının nano partiküllerin hücre içerisine girişlerini inceleme üzerinde yaptıkları çalışmada, nano partiküllerin boyut ve yüklerin hücre içine girişte etkisi üzerine yaptıkları çalışmada görüntüleme amaçlı konfokal mikroskopu ve floresan mikroskopu kullanmışlardır [63]. Raman Preet Singh ve Poduri Ramarao'nun gümüş nano partiküllerinin sitotoksitesisi ve hücresel trafiğinin incelenmesi üzerine yaptıkları çalışmada floresan mikroskopu kullanmışlardır [80]. Feng Zhao ve arkadaşlarının nano malzemelerin toksitesisi ve hücre içine girişleri üzerine yaptıkları çalışmada konfokal floresan görüntüleme, konfokal mikroskopuyla görüntüleme gibi farklı yöntemlerle gözlemlemişlerdir [10].

2.4. İnhibitörler

İnhibitör işleyiş mekanizmalarını engelleyerek gerekli işlemlerin yapılmasını önleyen maddelerdir. Farklı inhibitörlerin kullanılmasıyla hücrelerin giriş yolları incelenecek ve nano taşıyıcının giriş mekanizması incelenecektir. Deneylerde inhibitör olarak dynasore, genistein, EİPA, chlorpromazine, methyl- β -cyclodextrin kullanılmıştır. Her bir inhibitörün farklı etkileri vardır. Soğukta tüm endositoz yollarının inhibe edildiği bilinmektedir [63, 81].

2.4.1. Dynasore

Dynasore; dinamin'in GTPaz aktivitesini etkileyerek hücre içine girişte inhibitör görevi gören maddedir [82, 83]. Dinaminin inhibe edilmesi kltrin aracılıklı veziküllerin oluşmasını engelleyeceğinden keseler oluşamayacaktır. Bu şekilde kltrin aracılıklı endositoz inhibe edilecektir.

2.4.2. Genistein

Genistein; tirozin kinaz inhibitörü olup, dinamin 2'nin toplanmasını engeller. Ayrıca aktin filamentlerin bölgesel bozulmalarına neden olur. Böylelikle kaveolaların oluşumunu inhibe ederek endositozu azaltacaktır. [84, 85].

2.4.3. EİPA

5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride, Na⁺/K⁺ değişimini inhibitörüdür. Kısaltılmış şekilde EIPA olarak geçmektedir [86]. Kanser hücrelerinin anormal metabolizmalarından dolayı çok miktarda asidik metabolit üretmektedir. Dolayısıyla sitosolik anlamdaki pH değeri oldukça yüksektir. Bu değeri normal seviyede tutabilmeleri için hidrojen ekspresyonu ve etkinliği normal hücrelerle kıyaslandığında oldukça fazla olacaktır.

2.4.4. Cyclodextrin

Methyl- β -cyclodextrin; plazma mebranındaki kolesterolü çıkararak kltrin aracılıklı endositozu ve sıvı girişi engellemektedir [87]. Kolesterol, hücre membranının mekaniksel dengesini ve bütünlüğünü sağlamakta görevlidir. Bu inhibitör vasıtasıyla kolesterol mekanizmasını bozmak kltrin aracılıklı keselerin oluşmasını engelleyeceğinden kltrin aracılıklı endositoz gerçekleşemeyecektir.

2.4.5. Chlorpromazine

Chlorpromazine; klatrinden bağımsız endositozu inhibe etmekte olup, kltrin ve AP2'yi membrane yüzeyinden alarak hücre içindeki endozoma yerleştirmektedir [87, 88]. Bu inhibitör katyonik ve ampifatik yapıda olup, adaptör proteinlerin ve kltrin'in endozomal membranda toplanmasına neden oluyor. Böylece kltrin plazma membranından uzakta kalmasına ve kltrin cepçiklerinin oluşmasına engel olmaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. İnhibitörler

Tez aşamasında kullanılan inhibitörler olarak Sigma Aldrich G6649-5MG marka Genistein, SIGMA-ALDRICH D7693-6MG marka dynasore, SIGMA-ALDRICH A3085- 25MG marka EIPA, SIGMA-ALDRICH C0982-5G marka chlorpromazine ve SIGMA-ALDRICH 332615-5G marka methyl- β -cyclodextrin inhibitör kullanılmıştır.

3.1.2. Kimyasallar

Tez aşamasında Sigma Aldrich P2192-5G marka PLGA, PHOSPHOREX 25221 marka FITC işaretli PLGA, sürfaktan olarak SIGMA-ALDRICH P1754-1L marka Tween 80, selüloz kaynağı olarak SIGMA-ALDRICH M0262-100G marka selüloz ve Marmara Üniversitesi, Biyomühendislik Fakültesi, Sn. Prof. Dr. Ebru Toksoy Öner laboratuvarında üretilmiş olan levan kaynağı kullanılmıştır. MCF-7 hücrelerinin kaldırılması için tripsin, canlılık testleri için sülforadamin B ve BD 559759 marka cell lysis buffer kullanılmıştır.

3.1.3. Cihazlar

PLGA miktarı tayini için hassas terazi olarak Precisa ve AND marka tartılar kullanılmıştır. PLGA'nın aseton çözülmesi için Bandelin Sonorex marka ultrasonikatör kullanılmıştır. Nanopartiküllerin boyutlarının ölçülmesinde Zetasizer Nano ZS cihazı (Malvern Instruments), makro küvetler (Isolab, UV-Transparent disposable cuvettes) ve zetasizer küvetler (Malvern Instruments, disposable capillary cells DTS1070) kullanılmıştır. Nanopartikül hazırlama ve ölçüm çalışmalarında otomatik pipetlerden (Thermo, Eppendorf) yararlanılmıştır. ELİSA ölçümleri için Biotek Synergy H1 Hybrid Reader marka cihaz kullanılmıştır. DLS ölçümleri için Malvern Instruments ZS90 cihazı, floresan mikroskopu olarak da Zeiss Observer.Z1 cihazı kullanılmıştır. Asetonda çözülmüş PLGA nano taşıyıcıların sulu fazlara

aktarılrken karışmasında ve Distile su ve Tween 80 karışımı sonucu elde edilen sulu fazın homojen hâle getirilmesinde manyetik karıştırıcı olarak IKA marka karıştırıcı kullanılmıştır. Well plate'lerden toplanan hücrelerin vortekslenmesinde VWR International marka vorteks cihazı kullanılmıştır.

3.1.4. Hücre Kültürü

Hücre kültüründe MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. 48 kuyulu plate için 25×10^3 kadar hücre ekimi yapılmıştır. Besi yeri olarak da %15-20 oranında FBS, %1 oranında primicin içeren DMEM/f12 besi yeri kullanılmıştır. Hücrelerin yıkanması için PBS ve kaldırılması için Thermo Fisher marka tripsin kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. PLGA Hazırlanışı

19 ml su ve 1 ml Tween 80 karışımı stok hazırlanmıştır. Bu stoktan 0,25 ml alınarak 4,75 ml distile su ile karıştırılmıştır. 20 mg PLGA tartılmış ve 1,25 ml asetonla karıştırılarak ultrasonik banyoda çözülmesi sağlanmıştır. Çözülen bu karışım, manyetik karıştırıcıda bulunan Tween 80'li suya şırınga yardımıyla damlatılmıştır. Asetonun uçması ve ortamda sadece istenilen gerekli maddelerin kalması için bir gece manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Tween 80 kullanılmasının amacı, bu maddenin sürfaktant ve emülsifier olmasıdır. Sürfaktant özelliğinden yararlanılarak maddelerin katılacağı suyun yüzey gerilimi azaltılmaktadır. Böylelikle sulu ortama verilecek maddeler daha rahat karışabilmektedir. Ayrıca amfifilik özelliğe sahip olmasından dolayı PLGA'nın açık zincir hâlinde daha uzun süre kalması sağlanacaktır.

3.2.2. FITC İşaretli PLGA Hazırlanışı

Tween 80 ve su karışımı kaynağından 0,25 ml alınarak 4,75 ml distile suyla karıştırılmıştır. 19 ml PLGA ve 1 mg FITC işaretli PLGA tartılarak 1,25 ml asetonla karıştırılmış ve ultrasonik banyo yardımıyla çözülmüştür. Çözülen bu nano taşıyıcı, manyetik karıştırıcıda bulunan Tween 80'li su karışımına eklenmiştir. Asetonun uçması için bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Tween 80 kullanılmasının amacı suyun yüzey gerilimini azaltarak sulu ortama verilecek PLGA'nın daha rahat nüfuz etmesini sağlamaktır. Ayrıca amfifilik özelliğe sahip PLGA'nın açık zincir hâlinde daha uzun süre kalmasına yardımcı olacaktır.

3.2.3. Levam Kaplı PLGA Hazırlanışı

Tween 80 ve su karışımı kaynağından alınan 0,25 ml madde 4,75 ml distile su ile karıştırılmış ve bu karışıma 20 mg levam eklenmiştir. 1 mg FITC işaretli ve 19 mg normal PLGA tartılarak karıştırılmış ve 1,25 ml asetonda ultrasonik banyoda çözülmüştür. Çözülen nano taşıyıcı manyetik karıştırıcıda olan su kaynağına şırınga yardımıyla damlatılmış ve asetonun uçması için bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Bu hazırlama aşamasında da Tween 80 kullanılmasının amacı sulu ortamın yüzey gerilimini azaltarak PLGA'nın daha rahat bir şekilde ortama girmesine ve girdikten sonra açık zincir hâlini daha uzun süre korumasına destek olmasıdır.

3.2.4. Selüloz Kaplı PLGA Hazırlanışı

Tween 80 ve su karışımı kaynağından alınan 0,25 ml sıvı, 4,75 ml distile su ile karıştırılarak içerisine 7,5 mg selüloz eklenmiş ve manyetik karıştırıcıya konulmuştur. 1 mg FITC işaretli PLGA ve 19 mg PLGA tartılarak 1,25 ml asetonun içerisinde ultrasonik banyoda çözülmüştür. Daha sonra PLGA'lı sıvı şırınga yardımıyla su kaynağına damlatılmıştır. Barındırdığı asetondan kurtulmak için karışım bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. PLGA'nın uzun zincir hâlini daha uzun süre koruyabilmesi ve sulu ortamın yüzey gerilimini azaltarak PLGA'nın sulu faza daha rahat girişine neden olmasından dolayı Tween 80 kullanılmıştır.

3.2.5. İnhibitör Hazırlanışı

Öncelikli olarak kullanılacak bitin inhibitörlerin toksik olmayan en uygun miktarının tayin edilmesi gerekmektedir. Bunun için farklı derişimlerde inhibitör hazırlanarak ve hücrelere verilmiştir. Daha sonra sülforodamin B yöntemi ile canlılığa bakılmıştır. 96 kuyucuklu well plate kullanılarak derişimleri farklı olan maddeler farklı kuyucuklara ekildi. Plate'in her kuyusuna 100 µl TCA eklenerek 30 dakika boyunca +4 Celcius derecede bekletilmiştir. 30 dakika bittikten sonra 3 kez distile su ile kuyucuklar yıkandıktan sonra çeker ocakta 10 dakika kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işlemi bittikten sonra her kuyuya sülforodamin eklenmiş, plate ışık almayan bir yerde oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. %1'lik asedik asit solüsyonu hazırlanmıştır. Bekleme süresi bittikten sonra asedik asit solüsyonu ile 3 kez yıkama yapılmış ve çeker ocakta 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Son olarak da her

kuyucuğa Tris eklenerek ELISA testine götürülmüştür. Böylelikle çıkan sonuçlara göre inhibitörlerin toksisitesine bakılmış ve uygun değerler hesaplanmıştır. Bunların dışında inhibitörlerin hangi maddelerde iyi çözüldüğünün belirlenmesi gerekmektedir. Dynsaore, genistein ve EİPA inhibitörleri DMSO (di metil sülfoksit) kullanılarak, chlorpromazine ve cyclodextrin ise PBS kullanılarak çözülmüştür.

3.2.6. Nano Taşıyıcı Sistemlerin Hücre İçine Giriş Miktar Tayini

Boyut tayini yapılmasının dışında ortama ne kadar madde vereceğimizi anlamak için de kuyucuklara değişik derişimlere sahip nano taşıyıcı sistem ekilmiştir. İlk olarak ilk kuyucuk hariç sonraki 5 kuyucuğa su konuldu. Nano taşıyıcılardan 1 ml çekilerek ilk kuyucuğa konulmuş ve bu kuyucuktan da 0.5 ml alınarak bir sonrakine eklenmiştir. İkinci kuyudan da 0.5 ml alınarak bir sonrakine konuldu şeklinde gidilerek birinci kuyudan son kuyuya doğru seyren derişimlerde maddeler elde edilmiştir. Kuyucuklarda 300 µl besi yeri ve MCF-7 hücreleri varken üzerlerine 60 µl taşıyıcı maddelerden ekilmiştir. Floresan mikroskopuyla bakılarak maddelerin hangi derişimdekileri nasıl etki etmiş incelenerek hücre içine giriş tayini yapılmıştır. Bu işlemler yapılırken 48'lik well plate kullanılmıştır. Sonuç olarak selüloz için 7,5 mg, levan için 20 mg olarak tayin edilmiştir.

3.2.7. ELISA

Bu deneylerde ELISA cihazı, ortamdaki maddelerin varlığını anlamak amaçlı kullanılmıştır. Floresan ölçümü yapılacak olan plate cihaza yerleştirildikten sonra, bilgisayar kısmında yer alan programından yeni protokol oluşturularak floresan okuma seçeneği seçilmiş, plate çalkalama kısmı işaretlenerek 8 saniye orbital şekilde plate'in çalkalanması ayarlanmıştır. Böylelikle ortamdaki kabarcıklardan kurtulunmuştur. Floresan dalga boyu olarak excitation değeri 485 nm ve emission değeri olarak 528 nm ayarlanmıştır. Plate ekiminde kaç kuyu ekimi yapıldıysa protokol kısmında da o kadar kuyu seçilerek protokol kaydedilmiştir. Daha sonra yeni görev sekmesi seçilerek kaydedilmiş olan protokolü seçerek işlem başlatılmıştır. İşlem tamamlandıktan sonra çıkan sonuçlar değerlendirilmiştir. Deneylerde 48 ve 96 kuyucuklu well plate kullanılmıştır.

3.2.8. DLS

DLS, ölçülmesi istenilen maddelerin boyutlarını tayin etmekte kullanılan bir yöntemdir. Cihaza verilen sıvı ya da süspansiyonun içerisindeki parçacık ya da polimerlerin boyutsal olarak dağılımını gösterir. Ortama gönderilen ışınların ortamdaki maddelere çarparak yansması sonucu madde boyutunun ölçülmesi şeklinde çalışır. PLGA'nın ve karbonhidrat destekli PLGA'nın en uygun boyutunun bulunması, maddeler hazırlandıktan sonra DLS ölçümü ile boyut analiziyle olmaktadır. Maddelerin DLS sonuçlarında ortamdaki parçacıkların boyutlarına ve çeşitliliklerine göre farklı grafikler çıkmaktadır. Eğer ortamdaki tüm maddeler aynı boyuttalar ise monodispers grafik çıkmaktadır. Ortamda farklı boyuttaki maddelerin bulunması polidispers grafik oluşmasına neden olur. Normal PLGA'nın 20 mg ölçülmesi sonucu DLS ölçümlerinden monodispers grafik elde edilmiştir. Aynı işlem levam ve selüloz içinde kullanılmış ve monodispers yapı elde edilinceye kadar denemeler yapılmıştır. Levam için 20 mg, selüloz için 7,5 mg en uygun miktar olarak tayin edilmiştir. DLS ölçümü alınırken, öncelikli olarak File sekmesinden New measurement sekmesini seçerek yeni bir dosya oluşturulur, Measurement sekmesinden manuel sekmesine girilerek çıkan sekmeye çalışmanın adı verilir. Açılan pencerede örnek ismi verilir, bu pencerede deneyde istenilen özellikler seçilmelidir. Bu sekmede malzeme seçeneği polystyrene latex, dispersent olarak su seçilecektir. Cihaza hangi çeşit küvet konulduğuna göre hücre sekmesinden seçim yapılacaktır. Bu deneylerde disposable cuvettes seçilecektir. Bu sayfa içerisinde measurement sekmesinden kaç tekrar yapacağı seçenekleri ayarlanacaktır. Protokol oluşturulması bittikten sonra sayfada onaylama tuşuna basıldığı zaman açılacak yeni pencerede başlatma tuşuna basıldığı zaman cihaz ölçüme başlayacaktır. Bu yöntem kullanılarak PLGA ve levam ve selüloz destekli PLGA boyutlarının tayini yapılmıştır. Ölçüm işlemi bittiğinde değerler, volume (hacim), intensity (yoğunluk) ve number (sayı) olarak belgelenmektedir. Bu belgelerin değerleri doğrultusunda değerlendirilmeler yapılmaktadır. Boyut ölçümü yapılmak istenen maddeler uygun küvetlere aktarıldıktan sonra DLS cihazına uygun şekilde yerleştirilmektedir. Böylelikle cihaz küvet içerisindeki sıvıya ışın göndererek oluşan ışık saçılımlarını ölçmektedir.

3.2.9. Zeta Potansiyel Tekniği

Zeta potansiyeli, dispers sistemlerin yük stabilitesini belirlemek için kullanılır. Ortamın bir ucundan elektrik akımı verilerek ortamdaki maddelerin sahip oldukları Zeta potansiyeline sahip olan maddeler zıt yükteki elektroda gideceklerdir. Hız ve Zeta potansiyeli birbirleriyle doğru orantıya sahiptirler. Hızı ve yönü analiz etmekte kullanılan Doppler anemometry tekniği vasıtasıyla analiz edilir. Lipozom ve nano kristal gibi sistemlerin stabilitesini kontrol amaçlı kullanılabilir. [89, 90]. Levan kaplı PLGA, FITC işaretli PLGA, PLGA ve selüloz kaplı PLGA nano taşıyıcılarının hazırlanmasından sonra Zeta potansiyellerine bakılarak yük stabiliteyi incelenmiştir. Böylelikle deneylerde kullanılacak nano taşıyıcı miktarı tayini doğrulanmış olmuştur.

3.2.10. Nano Taşıyıcı ve İnhibitörlerin Hücrelere Verilmesi

Deneilerde sadece nano taşıyıcıların 1, 4, 6 ve 24 saat giriş miktarları kıyaslanmıştır. Bu değeriendirmeler sonucu grafiklerin 6 saate yaklaştıkça arttığı ve 24 saatte doyuma ulaştığı gözlemlenmiştir. Bu yüzden sonraki deneylerde 24 saat bekleme süresi seçilmiştir. Hazırlanan nano taşıyıcı sistemler, farklı derişimlerde olacak şekilde ayarlanarak MCF-7 hücreleri barındıran 48 kuyucuklu well plate'e ekim yapılmıştır. Farklı derişimlerde nano taşıyıcı kullanılmasının amacı toksisite anlamında en uygun derişimi bulmaktır. Kuyucuklarda 300 µl besi yeri bulunmaktadır. Bu kuyucuklara 60 µl nano taşıyıcı eklenmiştir. Daha sonra nano taşıyıcıların hücre içine girişlerinin olup olmadığını kontrol etmek için floresan mikroskopu ile bakılmıştır. Bu işlem yapılırken ortamdaki tüm sıvı çekilmiştir. Ancak hücreler kurumaması diye 100 µl PBS eklenmiştir. Görüntüleme işlemi bittikten sonra kuyucuklara PBS eklenerek yıkanmış ortam temizlenmiştir. Hücrelerin kalkması için de 500 µl tripsin eklenerek hücreler kaldırılmış ve 500 µl cell lysis buffer eklenerek hücreler patlatılmıştır. Oluşan karışım ependorflara aktarılarak vortekslenmiş ve kaldırılmıştır. İnhibitörlü deneylerde ise, hazırlanan inhibitörlerden 50 µl MCF-7 hücrelerine verildikten 30 dakika sonra her kuyucuğa 60 µl nano taşıyıcı eklenmiştir. 24 saat beklenildikten sonra ortamdaki besi yeri çekilip atılmış, 3 kere PBS ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra ortama 500 µl tripsin eklenerek hücreler kaldırılmıştır. Bu hücreler alınarak ependorfa konulmuş ve 500 µl cell lysis buffer eklenerek vortekslenmiştir. Ependorfta bulunan maddelerden bir

miktar alınarak temiz bir well plate'e aktarılarak ELİSA testi yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler hem aynı inhibitörlerin farklı nano taşıyıcılar üzerindeki etkisi hem de farklı inhibitörlerin aynı nano taşıyıcılar üzerindeki etkisi olarak değerlendirilmiştir. Deneyler 3 ayrı tarihte tekrarlanmıştır. Alınan değerlerin birbirleriyle kıyaslanması sonucu çıkarılan elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

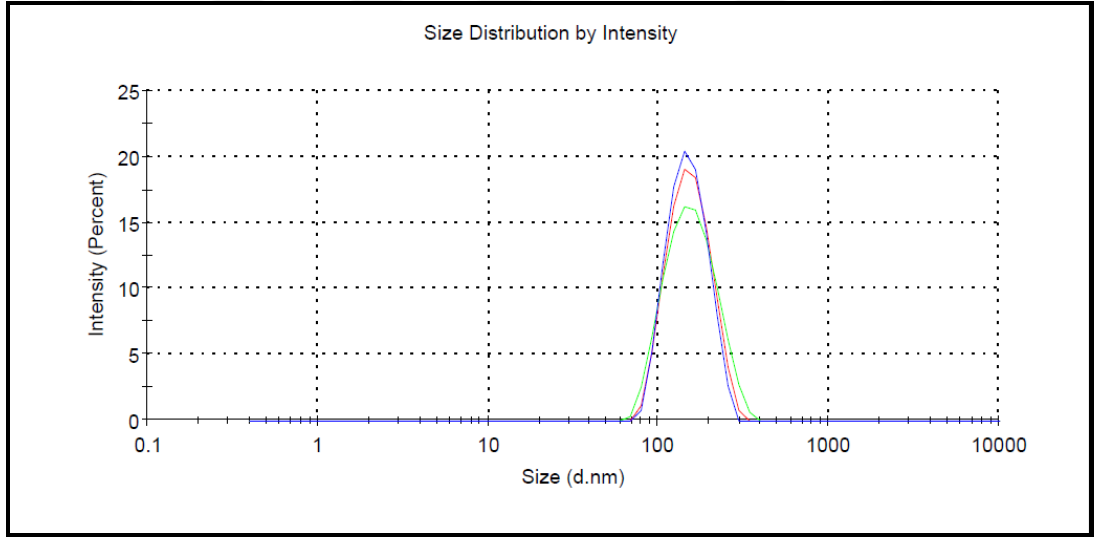


4. BULGULAR ve TARTIŞMA

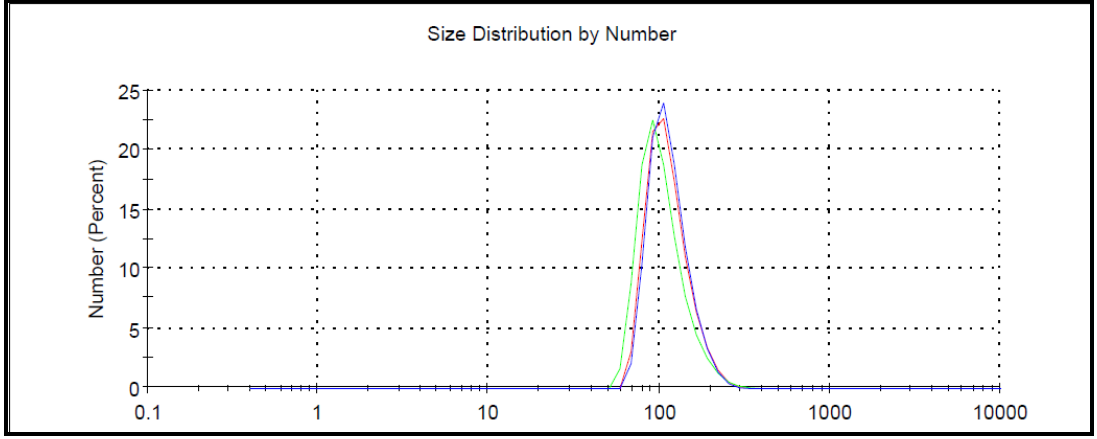
4.1. Nano Taşıyıcı Sistemlerin Madde Miktar Tayini

4.1.1. Boş PLGA Nano Taşıyıcısının Karakterizasyonu

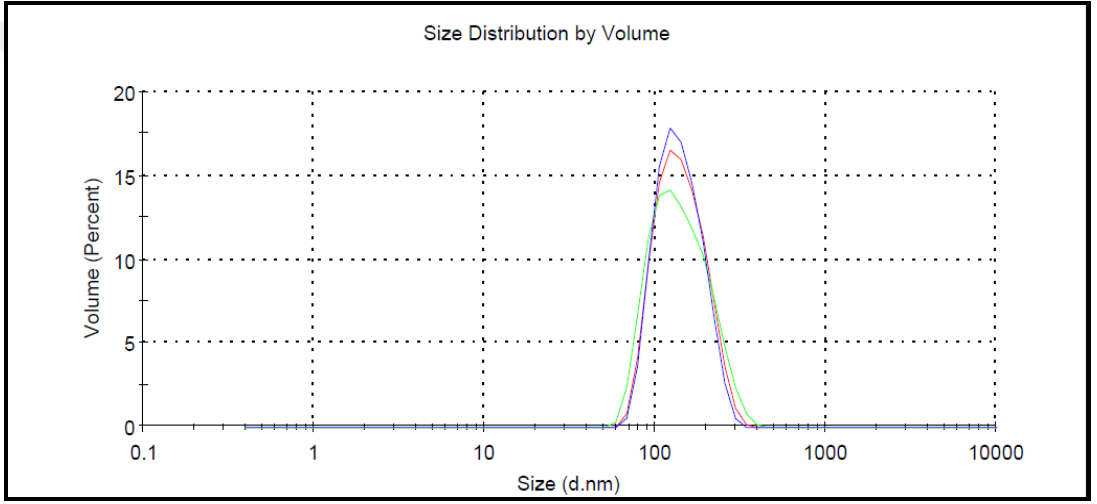
Boş PLGA nano taşıyıcısı 20 mg olarak belirlenmiş ve DLS analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları 20 mg PLGA nano taşıyıcısının uygun olduğunu göstermiş ve deneylerde boş PLGA nano taşıyıcısı olarak 20 mg kullanılmıştır. Analizler yoğunluk, hacim ve sayı değerleri bakımından yapılmıştır. Belirlenen değerdeki miktarlar monodispers dağılım göstermiştir. Zeta potansiyeli maddelerin yükleri ile alakalı bir çalışmadır. Bu teknik ile PLGA nano taşıyıcısının yük stabilitesine bakılmıştır.



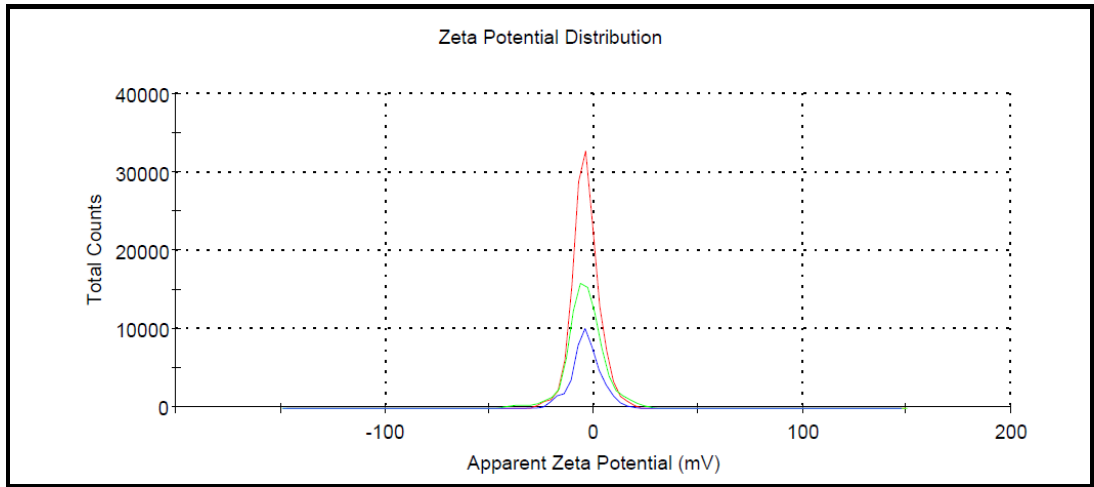
Şekil 4.1: PLGA DLS sonucu (yoğunlukça).



Şekil 4.2: PLGA DLS sonucu (sayıca).



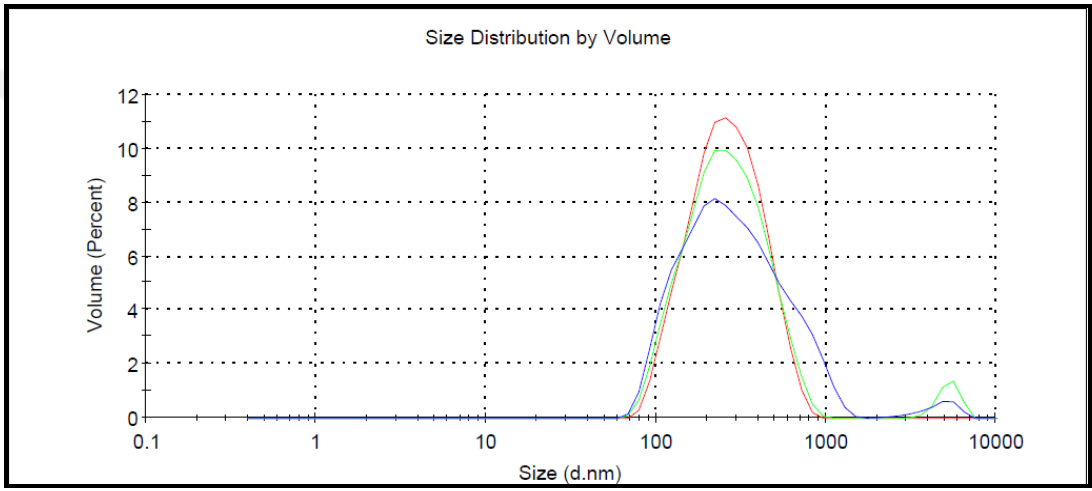
Şekil 4.3: PLGA DLS değeri (hacimce).



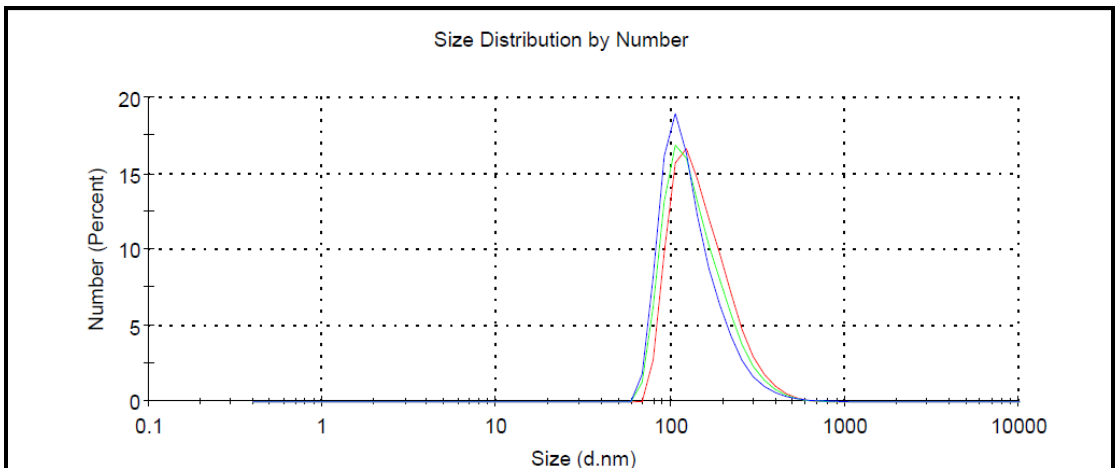
Şekil 4.4: PLGA Nano Taşıyıcısının Zeta Potansiyel Sonucu.

4.1.2. FITC İşaretli PLGA Nano Taşıyıcısının Karakterizasyonu

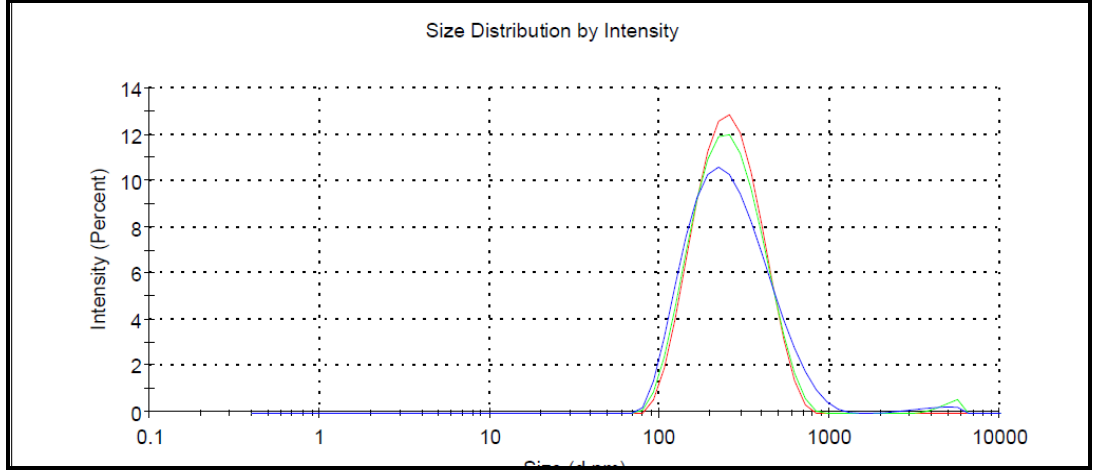
FITC işaretli PLGA nano taşıyıcısının DLS analizleri sonucu elde edilen karakterizasyon sonuçları, 19 mg PLGA ile 1 mg FITC işaretli PLGA karışımının uygun olduğunu göstermiştir. Böylelikle deneylerde 19 mg PLGA nano taşıyıcısı ile 1 mg FITC işaretli PLGA nano taşıyıcısı kullanılmıştır. Analizler yoğunluk, hacim ve sayı değerleri bakımından yapılmıştır. Belirlenen miktar değerleri monodispers dağılım göstermiştir. Belirlenen değerdeki miktarlar monodispers dağılım göstermiştir. Zeta potansiyeli maddelerin yükleri ile alakalı bir çalışmadır. Bu teknik ile FITC işaretli PLGA nano taşıyıcısının yük stabilitesine bakılmıştır.



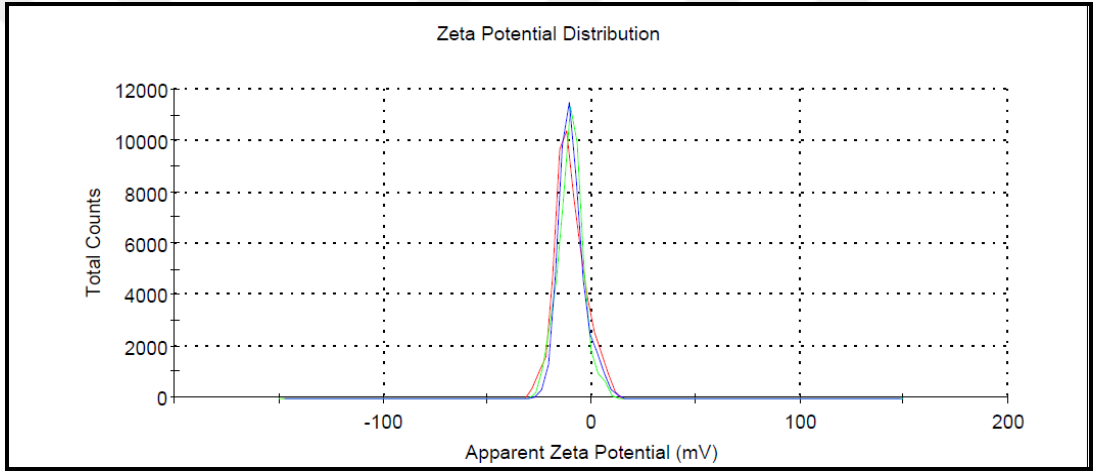
Şekil 4.5: FITC İşaretli PLGA DLS sonucu (hacimce).



Şekil 4.6: FITC İşaretli PLGA DLS sonucu (sayıca).



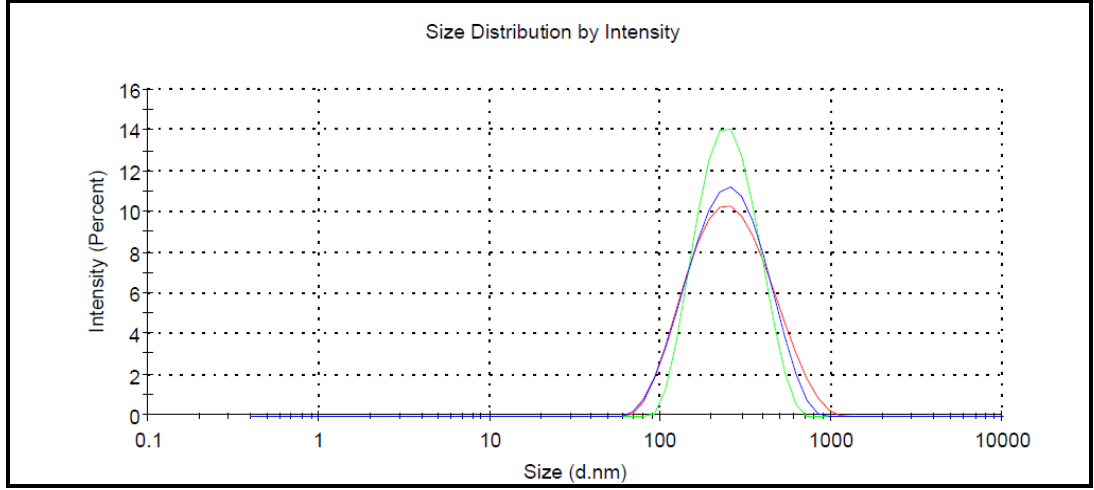
Şekil 4.7: FITC işaretli PLGA DLS sonucu (yoğunlukça).



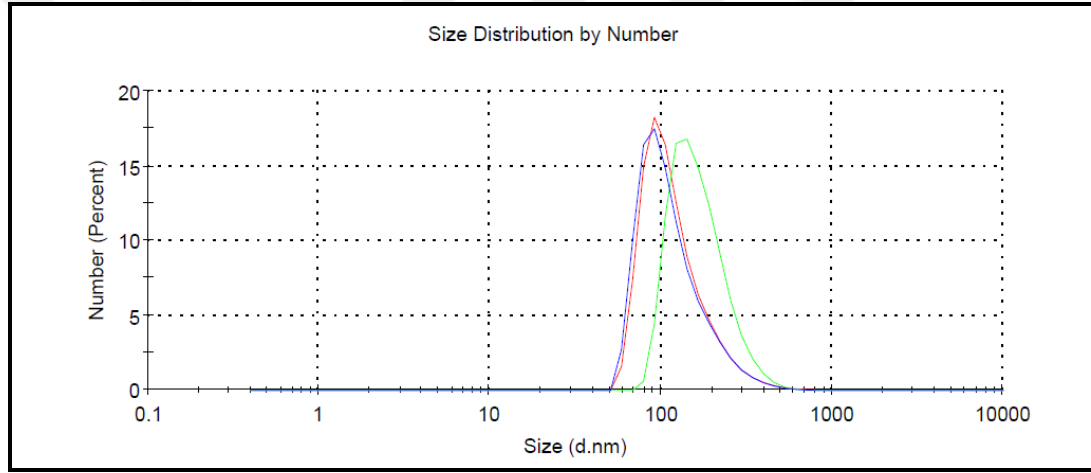
Şekil 4.8: FITC İşaretli Nano Taşıyıcının Zeta Potansiyel Sonucu.

4.1.3. Levan Kaplı PLGA Nano Taşıyıcısının Karakterizasyonu

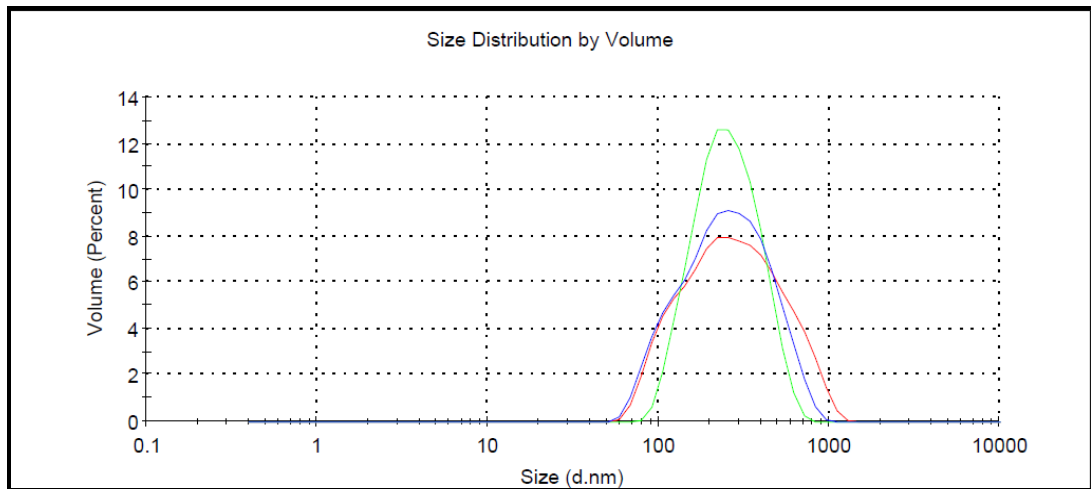
Levan kaplı PLGA nano taşıyıcısının DLS analizleri sonucu elde edilen karakterizasyon sonuçları levanın 20 mg olarak belirlenmesinin uygun olduğunu göstermiştir. Böylelikle 19 mg PLGA nano taşıyıcısına eklenen 1 mg FITC işaretli PLGA nano taşıyıcısına 20 mg levan eklenilmesi şeklinde deneylere devam edilmiştir. Analizler, yoğunluk, hacim ve sayı bakımından yapılmıştır. Belirlenen miktar değerleri monodispers dağılım göstermiştir. Belirlenen değerdeki miktarlar monodispers dağılım göstermiştir. Zeta potansiyeli maddelerin yükleri ile alakalı bir çalışmadır. Bu teknik ile levan kaplı PLGA nano taşıyıcısının yük stabilitesine bakılmıştır.



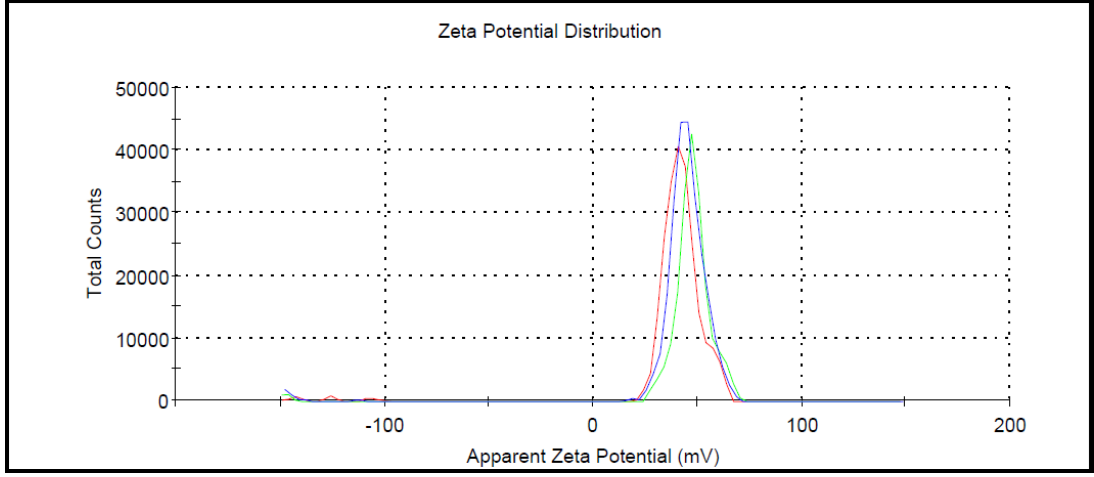
Şekil 4.9: Levam 20 mg DLS sonucu (yoğunlukça).



Şekil 4.10: Levam 20 mg DLS sonucu (sayıca).



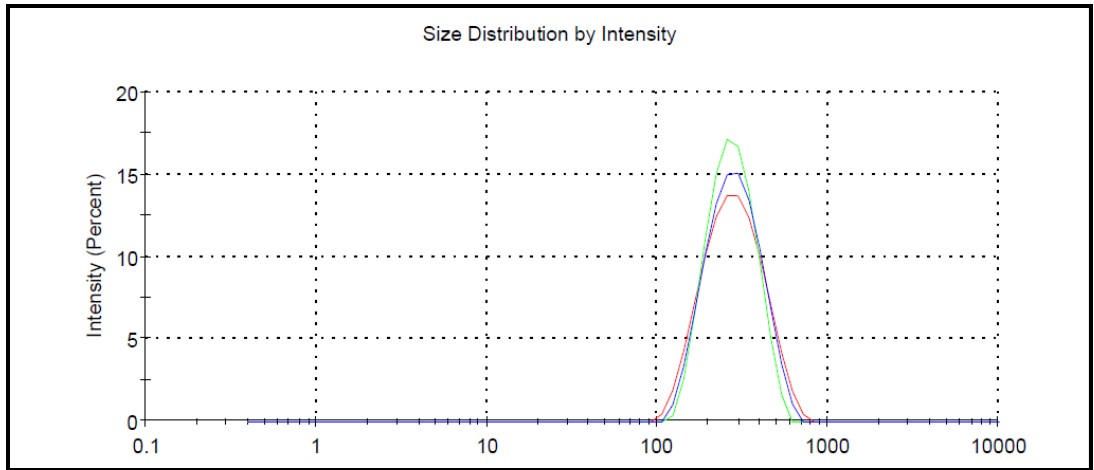
Şekil 4.11: Levam 20 mg DLS sonucu (hacimce).



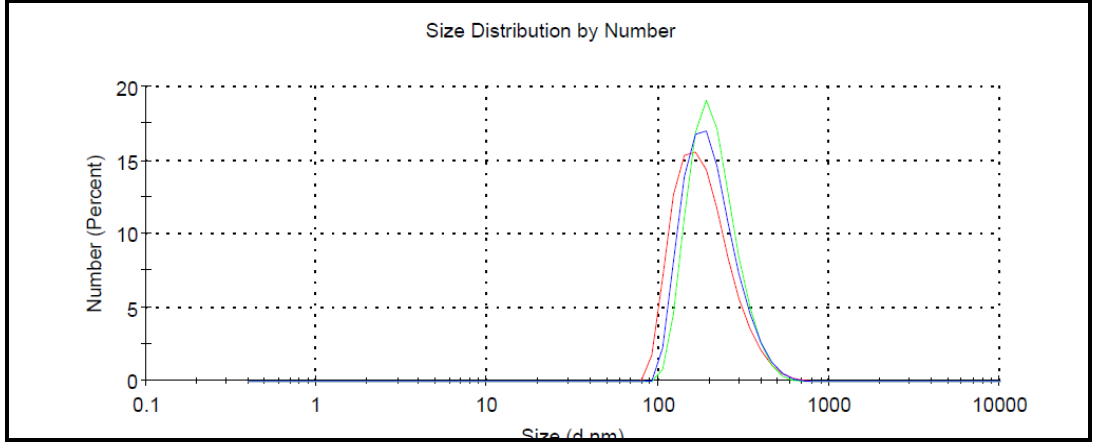
Şekil 4.12: Levam Kaplı PLGA Nano Taşıyıcısının Zeta Potansiyel Sonucu.

4.1.4. Selüloz Kaplı PLGA Nano Taşıyıcısının Karakterizasyonu

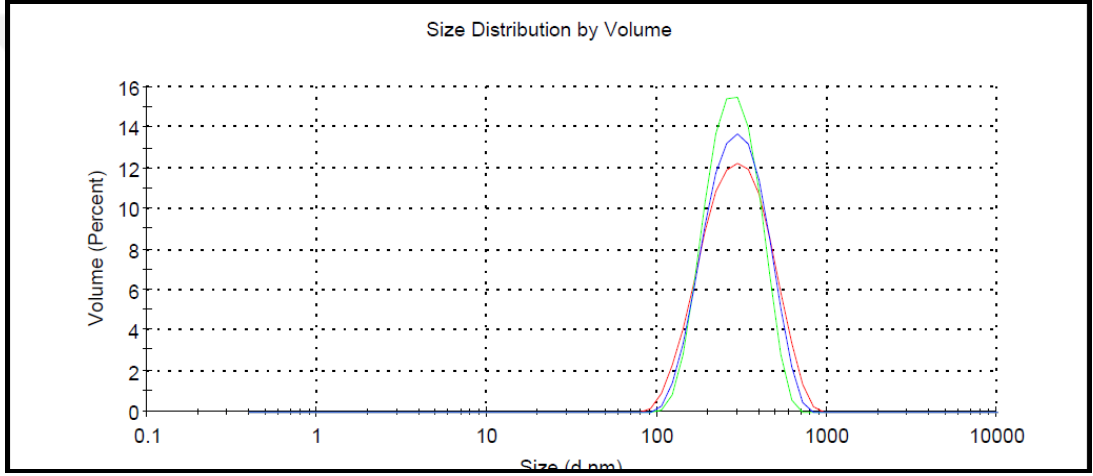
Selüloz kaplı PLGA nano taşıyıcısının DLS analizleri sonucu elde edilen karakterizasyon sonuçları, PLGA nano taşıyıcısı için 19 mg, FITC işaretli PLGA için 1 mg ve selüloz için 7,5 mg olarak belirlenmesinin uygun olduğunu göstermiştir. Analizler yoğunluk, hacim ve sayı değerleri bakımından yapılmıştır. Belirlenen miktar değerleri monodispers dağılım göstermiştir. Belirlenen değerdeki miktarlar monodispers dağılım göstermiştir. Zeta potansiyeli maddelerin yükleri ile alakalı bir çalışmadır. Bu teknik ile selüloz kaplı PLGA nano taşıyıcısının yük stabilitesine bakılmıştır.



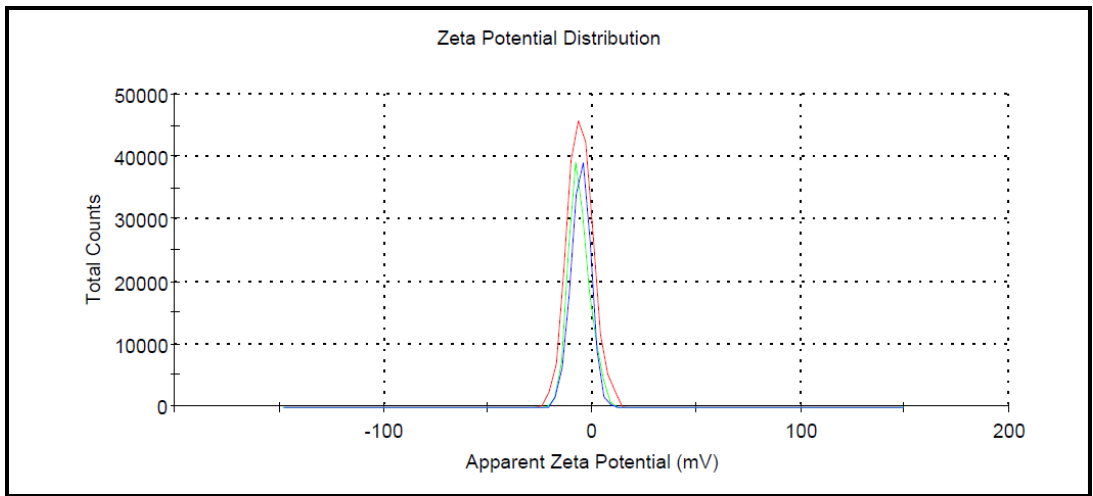
Şekil 4.13: Selüloz 7,5 mg DLS sonucu (yoğunlukça).



Şekil 4.14: Selülöz 7,5 mg DLS sonucı (sayıca).



Şekil 4.15: Selülöz 7,5 mg Volume DLS sonucı (hacimce).



Şekil 4.16: Selülöz Kaplı PLGA Nano Taşıyıcısının Zeta Potansiyel sonucı.

Tablo 4.1: Nano Taşıyıcıların DLS Değerleri.

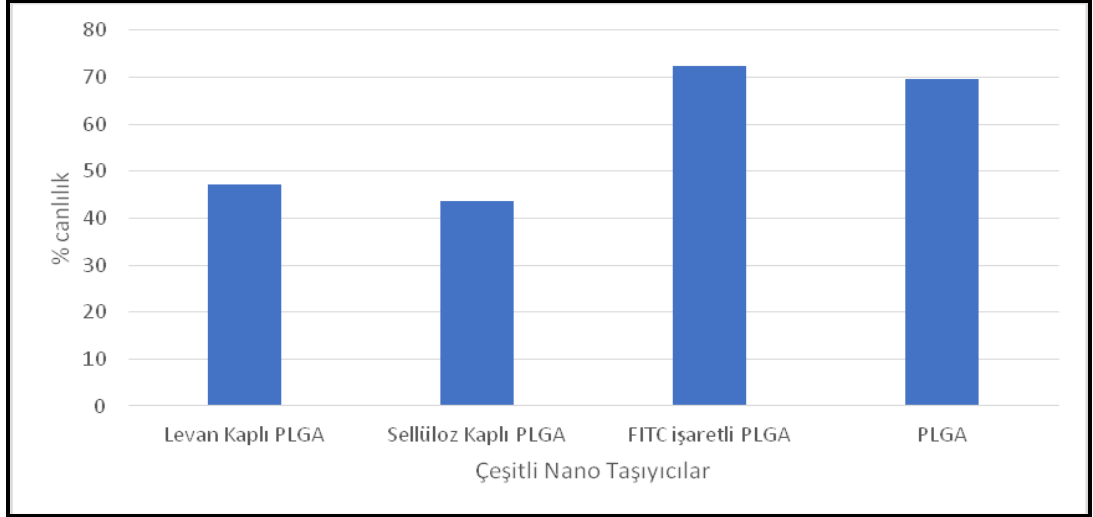
NANO TAŞIYICI ADLARI	HACİM	SAYI	YOĞUNLUK	Z-AVERAGE	PDL
PLGA	142.7	115.5	151.3	141.8	0.054
LEVAN KAPLI PLGA	280.6	120.8	270.4	216.8	0.182
SELÜLOZ KAPLI PLGA	308.0	209.3	292.8	243.2	0.179
FITC İŞARETLİ PLGA	340.3	137.9	285.3	226.1	0.208

Tablo 4.2: Nano Taşıyıcıların Zeta Değerleri.

NANO TAŞIYICI İSİMLERİ	ZETA POTENTIAL	MEAN DEĞERİ
PLGA	-3.90	-3.90
SELÜLOZ KAPLI PLGA	-6.19	-6.19
LEVAN KAPLI PLGA	-9.28	45.2
FITC İŞARETLİ PLGA	-9.64	-9.64

4.3. Nano Taşıyıcı Sistemlerinin Toksikite Çalışmaları

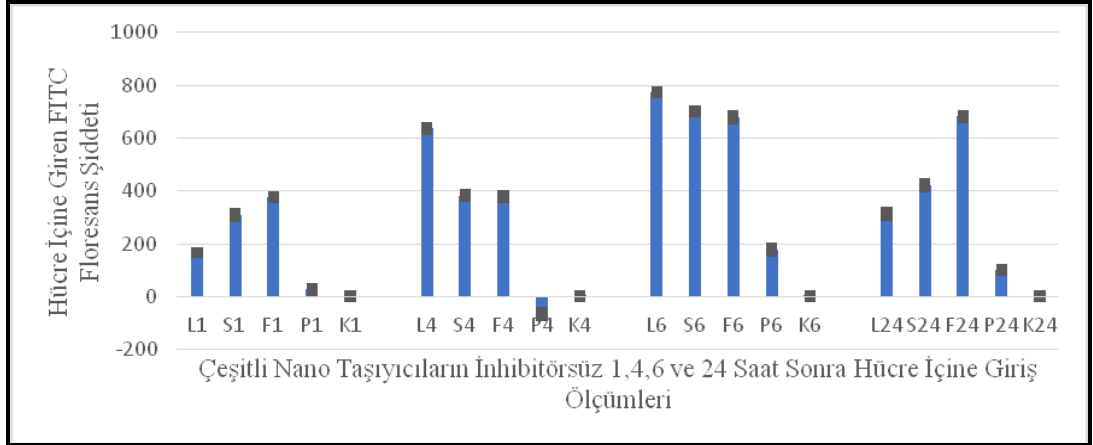
Nano taşıyıcı sistemlerin miktar tayininde bir başka önemli çalışma da toksisite tayinidir. Belirlenen miktarların toksisite açısından uygunluğu çalışmalarda kullanılması açısından önem ifade eder. Sülfurodamin uygulanması sonucu ELISA ile hücrelerin canlılıklarına bakılarak hücrelere verilen farklı nano taşıyıcıların toksisitesi ölçülmüştür. Sentezlenen en yüksek konsantrasyona sahip nano taşıyıcının bile kayda değer ölçüde toksisitesi olmadığından bu konsantrasyon deneylere devam etmek için kullanılmıştır.



Şekil 4.17: Çeşitli nano taşıyıcıların toksisitesi.

4.3.1. Levan kaplı PLGA, Selüloz kaplı PLGA ve FITC işaretli PLGA Zamana Bağlı Hücre İçine Giriş Çalışması

Hücrelerin levan kaplı PLGA, selüloz kaplı PLGA, FITC işaretli PLGA ve işaretsiz PLGA nano taşıyıcıları ile 1, 4, 6 ve 24 saat inkübe edilme sonucunda hangi saatte en çok hücre içine girişin gerçekleştiği incelenmiştir. Sonuçlar aşağıdaki gibidir.



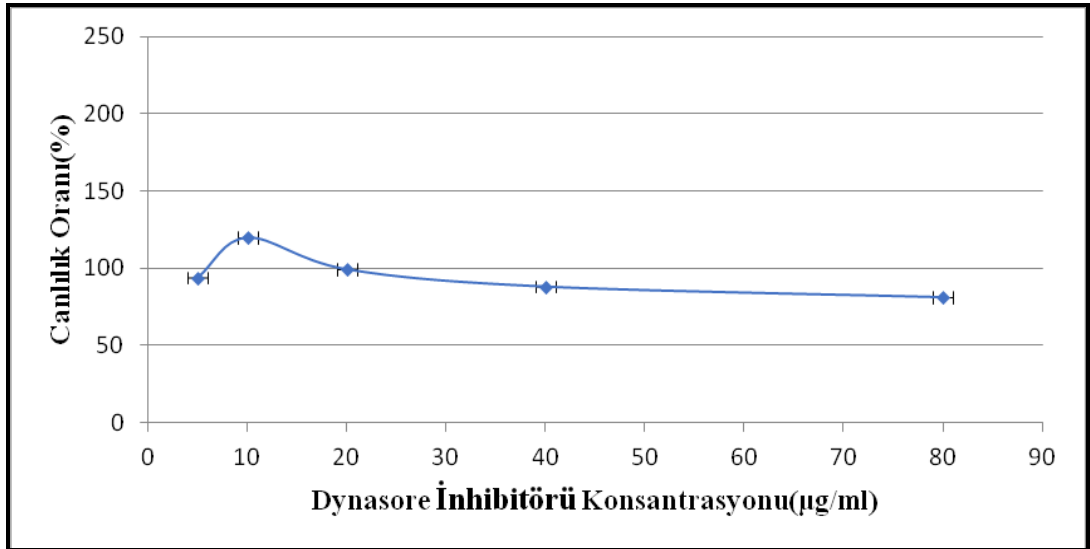
Şekil 4.18: Levan kaplı PLGA (L), selüloz kaplı PLGA (S), FITC işaretli PLGA (F) ve işaretsiz PLGA (P) nano taşıyıcılarının hücre içine giriş grafiği (nano taşıyıcı ile muamele edilmeyen hücreler kontrol (K)). Her harf önündeki rakam deney süresini saat olarak göstermektedir.

4.3.2. İnhibitörlerin Toksikite Çalışmaları

İnhibitörlerin uygun miktarlarının tayini, deneylerde kullanılan hücreleri öldürüp öldürmemesi açısından önemlidir. Bunun için de toksisite çalışması yapılmalıdır. Bu şekilde belirlenen miktarların uygun olup olmadığı anlaşılacak ve gerekli düzenlemeler yapılacaktır. İnhibitörler en derişikten en seyreltiğe doğru farklı derişimlerde hazırlanmış ve toksisite deneyi yapılmıştır. Böylelikle en uygun miktarların dynasore inhibitörü için 1,000 µl PBS içerisinde 28,8 µl, genistein için 1,000 µl PBS içerisinde 72 µl, chlorpromazine inhibitörü için 400 µl PBS içinde 28,8 µl, EİPA inhibitörü için 1,500 µl PBS içinde 2,5 µl ve cyclodextrin inhibitörü için de 400 µl PBS içerisinde 5 mg çözülmesi olarak belirlenmiştir.

4.3.2.1. Dynasore İnhibitörünün Toksikite Çalışması

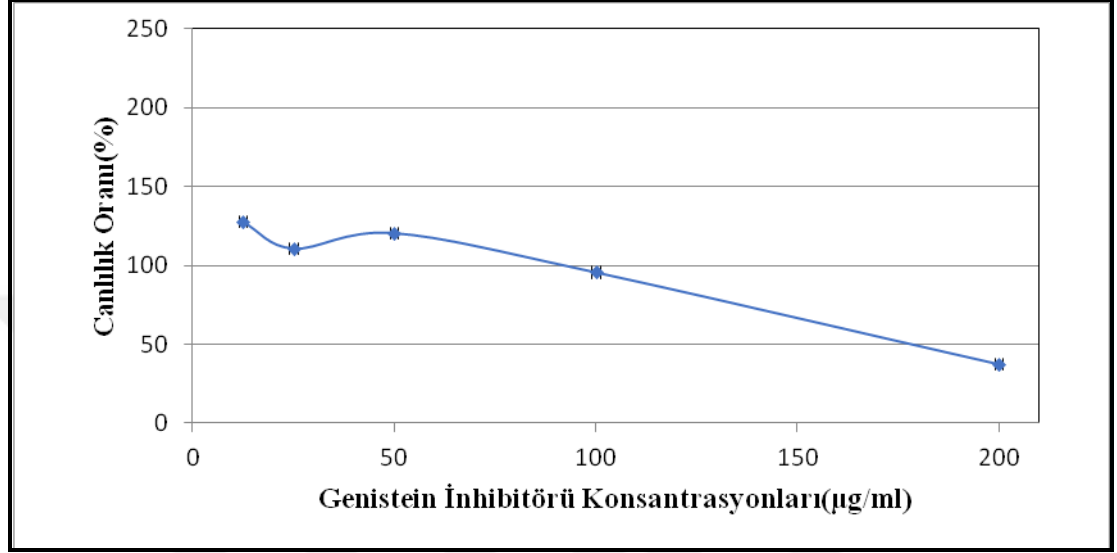
Toksikite çalışmaları için hem 2 ve 4 kat derişik hem de 2 ve 4 kat seyreltik olarak hazırlanmış konsantrasyonlar hücrelere verilmiştir. Normal konsantrasyonda verilmesinin daha verimli sonucu olmuştur. Uygun miktar olarak 1,000 µl PBS içerisinde 28,8 µl dynasore inhibitörü çözülmesi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.19: Dynasore İnhibitörünün Toksikite Grafiği.

4.3.2.2. Genistein İnhibitörünün Toksikite Çalışması

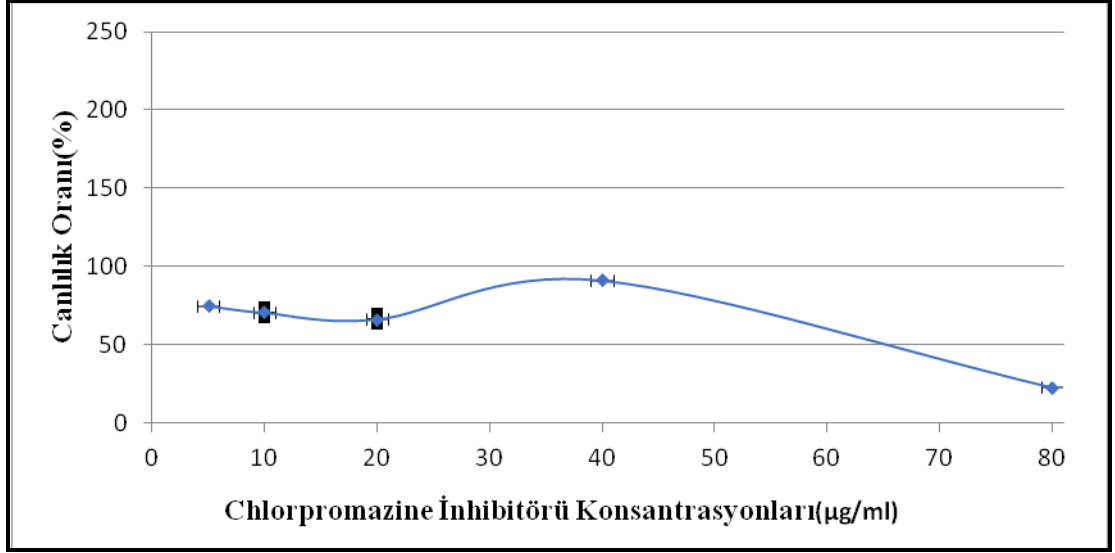
Toksikite çalışmaları için hem 2 ve 4 kat derişik hem de 2 ve 4 kat seyreltik olarak hazırlanmış konsantrasyonlar hücrelere verilmiştir. Normal konsantrasyonda verilmesinin daha verimli sonucu olmuştur. Uygun miktar olarak 1,000 µl PBS içerisinde 72 µl genistein inhibitörü çözülmesi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.20: Genistein inhibitörünün toksikite grafiği.

4.3.2.3. Chlorpromazine İnhibitörünün Toksikite Çalışması

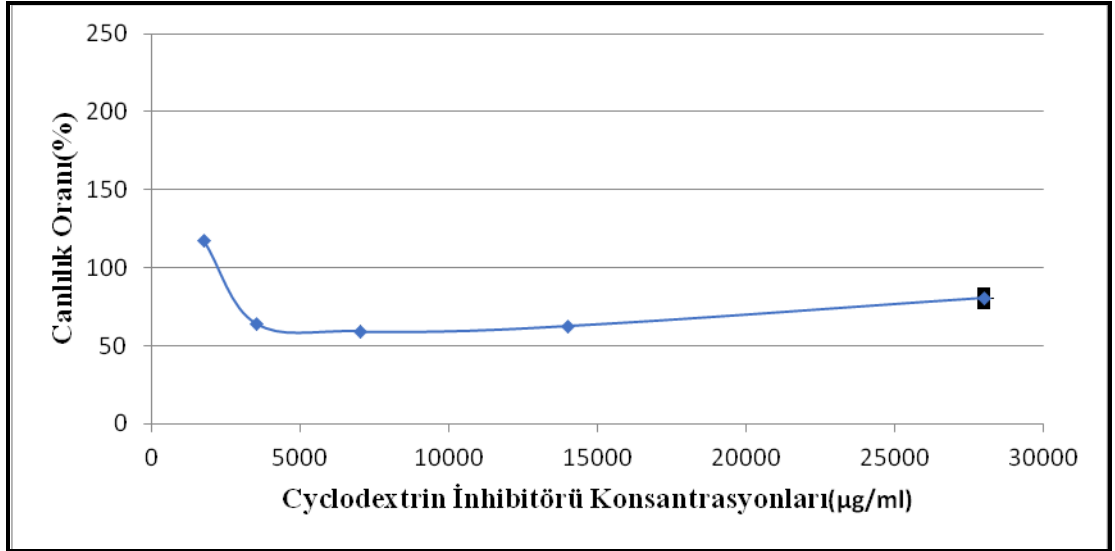
Toksikite çalışmaları için hem 2 ve 4 kat derişik hem de 2 ve 4 kat seyreltik olarak hazırlanmış konsantrasyonlar hücrelere verilmiştir. Normal konsantrasyonda verilmesinin daha verimli sonucu olmuştur. Uygun miktar olarak 400 µl PBS içerisinde 28,8 µl chlorpromazine inhibitörü çözülmesi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.21: Chlorpromazine inhibitörünün toksisite grafiği.

4.3.2.4. Cyclodextrin İnhibitörünün Toksikite Çalışması

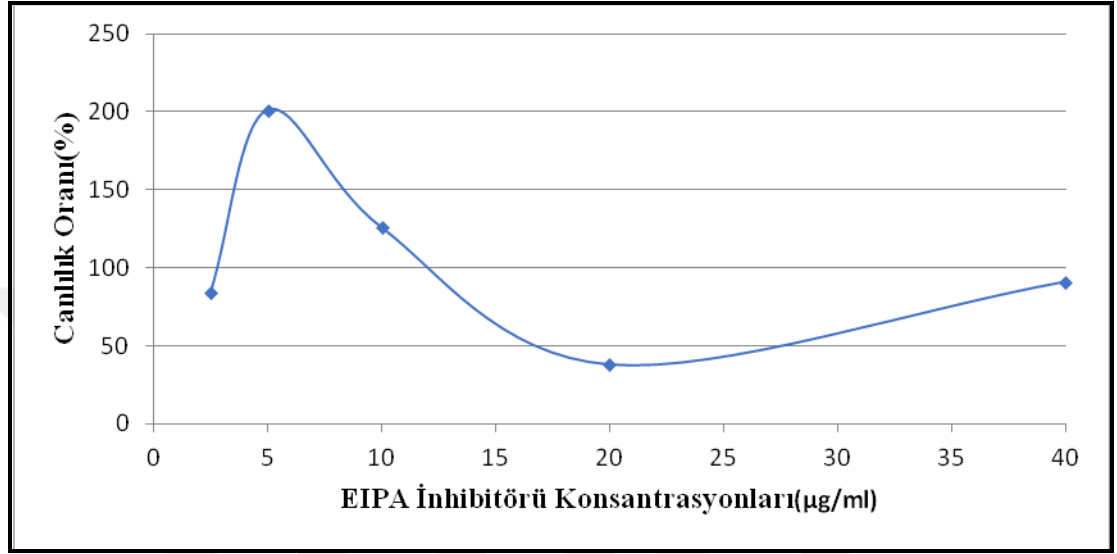
Toksikite çalışmaları için hem 2 ve 4 kat derişik hem de 2 ve 4 kat seyreltik olarak hazırlanmış konsantrasyonlar hücrelere verilmiştir. Normal konsantrasyonda verilmesinin daha verimli sonucu olmuştur. Uygun miktar olarak 400 µl PBS içerisinde 5 mg cyclodextrin inhibitörü çözülmesi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.22: Cyclodextrin inhibitörünün toksisite grafiği.

4.3.2.5. EİPA İnhibitörünün Toksikite Çalışması

Toksikite çalışmaları için hem 2 ve 4 kat derişik hem de 2 ve 4 kat seyreltik olarak hazırlanmış konsantrasyonlar hücrelere verilmiştir. Normal konsantrasyonda verilmesinin daha verimli sonucu olmuştur. Uygun miktar olarak 1,500 µl PBS içerisinde 2,5 µl EİPA inhibitörü çözülmesi olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.23: EİPA inhibitörünün toksisite grafiği.

Tüm inhibitörlerin non-toksik dozlarının sonuçları tabloda verilmiştir.

Tablo 4.3: Tüm inhibitörlerin non-toksik dozlarının sonuçları.

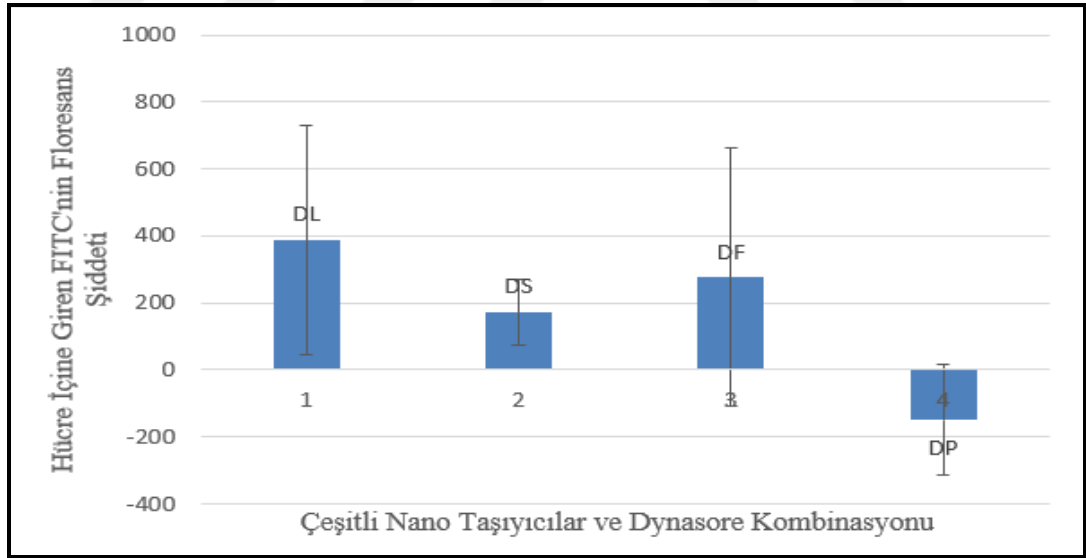
İnhibitör İsimleri	Değerler
Dynasore	20 µg/ml
Genistein	50 µg/ml
Metil-β-cyclodextrin	1750 µg/ml
Chlorpromazine	10 µg/ml
EİPA	10 µg/ml

4.4. İnhibitörlerin Her Bir Nano Taşıyıcının Hücre içine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizleri

Dynasore, genistein, cyclodextrin, chlorpromazine ve EİPA inhibitörleri, nano taşıyıcılarla birlikte MCF-7 meme kanserli ortama verildikten sonra 24 saat beklenmesi sonucu ELİSA cihazı ile analizleri yapılmıştır.

4.4.1. Dynasore İnhibitorünün Her bir Nano Taşıyıcının Hücre İçine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizi

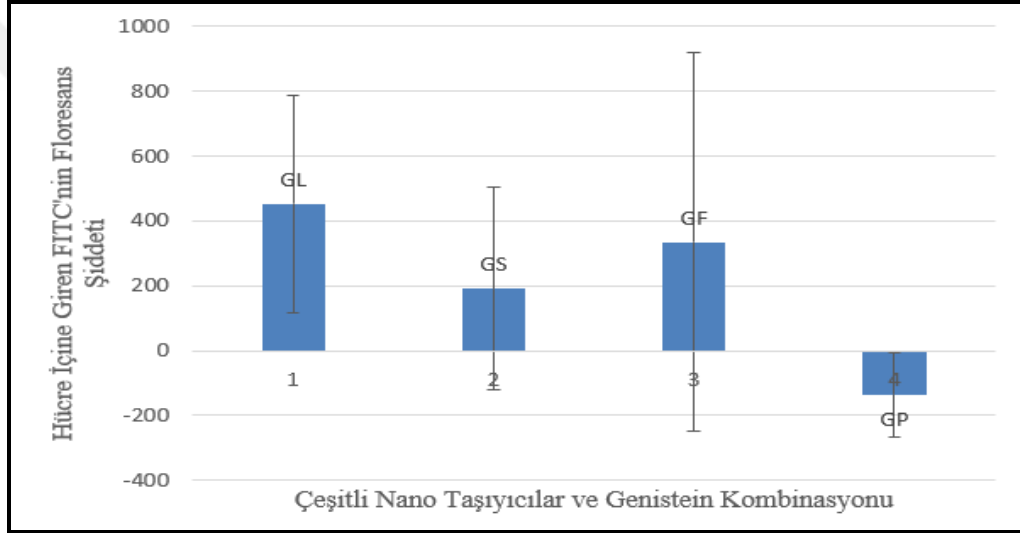
Boş PLGA, levan kaplı PLGA, selüloz kaplı PLGA ve FITC işaretli PLGA nano taşıyıcılarının dynasore inhibitörü ile aynı ortama verildikten 24 saat sonrasında FITC işaretli PLGA'nın hücre içine girişi floresan miktarının Elisa ile ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Böylelikle dynasore inhibitörünün nano taşıyıcıların hücre içerisine girişlerine olan etkisi elde edilmiştir. Verilen grafikte d harfi dynasore inhibitörünü, l harfi levan kaplı PLGA nano taşıyıcısını, s harfi selüloz kaplı PLGA nano taşıyıcısını, f harfi FITC işaretli PLGA nano taşıyıcısını ve p harfi de PLGA nano taşıyıcısını ifade etmektedir.



Şekil 4.24: Dynasore inhibitörünün 24 saat bekleme sonucu ELİSA sonucu.

4.4.2. Genistein İnhibitörünün Her bir Nano Taşıyıcının Hücre İçine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizi

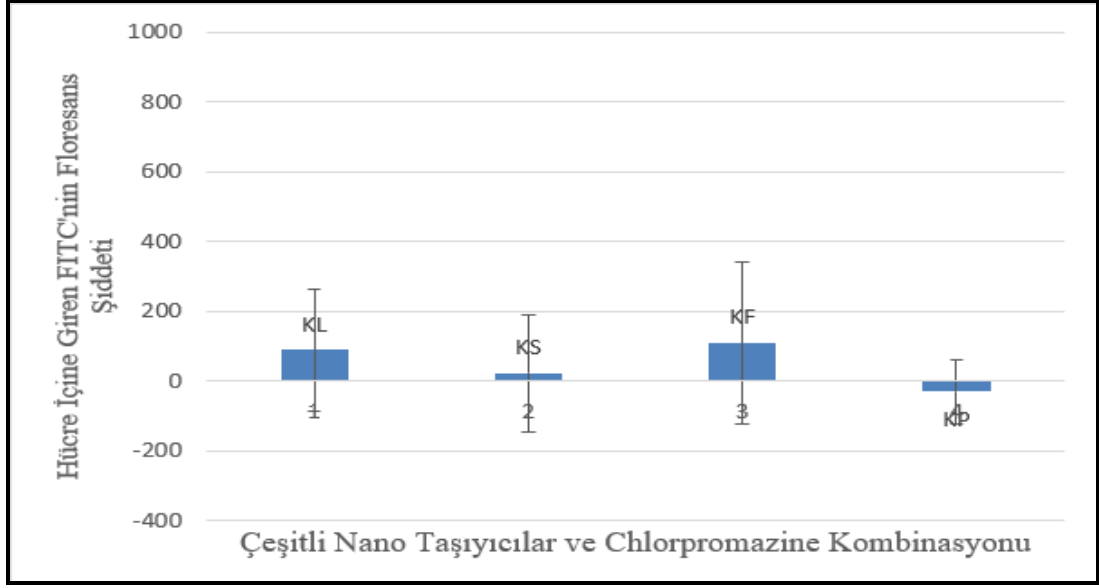
Boş PLGA, levan kaplı PLGA, selüloz kaplı PLGA ve FITC işaretli PLGA nano taşıyıcılarının genistein inhibitörü ile aynı ortama verildikten 24 saat sonrasında FITC işaretli PLGA'nın hücre içine girişi floresan miktarının Elisa ile ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Böylelikle genistein inhibitörünün, nano taşıyıcıların hücre içerisine girişlerine olan etkisi elde edilmiştir. Verilen grafikte g harfi genistein inhibitörünü, l harfi levan kaplı PLGA nano taşıyıcısını, s harfi selüloz kaplı PLGA nano taşıyıcısını, f harfi FITC işaretli PLGA nano taşıyıcısını ve p harfi de PLGA nano taşıyıcısını ifade etmektedir.



Şekil 4.25: Genistein inhibitörünün 24 saat bekleme sonucu ELİSA sonucu.

4.4.3. Chlorpromazine İnhibitörünün Her bir Nano Taşıyıcının Hücre İçine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizi

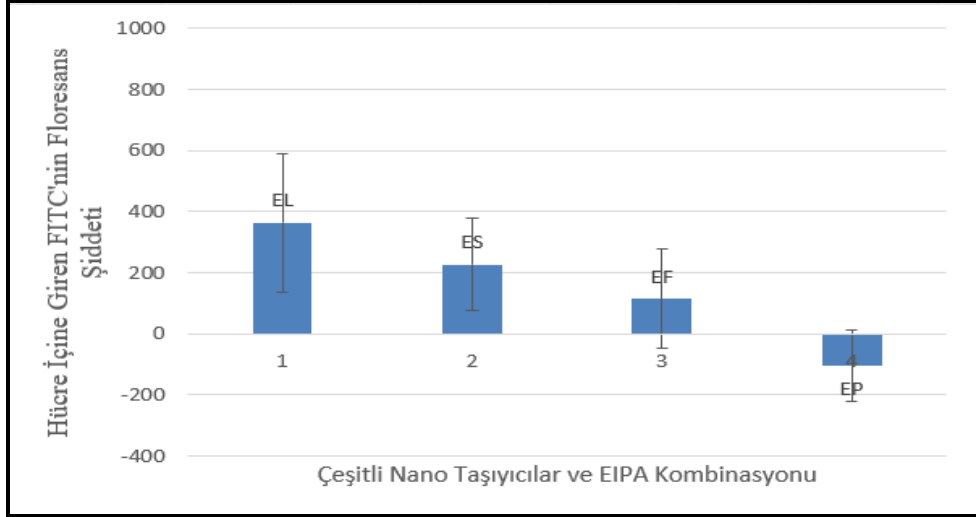
Boş PLGA, levan kaplı PLGA, selüloz kaplı PLGA ve FITC işaretli PLGA nano taşıyıcılarının chlorpromazine inhibitörü ile aynı ortama verildikten 24 saat sonrasında FITC işaretli PLGA'nın hücre içine girişi floresan miktarının Elisa ile ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Böylelikle chlorpromazine inhibitörünün, nano taşıyıcıların hücre içerisine girişlerine olan etkisi elde edilmiştir. Verilen grafikte k harfi chlorpromazine inhibitörünü, l harfi levan kaplı PLGA nano taşıyıcısını, s harfi selüloz kaplı PLGA nano taşıyıcısını, f harfi FITC işaretli PLGA nano taşıyıcısını ve p harfi de PLGA nano taşıyıcısını ifade etmektedir.



Şekil 4.26: Chlorpromazine inhibitörünün 24 saat bekleme sonucu ELİSA sonucu.

4.4.4. EİPA İnhibitörünün Her bir Nano Taşıyıcının Hücre İçine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizi

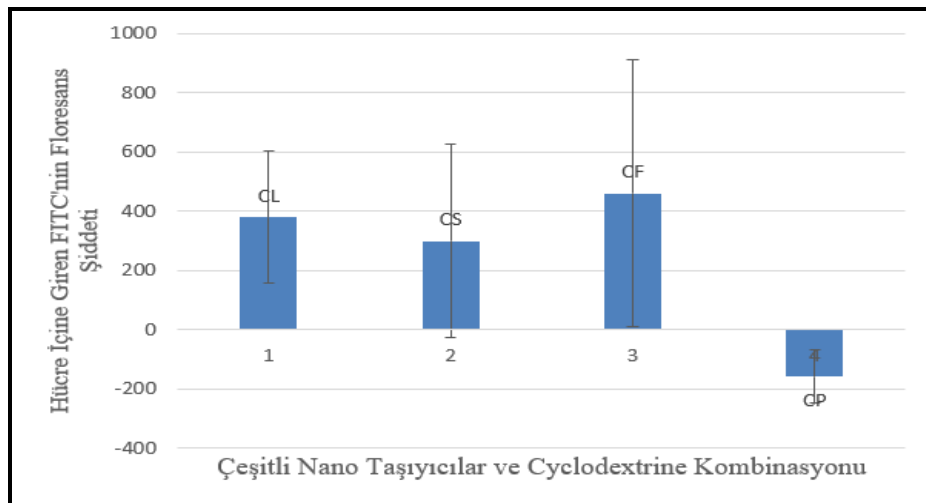
Boş PLGA, levan kaplı PLGA, selüloz kaplı PLGA ve FITC işaretli PLGA nano taşıyıcılarının EİPA inhibitörü ile aynı ortama verildikten 24 saat sonrasında FITC işaretli PLGA'nın hücre içine girişi floresan miktarının Elisa ile ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Böylelikle EİPA inhibitörünün, nano taşıyıcıların hücre içerisine girişlerine olan etkisi elde edilmiştir. Verilen grafikte e harfi EİPA inhibitörünü, l harfi levan kaplı PLGA nano taşıyıcısını, s harfi selüloz kaplı PLGA nano taşıyıcısını, f harfi FITC işaretli PLGA nano taşıyıcısını ve p harfi de PLGA nano taşıyıcısını ifade etmektedir.



Şekil 4.27: EİPA inhibitörünün 24 saat bekleme sonucu ELİSA sonucu.

4.4.5. Cyclodextrin İnhibitörünün Her bir Nano Taşıyıcının Hücre İçine Girişi Üzerindeki Etkisinin Elisa Analizi

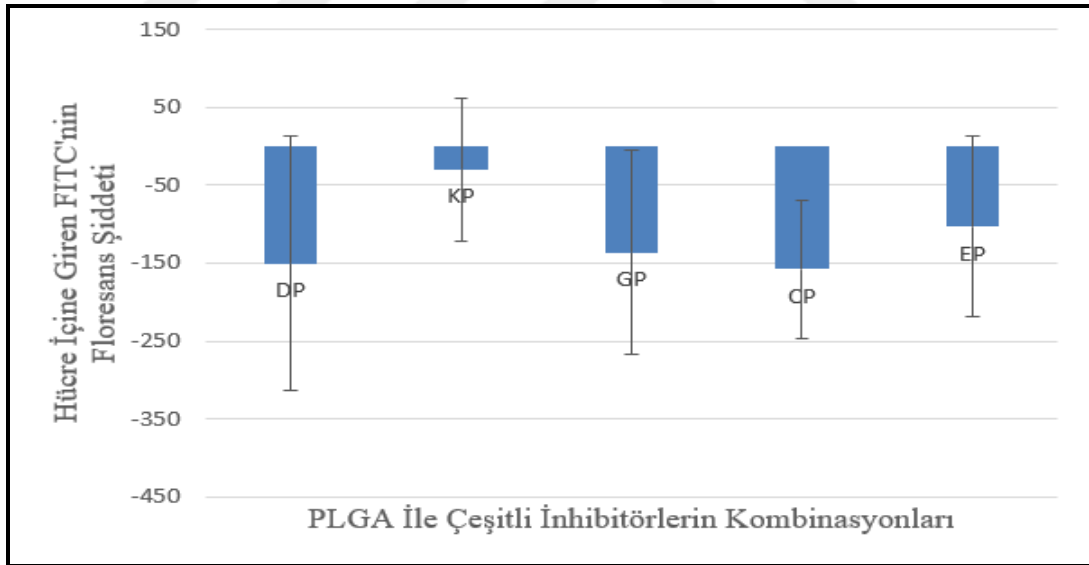
Boş PLGA, levan kaplı PLGA, selüloz kaplı PLGA ve FITC işaretli PLGA nano taşıyıcılarının cyclodextrin inhibitörü ile aynı ortama verildikten 24 saat sonrasında FITC işaretli PLGA'nın hücre içine girişi floresan miktarının Elisa ile ölçülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Böylelikle cyclodextrin inhibitörünün, nano taşıyıcıların hücre içerisine girişlerine olan etkisi elde edilmiştir. Verilen grafikte c harfi cyclodextrin inhibitörünü, l harfi levan kaplı PLGA nano taşıyıcısını, s harfi selüloz kaplı PLGA nano taşıyıcısını, f harfi FITC işaretli PLGA nano taşıyıcısını ve p harfi de PLGA nano taşıyıcısını ifade etmektedir.



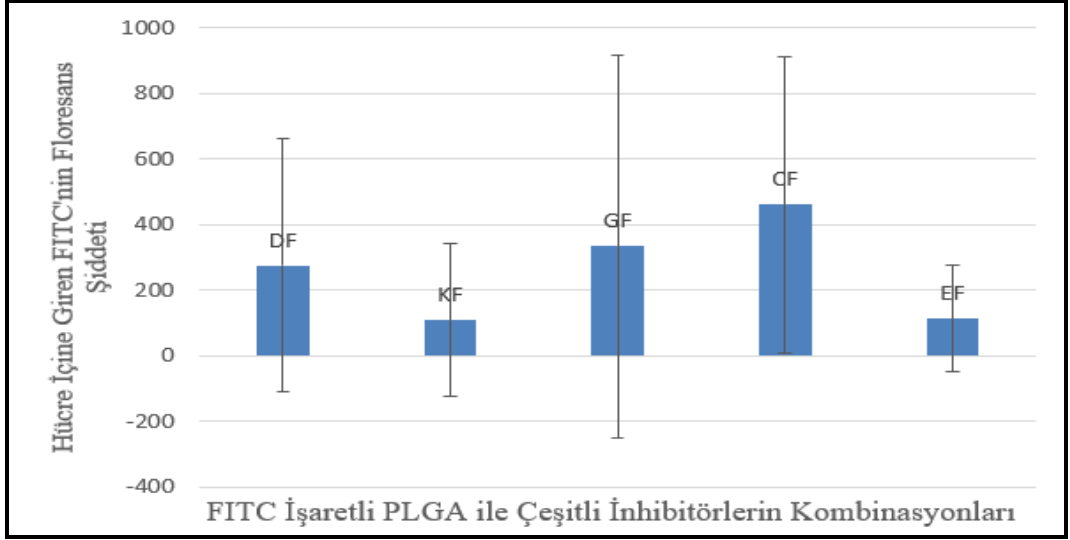
Şekil 4.28: Cyclodextrin inhibitörünün 24 saat bekleme sonucu ELİSA sonucu.

4.5. Farklı İnhibitörlerin Aynı Nano Taşıyıcılara Etkisi

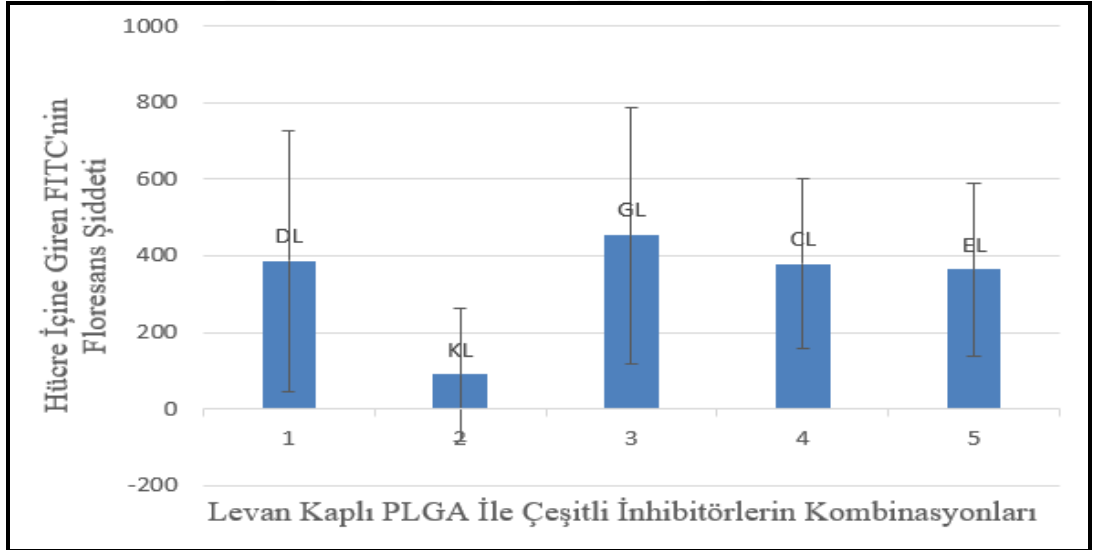
İnhibitörlerin kullanım amacı, farklı hücre içine giriş yollarının engellenerek nano taşıyıcı sistemlerin hücre içerisine alınmasının incelenmesidir. Hücre hattı olarak kullanılan MCF-7 kanser hücrelerine nano taşıyıcılar ve inhibitörler Deneylerde kullanılan farklı inhibitörlerin aynı nano taşıyıcı üzerindeki etkilerinden yola çıkılarak, tüm inhibitörlerin çok iyi etki göstererek PLGA'nın hücre içerisine girişinin yüksek oranda inhibe edildiği ve dolaylı olarak PLGA'nın normal şartlarda hücre içerisine iyi bir şekilde alınabildiği anlaşılmaktadır. FITC işaretli PLGA nano taşıyıcısı açısından PLGA'ya göre daha fazla girişi gözlenmiştir. İnhibitörlerin kendi içlerinde kıyaslama yapıldığında FITC işaretli PLGA nano taşıyıcısı üzerinde en çok etkiyi gösteren Chlorpromazine inhibitörü göstermiştir. Selüloz ve levan açısından bakıldığında grafiksel sonuçlar birbirlerine yakın çıkmıştır. Selüloz kaplı PLGA nano taşıyıcısı üzerinde en iyi inhibisyon etkisini chlorpromazine inhibitörü göstermiştir. Diğer inhibitörler açısından bakıldığında grafiklerin geneline bakıldığında sonuçlar birbirlerine yakın çıkmışlardır.



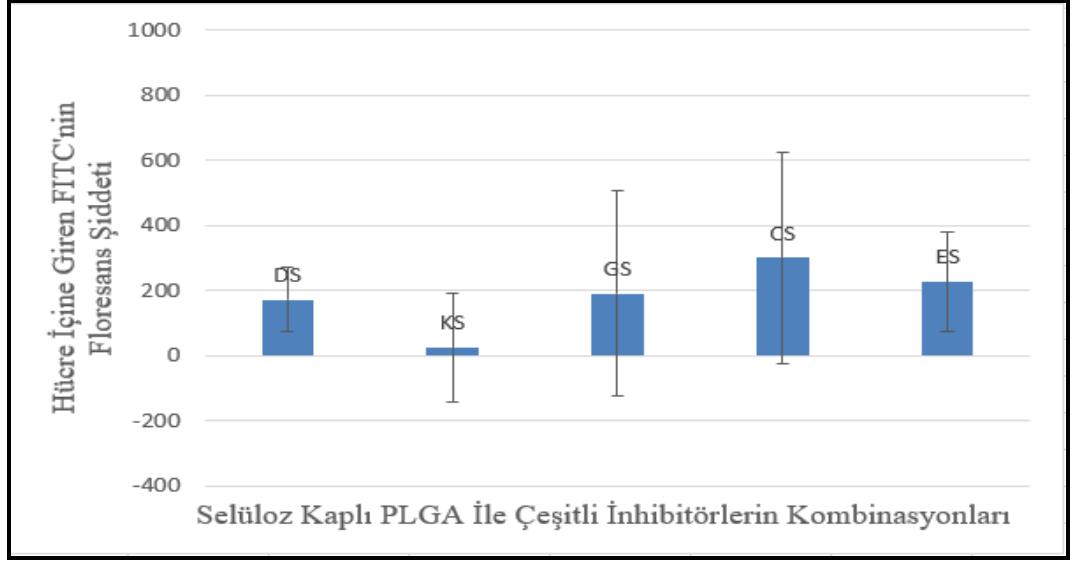
Şekil 4.29: Dynasore(D), genistein(G), cyclodextrin(C), chlorpromazine(K) ve EİPA(E) inhibitörlerinin PLGA(P) nano taşıyıcısı üzerindeki etkisi.



Şekil 4.30: Dynasore(D), genistein(G), cyclodextrin(C), chlorpromazine(K) ve EİPA(E) inhibitörlerinin FITC işaretli PLGA(F) nano taşıyıcısı üzerindeki etkisi.



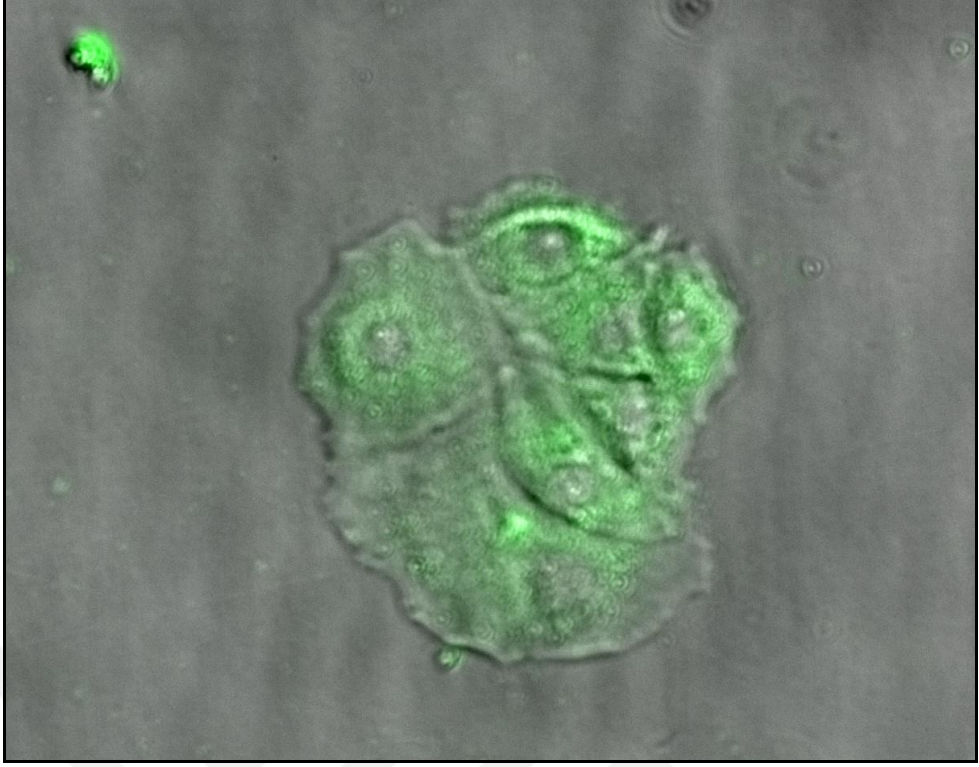
Şekil 4.31: Dynasore(D), genistein(G), cyclodextrin(C), chlorpromazine(K) ve EİPA(E) inhibitörlerinin levanlı PLGA(L) nano taşıyıcısı üzerindeki etkisi.



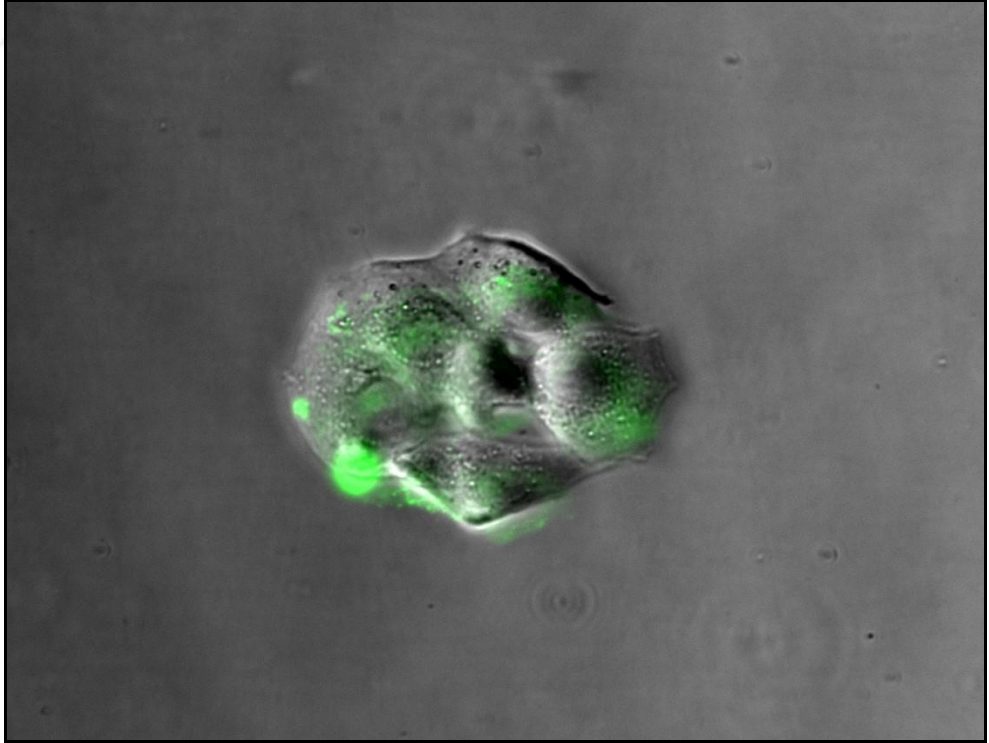
Şekil 4.32: Dynasore(D), genistein(G), cyclodextrin(C), chlorpromazine(K) ve EİPA(E) inhibitörlerinin selülozlu PLGA(S) nano taşıyıcısı üzerindeki etkisi.

4.6. Nano Taşıyıcı ve İnhibitörlerin Floresan Mikroskop Görüntüleri

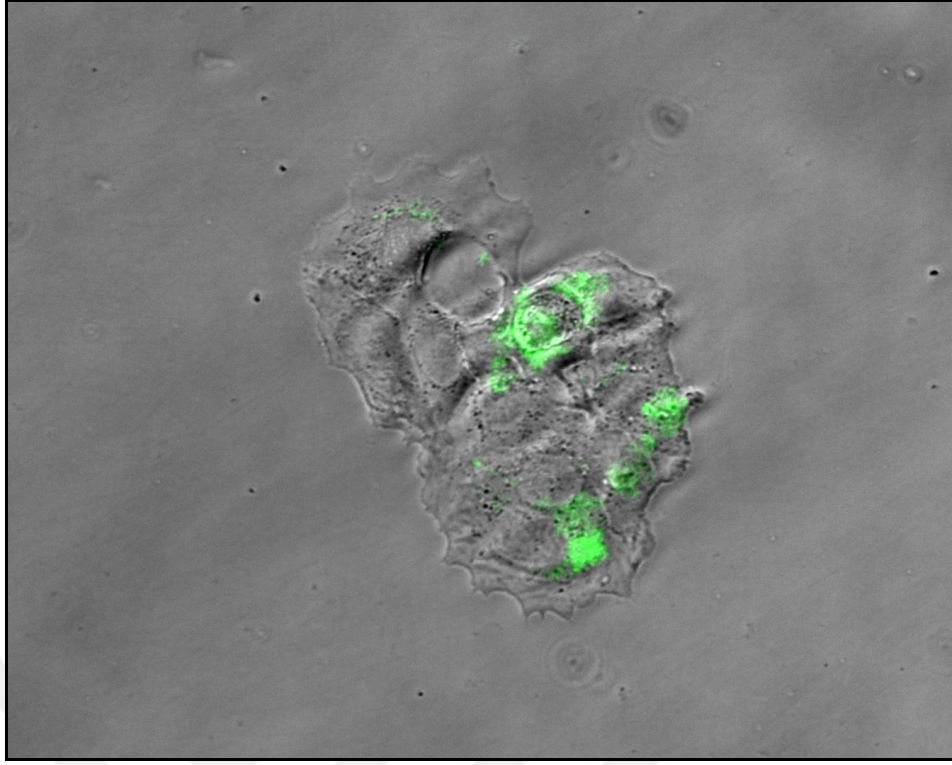
Görüntülemeler, ZEISS marka Observer.Z1 floresan mikroskopu kullanılarak yapılmıştır. Ekimler 48'lik plate kullanılarak yapılmıştır. Kuyucuklardan besi yerleri çekilip atıldıktan sonra PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi bittikten sonra hücrelerin kuruması amacıyla 100 µl PBS eklenmiş ve sonra görüntü alınmıştır. Görüntü alımlarında ortamda besi yeri olmaması, daha uygun ve doğru görüntüler alınmasını sağlar. Çünkü besi yerinin içerisinde de protein gibi floresan etkiye sahip bileşenler olabilmekte ve bunlarda yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Şekillerde gösterilen görüntülerde besi yeri ortamdaki uzaklaştırılmıştır.



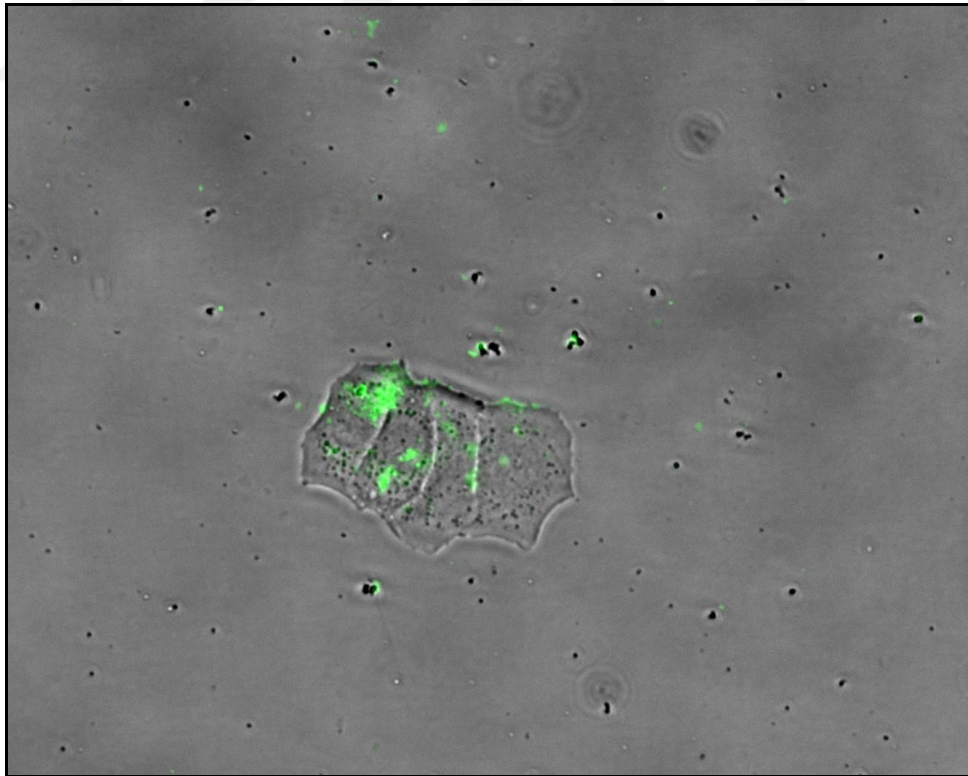
Şekil 4.33: Dynasore eklenmiş levam kaplı PLGA nano taşıyıcı görüntüsü.



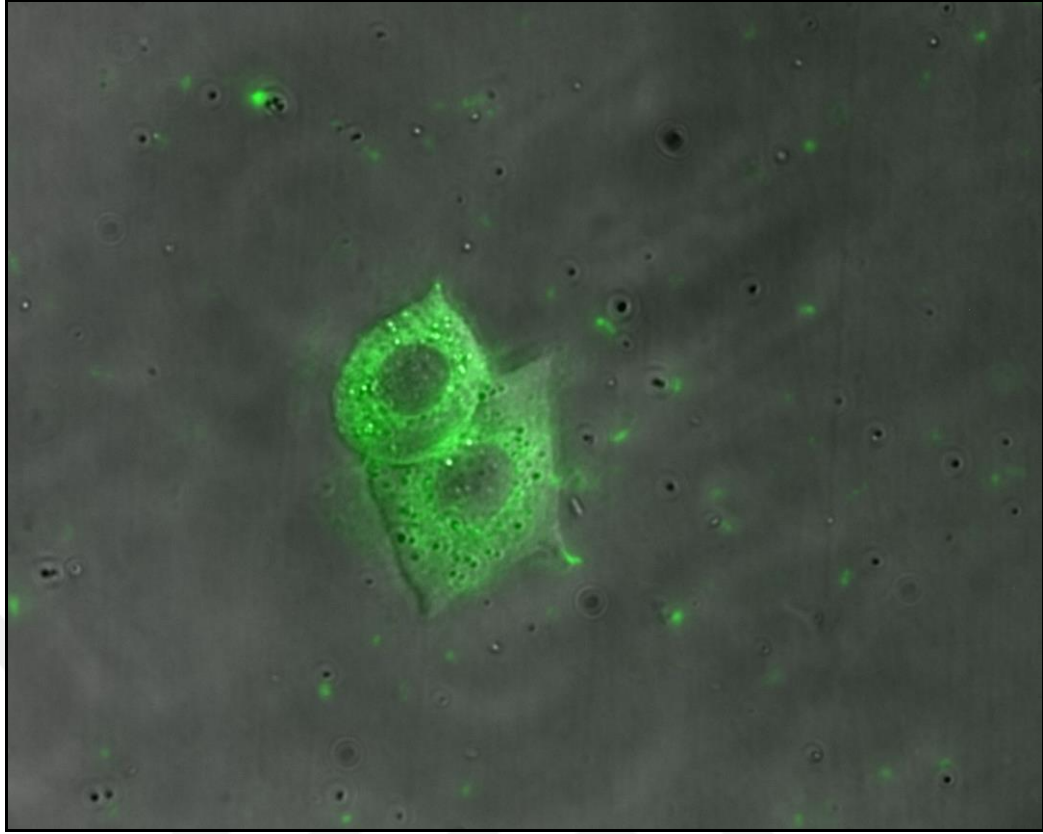
Şekil 4.34: Genistein inhibitörü eklenmiş levam kaplı PLGA nano taşıyıcı görüntüsü.



Şekil 4.35: Chlorpromazine inhibitörü eklenmiş levam kaplı PLGA nano taşıyıcı görüntüsü.



Şekil 4.36: Cyclodextrin eklenmiş levam kaplı PLGA nano taşıyıcı görüntüsü.



Şekil 4.37: Sadece levan kaplı PLGA nano taşıyıcı görüntüsü.

4.7. Tartışma

Tablo 4.4: İnhibitörler ve Etki Ettiği Yolakların Özeti

İNHİBİTÖR İSMİ	ETKİ ETTİĞİ YOLAK
DYNASORE	Klatrin aracılıklı endositoz
GENİSTEİN	Kaveola aracılıklı endositoz
CYCLODEXTRİN	Klatrin aracılıklı endositoz
CHLORPROMAZİNE	Klatrin aracılıklı endositoz
EİPA	Pinositoz

Tablo 4.4’te, çalışmamızda kullanılan çeşitli inhibitörlerin inhibe ettikleri hücre içine giriş yolları verilmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında dynasore, genistein, cyclodextrin ve chlorpromazine inhibitörlerinin en çok selüloz kaplı PLGA nano taşıyıcısının hücre içine girişini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Tablo 4.4’te görüldüğü

gibi bu dört inhibitörün klatrin ve kaveola aracılıklı endositozu inhibe ettiği bilinmektedir. Buradan yola çıkarak selüloz kaplı PLGA nano taşıyıcısının kaveola ve klatrin aracılıklı endositozla hücre içine giriş yaptığı anlaşılabilir. Şekil 4.27’de görüldüğü gibi, EİPA inhibitörü en çok levan kaplı PLGA nano taşıyıcısının hücre içine girişini inhibe etmiştir. Tablo 4.27’de görüldüğü gibi EİPA inhibitörü makro pinositoz yolağını inhibe eder. Buradan levan kaplı PLGA nano taşıyıcısının makro pinositozla hücre içerisine alındığı anlaşılabilir. Diğer taraftan, kaplanmamış ve sadece FITC işaretli PLGA’nın hücre içine girişi şekil 4.30’da gösterildiği gibi en çok chlorpromazine ve EİPA inhibitörleri tarafından inhibe edilmiştir. PLGA nano taşıyıcısının klatrin aracılıklı endositoz ve pinositoz aracılığıyla hücre içerisine girdiği anlaşılmaktadır.

Tablo 4.5: Çalışmamız Sonucunda Elde Edilen Nano Taşıyıcılar ve İnhibitör İlişkisi

Nano Taşıyıcı İsmi	Etkili Olan İnhibitör İsmi	İnhibe Edilen Yolak
Levan Kaplı PLGA	EİPA	Pinositoz
Selüloz Kaplı PLGA	Dynasore, chlorpromazine, cyclodextrin, genistein	Klatrin ve Kaveola aracılıklı endositoz
FITC İşaretli PLGA	Chlorpromazine, EİPA	Klatrin aracılıklı endositoz, Pinositoz

Daha önce yapılan çalışmalarda da bizim elde ettiğimiz sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiş ve benzer teknikler uygulanmıştır. Bannunah ve arkadaşları [91], “Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of size and Surface Charge” adlı çalışmalarında, mevcut tez çalışmasında kullanılan aynı inhibitörleri Caco-2 hücre hattı üzerinde kullanmışlardır ancak bu çalışmada çeşitli metal nano-partiküller kullanılmıştır ve çalışmamızın aksine polimerik nano-taşıyıcı kullanılmamıştır. Makalede +4 °C derecede tüm yolakların endositoz kapasitesinin düştüğü belirtilmiştir. Klatrin inhibitörü olan Chlorpromazine’nin varlığında hücre içerisine giriş anlamında %46’lık bir oran göstermiştir. Na/K iyonları üzerinde etki göstererek pinositozu inhibe eden EİPA inhibitörü de %42’lik giriş göstermiştir. Metil β siklodekstrin inhibitörünün varlığında %38’lik bir oran gözlemlenmiştir. Dynasore inhibitörü

açısından bakıldığında pozitif yüklü nano taşıyıcıların girişini %40 negatif olanların da %70 azalttığı gözlemlenmiştir. Genistein inhibitörü incelendiğinde, bu inhibitörün negatif yüklü nano taşıyıcılarda etkili olduğu ve %50 inhibisyon oranının olduğu gösterilmiştir. Ayrıca makalede negatif ve pozitif yüklü nano taşıyıcıların hücre içerisine giriş etkisi de kıyaslanmıştır. Bu makale ile mevcut çalışmamızda farklı hücre hattı kullanılmış olsa da benzer sonuçlar alınmıştır. Pozitif yüklü nano taşıyıcıların hücre içine alımı negatif yüklü nano taşıyıcılara göre daha fazla olsa da toksisite de negatif yüklü nano taşıyıcılara göre daha fazladır. Ayrıca pozitif yüklü olan nano taşıyıcıların hücre içerisine girişinde doz, önemli etkiye sahiptir. Nano partikül toksisite çalışmaları MTS assay kit kullanılarak yapılmıştır. Gratton ve arkadaşlarının “The effect of particle design on cellular internalization pathways” adlı çalışmalarında [92] HeLa hücreleri ve mevcut çalışmamıza benzer olarak genistein, dynasore, chlorpromazine, Metil β siklodekstrin inhibitörlerini kullanmışlardır. Genistein ve dynasore inhibitörleri benzer inhibisyon izleri göstermiştir. Bu makalede nano taşıyıcıların yüklerinden ziyade şekilleri ön plana çıkarılarak çalışmalar yapılmıştır. Dynasore ve chlorpromazine inhibitörleri açısından bakıldığında, 150 nm silindirik yapıların giriş miktarları %70, 200 nm olanlar içinde %60 oranında inhibisyon seviyesi göstermişlerdir. Genistein ve Metil β siklodekstrin inhibitörleri, kaveola aracılıklı endositoz inhibisyon oranlarına bakıldığında 150nm ve 200 nm içinde %60’lık inhibisyon gözlemlenmiştir. Tiago dos Santos ve arkadaşlarının “Effects of Transport Inhibitors on the Cellular Uptake of Carboxylated Polystyrene Nanoparticles in Different Cell Lines” adlı çalışmalarında da bizim makalemizde kullanılmış olan inhibitörlerden genistein ve chlorpromazine inhibitörlerini kullanmışlardır. Hücre hattı olarak, A549 insan akciğer adenokarsinom hücre hattı, HeLa ve 1321N1 insan beyin tümörü hattı kullanmışlardır. Nano parçacık olarak PLGA yerine, karboksil grubu eklenmiş polistiren kullanmışlardır. Bu makalede elde edilen sonuçlara göre; Chlorpromazine, 40 nm olan nano parçacığın içeri alınmasında inhibisyon seviyesi 1321N1 hücre hattı için 47 ± 1 , 200 nm olan için de 69 ’dur. A549 hücre hattı açısından bakıldığında, 40 nm için 23 ± 8 , 200 nm için 43 ± 5 , HeLa için de 40 nm için 23 ± 1 , 200 nm için de 26 ± 1 inhibisyon oranı göstermiştir. Genistein inhibitörü için, 40 nm olan nano parçacığın içeri alınmasında inhibisyon seviyesi 1321N1 hücre hattı için 19 ± 3 , 200 nm olan için de 33 ± 2 dur. A549 hücre hattı açısından bakıldığında, 40

nm için $\%24\pm3$, 200 nm için $\%50\pm10$, HeLa için de 40 nm için $\%7\pm1$, 200 nm için de $\%30\pm7$ inhibisyon oranı göstermiştir. NP alımını flow sitometre ile yapılmıştır.

Mevcut çalışmamızda gösterildiği gibi (Tablo 4.4 ve 4.5) PLGA nano miselleri kaplanmadan önce hücre içine kltrin aracılıklı endositoz ve pinositoz yollarından giriş yapmaktadır. Bu nano taşıyıcılar Levan ile kaplandığında hücre içine sadece pinositozu kullanarak girmekte olup, sellüloz kaplanması ile bu yolak tamamen devre dışı bırakılıp kaveola ve kltrin aracılıklı endositoz devreye girmektedir. Yukarıda bahsedildiği gibi kltrin aracılıklı endositoz hücre içine girişi hedefli hale getiren özel bir yoldur. Kltrin aracılıklı endositoz hücreye ve hedefe özel bir yolak iken, pinositoz hücrenin kltrin ve kaveol olmadığı zaman kullandığı bir yoldur. Bu noktadan hareketle, levan kaplı PLGA nano misellerinin spesifik olmayan hücre içine giriş yolağını kullandığını, sellüloz kaplı PLGA nano misellerinin ise hücre içine girişi oldukça düzenli ve hedefli hale getirdiğini söyleyebiliriz. Bu olay, sellülozun yapı-taşları olan glukozun hücre tarafından tanındığını, levan'ın yapı-taşı olan früktozun ise hücre tarafından tanınmadığını gösterebilir. Diğer taraftan levanın suda çözünür bir biyo-polimer olduğunu göz önünde bulundurursak, nano-partikülün etrafını kaplayan levanın su tuttuğunu ve hücrenin su damlalarını içeri alma yöntemi olan pinositozu kullanmasına sebep olduğu sonucuna varabiliriz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı kaplama hidrokarbonları ile hazırlanan PLGA nano taşıyıcılarının hücre içine giriş yolları, her bir yolağın özel inhibitörü kullanılarak incelenmiştir. Öncelikle hazırlanan sellüloz ve levan kaplı PLGA nano taşıyıcılarının toksisitesi, akabinde inhibitör toksisiteleri ölçülmüştür. Bu ölçümlerden sonra her bir nano taşıyıcının hücre içine giriş için ihtiyacı olan süre tespit edilmiştir. Bu başlangıç deneyleri sonucunda toksik olmayan nano-taşıyıcı dozu ile toksik olmayan inhibitör dozu kullanarak, optimize sürede her bir nano taşıyıcının hücre içine giriş yolağı incelenmiştir. Bunun için FITC ile işaretli PLGA polimeri kullanılmış ve hücre içine giriş yapan FITC miktarı soğurma şiddetinin ölçülmesi ile ölçülmüştür.

Hücre yüzeyinde, aynı anda işleyen birçok endositoz yolu vardır. Yeni moleküler genetik ve görüntüleme araçlarının ortaya çıkmasıyla birlikte, bir hücrenin farklı yollardan endositoz yapabileceği anlaşılmıştır. Bu tez çalışmasında, klattrin ve kaveol aracılıklı endositoz ile pinositoz yolları incelenmiştir. Burada öncelikle, klattrin ve kaveol gibi hücre yüzeyinde belirli proteinlere ihtiyaç duyan endositoz yolları incelenmiş, daha sonra özel proteinlerin yokluğunda işlediği bilinen pinositoz yolağı ele alınmıştır. Bu yolların plazma membran alanının ve geriliminin düzenlenmesinde önemli roller oynaması ve ayrıca hücre göçü sırasında membranının kullanılabilirliğini kontrol etmesi önemlidir. Klattrin aracılıklı endositoz hücreye materyal alımının baskın bir paradigmasıdır. Bunun yanında klattrin ve ona bağlı moleküler mekanizmayı kullanmayan birkaç endositik yolak, klattrin bağımsız endositik yollar olarak tanınmaya başlamıştır. Bu yollardan bazıları temel yolak niteliğindedir, diğerleri ise belirli sinyallerle tetiklenir ve hatta patojenler tarafından ele geçirilir. Bazı nano taşıyıcıların hücre içine girişi patojenleri taklit eder. Ayrıca bu yollar, endositik vezikül oluşumu mekanizmaları ve kinetikleri, ilgili moleküler mekanizmalar ve kargonun varış yerleri açısından farklılık gösterirler.

Bu tez çalışmasında kaplanmamış PLGA nano-taşıyıcısının spesifik olmayan yollardan hücre içine girişi tespit edilmiş iken, sellüloz ile kaplanmanın endositoz yolağını klattrine bağımlı ve özel hale getirdiği anlaşılmıştır.

Kanser tümörünü hedefleyen tedavilerde nano-taşıyıcının içindeki ilaç molekülünün hücre içine spesifik yoldan giriş yaptığından emin olmak ve DNA üzerinde etkisini maksimuma ulaştırmak büyük önem arz etmektedir. Bunu sağlayan klatrin aracılıklı endositoz en ideal yolak olup, çalışmamızda sellüloz kaplı PLGA nano-miselleri tarafından sağlanmıştır.

İleri çalışmalarda kemoterapötik ajan taşıyan aynı nano-taşıyıcılarla çalışarak, sellüloz kaplı PLGA nano-taşıyıcısının gerçekten daha etkili olup olmadığı araştırılabilir. Bunun yanında bu *in vitro* çalışmada kullanılan tüm nano taşıyıcılar aynı floresans işaret ile *in vivo* olarak kullanılıp, canlı vücudunda kanser tümöründe birikim oranları incelenebilir.



KAYNAKLAR

- [1] **Yadava, P. ve Singhb, R.** (2012). A SHORT REVIEW ON NANOTECHNOLOGY-The New Trend In The Medical Field. *Journal of Advanced Scientific Research*, 3(1).
- [2] **Marcato, P. D. ve Durán, N.** (2008). New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 8(5), 2216-2229.
- [3] **ScoEaNihr, E. S.** (2010). Scientific Basis for the Definition of the Term “nanomaterial”. European Commission, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENHR).
- [4] **Jain, K. K.** (2008). Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. *Medical Principles and Practice*, 17(2), 89-101.
- [5] **Ayla, Z.-G.** (2014). Nanofarmasotikler Ve Uygulamaları. İçinde Z.-G. Ayla, (Ed.). *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını No:3 s. 371*).
- [6] **Hanahan, D. ve Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- [7] **Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I. ve Hatton, P. V.** (2014). An overview of poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 15(3), 3640-3659.
- [8] **Keenan, M. ve Chi, J.-T.** (2015). Alternative fuels for cancer cells. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*, 21(2), 49.
- [9] **Hsu, P. P. ve Sabatini, D. M.** (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5), 703-707.
- [10] **Zhao, F., Zhao, Y., Liu, Y., Chang, X., Chen, C. ve Zhao, Y.** (2011). Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials. *small*, 7(10), 1322-1337.
- [11] **Hofferberth, S. C., Grinstaff, M. W. ve Colson, Y. L.** (2016). Nanotechnology applications in thoracic surgery. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 50(1), 6-16.
- [12] **Singh, R. ve Lillard Jr, J. W.** (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and molecular pathology*, 86(3), 215-223.
- [13] **Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R. ve Delie, F.** (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 69(1), 1-9.
- [14] **Saallah, S. ve Lenggoro, I. W.** (2018). Nanoparticles carrying biological molecules: Recent advances and applications. *KONA Powder and Particle Journal*, 35, 89-111.
- [15] **Pillai, O. ve Panchagnula, R.** (2001). Polymers in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*, 5(4), 447-451.
- [16] **Kumari, A., Yadav, S. K. ve Yadav, S. C.** (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 75(1), 1-18.

- [17] **Abbasi, E., Aval, S. F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H. T., Joo, S. W., ve ark.** (2014). Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale research letters*, 9(1), 1556-1276.
- [18] **Roberts, J. C., Bhalgat, M. K. ve Zera, R. T.** (1996). Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst™ dendrimers. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 30(1), 53-65
- [19] **Jevprasesphant, R., Penny, J., Attwood, D. ve D'Emanuele, A.** (2004). Transport of dendrimer nanocarriers through epithelial cells via the transcellular route. *Journal of controlled release*, 97(2), 259-267.
- [20] **Esfand, R. ve Tomalia, D. A.** (2001). Poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug discovery today*, 6(8), 427-436
- [21] **Lee, C. C., MacKay, J. A., Fréchet, J. M. ve Szoka, F. C.** (2005). Designing dendrimers for biological applications. *Nature biotechnology*, 23(12), 1517-1526.
- [22] **Torchilin, V. P.** (2007). Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharmaceutical research*, 24(1), 724-874.
- [23] **Kahraman, E. ve Özsoy, Y.** Polimerik Miseller ve Nazal Yol İle Uygulanmaları. *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 41, 121-139.
- [24] **Lee, K. S. ve Lee, J. H.** (2019). *Hybrid Enhanced Oil Recovery Using Smart Waterflooding*. Gulf Professional Publishing.
- [25] **Gaucher, G., Dufresne, M.-H., Sant, V. P., Kang, N., Maysinger, D. ve Leroux, J.-C.** (2005). Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery. *Journal of controlled release*, 109(1-3), 169-188.
- [26] **Soleimani Zohr Shiri, M., Henderson, W. ve Mucalo, M. R.** (2019). A Review of The Lesser-Studied Microemulsion-Based Synthesis Methodologies Used for Preparing Nanoparticle Systems of The Noble Metals, Os, Re, Ir and Rh. *Materials*, 12(12), 1896.
- [27] **Jones, M.-C. ve Leroux, J.-C.** (1999). Polymeric micelles—a new generation of colloidal drug carriers. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 48(2), 101-111.
- [28] **Kwon, G. S. ve Okano, T.** (1996). Polymeric micelles as new drug carriers. *Advanced drug delivery reviews*, 21(2), 107-116.
- [29] **Mourya, V. K., Inamdar, N., Nawale, R. B. ve Kulthe, S. S.** (2011). Polymeric micelles: general considerations and their applications. *Indian J Pharm Educ Res*, 45(2), 128-138.
- [30] **Makadia, H. K. ve Siegel, S. J.** (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397.
- [31] **Tabatabaei Mirakabad, F. S., Nejati-Koshki, K., Akbarzadeh, A., Yamchi, M. R., Milani, M., Zarghami, N., ve ark.** (2014). PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(2), 517-535
- [32] **Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A. ve Pr at, V.** (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release*, 161(2), 505-522.

- [33] **Harris, J. M.** (2013). Poly (ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications. Springer Science & Business Media.
- [34] **Ivanova, E. P., Bazaka, K. ve Crawford, R. J.** (2014). New functional biomaterials for medicine and healthcare. Woodhead publishing New Delhi, India.
- [35] **Kerlin, R. L. ve Li, X.** (2013). Pathology in Non-Clinical Drug Safety Assessment. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology ss. 725-750): Elsevier.
- [36] **Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D. ve Schubert, U. S.** (2010). Poly (ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. *Angewandte chemie international edition*, 49(36), 6288-6308.
- [37] **Herold, D. A., Keil, K. ve Bruns, D. E.** (1989). Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase. *Biochemical pharmacology*, 38(1), 73-76.
- [38] **Saw, P. E., Park, J., Lee, E., Ahn, S., Lee, J., Kim, H., ve ark.** (2015). Effect of PEG pairing on the efficiency of cancer-targeting liposomes. *Theranostics*, 5(7), 746.
- [39] **Konda, S. G., Shaikh, B. M., Chavan, S. A. ve Dawane, B. S.** (2011). Polyethylene glycol (PEG-400): An efficient and recyclable reaction medium for the synthesis of novel 1; 5-benzodiazepines and their antimicrobial activity. *Chinese Chemical Letters*, 22(1), 65-68.
- [40] **Sahan, Y., Gurbuz, O., Goncagul, G., Kara, A. ve Ozakin, C.** (2017). Antimicrobial effect of PEG-PLA on food-spoilage microorganisms. *Food science and biotechnology*, 26(4), 1123-1128.
- [41] **Junghanns, J.-U. A. H. ve Müller, R. H.** (2008). Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *International journal of nanomedicine*, 3(3), 295.
- [42] **Gao, L., Liu, G., Ma, J., Wang, X., Zhou, L. ve Li, X.** (2012). Drug nanocrystals: in vivo performances. *Journal of controlled release*, 160(3), 418-430.
- [43] **Bethune, D. S., Kiang, C. H., De Vries, M. S., Gorman, G., Savoy, R., Vazquez, J., ve ark.** (1993). Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature*, 363(6430), 605.
- [44] **Bianco, A., Kostarelos, K. ve Prato, M.** (2005). Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*, 9(6), 674-679.
- [45] **Pantarotto, D., Briand, J.-P., Prato, M. ve Bianco, A.** (2004). Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chemical Communications*, (1), 16-17.
- [46] **Liu, Z., Tabakman, S., Welsher, K. ve Dai, H.** (2009). Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano research*, 2(2), 85-120.
- [47] **Fast, J. P. ve Mecozi, S.** (2009). Nanoemulsions for intravenous drug delivery. *Nanotechnology in drug delivery ss.* 461-489.
- [48] **Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J. ve Solans, C.** (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in colloid and interface science*, 108, 303-318.

- [49] **Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B. ve Graves, S. M.** (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: condensed matter*, 18(41), 953-984.
- [50] **Kabanov, A. V. ve Vinogradov, S. V.** (2009). Nanogels as pharmaceutical carriers: finite networks of infinite capabilities. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(30), 5418-5429.
- [51] **Daoud-Mahammed, S., Couvreur, P. ve Gref, R.** (2007). Novel self-assembling nanogels: stability and lyophilisation studies. *International journal of pharmaceutics*, 332(1-2), 185-191.
- [52] **Oh, J. K., Drumright, R., Siegwart, D. J. ve Matyjaszewski, K.** (2008). The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*, 33(4), 448-477.
- [53] **Storm, G. ve Crommelin, D. J. A.** (1998). Liposomes: quo vadis? *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(1), 19-31.
- [54] **Azeem, A., Anwer, M. K. ve Talegaonkar, S.** (2009). Niosomes in sustained and targeted drug delivery: some recent advances. *Journal of drug targeting*, 17(9), 671-689.
- [55] **Uchegbu, I. F. ve Vyas, S. P.** (1998). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *International journal of pharmaceutics*, 172(1-2), 33-70.
- [56] **New, R. R. C.** (1990). *Liposomes*. IRL at Oxford University Press.
- [57] **Ahmed, R. Z., Patil, G. ve Zaheer, Z.** (2013). Nanosponges—a completely new nano-horizon: pharmaceutical applications and recent advances. *Drug development and industrial pharmacy*, 39(9), 1263-1272.
- [58] **Selvamuthukumar, S., Anandam, S., Krishnamoorthy, K. ve Rajappan, M.** (2012). Nanosponges: A novel class of drug delivery system-review. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 103-111.
- [59] **Bhowmik, H., Venkatesh, D. N., Kuila, A. ve Kumar, K. H.** (2018). Nanosponges: A review. *International journal of applied pharmaceutics*, 1-5.
- [60] **Galluzzi, L., Buque, A., Kepp, O., Zitvogel, L. ve Kroemer, G.** (2015). Immunological effects of conventional chemotherapy and targeted anticancer agents. *Cancer cell*, 28(6), 690-714.
- [61] **Jain, K. K.** (2005). *Targeted drug delivery for cancer*. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA; s.
- [62] **Sawyers, C.** (2004). Targeted cancer therapy. *Nature*, 432(7015), 294.
- [63] **Bannunah, A. M., Vllasaliu, D., Lord, J. ve Stolnik, S.** (2014). Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge. *Molecular pharmaceutics*, 11(12), 4363-4373.
- [64] **Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., ve ark.** (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials*, 8(7), 543.
- [65] **Mailander, V. ve Landfester, K.** (2009). Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules*, 10(9), 2379-2400.
- [66] **Pratten, M. K. ve Lloyd, J. B.** (1986). Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 881(3), 307-313.

- [67] **Rosales, C. ve Uribe-Querol, E.** (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *Biomed Res Int*, 2017, 9042851.
- [68] **Nabi, I. R. ve Le, P. U.** (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol*, 161(4), 673-677.
- [69] **Branza-Nichita, N., Macovei, A. ve Lazar, C.** (2012). Caveolae-dependent endocytosis in viral infection. *Molecular Regulation of Endocytosis*, 31.
- [70] **Kiss, A. L. ve Botos, E.** (2009). Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol Med*, 13(7), 1228-1237.
- [71] **Zhu, X. D., Zhuang, Y., Ben, J. J., Qian, L. L., Huang, H. P., Bai, H., ve ark.** (2011). Caveolae-dependent endocytosis is required for class A macrophage scavenger receptor-mediated apoptosis in macrophages. *J Biol Chem*, 286(10), 8231-8239.
- [72] **Pelkmans, L. ve Zerial, M.** (2005). Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*, 436(7047), 128.
- [73] **Nabi, I. R. ve Le, P. U.** (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. *The Journal of cell biology*, 161(4), 673-677 % @ 1540-8140.
- [74] **Kiss, A. L. ve Botos, E.** (2009). Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(7), 1228-1237 % @ 1582-1838.
- [75] **Veiga, E. ve Cossart, P.** (2006). The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends in cell biology*, 16(10), 499-504.
- [76] **McMahon, H. T. ve Boucrot, E.** (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(8), 517.
- [77] **Fotin, A., Cheng, Y., Grigorieff, N., Walz, T., Harrison, S. C. ve Kirchhausen, T.** (2004). Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature*, 432(7017), 649.
- [78] **Dannhauser, P. N. ve Ungewickell, E. J.** (2012). Reconstitution of clathrin-coated bud and vesicle formation with minimal components. *Nature cell biology*, 14(6), 1476-4679.
- [79] **Panyam, J. ve Labhassetwar, V.** (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced drug delivery reviews*, 55(3), 329-347.
- [80] **Singh, R. P. ve Ramarao, P.** (2012). Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicology letters*, 213(2), 249-259.
- [81] **Yoo, H. S. ve Park, T. G.** (2001). Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer. *Journal of controlled Release*, 70(1-2), 63-70.
- [82] **Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C. ve Kirchhausen, T.** (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental cell*, 10(6), 839-850.
- [83] **Kirchhausen, T., Macia, E. ve Pelish, H. E.** (2008). Use of dynasore, the small molecule inhibitor of dynamin, in the regulation of endocytosis. *Methods in enzymology*, 438, 77-93.
- [84] **Iversen, T.-G., Skotland, T. ve Sandvig, K.** (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: present knowledge and need for future studies. *Nano today*, 6(2), 176-185.

- [85] Vercauteren, D., Vandenbroucke, R. E., Jones, A. T., Rejman, J., Demeester, J., De Smedt, S. C., ve ark. (2010). The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. *Molecular Therapy*, 18(3), 561-569.
- [86] Hosogi, S., Miyazaki, H., Nakajima, K.-i., Ashihara, E., Niisato, N., Kusuzaki, K., ve ark. (2012). An inhibitor of Na⁺/H⁺ exchanger (NHE), ethyl-isopropyl amiloride (EIPA), diminishes proliferation of MKN28 human gastric cancer cells by decreasing the cytosolic Cl⁻ concentration via DIDS-sensitive pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 30(5), 1241-1253.
- [87] Dutta, D. ve Donaldson, J. G. (2012). Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cellular logistics*, 2(4), 203-208.
- [88] Wang, L.-H., Rothberg, K. G. ve Anderson, R. G. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *The Journal of cell biology*, 123(5), 1107-1117.
- [89] Watters, R. J., Kester, M., Tran, M. A., Loughran Jr, T. P. ve Liu, X. (2012). Development and use of ceramide nanoliposomes in cancer. *Methods in enzymology Cilt 508*, ss. 89-108.
- [90] Joseph, E. ve Singhvi, G. (2019). Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: A potential nanocarrier. *Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy* ss. 91-116.
- [91] Bannunah, A. M., Vllasaliu, D., Lord, J. ve Stolnik, S. J. M. p. (2014). Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge. 11(12), 4363-4373.
- [92] Gratton, S. E., Ropp, P. A., Pohlhaus, P. D., Luft, J. C., Madden, V. J., Napier, M. E., ve ark. (2008). The effect of particle design on cellular internalization pathways. 105(33), 11613-11618.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Abdülkadir Bahadır ALKAN

Doğum Tarihi ve Yeri: 24.04.1994, Gölcük

E-posta : bahadiralkan.123@gmail.com

EĞİTİM

- **Lisans** : 2017, Üsküdar Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER

- Haziran 2016 – Temmuz 2016 Beckman Coulter Inc. (stajyer)
- Temmuz 2016 – Ağustos 2016 NPIstanbul Hastanesi (stajyer)