

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS  
PROGRAMI**

**KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE  
ULTRASON DESTEKLİ KONTROLLÜ SALIMLI İLAÇ  
TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**HAZIRLAYAN**

**AŞKIN ÖZDEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA- 2023**



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI  
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS  
PROGRAMI**

**KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE  
ULTRASON DESTEKLİ KONTROLLÜ SALIMLI İLAÇ  
TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**HAZIRLAYAN  
AŞKIN ÖZDEMİR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŐMANI  
PROF. DR. EMİR BAKİ DENKBAŞ**

**ANKARA- 2023**

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı Biyomedikal Mühendisliği Tezli Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Aşkın Özdemir tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09 / 01 / 2023

**Tez Adı:** Kanser Tedavisinde Kullanılmak Üzere Ultrason Destekli Kontrollü Salımlı İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

**Tez Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı- Soyadı, Kurumu )**

**İmza**

Doç. Dr. ULVIYE BUNYATOVA, Başkent Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Pınar YILGÖR HURİ, Ankara Üniversitesi

.....

Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş, Başkent Üniversitesi

.....

**ONAY**

Prof. Dr. Faruk ELALDI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Tarih : ... / ... / .....

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU**

Tarih: 09/ 01/ 2023

Öğrencinin Adı, Soyadı: Aşkın Özdemir

Öğrencinin Numarası: 22010641

Anabilim Dalı: Biyomedikal Mühendisliği

Programı: Biyomedikal Mühendisliği

Danışmanın Unvanı/Adı, Soyadı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Tez Başlığı: Kanser Tedavisinde Kullanılmak Üzere Ultrason Destekli Kontrollü Salımlı İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı belirtilen Yüksek Lisans tez çalışmamın; Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç Bölümünden oluşan, toplam 44 sayfalık kısmına ilişkin, 09/ 01/ 2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 8'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

“Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını” inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

**ONAY**

09/ 01/ 2023

Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecim boyunca tecrübesi ve bilgisiyle beni destekleyen, her zaman yanımda olan, her konuda anlayış gösteren, her konuda yardımcı olmaya çalışan ve olaylara daha anlamlı bakmamı sağlayan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Emir BakiDENKBAŐ'a en içten teşekkürlerimi, saygılarımı ve Őükranlarımı sunarım. Tezim süresince deneysel çalışmalarımı yapabilmek için Biyotek bünyesindeki laboratuvarları kullanmamızı sağlayan TEKMER Genel Müdürü Ali İhsan ÜNLÜ'ye, teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim sürecinde yaptığım tüm çalışmalarda beni motive eden, bana her zaman destek olmaya çalışan ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Beyzanur ÇAKAR'a: tezim sürecinde ilaç ve teknik konularda benden desteğini esirgemeyen değerli Dr. BüŐra AKAY HACAN'a, çok değerli yardımları için laboratuvar arkadaşlarım AyŐenur ACUNER'e ve Rümeysa EKİCİ'ye teşekkür ederim. Her zaman yanımda olmalarından mutluluk duyduğum, tez yazım sürecimde desteklerini ve motivasyonlarını esirgemeyen beni ayakta tutan arkadaşlarıma sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman ve her koşulda yanımda olan, beni karşılıksız sevgi, emek ve destekleri ile büyüten, üzüldüğümde üzölen sevindiğimde benden daha fazla mutlu olan, kararlarıma her zaman saygı duyup sonsuz güvenen annem Fatma ÖZDEMİR ve babam Ümit SONER ÖZDEMİR'E; her zaman yanımda olan, beni güldören, mutlu eden, motivasyonumun yükselmesini sağlayan, kardeşlerime teşekkürü bir borç bilirim...

# ÖZET

**AŞKIN ÖZDEMİR**

## **KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE ULTRASON DESTEKLİ KONTROLLÜ SALIMLI İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

**Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı**

**2023**

Tıp teknolojisindeki son olumlu gelişmelere paralel olarak ultrason, farklı kanser hastalıklarının (örn. Prostat, meme ve karaciğer kanseri ablasyonu), göz hastalıklarının (, rahim fibroid ablasyonu, cerrahi doku kesimi ve diğer birçok cerrahi uygulamalarda ve tedavilerde kullanılmaktadır. Ayrıca, ilaç taşıyıcı sistemlerde ilaç salımını kontrol etmek, ayrıca uygulama yerindeki hedef hücelere sağlanması gereken hücresel alım hızını artırmak (veya kontrol etmek) ve hedef ilaçlar için ultrason etkisi ile ilgili araştırmalar da kullanılabilenekte olduğu ilgili literatürde bulunmuştur. Bu araştırma kapsamında, ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliğinin artırılması, yan etkilerinin azaltılması ve özellikle ilaç taşıyıcılarının fizyolojik bariyerlerden (örneğin kan damarlarının endotel hücre dizilimi, ilaç taşınması için hedeflenen dokuların endotel tabakası, epitel hücre sık sıralanan tabakalar, hücrelerin plazma zarları ve kan beyin bariyeri vb.) daha kolay geçişinin sağlanması en temel amaç ve hedefler olarak kabul edilmektedir.

Sunulan bu çalışma kapsamında; kanser tedavi edici aktif madde taşıyıcı sistemi üzerinde ultrason etkisi ile kontrollü ilaç salımını sağlayan sığır serum albümini (BSA) ile yapılan Cisplatin yüklü biyopolimerik nanopartiküler sistem geliştirmek mümkün olmuştur. Albümin nanoparçacıkları desolvasyon yöntemiyle hazırlanmış, partikül boyutuyla ilişkili parametreler optimize edilmiş daha sonra da farklı miktarlarda Cisplatin yüklenerek en uygun verimde ilaç ve BSA oranına sahip partikül belirlenmiştir. Hazırlanan albümin nanopartikülleri taramalı elektron mikroskobu, morfoloji için SEM ve boyut ve boyut dağılımları için DLS tabanlı cihaz ile karakterize edilmiştir.

İlaç yüklü nanopartiküller daha sonra farklı genliklerde ultrason etkisine maruz bırakılmış ve ultrason etkisine bağlı ilaç dağılım profilleri çıkarılmıştır. Burada belli

bir ultrason etkisine kadar ilaç dağılım hızının artığı tespit edilmiştir. Çalışmanın son aşamasında ilaç yüklü nanoparçacıklara ISO 10993-5 doğrultusunda Sitotoksisite testi bağımsız laboratuvar tarafından yapılmış olup hücre üzerindeki toksisite etkisine bakılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** İla salınımı, Ultrason destekli, Nanopartiküller, Biyopolimer, Cisplatin



## **ABSTRACT**

**AŞKIN ÖZDEMİR**

### **DEVELOPMENT OF ULTRASOUND-ASSISTED CONTROLLED-RELEASE DRUG CARRIER SYSTEMS FOR USE IN CANCER THERAPY**

**Baskent University Graduate School of Natural and Applied Sciences**

**Department of Biomedical Engineering**

**2023**

In parallel with the latest positive developments in medical technology, ultrasound is used in different cancer diseases (eg, prostate, breast and developing cancer ablation), eye diseases (, uterine fibroid ablation, surgical tissue cutting and many other surgical operations and treatments. Also, drug delivery systems are used in drug delivery systems). It has also been found in the relevant literature that structures related to the ultrasound effect of target drugs can be used to control the release of the drug, as well as to increase (or control) the oxygen uptake that the target must provide at the site of application, and especially due to the limitations of drug carriers (e.g. endothelial cell alignment of blood vessels, for drug delivery). endothelial layers of targeted tissues, tightly ordered layers of epithelial cells, plasma membranes of cells and blood-brain barrier etc.) are accepted as the most basic goals and targets.

Within the scope of this study presented; It has been possible to develop a cisplatin-loaded biopolymeric nanoparticulate system made with bovine serum albumin (BSA), which provides controlled drug release with the effect of ultrasound on the cancer-curing active substance carrier system. Albumin nanoparticles were prepared by the desolvation method, optimized for users with their appearance dimensions, and then loaded with Cisplatin in different ways and designed to have the most appropriate drug and BSA properties. The prepared album has components with nanoparticles scanning electron microscopy, SEM for morphology, and DLS-based device for sizing and sizing distributions.

The drug-loaded nanoparticles were then exposed to ultrasound at different amplitudes, and drug release profiles related to the ultrasound effect were obtained. Here, it was determined that the drug diffusion increased up to a certain ultrasound effect. The final experiments of the study were carried out by the Cytotoxicity-independent laboratory conducting ISO 10993-5 on drug-loaded nanoparticles, look at the effect of action on the toxic cell.

**Keywords:** Drug release, ultrasound assisted, nanoparticles, biopolymer, Cisplatin

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kanser Nedir? .....	3
2.1.1. Kanser Tedavi Yöntemleri.....	4
2.1.2. Kanser Tedavisi ve Nanomalzemeler.....	5
2.2. Nanotaşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi.....	6
2.2.1. Polimerik Nanotaşıyıcılar .....	8
2.2.1.2. Protein Bazlı Nanopartiküller .....	8
2.3. İlaç formunun Dozajlanması .....	10
2.3.1. İlaç Uygulama Yöntemleri.....	11
2.3.2. Dozaj Formlarının Sınıflandırılması .....	13
2.4. Geleneksel ve Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler .....	14
2.4.1. Geleneksel İlaç Taşıyıcı Sistemler .....	14
2.4.2. Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	16
2.4.3. Ultrasona Duyarlı İlaç Dağıtım Sistem Potansiyeli.....	17

<b>2.4.3.1. Tümör Dokusuna İlaç Verilmesi.....</b>	<b>18</b>
<b>2.5. Nanopartiküllere İlaç Yüklenmesi.....</b>	<b>18</b>
<b>2.6. BSA Nanopartikül Üretim Yöntemleri.....</b>	<b>19</b>
<b>2.6.1. BSA Nanopartiküllerin Desolvasyon Yöntemi ile Üretilmesi</b>	<b>20</b>
<b>2.6.2. BSA'ya İlaç Yüklemesi.....</b>	<b>22</b>
<b>2.6.3. Cisplatin.....</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERYAL METOD.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Kullanılan Kimyasallar .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.1. BSA Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Kimyasallar .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.2. BSA Nanopartiküllere İlaç Yüklemede ve İlaç Salınımında Kullanılan Kimyasallar .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Kullanılan Cihazlar .....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. İlaç Taşıyıcı Nanopartikül Üretimi .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.1. BSA Nanopartikül Üretimi .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.2. BSA Nanopartiküllere İlaç Yüklenmesi .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.3. Ultrason Etkisi ile İlaç Salınımı.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.4. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartiküllere Sitotoksisite Testi....</b>	<b>33</b>
<b>4. DENEYSEL BULGULAR.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1. BSA Nanopartikül Boyutu Optimizasyonu.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.1. BSA Nanopartikül Boyut Analizi.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1.2. BSA Nanopartiküllerin Morfolojik Karakterizasyonu.....</b>	<b>35</b>

<b>4.2. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartikül Karakterizasyonu .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartikül İlaç Salınım Profilleri.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartiküllerin Sitotoksitesinin</b>	
<b>Değerlendirilmesi .....</b>	<b>41</b>
<b>4.4.1. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartiküllerin Sitotoksitesinin Nitel</b>	
<b>Değerlendirilmesi.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.2. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartiküllerin Sitotoksitesinin Nicel</b>	
<b>Değerlendirilmesi .....</b>	<b>44</b>
<b>5.SONUÇLAR.....</b>	<b>46</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>48</b>

## TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1 Nanomalzeme Özellikleri.....	7
Tablo 2 İlaç Uygulama Yöntemleri .....	12
Tablo 3 BSA Miktarının Partikül Boyutuna Etkisi .....	34
Tablo 4 Çözücü Miktarının Partikül Boyutuna Etkisi.....	35
Tablo 5 Karıştırma Süresinin Partikül Boyutuna Etkisi .....	35
Tablo 6 Sitotoksisite Nicel Değerlendirme Analiz Sonuçları .....	44
Tablo 7 Sitotoksisite Nitel Değerlendirme Analiz Sonuçları .....	45

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1 Kanser Dokusunun Oluşumu [5].....	3
Şekil 2 Nanopartikül İlaç Taşıma Sistemi [32] .....	9
Şekil 3 İlaç formunun Dojazlanması .....	11
Şekil 4 İlaç Uygulama Bölgeleri .....	12
Şekil 5 Dozaj Formlarının Sınıflandırılması .....	13
Şekil 6 Geleneksel İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Zamana Göre İlaç Konsantrasyonu [45].....	15
Şekil 7 Geleneksel İlaç Salımının Sınırlamaları.....	15
Şekil 8 Geleneksel ve Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemin Karşılaştırılması.....	16
Şekil 9 Kontrollü İlaç Salınım Sistemlerinin Avantajları.....	17
Şekil 10 Emülsiyon/çözücü ekstraksiyon yöntemi ile Nanopartikül hazırlanması [37].....	20
Şekil 11 Desolvasyon Yöntemi ile BSA Nanopartikül Üretimi .....	21
Şekil 12 Cisplatin Moleküler Yapısı .....	22
Şekil 13 BSA nanopartikül boyutlarını etkileyen parametreler.....	26
Şekil 14 BSA Nanopartikül Üretimi.....	27
Şekil 15 BSA nanopartiküllere Cisplatin Yükleme .....	28
Şekil 16 BSA nanopartiküllere 1000 µl cisplatin yüklenmesi.....	29
Şekil 17 İlaç yüklü BSA nanopartiküllere ultrason etkisinin uygulanması.....	30
Şekil 18 Ultrasonik Homojenizatör .....	31
Şekil 19 Ultrasonik Homojenizatör ile deney gruplarına ultrason etkisinin uygulanması ..	31
Şekil 20 Ortamdaki ilaç salınımını belirlemek amacıyla kullanılan UV-visible spektroskopi cihazı (Nanodrop).....	32
Şekil 21 İçi boş BSA nanopartikül SEM görüntüsü morfolojik yapısı büyütme oranı X 10.000 .....	36
Şekil 22 İçi boş BSA nanopartiküller SEM görüntüsü büyütme oranı X 20.000.....	36
Şekil 23 İçi boş BSA nanopartiküller SEM görüntüsü büyütme oranı X 40.000.....	37
Şekil 24 İçi boş BSA nanopartikül %1 w/v BSA, 30 ml etanol ve 4 saat karıştırma için partikül boyutu ölçüm sonucu, büyütme oranı X 40.000 .....	37
Şekil 25 İçi boş BSA nanopartikül %2 w/v BSA, 30 ml etanol ve 1 saat karıştırma için partikül boyutu ölçüm sonucu, büyütme oranı X 60.000 .....	38
Şekil 26 0,2 gr BSA, + 1000 µl cisplatin (1/2 , BSA/Cisplatin), büyütme oranı X 80.000	39
Şekil 27 0,2 gr BSA ve 50 µl cisplatin (1/8 , BSA/Cisplatin), Büyütme oranı X 120.000 .	39
Şekil 28 0,2 gr BSA ve 500 µl cisplatin (1/4, BSA/Cisplatin), Büyütme oranı X 80. 000	40
Şekil 29 0,2 gr BSA ve 1000 µl cisplatin (1/2, BSA/Cisplatin), Boyut dağılımı.....	40
Şekil 30 Ultrason etkisinin uygulandığı 3 farklı genlikteki (%15, %45 ve %90) ve ultrason etkisinin uygulanmadığı durum için ilaç salınım profili, zamana bağlı ilaç salınım miktarına ait eğri .....	41
Şekil 31 Negatif kontrolün mikroskopik incelemesi .....	42
Şekil 32 Pozitif kontrolün mikroskopik incelemesi .....	43
Şekil 33 Cisplatin yüklü BSA partiküllerin mikroskopik incelemesi .....	43

## SİMGELER VE KISALTMALAR

BSA	Sığır Serum Albümin
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
nm	Nanometre
pH	Potansiyel Hidrojen
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi
UV	Mor ve Ötesi
°C	Santigrat Derece
mg	Miligram
ml	Mililitre
HSA	İnsan Serum Albümin
NP	Nanopartikül
URDD	Ultrasona Duyarlı İlaç Dağıtım Sistemleri
kHz	Kilo Hertz
MPa	Mega Pascal
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
µl	Mikrolitre
dk	Dakika
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
Gr	Gram



# 1. GİRİŞ

Kanser, ölüm nedenlerinin baş sıralarında yer alan karmaşık ve önemli bir hastalıktır. En yaygın kanserler (2020'deki tahmini yeni vakalara göre azalan sırada listelenmiştir) meme kanseri, akciğer ve bronş kanseri, prostat kanseri, kolon ve rektum kanseri, cilt melanomu, mesane kanseri, Hodgkin olmayan lenfoma, böbrek, pelvis kanseri, endometriyal kanser, lösemi, pankreas kanseri, tiroid kanseri ve karaciğer kanseridir. Kanser, hücrelerin, bölünme kontrolünü yitirmesiyle birlikte durmadan ve kontrolsüz olarak çoğalması olarak tanımlanabilir. Hücre DNA'sında meydana gelen mutasyon ve hasar sonucunda bölünme hızı anormal şekilde artar ve belli doku hücreleri hızlı şekilde çoğalır. Bu hücreler durmadan bölünebilme ve kötü huylu tümörlere dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Birçok kanser türünde, doku kütlesi olan katı tümörler meydana gelir. Kanser genel olarak 4 evrede incelenmektedir. Bu evrelerden birincisi olan benign evrede, genellikle bir kanserin küçük olduğu ve henüz başladığı organın içinde bulunduğu anlamına gelir. İkinci evrede görülen durum genellikle tümörün evre 1'den daha büyük olduğu ancak kanserin çevre dokulara yayılmaya başlamadığı anlamına gelir. 3. evrede ise 2 evreden farklı olarak malignite görülmeye başlar ve kanserli hücrelerin bulunduğu organın sınırları dışına çıkarak yakınlardaki lenf bezlerine doğru geçiş gösterir. 4. evrede ise kanseri dokunun başladığı organdan başka bir organa sıçradığı görülmekte olup bu durum ikincil veya metastatik kanser olarak tanımlanmaktadır.

Kanserde genellikle kullanılan tedavi yöntemleri cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Daha az sıklıkla hormon tedavileri, biyolojik tedavi yöntemleri ve hedefe yönelik tedaviler kullanılır. Bu tedavi yöntemleri tek başına veya birlikte uygulanmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlerin yan etkileri, tedavinin başarısını ve etkinliğini azaltmaktadır. Erken teşhis, kanser tedavisinde önemli bir husustur. Geleneksel tanı yöntemleri ile kanserin erken evrelerde teşhis edilmesi güçtür. Disiplinler arası bir bilim olan nanoteknoloji, kanser teşhis ve tedavisi için önemli bir rol oynamaktadır.

Tıp alanında kullanılan nanoteknoloji, kanserin erken dönemde teşhis edilebilmesi, görüntüleme amaçlı kullanılabilmesi, test ve tanı işlemlerinin hızla gerçekleştirilmesi ve enfeksiyonun ilerlemesinin durdurulabilmesinde kullanılabilir. Nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmak üzere nanopartiküller üretilmektedir. Nanopartiküller sayesinde hedefleme yapılabilmektedir. Hedefleme ilacın etki ya da konsantrasyonunun istenilen bölgede diğer bölgelere göre oranla kontrol edilmesidir. Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerin etkisini artırmak için çeşitli fiziksel, kimyasal

ve biyolojik araçlar kullanılabilir. Bu tez kapsamında bu etkiler arasından ultrason kullanılmaktadır [1]–[3]

Bu çalışmada temel olarak nanoteknolojinin kanser teşhis ve tedavisindeki yeri irdelenmiştir. Tez kapsamından BSA kullanılarak protein bazlı nanopartiküller üretimi gerçekleştirilmiş ve bir kanser ilacı olan Cisplatin'in BSA nanopartiküllere yüklemesi yapılmıştır. İlaç yüklü BSA nanopartiküllere farklı genliklerde ultrason etkisi verilerek, ultrasonun, nanopartiküllerden ilaç salınımına etkisi incelenmiştir.

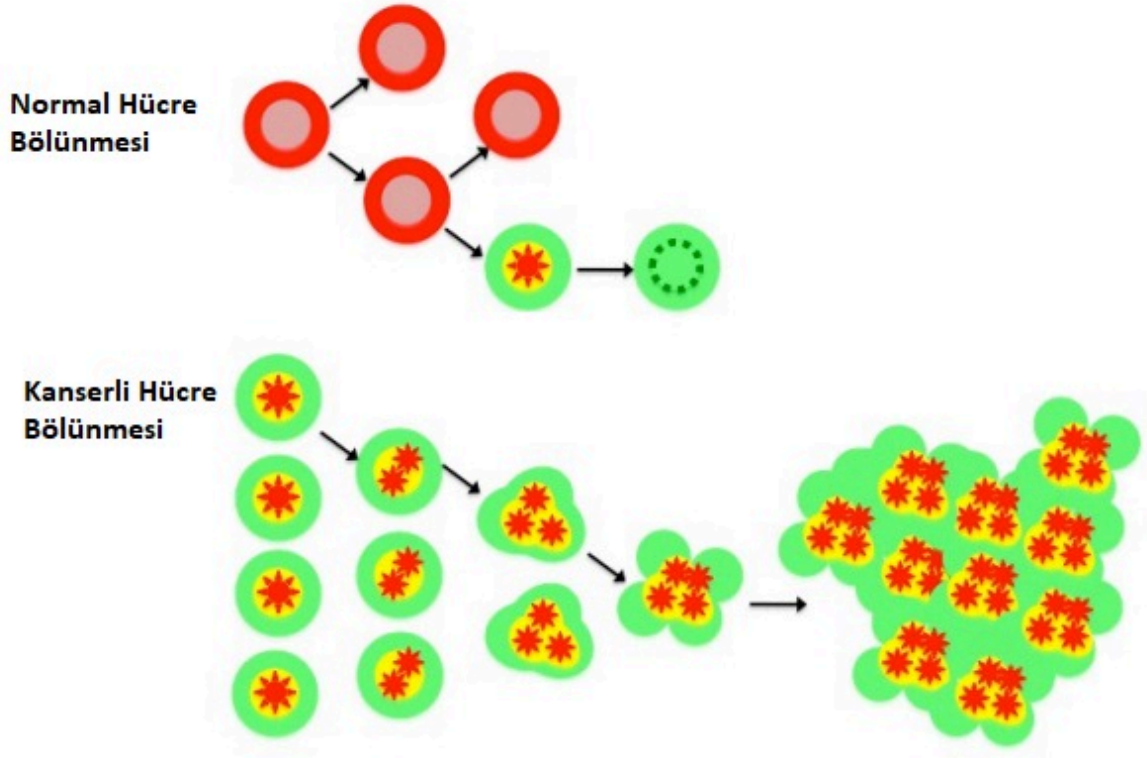
Tezin amacı ilaç yüklü nanopartiküllerin ultrason etkisiyle birlikte minimal invaziv bir yöntemle hedef dokuya uygulanarak ilacın planlanan tedavi için gerekli dozda ve istenilen hızda uygulanabilmesidir. Bu sayede geliştirilen nanopartikülün kanser tedavisinin başarısını arttırması hedeflenmekte ve gelecekte yapılacak kanser tedavileri ile ilişkili yenilikçi nanoteknoloji uygulamalarına öncül bir araştırma olarak literatüre katkı sunması hedeflenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser Nedir?

Kanser tek bir hastalık değildir. Kontrolsüz hücre bölünmesinin görüldüğü, genetik instabiliteye sahip hücreler yığını olarak tarif edilebilir. Çoğu kanser, hücre yaşlanma sırasında belirli bir doku veya organda biriken kromozom ve gen mutasyonlarının sonucunda oluşan hücrelerden kaynaklanır. Genetik instabilite, yaşlanan hücreler tarafından hem in vitro hem de in vivo olarak sayısal (anöploidi) ve yapısal kromozomal değişiklikler (translokasyon, delesyon, amplifikasyon ve inversiyon) şeklinde kendini gösterir [4].

Hücre çoğalmasını kontrol eden çeşitli genlerde mutasyonlar biriktikten sonra hücreler kanserli hale gelir. Kanser Genom Projesi'nden elde edilen araştırma bulgularına göre, çoğu kanser hücresi 60 veya daha fazla mutasyona sahiptir.



Şekil 1 Kanser Dokusunun Oluşumu [5]

Progenitör hücrelerden bazıları mutasyon sayesinde ortam şartlarına daha uygun adaptasyon sağlar ve taşıdığı mutasyonu mitotik bölünmeler ile çoğaltır. Eğer bu mutasyonlu genler, hücrelerin anormal çoğalmasına sebebiyet veriyorsa, kanser genleri olarak adlandırılırlar [5].

### **2.1.1. Kanser Tedavi Yöntemleri**

Kanser tedavisi kanserin evresine göre yapılır. Bazen, tedavi kanseri iyileştirmek içindir. Diğer zamanlarda amaç, kanserin daha fazla yayılmasını durdurmaktır. Geleneksel kanser tedavi yöntemleri cerrahi, kemoterapi, radyasyon, hormon, kök hücre ve immünoterapi tedavisi olarak sıralanabilmektedir.

Cerrahi tedavi doktorların kanser hücreleri ile dokuyu kesip çıkardığı bir operasyon işlemidir. Ortalama gelişmişlikteki ülkelerde kanserin küratif ve palyatif tedavisi temel bir yöntemdir olarak tercih edilir. Bu yaklaşım, uygun şekilde seçilmiş adjuvan sistemik tedavi ve radyoterapi ile birleştirildiğinde önemli bir küratif potansiyele sahiptir. Lokal olarak ilerlemiş veya metastatik kanserin yaygın bir ilk hastalık sunumu olduğu düşük ve orta gelirli ülkelerde, makul palyatif hastalık kontrolü sağlamak için cerrahi rezeksiyon veya debulking mevcut birkaç modaliteden biri olabilir [6].

Kemoterapi tedavi yöntemi, asıl amacı kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlar kullanarak öldürmek olup, sitotoksik anti-neoplastik ajanlar bu tip tedavide başrolde dir. Kemoterapi, radyoterapide de olduğu gibi cerrahi girişim öncesinde tümörün boyutunu küçültmek üzere neoadjuvan tedavi şeklinde veya tek başına uygulanabilir [7].

Kök hücre tedavisinde ise çok yüksek dozlarda kemoterapi veya radyasyon tedavisi nedeniyle kaybedilen kemik iliği hücreler kök hücreler ile değiştirilir. En yaygın olarak kan kanserleri ve lenf düğümlerindeki kanserleri tedavi etmek için kullanılır. Tümörler üzerindeki gelişmiş hedefi nedeniyle diğer terapilerle birlikte terapötik etkinlik artırabilir, böylece hedef dışı yan etkiler en aza indirilir [8].

Radyasyon, kanserin neden olduğu semptomlardan kurtulmak için palyatif tedavinin etkili bir yöntemi olarak kullanımının yanı sıra tedavi amacıyla da kullanılabilir. Radyasyon ile tedavinin diğer endikasyonları arasında cerrahi, kemoterapi veya immünoterapi gibi diğer tedavi yöntemleri ile kombinasyon

stratejileri bulunmaktadır. Onkolojik hastalarda ameliyattan önce uygulanan radyasyon (neoadjuvan tedavi) tümörün boyutunu küçültmeyi amaçlarken, ameliyattan sonra uygulanan radyasyon (adjuvan tedavi) geride kalmış olabilecek mikroskopik tümör hücrelerini yok etmeyi amaçlamaktadır [9].

Kanser tedavisi, malignitenin büyümesini daha da engelleyen veya durduran farklı hormon türlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilir. Bu tedavi yönteminde ise hormon eklenmesi, bloke edilmesi veya vücuttan atılması sağlanabilir. Hormonlar, hücrelerin büyümesi ve farklı aktiviteleri ile bazı vücut fonksiyonlarını kontrol eden vücut sisteminin önemli bir parçasıdır. Hormon tedavisinin bir diğer adı ise endokrin tedavisi olarak da bilinmektedir. Endokrin tedavi ikiye ayrılır.

Birincisi hormon üretme yeteneği bloke olan bireyler için, diğeri ise hormonların vücutta nasıl davrandığına müdahale etme yeteneği olan bireyler için uygulanır. [10].

Kanser tedavisinde kemoterapi ilaçlarının mümkün olduğunca tümörleri hedef alması ve sağlıklı dokular üzerinde etkisinin sınırlı olması, tedavideki başarı bakımından esastır. Bu husus ayrıca hastanın yaşam süresi ve kalitesinin artması bakımından önemlilik arz eder [1]. Geleneksel kanser tedavi yöntemleri, öncelikle DNA (Deoksiriboz Nükleik Asit) sentezine ve mitozaya müdahale ederek çalışmakta aynı zamanda hızla büyüyen ve bölünen kanser hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır. Bu yöntemde kullanılan ajanlar seçici olmamakla birlikte sağlıklı normal dokulara da zarar vererek istenmeyen yan etkilere sebebiyet vermektedir. Nanoteknolojinin ortaya çıkışı, son yirmi yılda genel olarak klinik terapötikler üzerinde derin bir etkiye sahip olmuştur. Geleneksel kemoterapötik ajanlarla karşılaştırıldığında, nano ölçekli ilaç taşıyıcılar yüksek potansiyel göstermiştir [11].

### **2.1.2. Kanser Tedavisi ve Nanomalzemeler**

Kanser tedavisinde birkaç yenilikçi ilaç verme yöntemi kullanılmaktadır. Çok çeşitli nano ölçekli bileşiklere dayalı sentetik polimerler, proteinler, lipitler ve organik ve inorganik parçacıklar kanser terapötiklerinin geliştirilmesi için kullanılmıştır. Çıplak kemoterapötik ilaçların doğrudan uygulanmasıyla karşılaştırıldığında, bir taşıyıcı içinde ilaç kapsülleme; kan akışındaki bozulmaya karşı koruma, daha iyi ilaç çözünürlüğü, gelişmiş ilaç stabilitesi, hedefe yönelik ilaç dağıtımı, azalmış toksik yan etkiler ve iyileştirilmiş gibi bir dizi avantaj sunar.

Nanotaşıyıcılar, büyük miktarlarda ilaç taşıyabilme, uzun akış süresi ve geliştirilmiş Etki Geçirgenliği ve Tutma (EPR) gibi avantajlara sahiptirler. Nanotaşıyıcılar, geleneksel ilaç kullanımının getirdiği; zayıf sulu çözünürlük, zayıf biyoyararlanım ve istenmeyen ilaç farmakokinetik özellikler gibi pek çok sınırlamanın üstesinden gelmek amacıyla tercih edilmektedir [12].

Kanser tedavisinde kullanılan nanoteknoloji ile üretilen nanotaşıyıcı türleri genel olarak aşağıdaki gibi sıralanabilmektedirler.

- Lipid Bazlı
- Liposom
- Viral Vektörler
- Polimerik Bazlı
- Dendrimerler
- Nanoshell
- Protein Bazlı
- Nükleik asit bazlı
- Metal Nanopartiküller

## **2.2. Nanotaşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi**

Günümüzde nanobiyoteknolojik araştırmalar ile sağlık alanındaki yaklaşım ve uygulamada değişimler görülmektedir. Özellikle etkili ilaç taşınımı ve hastalık teşhisinde nanotaşıyıcıların kullanımı artış göstermektedir. Nanotaşıyıcıların kullanıma girmesi ile hedefe yönelik tedavinin sürdürülmesinin yanısıra tedaviye bağlı yan etkileri azaltmak hedeflenmektedir. Polimerik nano taşıyıcılar, süperparamanyetik nanopartiküller, kuantum dot, dendrimerler ve lipit nanopartiküller gibi etkin nanotaşıyıcıların kullanıma girmesi tedavi etkinliğini arttırmıştır.

Nanotaşıyıcılar boyut olarak 1 ila 100 nanometre (nm) çapındadır [13] ve terapötik ajanın veya diğer ürünlerin hedef bölgeye taşınımında yaygın olarak kullanılan kolloidal partiküllerdir [14]. Mikrokapiller damar çapının yaklaşık 200 nm olması nedeniyle nanotaşıyıcıların terapötik kullanımında boyutunun 200 nm'nin altında olması gerekmektedir [15]. Nanotaşıyıcılar kabul edilen güvenlik aralığında genellikle inaktif

olmaları nedeniyle biyouyumluluk sağlar. Endozom-lizozom mekanizmasını atlatabilen nanotaşıyıcılar sürekli ilaç salınımı yapar ve dolaşımında kalış periyodu uzundur [16]. Nano taşıyıcıların fizyokimyasal özellikleri, yüzey, kompozisyon ve şekil gibi sekonder etkenlerin farklılaşması ile aktiviteleri değişir [17], bu durum ilaç dağıtımındaki etkiyi artırır. Günümüzde kullanıma giren çok çeşitte nanotaşıyıcılar bulunmasına rağmen, az sayıda nanotaşıyıcı ilacı hedeflenmiş alana taşıma yeteneğine sahiptir. Nanotaşıyıcıların düşük toksisite, biyouyumluluk, düşük immunojenite, yüksek güvenlik, düşük maliyet gibi pek çok avantajı vardır [18], [19].

Nanomalzemelerin kanser tedavisi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Bu etkiler Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1 Nanomalzeme Özellikleri

<b>Nanomalzeme özellikleri</b>	<b>Nanomalzemenin etkisi</b>
Koruyucu etki	İlaçların polimerlere tıkanması veya konjugasyonu, İnaktivasyon ilaçlarını koruyabilir ve aktivitelerini uzun süre korumalarına yardımcı olabilir [20].
Çözünme etkisi	Otonom olarak bir araya getirilmiş, polimerik misellerin hidrofobik çekirdeği, hidrofobik ilaç çözünürlüğünü artırmak için Güçlü bir nano-kapsayıcı görevi görebilir [21].
Aktif hedefleme	Spesifik tanıma süreçleri, aktif hedeflemeye ulaşabilir, ligand reseptörü ve antikor-antijen yüzey tanınmasını içerir Mannoze, folat ve galaktoz gibi farklı ligandlarla değişim [22].
Pasif hedefleme	Geliştirilmiş geçirgenlik ve tutma etkisi (EPR), İlaç taşıyıcılarının interstisyel doku sıvısında birikmesine izin verir. Taşıyıcılara hapsolmuş veya konjuge edilmiş ilaç, tümör dokusunu daha uzun süre depolayabilirken, serbest düşük moleküler ağırlıklı ilaç kolayca geri yayılır [15]
Kontrollü İlaç Salınımı	Gerektiğinde hasta olmayan bölgede ilaç kontrolü yapılabilir. pH, sıcaklık, ultrason veya özel enzimler gibi sinyaller verilir [16].

### **2.2.1. Polimerik Nanotaşıyıcılar**

Polimerik nanopartiküller biyolojik olarak kolay parçalanabilen polimerden üretilmiş kolloidal, solid nanotaşıyıcılardır [24]. İlaç moleküllerini, polimerin çekirdeğinde çözen/dağıtan rezervuar tipi (nanokapsüller) ve polimer matriks içinde hapseden matriks tipi (nanosferler) bulunmaktadır. Her iki tipte ilacı yüzeyinde kimyasal olarak bağlayabilir veya absorbe edebilir [25].

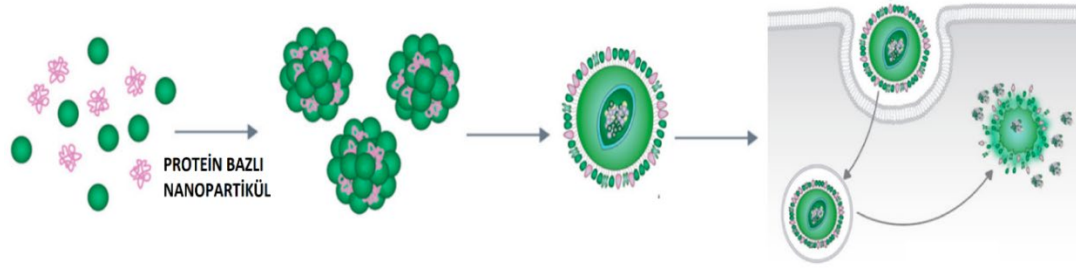
İnsan vücudunda polimerik nanotaşıyıcıların biyolojik çözünmesi ile metabolik olarak kolayca ayrışabilen monomerler oluşur [26]. Polimerik nanotaşıyıcılar hem doğal (kitosan, jelatin, albümin, kollajen, aljinat vb.) hem de sentetik polimerlerden (poli(laktik-ko-glikolik asit, polietilen glikol, poliglutamik asit ve polikaprolakton gibi) üretilebilir [27]. Polimerik nanotaşıyıcılar; artmış stabilite, ilaç yükleme, sistemik dolaşımdaki yarılanma ömrü ve uzamış ilaç salınımı gibi özellikleri nedeniyle diğer nanotaşıyıcılara göre avantaj sağlar. Polimerik yapının fizyokimyasal özellikleri değiştirilerek ilacın kontrollü salınımı geliştirilebilir. Birden fazla ilacın yüklendiği çok işlevli polimerik nanotaşıyıcıların üretilmesi de mümkündür [28]. Polimerik nanopartiküllerin sentezi ile hedefe yönelik ilacın dağıtımında uyarana duyarlı polimerlerin (akıllı polimerler) kullanımı hayata girmiştir. Bu akıllı polimerler, ilacı internal (düşük pH, redoks, enzim) ve eksternal çevresel uyarılarla (sıcaklık, ışık, ultrason, manyetik ve elektrik alan) serbest bırakır. Akıllı polimer tasarımıdaki zorluklardan bazıları: ölçeklenebilirlik, toksisite/biyouyumluluk, uyarana duyarlılığıdır. İnternal uyarılar klinik ve prelinik modeller arasındaki farklılıklar nedeniyle bazı zorluklara sahipken; eksternal uyarılar lokalizasyon, kompliyans ve doku penetrasyonundaki zorluklara sahiptir [29].

Hedefe yönelik ilaç dağıtımında polimerik nanotaşıyıcılar umut vadetmektedir. Protein bazlı nanotaşıyıcılar da polimerik nanotaşıyıcı grubuna ait bir alt sınıf olarak belirtilebilir ve nanopartikül üretilmesi ile protein bazlı nanotaşıyıcılar geliştirilebilir.

### **2.2.1.2. Protein Bazlı Nanopartiküller**

Nanopartikül dispersiyonları ilaç taşıyıcıları olarak çeşitli avantajlar gösterdiğinden, günümüzde nanoteknoloji farmasötik bilimler alanına çok entegre olmuştur. Protein bazlı nanopartiküller diğer nanopartikül türlerine göre birçok avantaj göstermektedir. Çoğunlukla protein bazlı nanopartiküller toksik etki göstermezler ve biyolojik olarak parçalanabilir [17].





Şekil 2 Nanopartikül İlaç Taşıma Sistemi [32]

Protein nanoparçacıklarının hazırlanması ve ilaç yükleme işlemleri, toksik kimyasallar veya organik çözücüler kullanılmadan hazırlanabilmektedir [31].

Protein bazlı nanopartiküller ilaç salımını kontrol edebilmekte, ilacın dağılımını, ilaç etkinliğinde artış ve yan etkilerde azalma sağlamaktadır. Bu taşıyıcılar, nanoparçacıklardaki ilaç yükünün nispeten yüksek olması ve ilacın sisteme dahil edilmesinin, ilaç aktivitesini koruyan herhangi bir kimyasal reaksiyon olmaksızın elde edilebilmesi ve bir bölgeye sahip olma olasılığı gibi bazı avantajlar göstermektedir [32].

Protein nanoparçacıklar; ilaç taşıyıcısı olarak antikanser ilaçlarının, peptid hormonlarının, DNA ve RNA gibi materyallerin iletiminde çeşitli avantajlara ve uygulamalara sahiptir. Protein nanoparçacıkları, diğer koloidal taşıyıcılarla karşılaştırıldığında daha kararlı ve daha kolay üretim avantajlarına sahiptir. Ayrıca, çeşitli kaynaklardan elde edilen protein, diğer malzemelerden elde edilen nanoparçacıklara kıyasla daha az kimyasal kullanımıyla birlikte kolay, uygun maliyetli ve çevre dostu bir sentez süreci kullanılarak nanoparçacıklara üretilebildiğinden in vivo olarak yüksek potansiyel kullanım beklenmektedir.

Protein nanoparçacıklar, fibroinler, albümin, jelatin, gliadin, baklagiller, 30Kc19, lipoprotein ve ferritin proteinleri gibi proteinler kullanılarak üretilebilir ve emülsiyon, elektrosprey ve desolvasyon yöntemleriyle hazırlanabilmektedir. İlaç dağıtım uygulamaları için çeşitli proteinler arasında en yaygın olarak fibroin ve albümin kullanılır [31].

Fibroinler toplam proteinin %65 ila 85'ini oluşturan ipek liflerinde bulunan ana proteindir. Fibroin, ağır ve hafif zincirlerden oluşan yarı kristal bir yapıdadırlar. Fibroin kullanan nanopartiküller, dar bir boyut dağılımına sahiptir. Büyük parçacık boyutlarına sahip fibroinlerin gerçek moleküler ağırlıklarından daha büyük

nanoparçacıklar üretir.

Fibroinler Yüksek stabilite çeşitli işleme koşullarına uygun, yüksek mekanik mukavemetli esneklik, düşük ve biyobozunurluk gibi avantajlara sahipken immünojenik reaksiyonlara neden olabilmektedir [31], [33], [34].

Albümin, yirminci yüzyılın başından beri düşünülen ve birçok terapötik uygulamaya sahip olan hayvansal proteinlerden biridir. Ticari uygulamalarda Ovalbumin adı verilen yumurta akı, sığır serum albümin (BSA) ve insan serum albumin (HSA) gibi çeşitli kaynaklardan hazırlanan albümin kullanılmaktadır [35]. BSA'nın ligand bağlama özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir ve dolaşım sistemi yoluyla dağıtım için çeşitli ilaçları yüklemek için kullanılabilirler.

### **2.3. İlaç formunun Dozajlanması**

Etken maddelerin doğrudan kullanımı bazı nedenlerden dolayı sıklıkla tercih edilmez. İlaç formlarının dozajlanabilmesi için çoğunlukla ilaç dağıtım sistemleri öne çıkmaktadır. Etken maddelerin düşük dozlarda kullanılması zor olduğundan dolayı dozajlama oldukça kritik bir konu olarak dikkat çeker [36]. Etken maddelerin cerrahi vücut açıklıklarından verilerek uygulama esnasında, miktarından veya özelliklerin dolayı (sıcaklık, pH gibi) bölgesel tahrişlere aynı zamanda yaralanmalara sebebiyet verebileceği için uygulanması kolay bir yöntem olmamakla birlikte genellikle etken maddelerin doğrudan vücut açıklıklarından uygulanması tercih edilmez [36].

Etken maddeler dış koşullara karşı duyarlı olmakla birlikte ışık, nem, sıcaklık ve pH gibi fiziksel etkilerden etkilendikleri için kimyasal olarak daha kararlı bir yapıya getirilmeleri gerekmektedir. Ayrıca etken maddeler; hasta için doğrudan kullanımını zorlaştıran tat, koku ve uyum gibi organoleptik özelliklere sahiptirler [37].



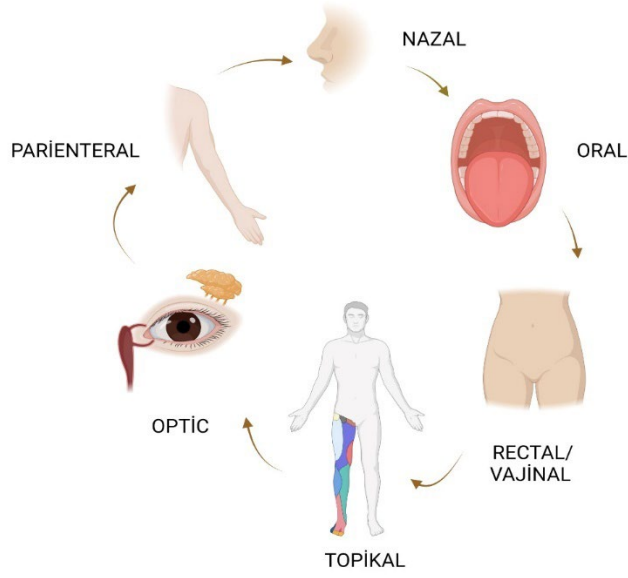
Şekil 3 İlaç formunun Dojazlanması

Etken maddenin uygulama yeri ve uygulama şeklinden kaynaklı zorluklarından dolayı her zaman yardımcı materyaller ile birlikte kullanılmaktadır. Yardımcı materyaller formülasyona belirli bir yapı ve şeklinin verilmesi, organoleptik özelliklerin olumsuz taraflarının ortadan kaldırılması, üretim sürecinin kolaylaştırılması ve en önemlisi uygun ve doğru şekilde dozajlanması için kullanılmaktadır. Ayrıca belirtilen kullanım sebeplerine ek olarak yardımcı materyal kullanılarak dozajlama yapılması etken maddenin depolanması veya kullanılmasında, biyolojik yararlanmada ve hastanın kullanımı esnasında genel güvenliğini artırır [38].

### 2.3.1. İlaç Uygulama Yöntemleri

Etken maddenin dozajlanmış halleri istenilen hedef bölgeye tedavi yöntemine veya etken maddenin fizikokimyasal özelliklerine göre farklı şekillerde uygulanabilmektedir [39]. Günümüzde en çok kullanılan etken maddenin dozajlanmış şekilleri tablet, kapsül, hap, merhem, şurup ve enjeksiyonlardan oluşmaktadır [40].

Tercih edilen ilaç uygulanması sırasında hangi yöntemin tercih edileceği 4 ana faktöre bağlıdır. Bunlar; vücudun tedavi edilen kısmı, ilacın vücutta çalışma şekli, ilacın çözünürlüğü ve geçirgenliği olarak tanımlanabilir. Aşağıdaki tabloda etken maddenin vücutta uygulama yöntemleri verilmiştir [40].



Şekil 4 İlaç Uygulama Bölgeleri

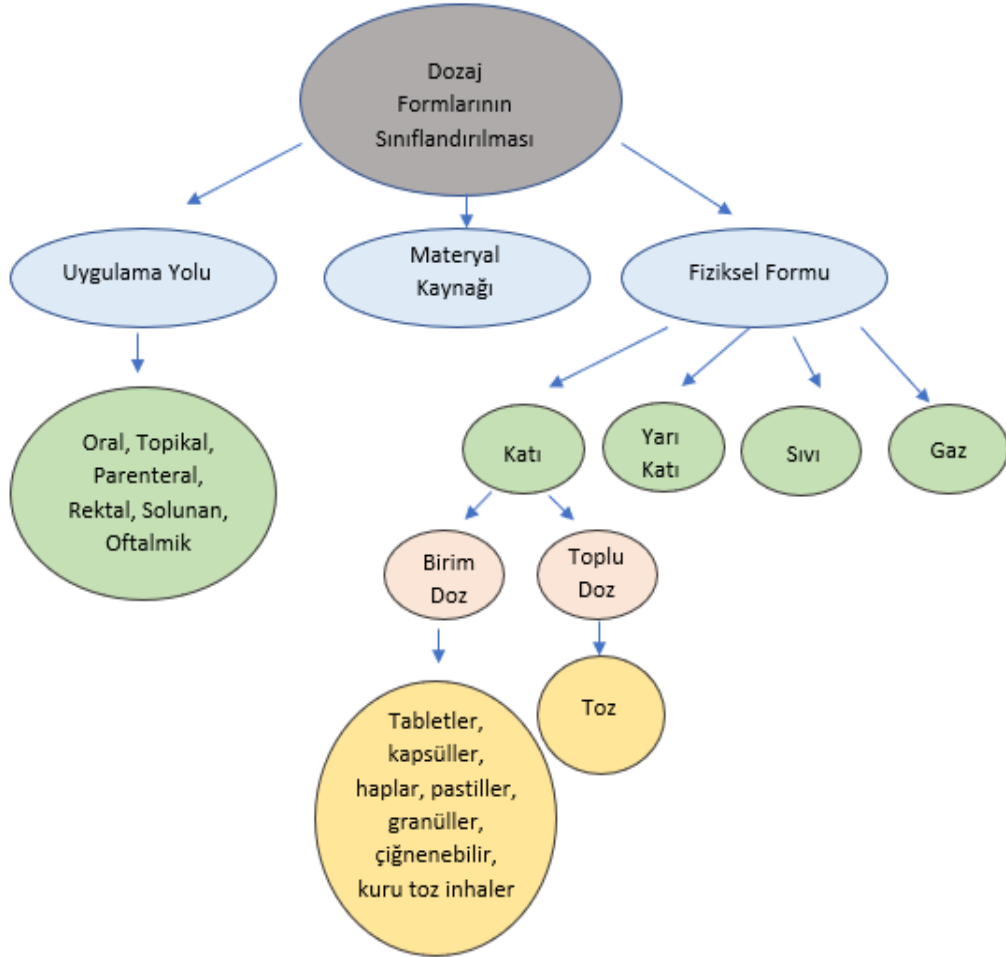
Tablo 2 İlaç Uygulama Yöntemleri

Oral	İlaç ağız yoluyla verilmektedir. Bu yöntemde tablet, kapsül, pastil veya sıvı formdaki etken maddenin dozajlanmış biçimleri kullanılmaktadır.
Bukkal	İlaç yanağın içinde tuturularak verilmektedir. Gargara, sprey, pastil şeklinde uygulanır.
Dilaltı	İlaç dilaltına tuturularak verilmektedir. Bu yöntemde genellikle tablet kullanılmaktadır.
Enteral	İlaç doğrudan mideye veya bağırsağa verilmektedir.
Solunum	İlaç bir tüp veya maske yoluyla solunarak verilmektedir. Bu yöntemde genellikle sprey veya aerosol kullanılmaktadır.
Burun	İlaç sprey veya pompa ile burun içine verilmektedir.
Oftalmik	İlaç göze damla, jel veya merhem yoluyla verilmektedir.
Otik	İlaç kulağa verilmektedir.
Rektal	İlaç rektal yolla verilmektedir. Bu yöntemde genellikle tablet, krem ve jel kullanılmaktadır.
Vajinal	İlaç vajinal yolla verilmektedir. Bu yöntemde genellikle tablet, krem ve jel kullanılmaktadır.

Cilt	İlaç cilde verilmektedir. Bu yöntemde genellikle yamalar, katı formdaki doajlar, jel ve kremler kullanılmaktadır.
Aşılanmış	İlaç bir hat ile bir damara enjekte edilerek ve zamanla yavaşça damlatılarak verilir.
Kas İçi	İlaç şırınga ile kas içine enjekte edilerek verilmektedir.
İntravenöz	İlaç şırınga ile damar içine enjekte edilerek verilmektedir.
Subkutan	İlaç derinin hemen altına enjekte edilerek verilmektedir.

### 2.3.2. Dozaj Formlarının Sınıflandırılması

Etken Maddelerin Dozajlanmış formları, uygulama yoluna, materyalin kaynağına (doğal/sentetik) ve ilaç dağıtım sistemlerinin fiziksel formuna göre sınıflandırılır [40].



Şekil 5 Dozaj Formlarının Sınıflandırılması

Etken maddenin katı dozaj formları ayrıca doz tipine göre ikiye ayrılmaktadır. Birim dozda: dozajlanmış etken madde sabittir ve ayrı form olarak oluşturulmuştur. Hasta

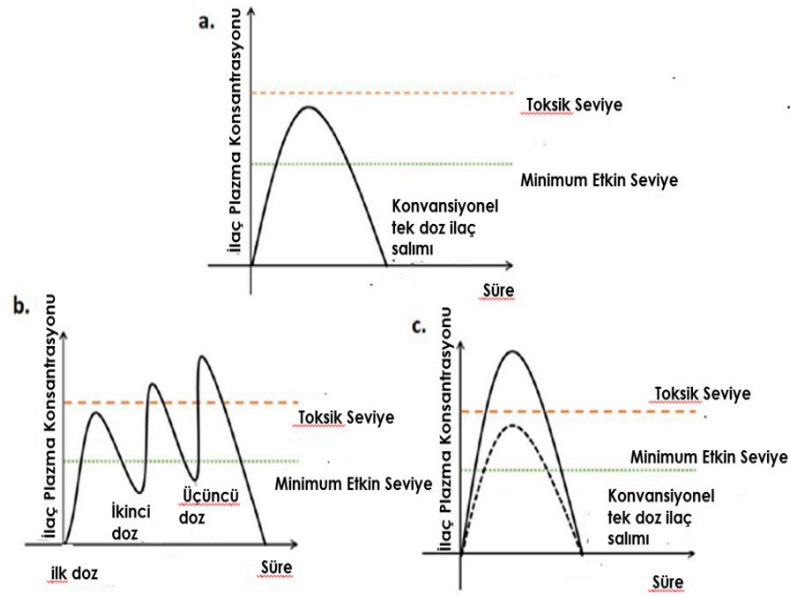
ilaç alacağı zaman belirli bir dozdan tek birim olarak kullanır. Birim dozaj formlarının örnekleri arasında tabletler, kapsüller, haplar, pastiller, çiğnenebilir tabletler ve ölçülü doz kaplarında kuru toz yer almaktadır. Toplu dozda ise: bireysel dozun formüle edilmediği katı bir katı tozdur. Toplu tozlar genellikle cerrahi ve yaralanma yaraları için pansuman tozu olarak kullanılır. Toplu dozaj formlarının örnekleri arasında insuflasyon tozu, pansuman tozu vb. yer almaktadır [40].

## **2.4. Geleneksel ve Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler**

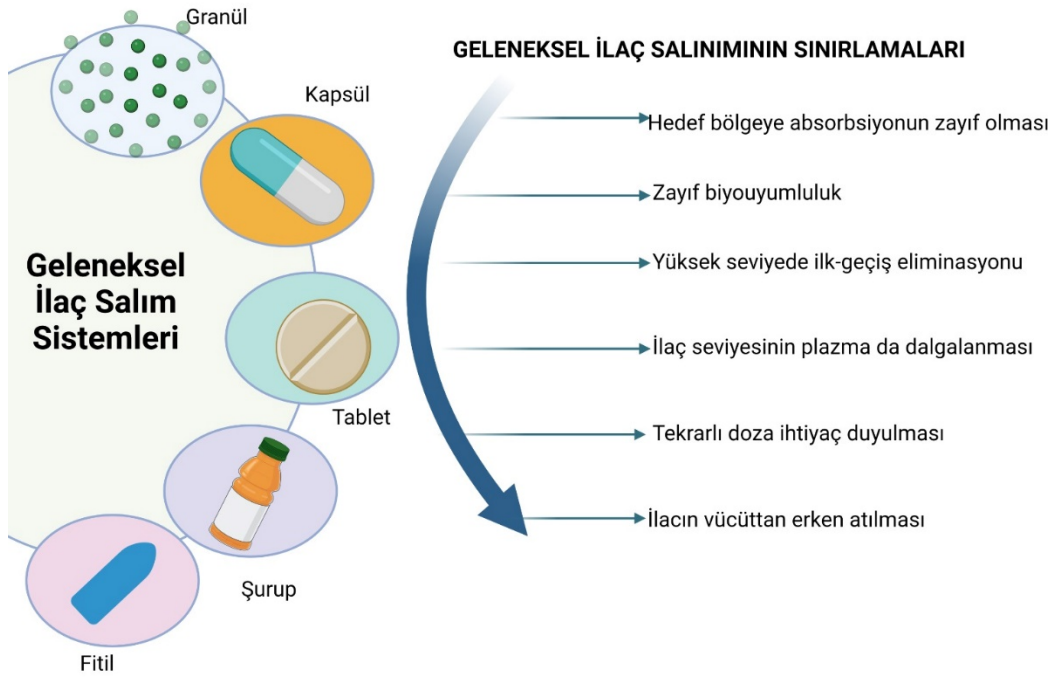
### **2.4.1. Geleneksel İlaç Taşıyıcı Sistemler**

Geleneksel ilaç taşıyıcı sistemler vücuttan çok hızlı bir şekilde atılır ve doz vücutta yeterli etkin dozda olacak şekilde korunamaz. Tek bir geleneksel yöntemle doz aldıktan sonra, ilacın çok hızlı bir şekilde bozulmasını takiben etken madde seviyesi hızla yükselişe geçer. Etken madde seviyesi hızla yükseldikten sonra aynı şekilde düşüşe geçmektedir. Buradaki ani yükseliş ve iniş sırasında; ilacın plazmadaki dozu önemli bir etki üretmesi beklenen terapötik seviyenin altında kalabilir. Bu durum geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımına bağlı olarak Şekil 6'daki gibi görülen plazma ilaç dalgalanması olarak isimlendirilir. Geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlerde, ilacın plazmadaki miktarını minimum seviyedeki etken madde konsantrasyonu ve toksik seviyedeki etken madde konsantrasyonu arasında tutmak için tekrarlı doz uygulaması yapılmakta böylece ilacın plazmadaki seviyesi düştüğünde yeni alınan dozla takviye edilmeye çalışılmaktadır [40]. Geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlerin kendi içerisinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Geleneksel ilaç taşıyıcı sistemler üretim yönteminin kolaylığı, non invaziv olması, yüksek raf ömrü, hasta çeşitliliğinin olması, tekrar dozlanması ve düşük maliyet yönünden avantajlıdır. Tüm bunlara rağmen uygulama bölgesindeki etken madde yetersizliği, etken maddenin erken metabolizması, zayıf biyoyarar ve hasta uyumunun zor olması ise dezavantajları arasındadır [45].



Şekil 6 Geleneksel İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Zamana Göre İlaç Konsantrasyonu [45].



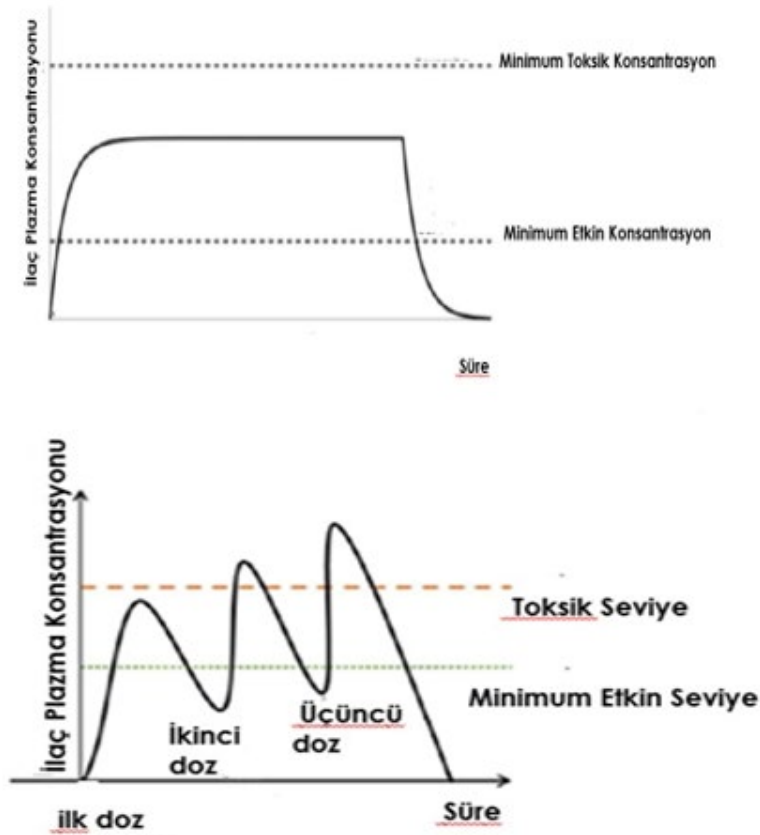
Şekil 7 Geleneksel İlaç Salımının Sınırlamaları

Düzenli zaman aralıklarında çoklu dozların uygulanması, tek bir doz kullanımına bir alternatif gibi görünebilir, ancak ilki, plazma ilaç seviyelerinde dalgalanmalara neden olur ve genellikle kan plazmasında ilacın miktarı etkili seviyelerin altına veya toksik seviyelerin üzerine çıkar. Bununla birlikte aynı gün içerisinde birden fazla doz alınması, hasta adaptasyonu için zorlayıcı olup, dozun unutulması ya da fazla alınması nedeniyle etken

maddenin hedeflenen konsantrasyon aralığında tutulmasını engeller. Diğer bir yaklaşım ise, ilacın amaçladığı etkilerden farklı yan etkilere yol açan, gereken dozdan daha fazla tek bir doz verilmesidir. Tüm bu belirtilen dezavantajlar değerlendirildiğinde; plazma ilaç seviyelerini sabit bir hızda tutmak ve daha uzun bir süre boyunca istenen etkiyi sunmak için kontrollü ilaç salımının önemi bir kez daha öne çıkmaktadır [41].

#### 2.4.2. Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemler

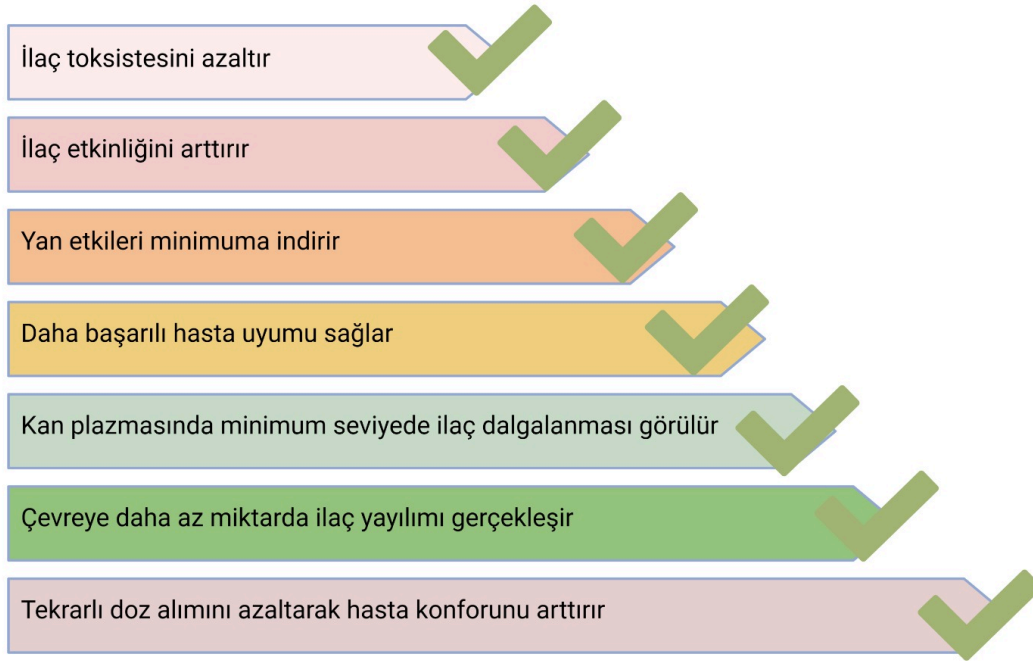
Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler, bir ilacın sabit bir seviyesinin kanda ve dokuda uzun süre tutulduğu ilaç dağıtım sistemidir. Şekil 8'deki grafiklerde geleneksel ve kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerin grafikleri verilmiştir. Geleneksel bir uygulama sisteminde, oral tabletler veya enjeksiyonlarla çoklu dozlama için tipik farmakokinetik eğriler vardır. Etkin maddenin kandaki miktarının minimum etkili konsantrasyonun üstünde ve altında dalgalanmaktadır. Öte yandan kontrollü dağıtım sistemi, yalnızca tek doz kontrollü ilaç dağıtımıyla sıfır dereceli farmakokinetik eğriler vermektedir [42].



Şekil 8 Geleneksel ve Kontrollü İlaç Taşıyıcı Sistemin Karşılaştırılması



Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerde, ilaç belirli dozlarda önceden belirlenmiş bir süre boyunca salınarak sürekli olarak etken maddenin kandaki miktarının minimum etkin seviyenin üzerinde ancak toksik seviyenin altında kalması sağlanır. Bu uygulama, dozu ve dozlama sıklığını azaltmaya yardımcı olurken hasta uyumunu ve tedavi başarısını da artırır. Bunlara ek olarak biyolojik ortama, hasta vücuduna, daha az ilaç maruziyeti sunarken, ilaç toksisitesini ve yan etkilerini de olabildiğince önler [41]. Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajları Şekil 9’da verilmiştir.



Şekil 9 Kontrollü İlaç Salınım Sistemlerinin Avantajları

### 2.4.3. Ultrasona Duyarlı İlaç Dağıtım Sistem Potansiyeli

İstenen dokuda ilaç salınımını tetikleyebilme yeteneğine sahip olması nedeniyle ultrason etkisi önemli bir uyarıcıdır. İstenen hedefe yönelik tedavide ultrasona duyarlı ilaç dağıtım sistemlerinin (URDD) kullanımı kritik bir öneme sahiptir. URDD’ler, mikrokabarcıklar, nanokabarcıklar, nanodropletler, lipozomlar, emülsiyonlar ve miseller gibi birçok farklı malzemeleri içermektedir. Küçük moleküller, biyomakromoleküller ve inorganik maddeler URDD'lere yüklenebilen ilaçlar arasındadır. Klinik uygulama alanları arasında antikanser tedavisi, iskemik miyokard tedavisi, bağışıklık tepkisinin

indüklenmesi, kıkırdak dokusu mühendisliği, transdermal ilaç uygulaması, Huntington hastalığının tedavisi, tromboliz ve kan–beyin bariyerinin bozulması yer alır [43].

#### **2.4.3.1. Tümör Dokusuna İlaç Verilmesi**

URDD'ler, tümör hedefli tedavide hücre ölümünü indüklemek için kullanılmaktadır [44]–[46]. Uygulama şekline bağlı olarak termal ve termal olmayan ultrasona bağlı iki farklı etki görülmektedir. Termal olmayan ultrason uygulamasında tümörleri kemoterapi ve radyoterapiye duyarlı hale getirmek için 43°C gibi düşük sıcaklıklar 30-60 dakika'ya kadar kullanılabilir [47].

Termal ultrasonda ise 60°C gibi yüksek sıcaklıklar, karaciğer [48], meme [49], pankreas [50], prostat gibi birçok organdaki tümörlerin ablasyonu [51], [52] ve kan damarlarının termal pıhtılaşmasını [53] sağlamak amacıyla kullanılabilir.

Suzuki ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada [54], ultrasona duyarlı ilaç dağıtım sisteminin nanokabarcık kombinasyonu ile kanser hücrelerine nüfuz edebildiği gösterilmiştir. Araştırmada 293T insan böbrek hücre hattı, MCF7 insan meme adenokarsinomu hücre hattı, EMT6 fare meme karsinomu hücre hattı ve 26 kolon fare rektum karsinomu hücre hatlarında sisplatin ve 5-florourasil 'nin sitotoksik potansiyelinin ultrason etkisi ile arttırıldığı görülmüştür. Optimal koşullar altında, (frekans 945 kHz, görev döngüsü oranı %20-%80, basınç 0,96 MPa) ultrason duyarlı sistemle birleştirilmiş nanokabarcıkların (albümin içeren, %10, v/v), önemli bir sitotoksik etki oluşturduğu kaydedilmiştir. İlaç dağıtım sisteminin ultrason ile birleştirilmesi nanokabarcıkların daha hızlı çökmesine ve kabarcık kavitasyonuna neden olurken şok dalgaları ise geçici membran geçirgenliğine yol açar. Bu durum plazmid DNA ve ilaçların tamamının kanserli dokuya girmesine neden olur [43] .

#### **2.5. Nanopartiküllere İlaç Yüklenmesi**

Nanopartiküller, ilaç yükleme prosesi için modern tıpta en çok çalışılan uygulamalardandır. Araştırmacıların ana ilgi alanı, ilacın kontrollü bir şekilde belirli bir bölgeye uygulayabilen bir formülasyonunun geliştirilmesidir. Bu bağlamda, uyarıya duyarlı nanopartiküllerin geliştirilmesi ve nanopartiküllere ilaç yüklenerek bir taşıyıcı formuna getirilmesi ile, ilaçların hedef bölgeye ulaşılabilirliğinin artması desteklenebilir [55].

İçerisine ilaç yüklenerek nanotaşıyıcı formuna getirilmek istenen nanopartiküller,

hücrenel alım için uygun biyouyumluluğa ve parçacık boyutuna, yüksek ilaç yükleme hızına ve/veya ilaç kapsülleme ve yakalama etkinliğine sahip olmalıdır. Tüm bu özelliklerin karşılanabilmesi için, matris materyalindeki ilacın oldukça iyi çözünmesi, ilaç-polimer etkileşiminin yeterli oranda olması gerekmektedir [56].

Nanopartiküllere ilaç yüklenmesi için; genellikle yükleme sonrası, birlikte yükleme ve ön yükleme şeklinde üç temel yöntem bulunmaktadır [57].

Son yükleme olarak tanımlanan yöntemde; ilaç yüklü nanopartiküller elde etmek için ilk olarak nanopartikülleri üretilir ve daha sonra ilaç yükleme işlemi gerçekleştirilir [57]. Bu yöntemde yüksek su içeriği ve gözenekliliği nedeniyle, önceden hazırlanmış nanopartiküllere difüzyon yoluyla ilaç molekülleri yüklenmektedir. Temel ilke olarak ilacı nanotaşıyıcıya (jel formunda) yönlendirmek için konsantrasyon gradyanını kullanır ve dengeye ulaşıldığında maksimum yükleme elde edilir. İlaç sadece jel ağında hapsolmuş sıvı fazda çözündüğünden, konsantrasyon gradyanı tersine çevrilir çevrilmez salım gerçekleşecektir. Başka bir deyişle, jel konsantre bir ilaç çözeltisine daldırıldığında yükleme meydana gelir ve jel izole edildiğinde ve yıkandığında ilaç salınımı hemen gerçekleşir. Bazı durumlarda, gözeneklere su veya solvent moleküllerinin girmesi matrisi şişirebilir, bu da gözeneklerin genişlemesine yol açarak ilaç moleküllerinin difüzyonunu kolaylaştırır [58].

Birlikte yükleme yönteminde ise, bir ilacın nanoparçacıkların oluşumu sırasında yüklenmesi veya kapsüllemesi gerçekleşir[57].

Ön yükleme metodunda ise, önce ilaç nanopartiküllerini üretilir, ardından ilaç çekirdeği stabilize edilir ve bu yapıyı koruyan bir kabuğun oluşumu gerçekleştirilir. Kabuk kalınlığını ayarlayarak, yüksek miktarda ilaç yüklü nanoparçacıklar yapılabilir. Kabuk kullanımı, ilaç salımını kontrol etmek için bir difüzyon bariyeri sağlar ve ayrıca ilaç çekirdeğini dış bozucu çevreden korur. Ayrıca kabuk, ayarlanabilir olduğundan istenen düzeyde salım sunacak şekilde tasarlanabilir [57].

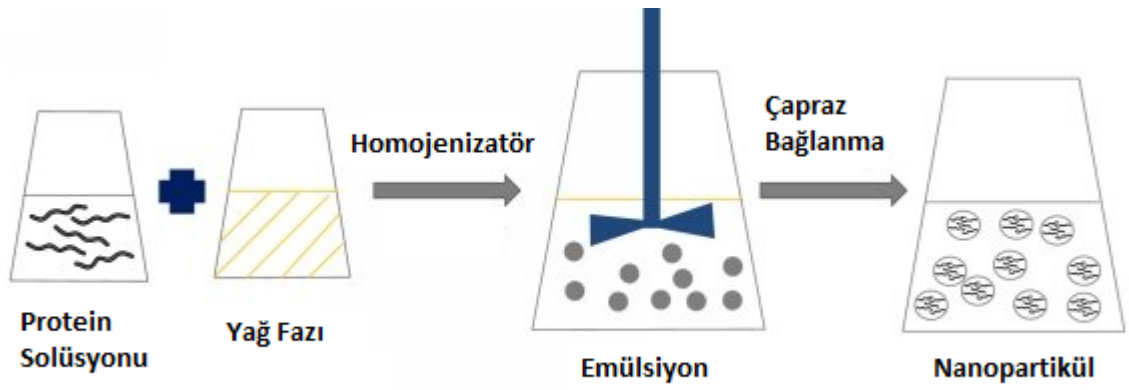
## **2.6. BSA Nanopartikül Üretim Yöntemleri**

BSA nanoparçacıklar, desolvasyon, emülsifikasyon, termal jelleşme ve nano püskürtmeli kurutma, nab-teknolojisi ve kendi kendine montaj (self assembly) gibi yöntemler kullanılarak üretilmektedirler [35].

Yapılan literatür çalışmalarında en sık kullanılan yöntemlerin desolvasyon ve

emülsifikasyon yöntemleri olduğu görülmüştür.

Emülsiyon/çözücü ekstraksiyon yöntemi yaygın olarak polimer nanopartiküller üretmek amacıyla kullanılırken aynı zamanda protein nanopartikülleri üretmek için de kullanılmaktadır. Emülsiyon, iki veya daha fazla karışmayan sıvının bir karışımı olup, bu yöntemde bir veya daha fazla sıvı başka bir sıvıya dağılır [31]. Emülsifikasyon yöntemi ise Şekil 10'da şematize edilmiştir. Emülsifikasyon yönteminin yüksek kararlılık, nanopartiküllerin şekli ve boyutunun reaksiyon koşulları ile kontrol edilebilmesi ve yüksek kapsülleme verimliliği gibi avantajları bulunurken çözünme ile elde edilenden daha büyük parçacıklar üretmek ve termodinamik kararsızlık gibi dezavantajları bulunmaktadır [31].



Şekil 10 Emülsiyon/çözücü ekstraksiyon yöntemi ile Nanopartikül hazırlanması [37]

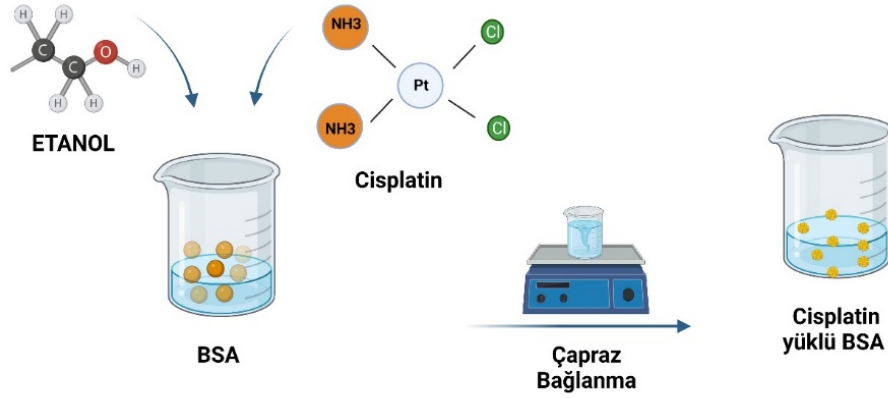
Desolvasyon, protein bazlı nanoparçacıkların üretimi açısından en yaygın kullanılan yöntemdir [59]. Desolvasyon yöntemi, ilaçları içeren protein çözeltilerine etanol ve aseton gibi desolvasyon ajanlarının eklenmesi gibi basit bir işlemle nanopartiküllerin sentezine izin verir. Desolvasyon ajanları protein yapısını değiştirerek proteinin çözünürlüğünü azaltır ve böylece protein nanoparçacıkları şeklinde çökme oluşumuna yol açar [60].

### 2.6.1. BSA Nanopartiküllerin Desolvasyon Yöntemi ile Üretilmesi

İlaç dağıtım uygulamalarında kontrollü ilaç salınım sistemleri için desolvasyon yöntemi BSA nanopartiküllerinin hazırlanması için basit ve hızlı bir yöntemdir [60].

Bu prosedürün kullanımı kolaydır, çünkü çözücü maddenin miktarı ve partikül boyutunu etkileyen ilave oranı gibi diğer potansiyel faktörler ihmal edilebilir düzeydedir. Bu nedenle, çözücü maddenin polimerik sulu çözeltiliye aralıklı olarak eklenmesi, gıda ve ilaç uygulamaları için nanoparçacıkların boyut kontrolü için yararlı olabilir [61].

BSA Nanopartiküllerinin desolvasyon yöntemi ile hazırlanması şekil 11’de verilmiştir. Görselde verildiği gibi desolvasyon ajanı olarak etanol kullanılmıştır.



Şekil 11 Desolvasyon Yöntemi ile BSA Nanopartikül Üretimi

Genel olarak partikül boyutu, hazırlama sırasında BSA içeriği, pH, iyonik kuvvet ve desolvasyon işlemi sırasında desolvasyon ajanının miktarı gibi farklı faktörlere bağlıdır. Koşullar aynı olduğunda, nanoparçacık boyutunun pH ayarlaması ile kontrol edilebileceği kanıtlanmıştır. Ayrıca çözücü maddeyi ekleme prosedürü, partikül boyutunun tekrarlanması ve kontrol edilebilmesi açısından önem teşkil etmektedir. Nanopartiküllerin yeniden üretilebilirliğini geliştirmek için, her çözücü ilavesinde yeterli reaksiyon süresine izin verilmelidir. Bunlara ek olarak reaksiyon süresi önemli bir parametre olarak belirlenmiştir [61].

BSA Nanopartiküllerin desolvasyon yöntemi ile hazırlanmasının çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Desolvasyon yönteminin avantajlarını yüksek stabilite, kolay üretim, küçük boyutlu nanopartikül üretimi, yüksek ilaç yükleme kapasitesi olarak belirtirken dezavantajı ise yalnızca çözünme işleminin kendisinden minimum düzeyde etkilenebilen veya taşıyıcı proteinler tarafından seyreltilebilen proteinler için mümkün olması olarak belirtilmektedir [31].

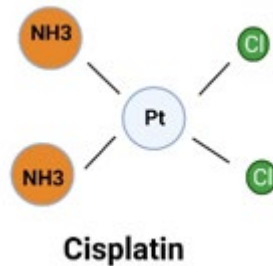
### 2.6.2. BSA'ya İlaç Yükleme

Albümin bazlı nanopartiküller toksik ve immunojenik olmamaları, biyogüvenli olmaları, dolaşımda kararlı olmaları ve biyobozunur olmaları sebebiyle özellikle ilaç salınım sistemlerinde kullanıldıklarında oldukça başarılı sonuçlar elde edilmektedir [62], [63]. Albümin, bir vasküler endotel membran proteini olan Glikoprotein 60 (Gp60) ile etkileşime girebilmekte ve bu sayede dolaşımdaki albümin partiküllerin; membran geçirgenliğinin artması ve hücre içine daha kolay alınması mümkün olmaktadır [64]ve Sığır Serum Albümin'i birbirine homoloji olarak %80 benzerlikte olup molekül ağırlığı bakımından ise %1'den daha az farklılık göstermektedir [26], [27]. Bu benzerlik sayesinde insan için geliştirmekte olan albümin kaynaklı nanomateryaller (nanopartikül, nanotaşıyıcı vb.) BSA kullanılarak üretilebilir. Bu nedenle biyoyumluluk oranının yüksek olacağı düşünülerek tez kapsamında nanopartikül üretmek için BSA tercih edilmiştir.

### 2.6.3. Cisplatin

Cisplatin, iyi bilinen ve mesane, baş ve boyun, akciğer, yumurtalık ve testis kanserleri başta olmak üzere kanserin tedavisinde kullanılan bir kanser ilacıdır. Cisplatin karsinomlar, germ hücreli tümörler, lenfomalar ve sarkomlar dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerine karşı etkilidir. Ayrıca, cisplatinin diğer ilaçlarla kombinasyon terapilerinin, ilaç direncinin üstesinden geldiği ve toksisiteyi azalttığı düşünülmektedir [67].

Sisplatin hücrelere difüzyon yoluyla nüfus eder. Sisplatin DNA çapraz bağlarının arasına girerek DNA replikasyonunu önlemektedir [68].



Şekil 12 Cisplatin Moleküler Yapısı

Cisplatinin moleküler yapısı, geçiş metali klorürleri olarak bilinen inorganik bileşikler sınıfına aittir. Bunlar, en büyük halojen atomunun Klor (Cl) olduğu ve en ağır metal atomunun bir geçiş metali olduğu inorganik bileşiklerdir.

Cisplatin, normal ilaç-protein bağlanmasının özelliği olan plazma proteinine ani ve geri dönüşümlü bağlanmaya uğramaz. Bununla birlikte, platinin kendisi albümin, transferrin ve gama globülin dahil olmak üzere plazma proteinlerine bağlanma yeteneğine sahiptir.

### 3. MATERYAL METOD

Sunulan tez kapsamında, kanser tedavisinde kullanılan bir kemotörapatik ilaç olan cisplatinin taşıyıcısı olarak BSA proteini kullanılmış ve bir nanotaşıyıcı formu geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu şekilde geliştirilen ilaç yüklü BSA kaplı nanopartiküllere farklı şiddetlerde ultrason uygulanarak, ultrason etkisinin ilaç salınımı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Bu bölümde öncelikle ilaç taşıyıcısı olarak kullanılacak içi boş BSA nanopartiküllerin optimizasyonu, BSA nanopartiküllere cisplatin ilacının yüklenmesi ve farklı genliklerde uygulanan ultrason etkisine bağlı gerçekleşen ilaç salınımı hakkında bilgi verilmiştir.

Sunulan tez kapsamında deneysel çalışmalar 3 ana işlem basamağında gerçekleştirilmiştir. İlk olarak BSA miktarı, çözücü miktarı ve karıştırma süresi nanopartikül boyutunu etkileyen 3 ana parametre olarak belirlenmiş ve en uygun partikül boyutunu elde etmek amacıyla deneyler gerçekleştirilmiştir. İkinci bölümde ise BSA nanopartiküllere farklı oranlarda cisplatin eklenerek ilaç yüklemek için en uygun (polimer: ilaç) oranı belirlenmiştir. Son basamakta ise 3 farklı genlikte ultrason etkisi uygulanmış ve genliğe bağlı olarak ortama salınan ilaç miktarı gözlemlenmiştir.

#### 3.1. Kullanılan Kimyasallar

##### 3.1.1. BSA Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Kimyasallar

Polimerik nanopartikülün üretilmesi sırasında BSA (Amresco, Amerika), %99.8 saflıkta etanol (Sigma-Aldrich, Almanya), ve de iyonize su kullanılmıştır.

##### 3.1.2. BSA Nanopartiküllere İlaç Yüklemede ve İlaç Salınımında Kullanılan Kimyasallar

BSA nanopartiküllere ilaç yükleme basamağında glutraldehit, cisplatin (Koçak Farma, İstanbul Türkiye), PBS (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır.

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Polimeri çözmek amacıyla saf su ve ultra saf su ihtiyacı için Merck'in Direct-Q modelindeki cihaz kullanılmıştır.



Kullanılan BSA miktarını belirlemek ve partikül miktarını tespit etmek için Weightlab Instruments markalı WL 303L modeli 0.001g'a kadar hassas ölçüm yapan terazi kullanılmıştır.

İlaç yüklemesi ve ilaç salınım sırasında ihtiyaç duyulan pH 7.4'teki ortamı sağlamak amacıyla Milwaukee markalı Mi 180 Bench meter modele sahip pH cihazı kullanılarak tampon çözelti pH'ı ayarlanmıştır. Cihaz doğru ölçüm için, pH'ı bilinen çözeltilerle deneysel işlemlerden önce kalibre edilmiştir.

BSA nanopartikülleri çözmek ve ilaç yükleme işlemleri sırasında Snijder markasına ait 34532 modeli manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

Üretilen BSA nanopartikülleri optimize etme sürecinde nanopartikül boyutunu tespit etmek amacıyla Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı'nda bulunan DLS (Dinamik Işık Saçılımı) tabanlı ölçüm alan Malvern Marka cihaz kullanılmıştır. Üretilen nanopartiküllerin ayırt edilmesi amacıyla Inovialab markasına ait BRC-5180T modeli santrifüj kullanılmıştır. Ayırıştırılan nanopartiküller Teknosem marka liyofilizatör ile kurutulmuştur.

Nanopartikülleri karakteriz etmek ve ilaç yüklemesini doğrulamak amacıyla Boğaziçi Üniversitesi Kandilli Kampüsünde bulunan Thermoscientific markalı Quattro S ColorSEM modeli taramalı elektron mikroskobu kullanılarak SEM (Taramalı Elektron Mikroskopi) analizi yapılmıştır.

İlaç yüklü nanopartiküllere farklı genliklerde ultrason etkisi uygulamak için BRANSON marka Ultrasonik Homojenizatör kullanılmıştır.

Ortamdaki ilaç salınımı görmek ve kalibrasyon eğrisi çıkartmak için Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliğinde Laboratuvarı'nda bulunan Termo SCIENTIFIC marka Nanodrop 1000 modelindeki UV-Visible spektrofotometre kullanılmıştır.

### **3.3. İlaç Taşıyıcı Nanopartikül Üretimi**

#### **3.3.1. BSA Nanopartikül Üretimi**

İlk olarak BSA nanopartikülleri en uygun boyut ve forma getirmek amacıyla partikül boyutunu etkileyen çeşitli parametreler belirlendi ve parametre optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu bağlamda BSA miktarı, çözücü miktarı ve karıştırma süresinin partikül boyutuna etkisini belirlemek amacıyla deneyler gerçekleştirildi.

**BSA NANOPARTİKÜL BOYUTUNU  
ETKİLEYEN 3 PARAMETRE**



Şekil 13 BSA nanopartikül boyutlarını etkileyen parametreler

Deneysel aşamada farklı oranlarda (%1'lik w/v, %1,5'lük w/v ve % 2'lik w/v) BSA 10 ml De iyonize suda manyetik karıştırıcı üzerinde iyice çözünene kadar karıştırıldı. Daha sonra üzerine BSA'yı çöktürmek amacıyla farklı miktarlarda (25 ml, 30 ml ve 75ml) %99,8 saflıkta etanol damla damla karıştırma esnasında eklenerek 800 rpm'de karıştırıldı. BSA nanopartiküllerin üretiminde karıştırma süresinin partikül boyutuna etkisi inceleneceğinden karıştırma süresi de 1 saat, 4 saat ve 6 saat olarak değiştirilerek partikül boyutu gözlemlendi. BSA nanopartiküller ilgili karıştırma süresi boyunca karıştırıldıktan sonra partikülleri solüsyondan ayırmak amacıyla 12.000 rpm de 10 dk boyunca 3 kez yıkama yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet kısmındaki partiküller liyofilizatörde 1 gece kurutuldu ve DLS tabanlı cihazla partikül hidrodinamik çapı incelendi.

Yapılan bu parametre çalışmasının ardından BSA nanopartikül üretmek üzere optimum koşullar belirlendi ve cisplatin yükleme basamağına geçildi.

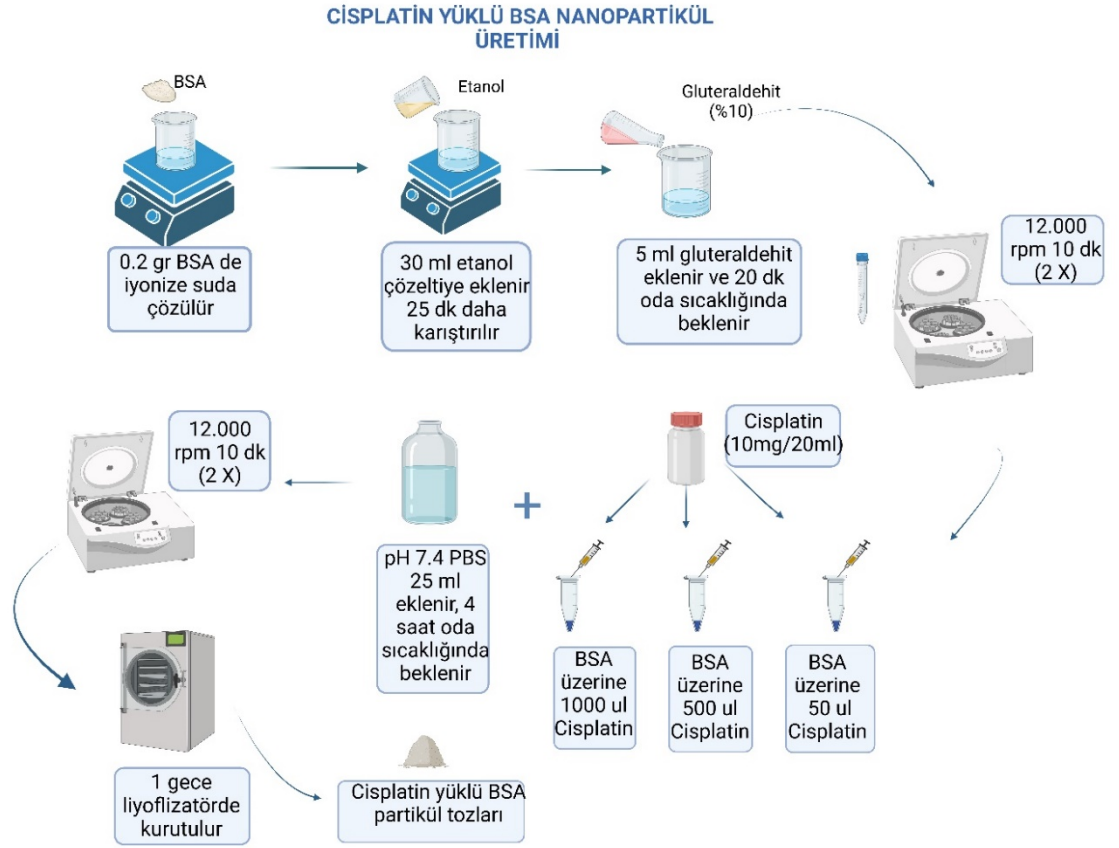


Şekil 14 BSA Nanopartikül Üretimi

### 3.3.2. BSA Nanopartiküllere İlaç Yüklenmesi

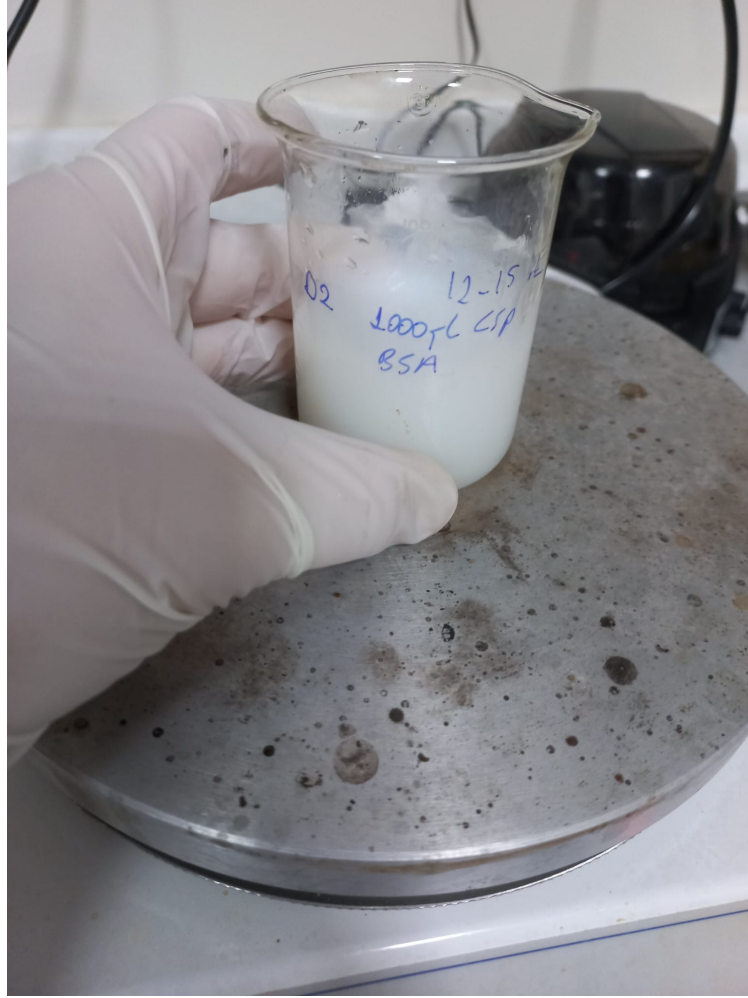
BSA nanopartikül üretimi için en uygun BSA ve çözücü miktarı ve karıştırma hızı belirlendikten sonra ilgili koşullar temel alınarak BSA nanopartiküle ilaç yükleme basamağına geçilmiştir. Bu işlem 2 ana basamakta gerçekleştirilmiş olup ilk basamakta BSA partiküller üretilmiş, diğer basamakta ise BSA nanopartiküllere farklı oranlarda cisplatin emdirilme yoluyla yüklenmiştir. Bu basamakta ilaç yükleme prosedürü için literatürdeki Tiwari ve arkadaşlarının prosedürü modifiye edilerek kullanılmıştır [69].

Boş aljinat köpüğün çapraz bağlanmasında kullanılan prosedür SA/CS/Met köpüklerinde de uygulandı ve ilaç salımında kullanılmak üzere oda sıcaklığında bekletildi.



Şekil 15 BSA nanopartiküllere Cisplatin Yükleme

Sunulan tez kapsamında ilaç yüklü nanopartikül üretimi prosedürü şu şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 0.2 gr BSA tartıldı ve 10 ml de iyonize suyla beraber manyetik karıştırıcıda 800 rpm’de iyice çözüne kadar karıştırıldı. BSA çözüldükten sonra üzerine 30 ml etanol eklendi ve 25 dk daha manyetik karıştırıcıda etanol ile BSA karıştırılarak BSA’nın partikül formunda çökmesi sağlandı. Daha sonra üzerine %10’luk 5 ml gluteraldehit eklendi ve 20 dk tezgâhta oda sıcaklığında bekletilerek BSA nanopartiküllerin sertleşmesi sağlandı. Nanopartikülleri solüsyondan ayırtırmak için 12.000 rpm de 10 dk santrifüjlenerek 2 kez yıkama yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine farklı miktarlarda (1000 µl, 500 µl ve 50 µl) cisplatin ve pH 7.4 ‘te 25 ml PBS (fosfat tamponu) eklendi ve 4 saat boyunca, ilacın partiküllere emdirilmesi için oda sıcaklığında beklendi. Ardından 12.000 rpm de 10 dk tekrar santrifüjlenerek 2 kez yıkama yapıldı. Örnekler (-20 C<sup>0</sup> ) de 4 saat boyunca dondurulduktan sonra liyofilizatörde kurutuldu.

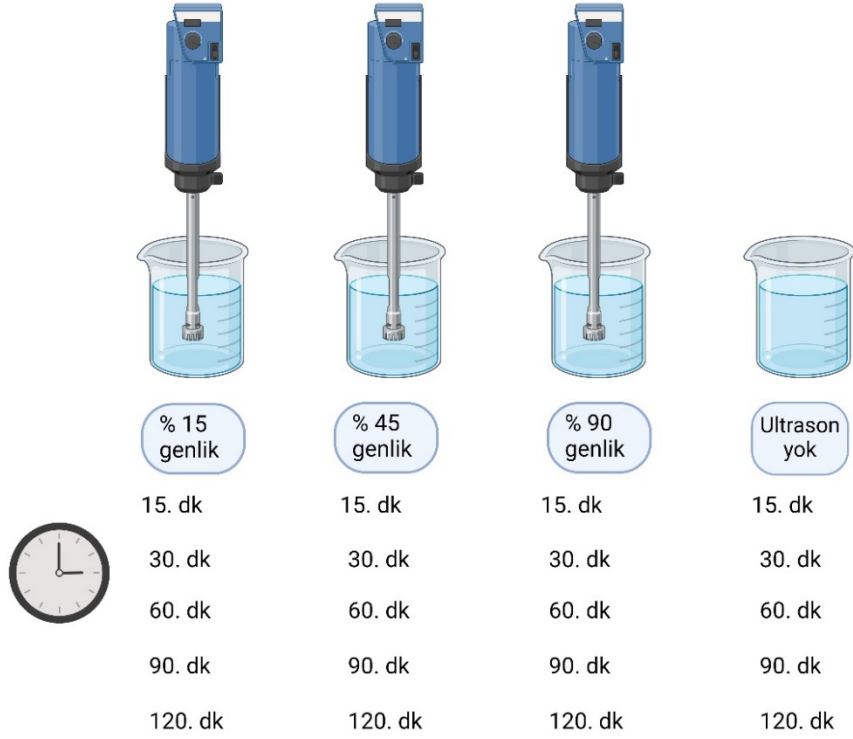


Şekil 16 BSA nanopartiküllere 1000 µl cisplatin yüklenmesi

### 3.3.3. Ultrason Etkisi ile İlaç Salınımı

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan Cisplatin yüklü BSA nanopartiküller liyofilizatörde kurutulduktan sonra SEM ile karakterizasyonu yapıldı ve içine ilacı yeterli oranda aldığı tespit edilen deney grubu (500 µl Cisplatin ve 0.2 gr BSA) ile salınım çalışmaları gerçekleştirildi.

Bu bağlamda ilk olarak Cisplatin yüklü kuru 10 mg BSA partikül tartıldı ve üzerine 10 ml pH 7.4 PBS tamponu eklendi. Bu aşamada ultrason etkisini incelemek üzere 3 farklı genlik ve bir de durgun salınımı izlemek amacıyla 4 deney grubu hazırlandı.



Şekil 17 İlaç yüklü BSA nanopartiküllere ultrason etkisinin uygulanması

Belirtilen deney gruplarından ilk üçüne ultrason etkisi şekil 18’de gösterilen Ultrasonik Homojenizatör aracılığıyla %15, %45 ve %90 genlikte 15, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda, 1 dk’lık periyotlar şeklinde deney gruplarına ayrı ayrı uygulandı. Durgun salınımın gözlemlendiği deney grubunda ise herhangi bir etki uygulanmadan 15, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda ölçüm alındı.



Şekil 18 Ultrasonik Homojenizatör



Şekil 19 Ultrasonik Homojenizatör ile deney gruplarına ultrason etkisinin uygulanması





Şekil 20 Ortamdaki ilaç salınımını belirlemek amacıyla kullanılan UV-visible spektroskopi cihazı (Nanodrop)

Deney gruplarına yukarıda anlatıldığı gibi 3 farklı genlikte aralıklı olarak 1 dk boyunca ultrason etkisi uygulandı ve BSA nanopartiküllerden ilaç salınımı değerlendirmek için her bir deney grubunda yapılan her bir ultrason uygulaması sonrasında örneklerden 1  $\mu$ l örnek alındı ve şekil 20'deki nanodrop cihazı ile 310 nm ölçüm alındı. Aynı şekilde ultrason etkisi uygulanmayan deney grubu için aynı zaman aralıklarında nanodrop cihazı ile ölçüm alındı.

Nanodrop cihazı ile ölçülen absorbans değerlerini konsantrasyon değerleri ile ilişkilendirmek amacıyla konsantrasyonu bilenen miktarlarda Cisplatin, PBS tampon çözeltisinde çözülerek seyrelti eğrileri hazırlandı ve kalibrasyon grafiği çıkarıldı. Kalibrasyon grafiği için ilk olarak doğrudan flakon içerisinden 1  $\mu$ l örnek alınıp nanodrop ile absorbansı ölçüldü ve farklı dalga boyları için absorbans taraması yapıldı. Buna göre 310 nm'de cisplatin için maksimum absorbans gözlemlendi. Bu dalga boyu tüm ilaç salınım deneyleri ve kalibrasyon eğrisi oluşturma sırasında referans olarak kullanıldı ve tüm



ölçümler bu dalga boyunda gerçekleştirildi. Ardından flakon içerisindeki cisplatin 1/5, 1/10, 1/20, 1/50 ve 1/100 oranında seyreltilerek 310 nm’de absorbans ölçümü yapıldı. Bu şekilde elde edilen kalibrasyon eğrisi, ilaç salınım deneylerindeki absorbansa bağlı konsantrasyonu tespit etmek amacıyla kullanılmıştır.

#### **3.3.4. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartiküllere Sitotoksosite Testi**

Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan Cisplatin yüklü BSA nanopartiküller 0,2 gr BSA + 10 ml dı Su + 500 µl cisplatin 1/4, BSA/Cisplatin kurutulduktan sonra bağımsız bir laboratuvara TS EN ISO 10993-5(Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi- Bölüm 5: İn vitro sitotoksosite testleri) standardına göre sitotoksiste analizine gönderilmiştir.

Numunenin analiz edilmesi için L-929 (fare subkutanöz bağ dokusu) hücre hattı kullanılmıştır. Kültür ortamı olarak FMEM+ L-Glutamin, FTAL Bovine Serum, Penisilin-Streptomisin kullanılmaktadır. Analiz kontrolleri için kör kontrolde steril hücre kültürü ortamı, negatif kontrol için Polietilen Kryo Tüp+ Hücre ve pozitif kontrol için doğal kauçuk Lateks + Hücre kullanılmıştır.

Sitotoksosite analizi özütleme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Özütleme yöntemi, hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitesinin bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılır.

TS EN ISO 10993-12 (Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi- Bölüm 12: Test Numunesi Hazırlama ve Referans Materyeller) standardına belirtildiği üzere %10 serumlu hücre kültürü ortamı içerisinde 24 saat, 37 °C’de, 50 rpm hızda salınım yapan su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra özütleme sonlandırılarak elde edilen özüt 24 saat içinde kullanılmıştır.

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara ekilerek konfluent hale gelmesi beklenmiş olup daha sonra 37°C %5 CO<sub>2</sub> etüvde 24 saat boyunca negatif, pozitif kontrol ve numune özütlerine maruz bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler mikroskopik olarak incelenmiştir.

Deney, kuyucuklara isopropil alkol eklenerek sonlandırılarak plakalarda oluşan renk değişikliği spektrofotometre de ölçüm yapılarak % canlılık hesaplanmıştır.

## 4. DENEYSEL BULGULAR

### 4.1. BSA Nanopartikül Boyutu Optimizasyonu

Materyal metot kısmında da belirtildiği üzere tez kapsamında gerçekleştirilen ilk deneysel aşama en uygun partikül boyutunu yakalayabilmek adına yapılan parametre çalışmasıdır. Bu bağlamda karıştırma süresi, BSA miktarı ve etanol miktarının partikül boyutunu etkileyen faktörler olduğu literatürdeki daha önceki çalışmalardan belirlenmiştir. Bu doğrultuda belirlenen parametreler değiştirilerek BSA üretimi tekrarlanmış ve üretilen nanopartiküllerin boyutu DLS tabanlı Malvern marka cihaz ile ölçülmüştür. Ardından partikül boyutu istenen değer aralığında kalan örnekler SEM ile analiz edilmiş ve böylece boş BSA nanopartikül üretim protokolü çıkarılmıştır. Deneysel işlemlerin ilerleyen basamaklarında burada optimize edilen değerler kullanılmıştır.

#### 4.1.1. BSA Nanopartikül Boyut Analizi

İçerik boş BSA nanopartikül üretiminde çalışılan ilk parametre BSA miktarıdır. BSA miktarının partikül boyutuna etkisini incelemek amacıyla Tablo 1’de verildiği gibi deney seti hazırlanmış 0.1 gr, 0.15gr ve 0.2 gr BSA; 30 ml etanol ve 10 ml de iyonize su ile birlikte 800 rpm de 1 saat karıştırılmış olup partikül boyutu yine tablo 1 ‘de verildiği gibi elde edilmiştir.

Tablo 3 BSA Miktarının Partikül Boyutuna Etkisi

Bsa Miktarı	Çözücü Miktarı	Karıştırma Süresi	Partikül Boyutu
% 1 BSA w/v (0.1 gr BSA)	30 ml etanol	800rpm/ 1 saat	841 nm
%1.5 BSA w/v (0.15 gr BSA)	30 ml etanol	800rpm/ 1 saat	296 nm
%2 BSA w/v (0.20 gr BSA)	30 ml etanol	800rpm/ 1 saat	124 nm

Buna ek olarak çözücü olarak kullanılan etanol miktarının partikül boyutu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla Tablo 2’deki deney düzeneği kurulmuş 25 ml, 30ml ve 75 ml

etanol: 0.1gr BSA, 10 ml de iyonize su ile yine 1 saat boyunca 800 rpm de karıştırılmış ve partikül boyutu tablodaki gibi elde edilmiştir.

Tablo 4 Çözücü Miktarının Partikül Boyutuna Etkisi

Çözücü Miktarı	BSA Miktarı	Karıştırma Süresi	Partikül Boyutu
25 ml Etanol	1 BSA (0.1 gr BSA)	800rpm/ 1 saat	2400nm
30 ml Etanol	1 BSA (0.1 gr BSA)	800rpm/ 1 saat	841nm
75 ml Etanol	1 BSA (0.1 gr BSA)	800rpm/ 1 saat	669.3nm

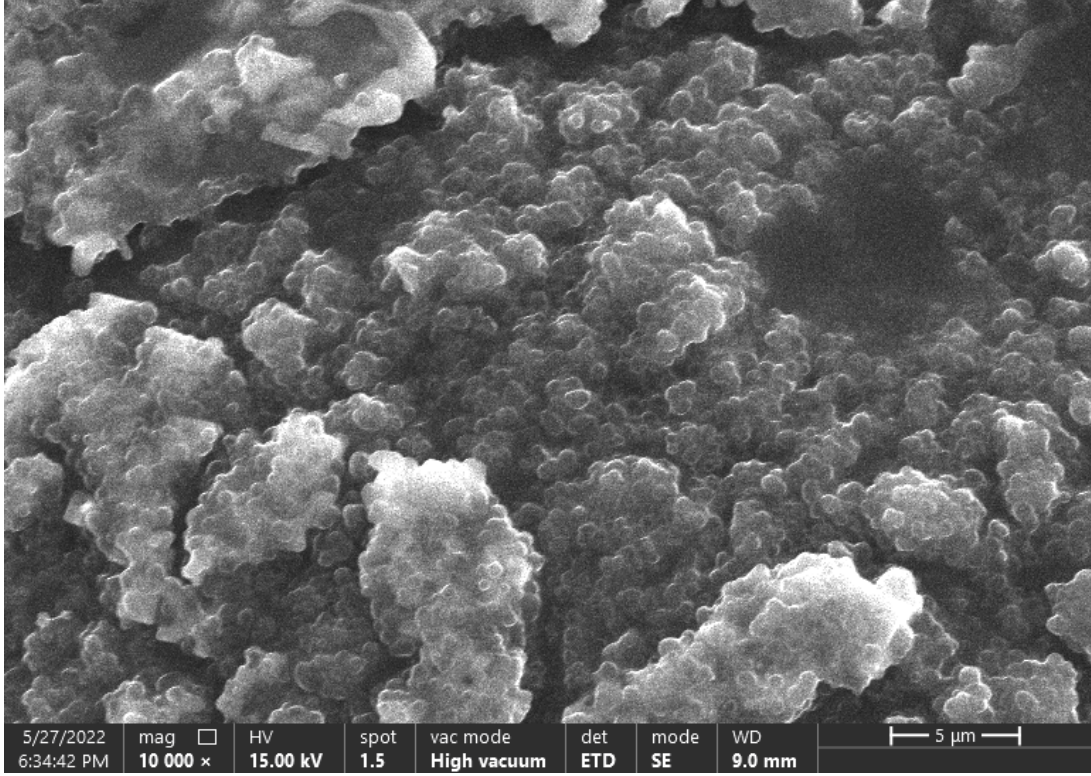
Son olarak partikül boyutunu etkileyen bir diğer parametre olan karıştırma süresi Tablo 3'teki gibi 1 saat, 4 saat ve 6 saat olacak şekilde değiştirilmiş 0.1 gr BSA, 10 ml de iyonize su ve yine 30 ml etanol kullanılarak partikül boyutu ölçülmüştür.

Tablo 5 Karıştırma Süresinin Partikül Boyutuna Etkisi

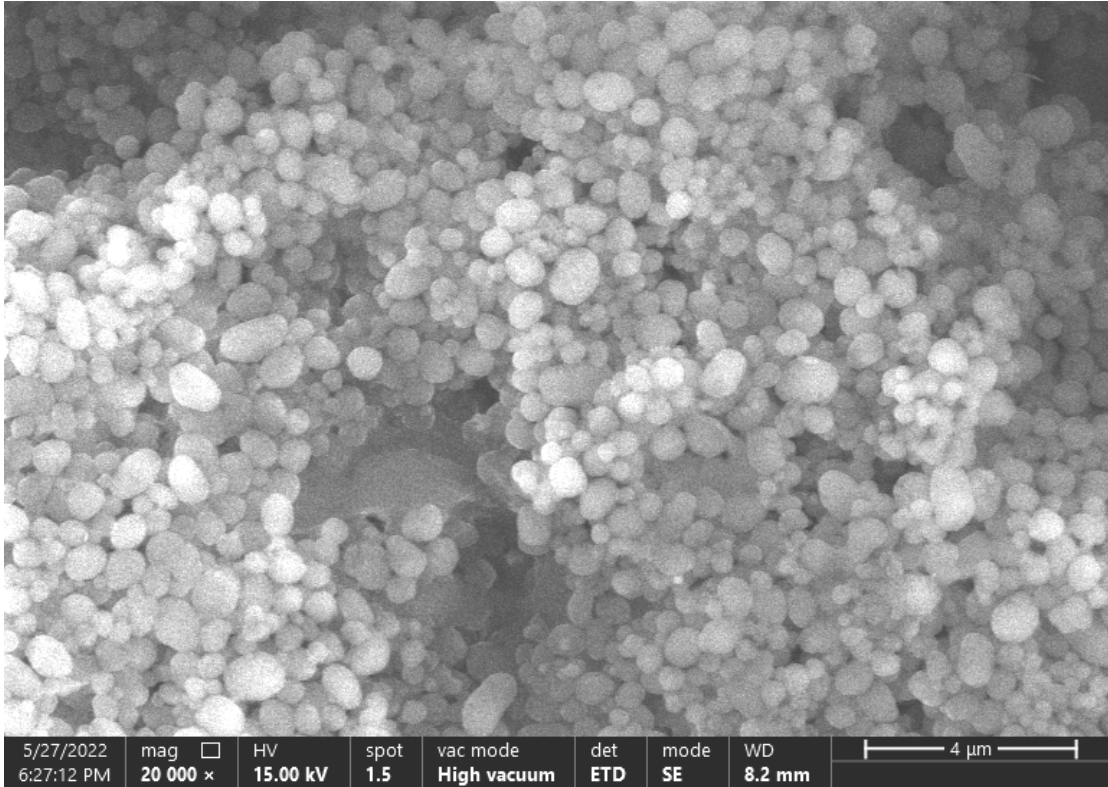
Karıştırma Süresi	BSA miktarı	Çözücü Miktarı	Partikül Boyutu
800rpm/ 1 saat	%1 BSA w/v (0.20 gr BSA)	30 ml Etanol	989nm
800rpm/ 4 saat	%1 BSA w/v (0.20 gr BSA)	30 ml Etanol	551.8nm
800rpm/ 6 saat	%1 BSA w/v (0.20 gr BSA)	30 ml Etanol	250 nm

#### 4.1.2. BSA Nanopartiküllerin Morfolojik Karakterizasyonu

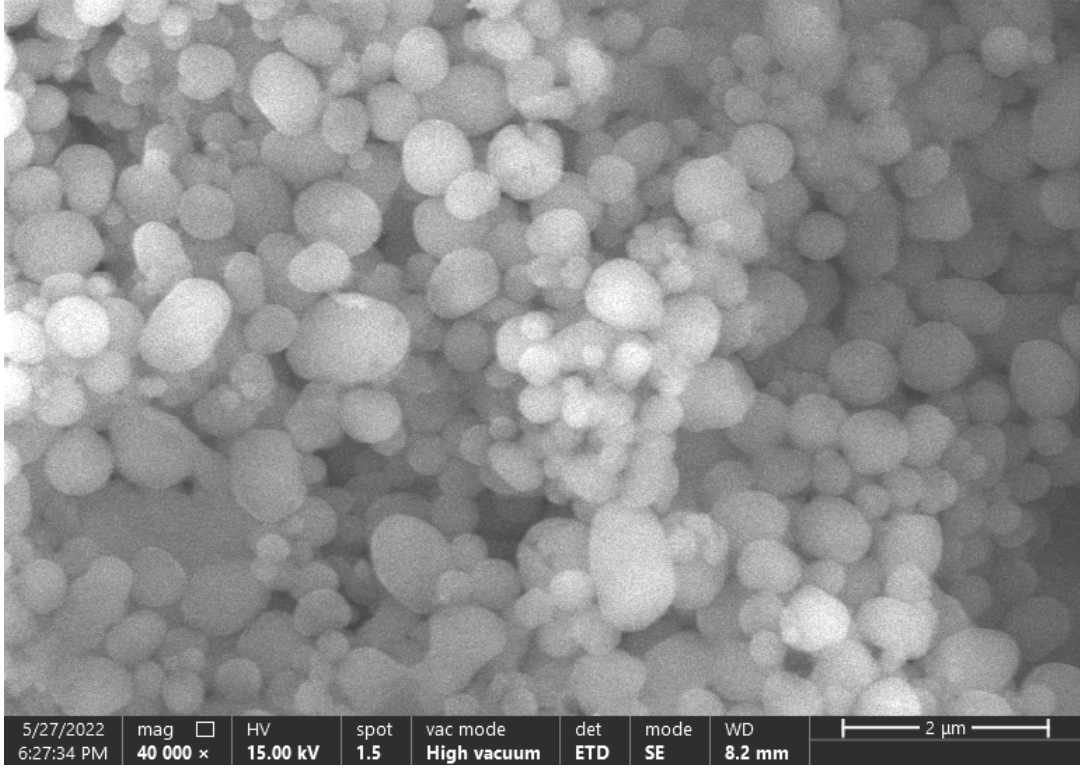
Üretilen BSA nanopartiküllerin morfolojik karakterizasyonu SEM kullanılarak yapılmıştır. İçi boş BSA nanopartiküllerin yapısının gözlemlenmesi, varsa aglomerasyonun tespit edilmesi ve boyutunun doğrulanması amacıyla SEM görüntüleri çekilmiştir.



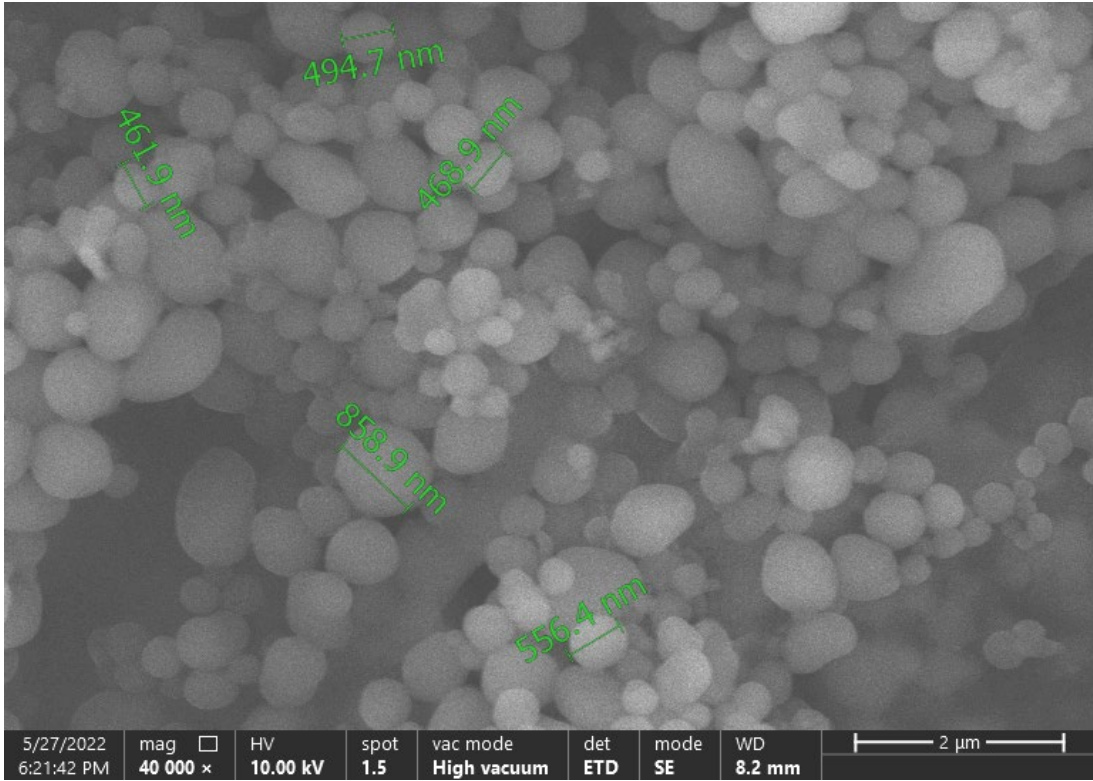
Şekil 21 İçi boş BSA nanopartikül SEM görüntüsü morfolojik yapısı büyütme oranı X 10.000



Şekil 22 İçi boş BSA nanopartiküller SEM görüntüsü büyütme oranı X 20.000

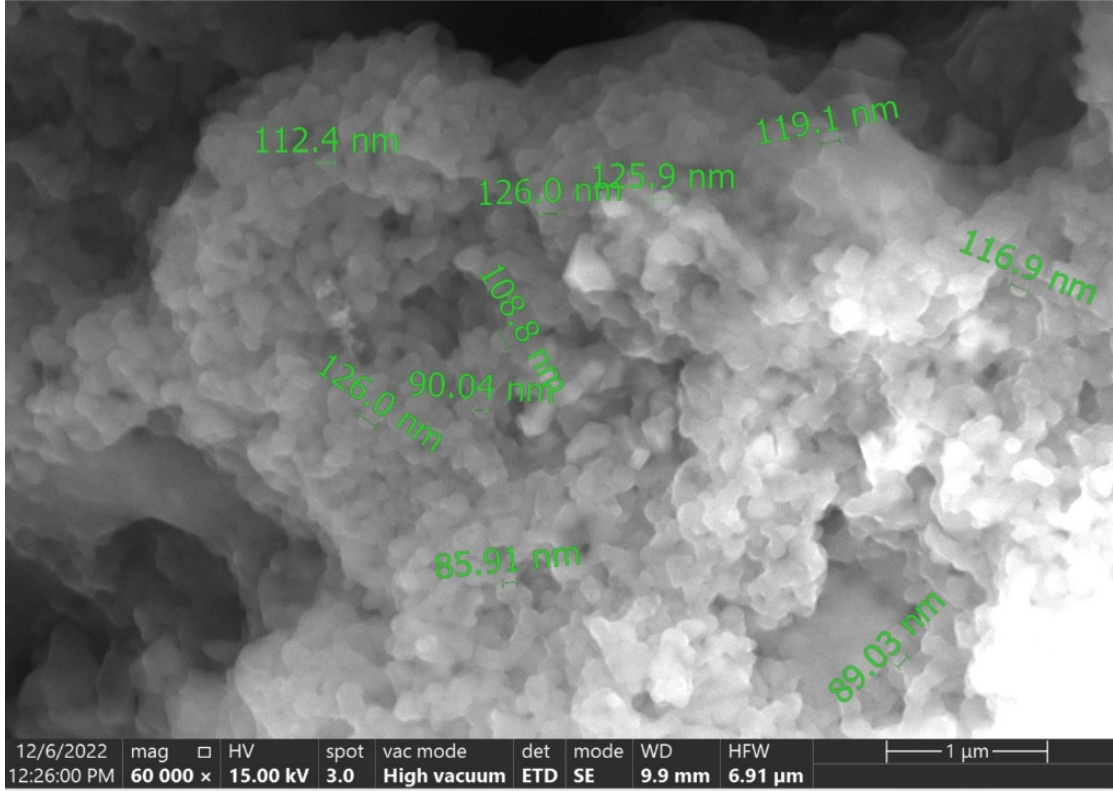


Şekil 23 İçi boş BSA nanopartiküller SEM görüntüsü büyütme oranı X 40.000



Şekil 24 İçi boş BSA nanopartikül %1 w/v BSA, 30 ml etanol ve 4 saat karıştırma için partikül boyutu ölçüm sonucu, büyütme oranı X 40.000

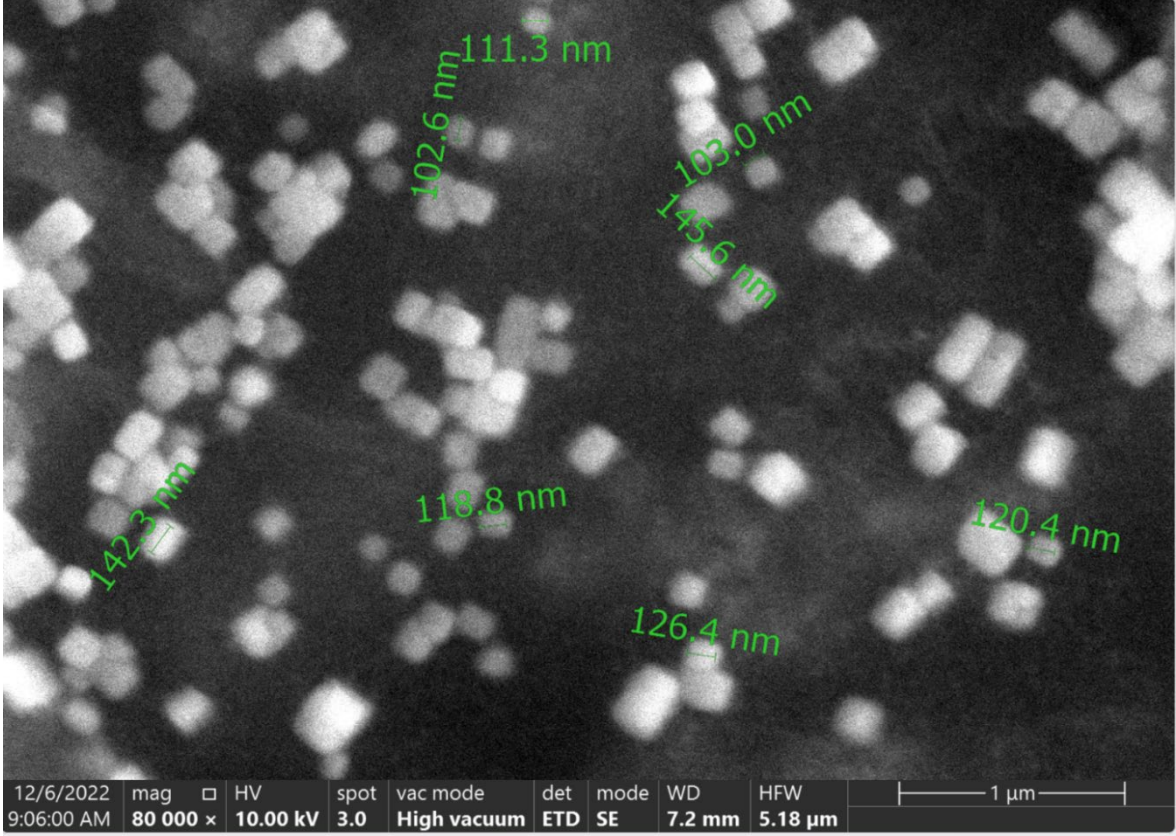




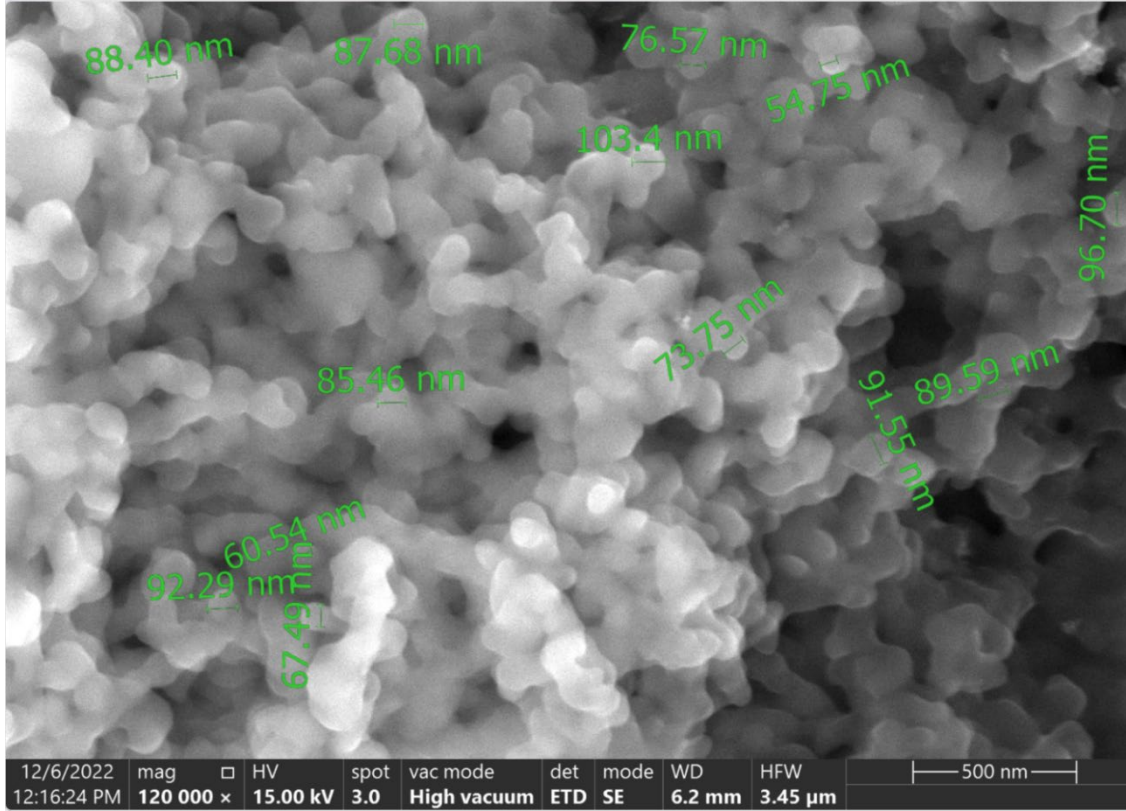
Şekil 25 İçi boş BSA nanopartikül %2 w/v BSA, 30 ml etanol ve 1 saat karıştırma için partikül boyutu ölçüm sonucu, büyütme oranı X 60.000

#### 4.2. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartikül Karakterizasyonu

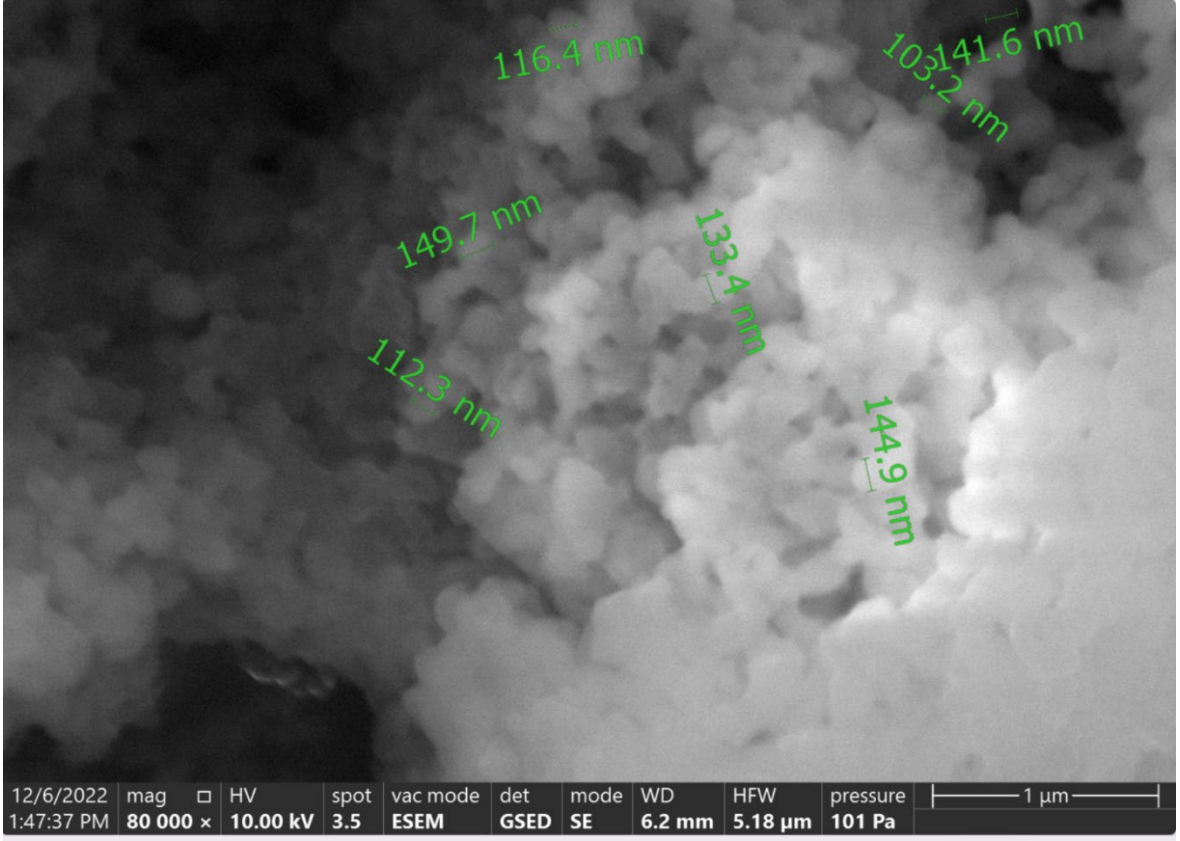
Üretilen BSA nanopartiküllere Bölüm 3 materyal metot kısmında anlatıldığı gibi Cisplatin ilacı yüklenmiştir. Bu işlem sırasında en uygun ilaç/ BSA oranını tespit etmek için farklı miktarda ilaç yüklenerek 3 farklı deney seti gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda 1000 µl Cisplatin ve 0.2 gr BSA içeren deney seti için BSA/cisplatin (1:2) oranı olarak, 500 µl µl Cisplatin ve 0.2 gr BSA içeren deney seti için BSA/cisplatin (1:4) oranı olarak ve 50 µl Cisplatin ve 0.2 gr BSA içeren deney seti için BSA/cisplatin (1:8) oranı olarak adlandırılmıştır. Yapılan bu ilaç yükleme işlemi sonrasında en verimli oran aşağıda verilen şekil 26, şekil 27 ve şekil 28 numaralı SEM görüntülerinden yola çıkılarak tespit edilmiştir.



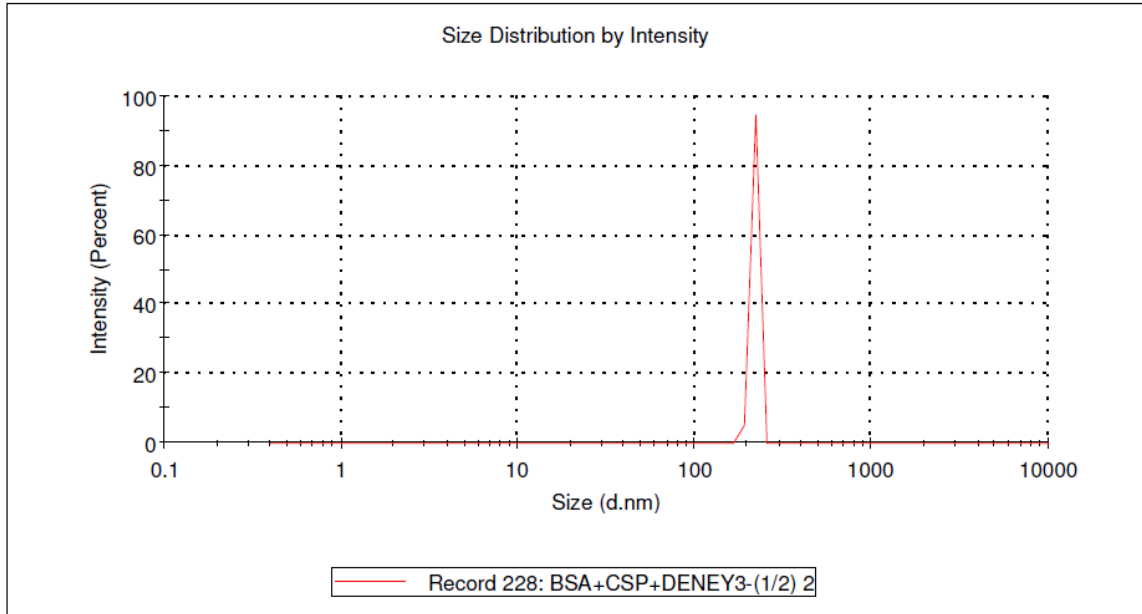
Şekil 26 0,2 gr BSA, + 1000 µl cisplatin (1/2 , BSA/Cisplatin), büyütme oranı X 80.000



Şekil 27 0,2 gr BSA ve 50 µl cisplatin (1/8 , BSA/Cisplatin), Büyütme oranı X 120.000



Şekil 28 0,2 gr BSA ve 500 μl cisplatin (1/4, BSA/Cisplatin), Büyütme oranı X 80. 000

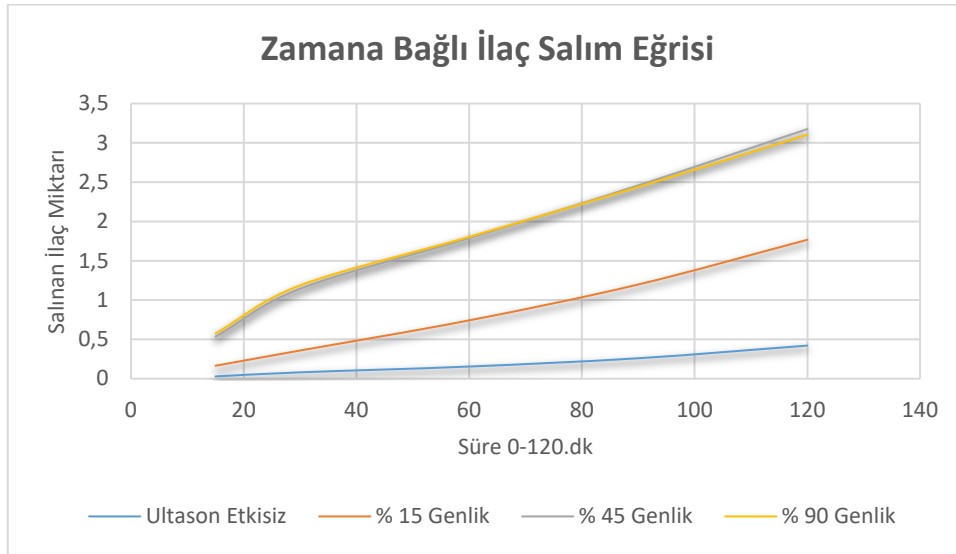


Şekil 29 0,2 gr BSA ve 1000 μl cisplatin (1/2, BSA/Cisplatin), Boyut dağılımı



### 4.3. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartikül İlaç Salınım Profilleri

Bölüm 3'te de belirtildiği üzere BSA nanopartiküllere 3 farklı oranda (1000 µl, 500 µl ve 50 µl) Cisplatin yüklenmiştir. Ardından SEM analizi yapılmış ve %2'lik w/v BSA kullanımı için en uygun ilaç miktarı belirlenmiştir. Bu doğrultuda tez kapsamında (BSA/Cisplatin) için 1/4 oranı hem partikül boyutu hem de partikül içerisine hapsettiği ilaç miktarı bakımından en uygun bulunmuştur. Bu nedenle farklı genliklerdeki ultrason uygulamasının ilaç salınımı üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla (1/4), BSA/Cisplatin oranı yani 0.2 gr BSA ve 500 µl Cisplatin içeren Şekil 15'teki deney grubu kullanılmıştır. Bu bağlamda deney grubuna ait 4 farklı numune hazırlanmış ve pH 7.4 PBS tamponunda çözülmüştür. Numuneler sırasıyla %15, %45 ve %90 genlikte ultrason şiddetine 2 saat boyunca 15. dk, 30. dk, 60. dk, 90.dk ve 120. dk'larda 60 saniyeliliğine ultrason etkisine maruz bırakılmıştır. Numunelerden biri ise bazal seviyedeki ilaç salınımını gözlemlemek amacıyla herhangi bir ultrason etkisine bırakılmadan yukarıda belirtilen aralıklarla ölçüm alınmıştır.



Şekil 30 Ultrason etkisinin uygulandığı 3 farklı genlikteki (%15, %45 ve %90) ve ultrason etkisinin uygulanmadığı durum için ilaç salınım profili, zamana bağlı ilaç salınım miktarına ait eğri

### 4. 4. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartiküllerin Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

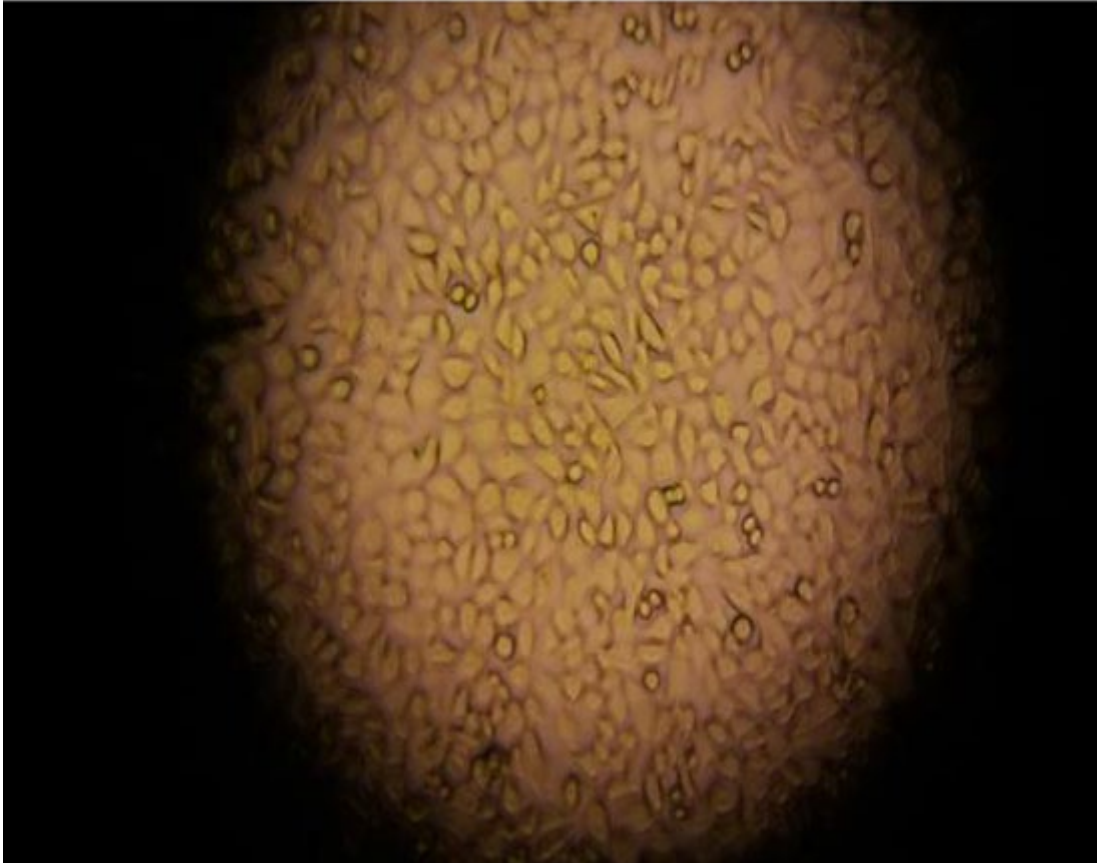
Bölüm 3'de anlatıldığı gibi hazırlanan Cisplatin yüklü BSA nanopartiküller 0,2 gr BSA + 10 ml dı Su + 500 µl cisplatin 1/4, BSA/Cisplatin kurutulduktan sonra bağımsız bir laboratuvara TS EN ISO 10993-5(Tıbbi cihazların biyolojik değerlendirilmesi- Bölüm 5: İn

vitro sitotoksisite testleri) standardına göre sitotoksiste analizine gönderilmiştir. Analiz sonuçları nitel ve nicel olmak üzere iki şekilde değerlendirilmiştir.

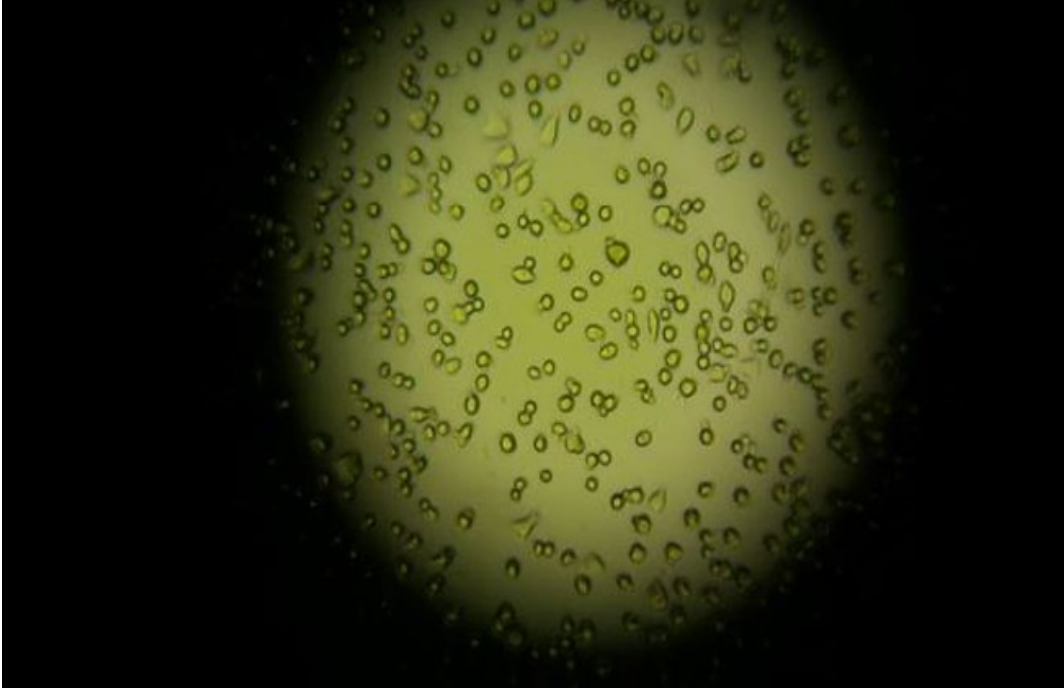
#### **4.4.1. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartiküllerin Sitotoksisitesinin Nitel Değerlendirilmesi**

Nitel değerlendirme için özütlerin, hücreler üzerinde yarattığı etki mikroskopik olarak incelenmiş olup standartta verilen ‘’ özütlerin sitotoksisitesinin nitel morfolojik derecelendirilmesi’’ başlığı altında değerlendirilmiştir.

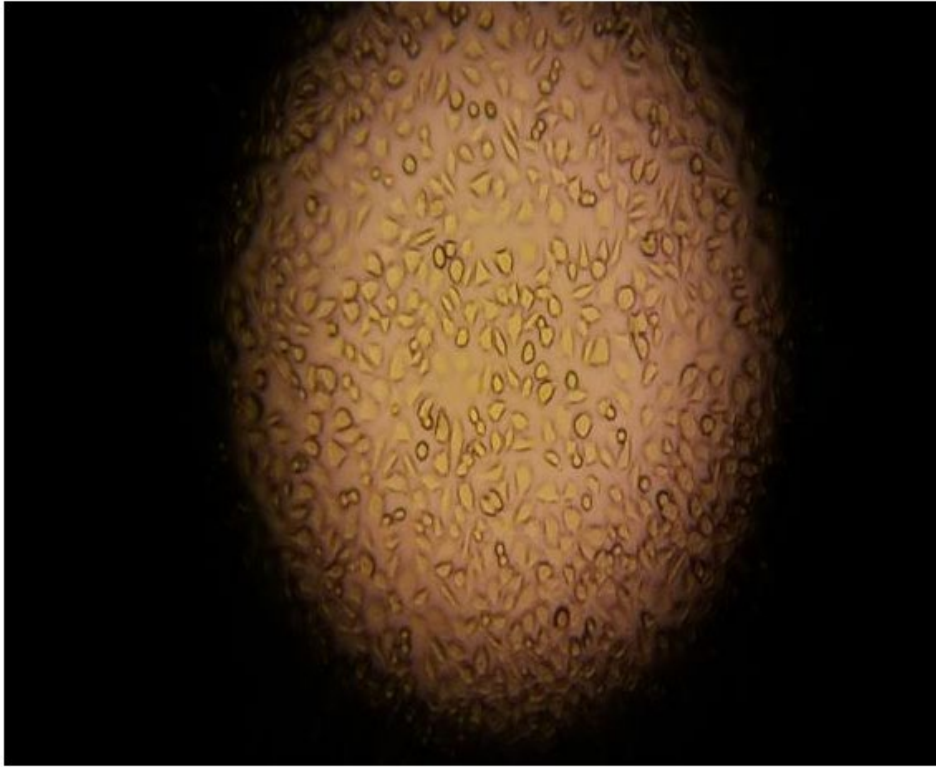
Negatif kontrol hücreler üzerinde toksik etki göstermezken (0) pozitif kontrolde yüksek derecede (4) toksik özellik gösterdiği görülmüştür. Cisplatin yüklü BSA nanopartikül özütlerinin sitotoksik etkisi incelerek toksik etki göstermediği (0) görülmüştür.



Şekil 31 Negatif kontrolün mikroskopik incelemesi



Şekil 32 Pozitif kontrolün mikroskobik incelemesi



Şekil 33 Cisplatin yüklü BSA partiküllerin mikroskobik incelemesi

Hücre kültür durumlarının mikroskopik incelemesi sonuçları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 6 Sitotoksiste Nicel Değerlendirme Analiz Sonuçları

<b>Test Materyali</b>	<b>Reaksiyon</b>	<b>Hücre Kültürlerin Durumları</b>
NEGATİF KONTROL	0	Ayrık stoplazma içi granüller,hücre yıkımı yok,hücre çoğalmasında azalma yok
POZİTİF KONTROL	4	Hücre katmanlarının tamamı veya tamamına yakını yıkıma uğramış
CİSPLATİN YÜKLÜ BSA NANOPARTİKÜLLERİ	0	Ayrık stoplazma içi granüller,hücre yıkımı yok,hücre çoğalmasında azalma yok

#### **4.4.2. Cisplatin Yüklü BSA Nanopartiküllerin Sitotoksitesinin Nicel Değerlendirilmesi**

Nicel değerlendirme metodu olarak EN ISO 10993-5 Sitotoksiste Deneyi kullanılmış olup elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kullanılan negatif ve pozitif kontrolden alınan sonuçlar ile testin geçerliliği kanıtlanmıştır. Aşağıdaki tabloda istatistiksel değerlendirme sonuçları verilmiştir.

Tablo 7 Sitotoksiste Nitel Değerlendirme Analiz Sonuçları

DİLÜSYON ORANLARI						
TEST NUMUNESİ	100%	75%	50%	25%		
1. TEKRAR	1,044	1,139	1,155	1,240		
2. TEKRAR	1,031	1,133	1,160	1,238		
3. TEKRAR	1,020	1,137	1,157	1,242		
ORTALAMALAR	1,032	1,136	1,157	1,240		
POZİTİF KONTROL	100%	75%	50%	25%		
1. TEKRAR	0,122	0,150	0,154	0,233		
2. TEKRAR	0,130	0,142	0,150	0,236		
3. TEKRAR	0,119	0,146	0,140	0,236		
ORTALAMALAR	0,124	0,146	0,148	0,235		
Negatif Kontrol(%100)	1.Tekrar	2.Tekrar	3.Tekrar			
%100 Ekstrakt	1,115	1,128	1,140			
ORTALAMALAR	1,128					
Blank	A2	A3	A4	A5	A6	A7
	1,15	0,999	1,20	1,16	1,10	0,992
	H2	H3	H4	H5	H6	H7
	1,07	0,980	1,13	1,11	1,07	1,06
ORTALAMALAR	1,085					

Bu deneyde numune özütünün 1/1 dilüsyonlarının hücreler üzerine olan etkileri incelenmiş olup; Cisplatin yüklü BSA nanopartiküllerden elde edilen özütün tam dilüsyonu ile canlılık %95 olarak tespit edilmiştir. Pozitif kontroller sonucu %11 iken negatif kontrol sonucu %104 olarak hesaplanmıştır.

Standartta belirtildiği üzere hücre canlılığının %70 değerinden az olması sitotoksik göstergesi olduğundan Cisplatin yüklü BSA nanopartiküllerin %95 hücre canlılığı ile sitotoksik özellik göstermediği görülmüştür.

## 5.SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında kanser tedavisinde kullanılmak üzere protein yapılı bir nanopartikül geliştirilmesi ve içerisine bir kanser ilacı olan Cisplatinin yüklenmesi hedeflenmiştir. Ardından bu partiküle ultrason etkisi uygulanmış ve değişen genliklerdeki ultrason uygulamasının nanopartikülden ilaç salımı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında ilk olarak BSA nanopartikül boyutunu etkileyen parametrelerden öne çıkan üç tanesi; karıştırma süresi, BSA miktarı ve çözücü miktarı olarak belirlenmiştir. Bu bağlamda yapılan deneyler sonucunda, hücre içine partikül alımını kolaylaştıran optimum partikül boyutunu ve morfolojik olarak en düzgün yapıyı veren %2 w/v BSA, 10 ml De iyonize su, 30 ml saf etanol ve 1 saat 800 rpm'de karıştırma formülasyonu belirlenmiştir. Yapılan bu optimizasyon sürecinde boş BSA nanopartiküllerin boyutu ortalama 100 nm olarak belirlenmiş ve küresel benzeri şekli SEM görüntülemesi ile doğrulanmıştır. İçi boş olan BSA nanopartiküller uygun boyut için optimize edildikten sonra cisplatin yükleme basamağına geçilmiştir. Bu aşamada 0.2 gr BSA içeren üç ayrı örneğe sırasıyla 1000 µl, 500 µl ve 50 µl ilaç yüklenmiş ve yapılan SEM analizleri sonucunda en verimli ilaç yüklemesinin 500 µl cisplatin içeren örnekte olduğu görülmüştür. 1000 µl ilaç içeren örnekte BSA miktarına kıyasla ilaç miktarının fazla olduğu ve bu nedenle BSA nanopartiküllere ilaç yüklenmesinden ziyade, BSA'nın, cisplatin kristallerinin etrafını ince bir tabaka olarak sardığı görülmüştür. Bu durum ultrason etkili ilaç salınım deneyi için istenen bir durum olmadığından 1000µl Cisplatin içeren örnek bir sonraki aşama olan ultrason uygulaması sırasında kullanılmamıştır. Aynı şekilde 50 µl ilaç içeren örnekte ise ilaç miktarının oldukça az olmasından dolayı BSA partiküller içine yeterli miktarda Cisplatin hapsolamadığı ve BSA nanopartiküllerin kendi içine büzüşerek partikül boyutunu 100 nm'nin altına kadar düşürdüğü görülmektedir.

Üretilen BSA nanopartiküllerin dolaşıma verildiğinde hücreler tarafından hem daha kolay içeri alınabilmesi hem de retikulaendotelyal sistemden kaçınarak dokuya ulaşmasının sağlanması için partikül boyutunun çalışmanın başında da hedeflendiği gibi 100 ile 200 nm arasında kalması ve BSA nanopartiküllere cisplatin yüklendikten sonra da bu boyutun korunması sağlanmıştır.

Tez kapsamında en uygun oranda BSA ve Cisplatin içeren formülasyon belirlendikten sonra ise tezin ana amacı olan ultrason etkisi ile ilaç salım profilinin incelenmesi basamağına geçilmiştir. Bu aşamada 500 µl Cisplatin ve 0.2 gr BSA içeren nanopartikül tozları pH 7.4 PBS tamponunda %15, %45 ve %90 genlikte ultrasona

belirtilen zaman aralıklarında maruz bırakılmıştır. Her bir ultrason uygulaması 60 saniye boyunca yapılmış ve uygulama sonrasında UV-visible spektroskopi ile ölçüm alınmıştır. Bu bağlamda zamana bağlı ilaç salınım eğrisinde görüldüğü üzere ultrason etkisi yapılmayan deney grubunda zamana bağlı ilaç salınımı bazal seviyede gerçekleşirken %15 genlik uygulandığında ilaç salınımı bazal profilden yaklaşık 3,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Buna karşın %45 genlik de ultrason uygulandığında BSA nanopartiküllerden ilaç salınımı gözle görülür seviyede fazla olmuş ve ultrason etkisinin uygulanmadığı bazal seviyeye oranla yaklaşık 6,5 kat fazla salınım olduğu görülmüştür. Bununla birlikte %90 genlik uygulanması durumunda da %45 genlik durumu ile oldukça yakın bir ilaç salınım profili kaydedilmiştir. Bu durumun sebebi olarak %45 genlikte maksimum ilaç salınımının gerçekleştiği ve bu değerden sonra genliğin artırılması halinde ilaç salınım profilinde kayda değer bir değişim gerçekleşmediği gösterilebilir. Yapılan araştırma sonuçlarından da görüldüğü üzere 500 µl Cisplatin yüklü BSA nanopartiküllerden ilaç salınımı için %45 genlikteki ultrason uygulaması bazal seviyeye kıyasla oldukça etkin bir şekilde ilaç salınımı desteklemektedir.

İlaç salınım profillemesinin çıkarılmasının ardından üretilen BSA nanopartiküllerin hücresel seviyede herhangi bir toksisitesinin olup olmadığının gösterilmesi ve in vivo uygulamaya geçilmesi halinde diğer dokularda toksisiteye bağlı bir endişe yaratmaması amacıyla bağımsız bir laboratuvara sitotoksosite testleri yaptırılmıştır. Yapılan bu testin standardı doğrultusunda %70 ve üzeri hücre canlılığı görülmesi durumunda test edilen ürün non-toksik ürün olarak kabul edilmektedir. Tez kapsamında üretilen Cisplatin yüklü BSA nanopartiküllerin hücre canlılığı ise %95 olarak tespit edilmiş olup bu durum partikülün sitotoksosite performansı açısından biyogüvenli olarak değerlendirilmesi desteklemektedir. Yapılan sitotoksosite testinde herhangi bir ultrason etkisi uygulanmadan ilaç salınımı bazal seviyede gerçekleşmiş olduğundan toksik yanıt oluşumunu destekleyecek kadar ilaç salınmamış bu nedenle test yapılan fibroblast hücrelerinde hücre canlılığı bu durumdan etkilenmemiş ve hücre canlılığı %95 oranında tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada ultrason etkisi ile ilaç salınımı destekleyen Cisplatin yüklü BSA nanopartikül geliştirilmiş ve %45 genlik uygulanması halinde dahi bazal seviyenin 6,5 kat üzerinde ilaç salınımı gerçekleştiği gösterilmiş ve üretilen nanopartikülün sağlıklı hücreler için sitotoksik olmadığı gösterilmiştir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Ö. Oylar and İ. Tekin, “Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi,” 2011.
- [2] N. K. Yildirim, N. Kacmaz, and M. Ozkan, “Unmet Care Needs in Advanced Stage Cancer Patients,” *J Psychiatr Nurs*, vol. 4, no. 3, pp. 153–158, 2013, doi: 10.5505/phd.2013.63825.
- [3] Ö. Sayiner and T. ÇOmoglu, “Targeting with nanocarrier systems,” *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, vol. 40, no. 3. University of Ankara, pp. 62–79, 2016. doi: 10.1501/Eczfak\_0000000589.
- [4] S. Pathak and A. S. Multani, “Aneuploidy, stem cells and cancer,” 2006. [Online]. Available: [researchgate.net/publication/7388394](https://www.researchgate.net/publication/7388394)
- [5] A. Balmain, J. Gray, and B. Ponder, “The genetics and genomics of cancer,” *Nature Genetics*, vol. 33, no. 3S. pp. 238–244, 2003. doi: 10.1038/ng1107.
- [6] A. J. Dare *et al.*, “Surgical Services for Cancer Care.”
- [7] O. Baykara, “Current Modalities in Treatment of Cancer,” *Balıkesir Health Sciences Journal*, vol. 5, no. 3, pp. 154–165, 2016, doi: 10.5505/bsbd.2016.93823.
- [8] D. T. Chu *et al.*, “Recent Progress of Stem Cell Therapy in Cancer Treatment: Molecular Mechanisms and Potential Applications,” *Cells*, vol. 9, no. 3. NLM (Medline), Feb. 28, 2020. doi: 10.3390/cells9030563.
- [9] “İyonlaştırıcı Radyasyon ve Onkolitik Virüsler ile Kombine Tedavinin Etkileri Meliha EKİNCİ \* , Derya İLEM-ÖZDEMİR \*\*° Review ARticleS The Effects of Combination Therapy of Ionizing Radiation and Oncolytic Viruses.”
- [10] N. Gupta and R. Malviya, “Hormone Therapy for Cancer Treatment Synthesis and Characterization of supramolecular hydrogels for pharmaceutical applications View project extraction of okra mucilage View project,” 2021. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/355147145>
- [11] S. Senapati, A. K. Mahanta, S. Kumar, and P. Maiti, “Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance,” *Signal Transduction and Targeted Therapy*, vol. 3, no. 1. Springer Nature, Dec. 01, 2018. doi: 10.1038/s41392-017-0004-3.



- [12] B. Yu, H. C. Tai, W. Xue, L. J. Lee, and R. J. Lee, "Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer," *Molecular Membrane Biology*, vol. 27, no. 7. pp. 286–298, Oct. 2010. doi: 10.3109/09687688.2010.521200.
- [13] S. Park *et al.*, "Supplementary Information Flexible molecular-scale electronic devices", doi: 10.1038/NNANO.
- [14] W. Y. Qian, D. M. Sun, R. R. Zhu, X. L. Du, H. Liu, and S. L. Wang, "pH-sensitive strontium carbonate nanoparticles as new anticancer vehicles for controlled etoposide release," *Int J Nanomedicine*, vol. 7, pp. 5781–5792, 2012, doi: 10.2147/IJN.S34773.
- [15] R. Singh and J. W. Lillard, "Nanoparticle-based targeted drug delivery," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 86, no. 3. pp. 215–223, Jun. 2009. doi: 10.1016/j.yexmp.2008.12.004.
- [16] J. D. Kingsley, H. Dou, J. Morehead, B. Rabinow, H. E. Gendelman, and C. J. Destache, "Nanotechnology: A focus on nanoparticles as a drug delivery system," in *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, Sep. 2006, vol. 1, no. 3, pp. 340–350. doi: 10.1007/s11481-006-9032-4.
- [17] T. Sun, Y. S. Zhang, B. Pang, D. C. Hyun, M. Yang, and Y. Xia, "Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 53, no. 46. Wiley-VCH Verlag, pp. 12320–12364, Nov. 10, 2014. doi: 10.1002/anie.201403036.
- [18] B. Mishra, B. B. Patel, and S. Tiwari, "Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 6, no. 1. Elsevier Inc., pp. 9–24, 2010. doi: 10.1016/j.nano.2009.04.008.
- [19] C. W. How, A. Rasedee, S. Manickam, and R. Rosli, "Tamoxifen-loaded nanostructured lipid carrier as a drug delivery system: Characterization, stability assessment and cytotoxicity," *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 112, pp. 393–399, Dec. 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.08.009.
- [20] Y. T. Ko, A. Kale, W. C. Hartner, B. Papahadjopoulos-Sternberg, and V. P. Torchilin, "Self-assembling micelle-like nanoparticles based on phospholipid-polyethyleneimine conjugates for systemic gene delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 133, no. 2, pp. 132–138, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.jconrel.2008.09.079.

- [21] B. Liu *et al.*, “The antitumor effect of novel docetaxel-loaded thermosensitive micelles,” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 69, no. 2, pp. 527–534, Jun. 2008, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.01.015.
- [22] A. S. Mikhail and C. Allen, “Block copolymer micelles for delivery of cancer therapy: Transport at the whole body, tissue and cellular levels,” *Journal of Controlled Release*, vol. 138, no. 3, pp. 214–223, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.jconrel.2009.04.010.
- [23] K. F. Pirollo and E. H. Chang, “Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake?,” *Trends Biotechnol*, vol. 26, no. 10, pp. 552–558, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.tibtech.2008.06.007.
- [24] S. Bamrungsap *et al.*, “Nanotechnology in therapeutics: A focus on nanoparticles as a drug delivery system,” *Nanomedicine*, vol. 7, no. 8, pp. 1253–1271, Aug. 2012, doi: 10.2217/nnm.12.87.
- [25] R. H. Prabhu, V. B. Patravale, and M. D. Joshi, “Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: Current insights,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 10, Dove Medical Press Ltd., pp. 1001–1018, Feb. 02, 2015, doi: 10.2147/IJN.S56932.
- [26] B. Mishra, B. B. Patel, and S. Tiwari, “Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery,” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 6, no. 1, Elsevier Inc., pp. 9–24, 2010, doi: 10.1016/j.nano.2009.04.008.
- [27] X. Wang, Y. Wang, Z. G. Chen, and D. M. Shin, “Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology,” *Cancer Res Treat*, vol. 41, no. 1, p. 1, 2009, doi: 10.4143/crt.2009.41.1.1.
- [28] Y. Zhu and L. Liao, “Applications of nanoparticles for anticancer drug delivery: A review,” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 15, no. 7, American Scientific Publishers, pp. 4753–4773, Jul. 01, 2015, doi: 10.1166/jnn.2015.10298.
- [29] D. Rosenblum, N. Joshi, W. Tao, J. M. Karp, and D. Peer, “Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics,” *Nature Communications*, vol. 9, no. 1, Nature Publishing Group, Dec. 01, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-03705-y.
- [30] M. Tarhini, H. Greige-Gerges, and A. Elaissari, “Protein-based nanoparticles: From preparation to encapsulation of active molecules,” *International Journal of*

- Pharmaceutics*, vol. 522, no. 1–2. Elsevier B.V., pp. 172–197, Apr. 30, 2017. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.01.067.
- [31] S. Hong, D. W. Choi, H. N. Kim, C. G. Park, W. Lee, and H. H. Park, “Protein-based nanoparticles as drug delivery systems,” *Pharmaceutics*, vol. 12, no. 7. MDPI AG, pp. 1–28, Jul. 01, 2020. doi: 10.3390/pharmaceutics12070604.
- [32] Z. Zaheer, “Stability Indicating HPTLC determination of Donepezil Hcl in Pharmaceutical dosage form,” 2006. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/233728393>
- [33] K. Numata and D. L. Kaplan, “Silk-based delivery systems of bioactive molecules,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 62, no. 15. pp. 1497–1508, Dec. 30, 2010. doi: 10.1016/j.addr.2010.03.009.
- [34] S. Keten, Z. Xu, B. Ihle, and M. J. Buehler, “Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of B-sheet crystals in silk,” *Nat Mater*, vol. 9, no. 4, pp. 359–367, 2010, doi: 10.1038/nmat2704.
- [35] W. Ziaaddini, M. Saberi, and M. Saidifar, “Synthesis and identification of bovine serum albumin nanoparticles (BSA NPs) as a drug delivery system Manufacturing and characterization of biphasic scaffold based on polycaprolactone for dental pulp regeneration View project Synthesis and identification of bovine serum albumin nanoparticles (BSA NPs) as a drug delivery system,” 2017. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/323143068>
- [36] H. R. Hicks, B. A. Carreras, J. A. Holmes, and R. Langer, “New Methods of Drug Delivery,” Office of Technology Assessment, 1985. [Online]. Available: <http://science.sciencemag.org/>
- [37] D. S. Benoit, C. T. Overby, K. R. Sims Jr, and M. A. Ackun-farmmer, “Drug Delivery Systems History of DDS Development,” Saltzman, 2014.
- [38] K. K. Jain, “An Overview of Drug Delivery Systems,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 2059, Humana Press Inc., 2020, pp. 1–54. doi: 10.1007/978-1-4939-9798-5\_1.
- [39] P. Verma, A. S. Thakur, K. Deshmukh, A. K. Jha, and ) S Verma, “ROUTES OF DRUG ADMINISTRATION.”
- [40] S. Adepu and S. Ramakrishna, “Controlled drug delivery systems: Current status and future directions,” *Molecules*, vol. 26, no. 19. MDPI, Oct. 01, 2021. doi: 10.3390/molecules26195905.

- [41] Rakesh K. Tekade, National Institute of Pharmaceutical Education and Research (NIPER) Ahmedabad, Gandhinagar, Basic Fundamentals Of Drug Delivery.
- [42] F. Wu *et al.*, “Extracorporeal high intensity focused ultrasound ablation in the treatment of patients with large hepatocellular carcinoma,” *Ann Surg Oncol*, vol. 11, no. 12, pp. 1061–1069, 2004, doi: 10.1245/ASO.2004.02.026.
- [43] Y. Z. Zhao, L. N. Du, C. T. Lu, Y. G. Jin, and S. P. Ge, “Potential and problems in ultrasound-responsive drug delivery systems,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pp. 1621–1633, Apr. 19, 2013. doi: 10.2147/IJN.S43589.
- [44] Y. Z. Zhao *et al.*, “Using acoustic cavitation to enhance chemotherapy of DOX liposomes: Experiment in vitro and in vivo,” *Drug Dev Ind Pharm*, vol. 38, no. 9, pp. 1090–1098, Sep. 2012, doi: 10.3109/03639045.2011.640332.
- [45] N. Y. Rapoport, A. M. Kennedy, J. E. Shea, C. L. Scaife, and K. H. Nam, “Controlled and targeted tumor chemotherapy by ultrasound-activated nanoemulsions/microbubbles,” *Journal of Controlled Release*, vol. 138, no. 3, pp. 268–276, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.jconrel.2009.05.026.
- [46] C. T. Lu *et al.*, “Experiment on enhancing antitumor effect of intravenous epirubicin hydrochloride by acoustic cavitation in situ combined with phospholipid-based microbubbles,” *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 68, no. 2, pp. 343–348, Aug. 2011, doi: 10.1007/s00280-010-1489-4.
- [47] C. J. Diederich and K. Hynynen, “ULTRASOUND TECHNOLOGY FOR HYPERTHERMIA,” 1999.
- [48] F. Wu *et al.*, “Extracorporeal high intensity focused ultrasound ablation in the treatment of patients with large hepatocellular carcinoma,” *Ann Surg Oncol*, vol. 11, no. 12, pp. 1061–1069, 2004, doi: 10.1245/ASO.2004.02.026.
- [49] F. Wu *et al.*, “A randomised clinical trial of high-intensity focused ultrasound ablation for the treatment of patients with localised breast cancer,” *Br J Cancer*, vol. 89, no. 12, pp. 2227–2233, Dec. 2003, doi: 10.1038/sj.bjc.6601411.
- [50] N. Rapoport, A. M. Kennedy, J. E. Shea, C. L. Scaife, and K. H. Nam, “Ultrasonic nanotherapy of pancreatic cancer: Lessons from ultrasound imaging,” *Mol Pharm*, vol. 7, no. 1, pp. 22–31, Feb. 2010, doi: 10.1021/mp900128x.
- [51] J. Y. Chapelon, M. Ribault, A. Birer, F. Vernier, R. Souchon, and A. Gelet, “Treatment of localised prostate cancer with transrectal high intensity focused ultrasound,” 1999.

- [52] A. Gelet *et al.*, “Local recurrence of prostate cancer after external beam radiotherapy: Early experience of salvage therapy using high-intensity focused ultrasonography,” *Urology*, vol. 63, no. 4, pp. 625–629, Apr. 2004, doi: 10.1016/j.urology.2004.01.002.
- [53] S. Vaezy *et al.*, “Liver Hemostasis with High-Intensity Ultrasound: Repair and Healing,” *Journal of Ultrasound in Medicine*, vol. 23, no. 2, pp. 217–225, 2004, doi: 10.7863/jum.2004.23.2.217.
- [54] M. Suzuki *et al.*, “Nanobubbles enhanced drug susceptibility of cancer cells using ultrasound,” *International Congress Series*, vol. 1284, pp. 338–339, Sep. 2005. doi: 10.1016/j.ics.2005.06.090.
- [55] K. C. de Castro, J. M. Costa, and M. G. N. Campos, “Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review,” *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 71, no. 1, pp. 1–13, 2022, doi: 10.1080/00914037.2020.1798436.
- [56] B. Li, Q. Li, J. Mo, and H. Dai, “Drug-loaded polymeric nanoparticles for cancer stem cell targeting,” *Front Pharmacol*, vol. 8, no. FEB, Feb. 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00051.
- [57] Y. Liu, G. Yang, S. Jin, L. Xu, and C. X. Zhao, “Development of High-Drug-Loading Nanoparticles,” *ChemPlusChem*, vol. 85, no. 9. Wiley-VCH Verlag, pp. 2143–2157, Sep. 01, 2020. doi: 10.1002/cplu.202000496.
- [58] N. Wang, X. Cheng, N. Li, H. Wang, and H. Chen, “Nanocarriers and Their Loading Strategies,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 8, no. 6. Wiley-VCH Verlag, Mar. 21, 2019. doi: 10.1002/adhm.201801002.
- [59] C. Weber, C. Coester, J. Kreuter, and K. Langer, “Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles,” 2000.
- [60] Z. Zhao, Y. Li, and M. bin Xie, “Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, no. 3. MDPI AG, pp. 4880–4903, Mar. 04, 2015. doi: 10.3390/ijms16034880.
- [61] S. Y. R. Paik *et al.*, “Robust size control of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by intermittent addition of a desolvating agent and the particle formation mechanism,” *Food Chem*, vol. 141, no. 2, pp. 695–701, 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.059.

- [62] J. Zhang *et al.*, “Task-Specific Design of Immune-Augmented Nanoplatform to Enable High-Efficiency Tumor Immunotherapy,” *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 11, no. 46, pp. 42904–42916, Nov. 2019, doi: 10.1021/acsami.9b13556.
- [63] M. Joshi, M. Nagarsenkar, and B. Prabhakar, “Albumin nanocarriers for pulmonary drug delivery: An attractive approach,” *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 56. Editions de Sante, Apr. 01, 2020. doi: 10.1016/j.jddst.2020.101529.
- [64] “ajplung.00127.2018”.
- [65] R. Kurrat, J. E. Prenosil, and J. J. Ramsden, “Kinetics of Human and Bovine Serum Albumin Adsorption at Silica-Titania Surfaces General patterns governing the adsorption of proteins and,” 1997.
- [66] E. L. Gelamo and M. Tabak, “Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants,” 2000. [Online]. Available: [www.elsevier.nl/locate/saa](http://www.elsevier.nl/locate/saa)
- [67] S. Dasari and P. Bernard Tchounwou, “Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 740. Elsevier, pp. 364–378, Oct. 05, 2014. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- [68] “Antineoplastic Agents Occupational Hazards in Hospitals.”
- [69] R. Tiwari, K. Viswanathan, V. Gour, S. P. Vyas, and V. Soni, “Cisplatin-loaded albumin nanoparticle and study their internalization effect by using  $\beta$ -cyclodextrin,” *Journal of Receptors and Signal Transduction*, vol. 41, no. 4, pp. 393–400, 2021, doi: 10.1080/10799893.2020.1817077.