

**HİYALURONİK ASİT TABANLI ve HEDEFLİ  
NANO TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRİLMESİ**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**Ayça BAKIR**

**Eskişehir 2018**

**HİYALURONİK ASİT TABANLI ve HEDEFLİ NANO TAŞIYICI SİSTEM  
GELİŞTİRİLMESİ**

**Ayça BAKIR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İleri Teknolojiler Anabilim Dalı**

**Nanoteknoloji Bilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**OCAK 2018**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayça Bakır'ın “Hyaluronik Asit Tabanlı ve Hedefli Nano Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi” başlıklı tezi 04/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, İleri Teknolojiler Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

|                       | <u>Unvanı Adı Soyadı</u>      | <u>İmza</u> |
|-----------------------|-------------------------------|-------------|
| Üye (Tez Danışmanı) : | Prof. Dr. Arzu Ersöz          | .....       |
| Üye :                 | Prof. Dr. Ebru Birlik Özkütük | .....       |
| Üye :                 | Yrd. Doç. Dr. Özlem Ünlüer    | .....       |

Prof. Dr. Ersin Yücel  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### HİYALURONİK ASİT TABANLI ve HEDEFLİ NANO TAŞIYICI SİSTEM GELİŞTİRİLMESİ

Ayça BAKIR

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Nanoteknoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2018

Danışman: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) istatistiklerine göre her yıl yaklaşık 8,8 milyon insan kanserden hayatını kaybetmektedir ve 2020 yılı içerisinde bu ölümlerin 13 milyonu geçmesi beklenmektedir. Mevcut kanser ilaçlarının dezavantajlarını elimine etmek için hedeflenmiş nano-taşıyıcı sistemler üzerine çalışmalar önem kazanmıştır. Bu çalışmada; tümör hücre yüzey reseptörü olan CD44'ü hedefleyecek Hiyaluronik asit (HA) tabanlı nano-taşıyıcı lipozomal yapı geliştirilmiştir. Yaklaşık 95 kDa boyutunda HA, *Streptococcus equi* hücre kültüründen Sephadex G-75 kullanılarak saflaştırılmış ve, immobilize Hiyaluronidaz kolon sistemi ile 5 kDa boyutuna getirilmiştir. HA karakterizasyonu, Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC), Heksadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB) yöntemi ile yapılmıştır. Saflaştırılan HA, ANADOLUCA yöntemi ile hedefleme ajanı olarak kullanılacak MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA kompleksine dönüştürülmüş, ayrıca hem ikincil ajan olarak hem de görüntüleme için “Green Fluorescent Protein” (GFP) kullanılmıştır. siRNA enkapsüle lipozom, 1,2-Dioleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DOPC), 2 metakriloiloksietil fosforilkolin (MPC), ve kolesterol (Chol) kullanılarak ince film hidrasyon ve sonikasyon yöntemi ile sentezlenmiş; karakterizasyonu için Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), boyut ve zeta potansiyeli analizleri yapılmıştır. Lipozom, yaklaşık olarak 90 nm boyutunda bulunmuştur. Sonuç olarak, elde edilen nano-taşıyıcı lipozomal yapının kanser hücrelerinin hem görüntülenmesinde hem de tedavisinde umut vadeden bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** CD44, GFP, Hiyaluronik asit, Lipozom, MPC, siRNA, *Streptococcus equi*.

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF HYALURONIC ACID BASED AND TARGETED NANO CARRIER SYSTEM

Ayça BAKIR

Department of High Technologies

Programme in Nanotechnology

Anadolu University, Graduate School of Sciences, January 2018

Supervisor: Prof. Dr. Arzu ERSÖZ

According to the World Health Organization (WHO) statistics, an estimated 8.8 million people die from cancer each year, and in 2020, these deaths are expected to exceed 13 million deaths. It has become important to work on targeted nano-carrier systems to eliminate the disadvantages of current cancer drugs. In this study; a hyaluronic acid (HA) based nano-carrier liposomal structure has been developed that will target CD44, the tumor cell surface receptor. The HA, which was found to have a molecular weight of about 95 kDa, was purified and stabilized by using Sephadex G-75 from *Streptococcus equi* culture and transformed into a size of 5kDa by the immobilized Hyaluronidase (Hyase) column system. HA characterization was performed by Gel Permeation Chromotography (GPC) and Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) method. The purified HA was converted to the MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA complex to be used for targeting by the ANADOLUCA method and “Green Fluorescent Protein” (GFP) was used both as a secondary agent and for imaging. siRNA encapsulated liposome was synthesized by thin film hydration and sonication method using 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) and Cholesterol (Chol). Scanning Electron Microscopy (SEM) and size and zeta potential analyzes were performed for characterization. The liposome was found to be about 90 nm in size. In conclusion, the obtained nano-carrier liposomal structure is thought to be a promising approach for both imaging and treatment of cancer cells.

**Keywords:** CD44, GFP, Hyaluronic acid, Liposome, MPC, siRNA, *Streptococcus equi*.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca sevgisi, deneyimleri, hayat tecrübesi ve sonsuz desteği ile her zaman yanımda olan sevgili danışman hocam Prof. Dr. Arzu Ersöz'e,

Eğitimim boyunca sabır ve anlayışla desteğini esirgemeyen, tüm araştırma ve deneysel sürecim boyunca bilgi birikimi ve tecrübeleriyle bana destek olan ve özellikle kritik süreçlerde beni cesaretlendiren değerli hocam Prof. Dr. Rıdvan Say'a,

Deneysel çalışmalarım sırasında, hiçbir zaman benden yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Özlem Ünlüer'e, Doç. Dr. Ayça Özcan'a ve Doç. Dr. Filiz Yılmaz'a,

Bilgi ve tecrübeleriyle önerilerini sunan, laboratuvar çalışmalarımda desteğiyle her zaman yanımda olduğunu hissettiren Umut Çelikoğlu'na,

Tez çalışmamın hücre kültürü bölümünde bilgisini, deneyimlerini esirgmeden bana yol gösteren Emine Çelikoğlu'na,

Beraber çalışırken keyif aldığım, çalışmalarım sırasında her türlü yardımı ve manevi desteği sağlayan, laboratuvarında çalışmalarım bitene kadar sabırla bekleyip yardım eden ve çalışma ortamına kattığı renklerden dolayı arkadaşım Halil İbrahim Akbaş'a,

Deneysel sürecimin önemli bir kısmında bana yardım ederek beni motive eden arkadaşım Derviş Malatyalı'ya,

Aramıza daha sonradan katılan, ancak güler yüzleri ve yardımseverlikleriyle hep yanımda olan sevgili arkadaşlarım Meltem Karahan ve Yağmur Alev'e,

Bir türlü mezun olamayıp aynı kaderi paylaştığım çalışkan arkadaşım Sercan Güzel'e,

Geçmişte bu güzel ekibin birer parçası olan, gelecekte ise hayatımın birer parçaları olacak, sevgilerini her daim hissettiğim arkadaşlarım Berfu Engin, Burcu Yazıcı, Derya Karaarslan, Fatma Yediyıldız, Gözde Yavuz ve Yasemin Uymaz'a,

Hayatım boyunca, aldığım her kararda arkamda, attığım her adımda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hep hissettiğim, bana karşı her zaman fedakâr ve özverili olan babam Dünder Bakır, annem Nalân Bakır ve kardeşim Aytaç Bakır'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayça Bakır

Ocak 2018

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmanın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Ayça BAKIR

## İÇİNDEKİLER

|                                                              |      |
|--------------------------------------------------------------|------|
| BAŞLIK SAYFASI .....                                         | i    |
| JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....                                   | ii   |
| ÖZET .....                                                   | iii  |
| ABSTRACT.....                                                | iv   |
| TEŞEKKÜR .....                                               | v    |
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....             | vi   |
| İÇİNDEKİLER .....                                            | vii  |
| TABLolar DİZİNİ.....                                         | x    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                         | xi   |
| GÖRSELLER DİZİNİ .....                                       | xiii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                         | xiv  |
| 1. GİRİŞ .....                                               | 1    |
| 2. TEORİK BİLGİ .....                                        | 6    |
| 2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Önemi.....                   | 6    |
| 2.2. İlaç Taşıyıcı Nano-Sistemler .....                      | 6    |
| 2.2.1. Polimerik nanopartiküller.....                        | 7    |
| 2.2.2. Metalik nanopartiküller .....                         | 8    |
| 2.2.3. Kuantum noktaları .....                               | 8    |
| 2.2.4. Karbon nanotüpler .....                               | 8    |
| 2.2.5. Polimerik miseller .....                              | 9    |
| 2.2.6. Dendrimerler .....                                    | 9    |
| 2.2.7. Manyetik nanopartiküller .....                        | 9    |
| 2.2.8. Lipozomlar.....                                       | 9    |
| 2.3. İlaç Taşıyıcı Nano-Sistem Olarak Nano-Lipozomlar .....  | 10   |
| 2.3.1. Lipozomların yapısal bileşeni .....                   | 12   |
| 2.3.2. Lipozomların sınıflandırılması .....                  | 16   |
| 2.3.2.1. Bileşim ve uygulamaya dayalı lipozomlar .....       | 16   |
| 2.3.2.2. Yapısal parametrelere dayalı lipozomlar .....       | 19   |
| 2.3.3. Lipozom hazırlama yöntemleri.....                     | 20   |
| 2.4. Nano-Lipozomlarda İlaç Enkapsülasyonu ve Salınımı ..... | 21   |
| 2.5. Nano-Lipozomlarda İlaç Hedefleme .....                  | 23   |

|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6. Kanser Tedavisinde Lipozom .....                                                                            | 25 |
| 2.7. Hiyaluronik Asit ve İlaç Endüstrisindeki Yeri.....                                                          | 27 |
| 2.7.1. Mikrobiyal olarak hiyaluronik asit eldesi.....                                                            | 29 |
| 2.8. Amaç.....                                                                                                   | 30 |
| 3. MATERYAL .....                                                                                                | 33 |
| 3.1. Kimyasallar.....                                                                                            | 33 |
| 3.2. Biyolojik Materyal .....                                                                                    | 34 |
| 3.3. Besiyerleri .....                                                                                           | 34 |
| 3.4. Çözeltiler ve Tamponlar .....                                                                               | 34 |
| 3.5. Cihazlar ve Laboratuvar Sarf Malzemeleri .....                                                              | 35 |
| 4. YÖNTEM VE UYGULAMA .....                                                                                      | 37 |
| 4.1. HA Üretimi .....                                                                                            | 37 |
| 4.1.1. Hücre kültürasyonu .....                                                                                  | 37 |
| 4.1.1.1. <i>Streptococcus equi</i> bakterisinin gelişimi ve saflık kontrolü ....                                 | 37 |
| 4.1.1.2. İnokulum ortamı hazırlama ve bakteri ekimi.....                                                         | 37 |
| 4.1.1.3. Fermantasyon ortamı hazırlama ve bakteri ekimi.....                                                     | 38 |
| 4.1.2. HA izolasyonu.....                                                                                        | 38 |
| 4.1.3. HA saflaştırılması.....                                                                                   | 39 |
| 4.1.4. HA miktar tayini için standart grafiği oluşturulması.....                                                 | 40 |
| 4.2. Hiyaluronidaz (Hyase) Kriyojel Kolon Hazırlanması ve Kullanımı .....                                        | 41 |
| 4.3. MATyr-Ru(bipy) <sub>2</sub> -HA Sentezi .....                                                               | 42 |
| 4.4. Lipozom Sentezi .....                                                                                       | 42 |
| 4.4.1. Boş lipozom sentezi .....                                                                                 | 42 |
| 4.4.2. siRNA enkapsülasyonu .....                                                                                | 43 |
| 4.4.3. MATyr-Ru(bipy) <sub>2</sub> -HA ve GFP ile yüzey modifikasyonu .....                                      | 43 |
| 4.4.4. Enkapsüle olmamış siRNA, bağlanmamış MATyr-Ru(bipy) <sub>2</sub> -HA ve<br>GFP'nin uzaklaştırılması ..... | 43 |
| 4.5. Karakterizasyon Çalışmaları .....                                                                           | 44 |
| 4.5.1. HA.....                                                                                                   | 44 |
| 4.5.2. Hyase kriyojel kolon .....                                                                                | 44 |
| 4.5.3. MATyr-Ru(bipy) <sub>2</sub> -HA .....                                                                     | 45 |
| 4.5.4 Lipozom.....                                                                                               | 45 |
| 5. BULGULAR.....                                                                                                 | 47 |
| 5.1. HA.....                                                                                                     | 47 |

|                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1.1. HA miktar tayini .....                                                                            | 47 |
| 5.1.2. HA moleküler ağırlık analizi.....                                                                 | 49 |
| 5.1.3. HA, FT-IR analizi .....                                                                           | 52 |
| 5.2. Hyase Kriyojel Kolon.....                                                                           | 54 |
| 5.2.1. Şişme testi.....                                                                                  | 54 |
| 5.2.2. Yüzey morfolojisi .....                                                                           | 54 |
| 5.2.3. FT-IR analizi .....                                                                               | 55 |
| 5.3. MATyr-Ru(bipy) <sub>2</sub> -HA .....                                                               | 56 |
| 5.3.1. FT-IR analizi .....                                                                               | 56 |
| 5.4. Lipozom.....                                                                                        | 56 |
| 5.4.1. Boş lipozom.....                                                                                  | 56 |
| 5.4.2. siRNA enkapsüle, MATyr-Ru(bipy) <sub>2</sub> -HA ve GFP modifiye lipozom<br>(nihai lipozom) ..... | 60 |
| 6. SONUÇ VE YORUM .....                                                                                  | 64 |
| KAYNAKÇA.....                                                                                            | 68 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                                 |    |

## **TABLÖLAR DİZİNİ**

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1.</b> Kanser tedavisinde kullanılan piyasadaki lipozomal terapötikler ve ajanlar | 27 |
| <b>Tablo 3.1.</b> Kullanılan kimyasallar .....                                               | 33 |
| <b>Tablo 3.2.</b> Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler .....                                 | 34 |
| <b>Tablo 3.3.</b> Kullanılan çözeltiler ve tamponlar.....                                    | 35 |
| <b>Tablo 3.4.</b> Kullanılan cihazlar ve laboratuvar sarf malzemeleri .....                  | 35 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Nano boyut karşılaştırması .....                                                                          | 1  |
| Şekil 1.2. Biyomedikal bilimlerde nanoteknolojinin kullanım alanları.....                                            | 3  |
| Şekil 1.3. Nanoteknolojinin 2025 yılına kadar öngörülen büyümesi .....                                               | 4  |
| Şekil 2.1. Çeşitli ilaç taşıyıcı nano-sistemler.....                                                                 | 7  |
| Şekil 2.2. Tek ve çok duvarlı karbon nanotüplerin yapısı .....                                                       | 8  |
| Şekil 2.3. Temel lipozom yapısı .....                                                                                | 10 |
| Şekil 2.4. Hidrofilik ve lipofilik ilaç moleküllerinin lipozom yapısına yerleşimi.....                               | 12 |
| Şekil 2.5. Lipozomun evrimi .....                                                                                    | 17 |
| Şekil 2.6. Polimerize olabilen bazı lipidlerin yapısı .....                                                          | 18 |
| Şekil 2.7. Vezikül çeşitleri.....                                                                                    | 20 |
| Şekil 2.8. Lipozom sentezi için farklı hazırlama yöntemleri.....                                                     | 21 |
| Şekil 2.9. İlaç iletiminde lipozomal ilaçların şematik gösterimi .....                                               | 22 |
| Şekil 2.10. Spesifik yüzey reseptörlerinin ekspresyonu ile terapötik ajanların spesifik hücrelere hedeflenmesi ..... | 23 |
| Şekil 2.11. İlaç iletimi için lipozomun afinite ve seçiciliğini geliştiren hedefleme ajanları.....                   | 24 |
| Şekil 2.12. HA'nın yapısı .....                                                                                      | 28 |
| Şekil 2.13. Bakteriyel büyüme evreleri .....                                                                         | 30 |
| Şekil 4.1. Ru(bipy) <sub>2</sub> MATyr-HA reaksiyonu .....                                                           | 42 |
| Şekil 5.1. Karbazol yönteminin glikoz ile reaksiyonunu gösteren kalibrasyon grafiği..                                | 48 |
| Şekil 5.2. Karbazol yöntemi ile HA standart grafiği .....                                                            | 48 |

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 5.3.</b> CTAB yöntemi ile glikozun reaksiyonu.....                                                 | 49 |
| <b>Şekil 5.4.</b> CTAB yöntemi ile HA standart grafiği .....                                                | 49 |
| <b>Şekil 5.5.</b> Ticari HA kromotogramı (GPC) .....                                                        | 50 |
| <b>Şekil 5.6.</b> <i>S.equi</i> 'den saflaştırılan HA kromotogramı (GPC) .....                              | 50 |
| <b>Şekil 5.7.</b> Sarı vial kalibrasyon grafiği (GPC).....                                                  | 51 |
| <b>Şekil 5.8.</b> Sephadex G-75 ile toplanan fraksiyonlarda CTAB ile HA tayini.....                         | 51 |
| <b>Şekil 5.9.</b> Hyase kriyojel kolon ile HA zincirlerinin kırıldığını gösteren kromotogram<br>(GPC) ..... | 52 |
| <b>Şekil 5.10.</b> <i>S. equi</i> 'den saflaştırılan HA'nın FT-IR spektrumu .....                           | 53 |
| <b>Şekil 5.11.</b> Ticari HA'nın FT-IR spektrumu .....                                                      | 53 |
| <b>Şekil 5.12.</b> Kriyojel kolona ait SEM görüntüleri.....                                                 | 55 |
| <b>Şekil 5.13.</b> Hyase kriyojel kolon FT-IR spektrumu.....                                                | 55 |
| <b>Şekil 5.14.</b> MATyr-Ru(bipy) <sub>2</sub> -HA FT-IR spektrumu.....                                     | 56 |
| <b>Şekil 5.15.</b> Boş lipozom için boyut analizi .....                                                     | 57 |
| <b>Şekil 5.16.</b> Boş lipozom için zeta potansiyeli.....                                                   | 58 |
| <b>Şekil 5.17.</b> Boş lipozomun SEM görüntüleri.....                                                       | 59 |
| <b>Şekil 5.18.</b> Nihai lipozom için boyut analizi .....                                                   | 60 |
| <b>Şekil 5.19.</b> Nihai lipozom için zeta potansiyeli .....                                                | 61 |
| <b>Şekil 5.20.</b> Nihai lipozomun SEM görüntüsü .....                                                      | 62 |
| <b>Şekil 5.21.</b> Nihai lipozom floresans grafikleri.....                                                  | 63 |

## **GÖRSELLER DİZİNİ**

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Görsel 4.1.</b> TSA katı besiyerinde saflık kontrolü.....           | 37 |
| <b>Görsel 4.2.</b> Sephadex G-75 kolon sistemi.....                    | 39 |
| <b>Görsel 4.3.</b> İmmobilize Hyase kolon sistemi .....                | 41 |
| <b>Görsel 5.1.</b> Karbazol ile besiyeri, HA ve glikoz reaksiyonu..... | 47 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

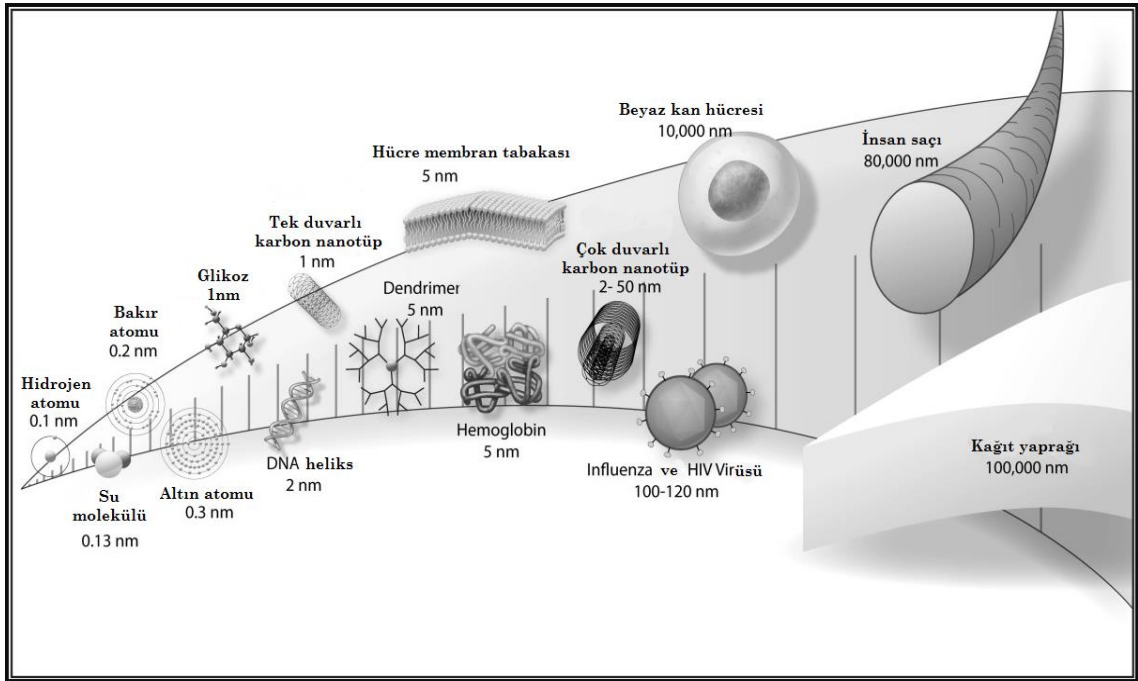
|           |                                                                                            |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| ANADOLUCA | : AmiNoAsit monomer dekore edilmiş Rutenyum şelatlarının ışık etkili konjugasyon yaklaşımı |
| APS       | : Amonyum Persülfat                                                                        |
| BBB       | : Kan-Beyin Bariyeri                                                                       |
| Chol      | : Kolesterol                                                                               |
| CD44      | : Cluster of Differentiation 44                                                            |
| CNTs      | : Karbon Nanotüpler                                                                        |
| DNA       | : Deoksiribonükleik Asit                                                                   |
| DODAB/C   | : Di-Okta-Desil Di-Metil Amonyum Bromür/Klorür                                             |
| DOPC      | : 1, 2-Dioleoil-sn-Glisero-3-Fosfokolin                                                    |
| DOPG      | : Di-Oleoil Fosfatidil Gliserol                                                            |
| DOTAP     | : Di-Oleoil Tri-Metil Amonyum Propan                                                       |
| DPPA      | : Di-Palmitoil Fosfatidik Asit                                                             |
| DPPC      | : Di-Palmitoil Fosfatidil Kolin                                                            |
| DPPE      | : Di-Palmitoil Fosfatidil Etanolamin                                                       |
| DPPG      | : Di-Palmitoil Fosfatidil Gliserol                                                         |
| DPPS      | : Di-Palmitoil Fosfatidil Serin                                                            |
| DSPC      | : Di-Stearoil Fosfatidil Kolin                                                             |
| EPR       | : Gelişmiş Geçirgenlik ve Alıkonma                                                         |
| GAG       | : Glikozaminoglikan                                                                        |
| GFP       | : Green Fluorescent Protein                                                                |

|       |                                        |
|-------|----------------------------------------|
| HA    | : Hiyaluronik Asit                     |
| HEMA  | : Hidroksietil Metakrilat              |
| Hyase | : Hiyaluronidaz                        |
| LUVs  | : Büyük Tek Katmanlı Veziküller        |
| MBA   | : Metilen Bisakrilamid                 |
| MLVs  | : Çok Katmanlı Veziküller              |
| MPC   | : 2-Metakriloiloksietil Fosforil Kolin |
| MUVs  | : Orta Tek Katmanlı Veziküller         |
| MWNTs | : Çok Duvarlı Karbon Nanotüpler        |
| PA    | : Fosfatidik Asit                      |
| PC    | : Fosfatidil Kolin                     |
| PDI   | : Polidispersite İndeksi               |
| PE    | : Fosfatidil Etanolamin                |
| PEG   | : Polietilen Glikol                    |
| PG    | : Fosfatidil Gliserol                  |
| PI    | : Fosfatidil İnositol                  |
| PLGA  | : Poli (laktik-ko-glikolik asit)       |
| PS    | : Fosfatidil Serin                     |
| PVA   | : Polivinil Alkol                      |
| RES   | : Retikulo-endotelial Sistem           |
| RNA   | : Ribonükleik Asit                     |
| SDS   | : Sodyum N-Dodesil Sülfat              |

|                |                                         |
|----------------|-----------------------------------------|
| SEM            | : Taramalı Elektron Mikroskobu          |
| siRNA          | : Small Interfering RNA (susturucu RNA) |
| SSLs           | : Sterik Stabil Lipozomlar              |
| SUVs           | : Tek Katmanlı Veziküller               |
| SWNTs          | : Tek Duvarlı Karbon Nanotüpler         |
| T <sub>c</sub> | : Faz Geçiş Sıcaklığı                   |
| TEMED          | : Tetraetil Metilendiamin               |
| TSA            | : %5 Koyun Kanlı Tryptic Soy Agar       |

## 1. GİRİŞ

21. yüzyılda, hayatımız ve çevre için her bakış açısı büyük bir ilgi gören nanoteknoloji, sadece tıp ve mühendislik alanında değil, fizik, kimya, biyokimya, moleküler biyoloji gibi bilimin çoğu alanında ortak bir noktada buluşan; materyallerin, cihazların veya sistemlerin nanometre ölçeğinde oluşturulması ve kullanılmasını içeren bir teknolojidir (Sandhu, Singh, & Sharma, 2016) (Bhandare & Narayana, 2014b). “Nano” kelimesi “cüce” anlamına gelen Latince bir kelime olup çok küçük, minyatür anlamında kullanılmaktadır. Nano boyut denildiğinde (Şekil 1.1) bir metrenin bir milyarda birinden ( $1\text{nm}=10^{-9}\text{ m}$ ) söz edilmekte olup nanoteknoloji 0,1-100 nm boyutundaki malzemelerle ilgilenir (Nikalje, 2015).



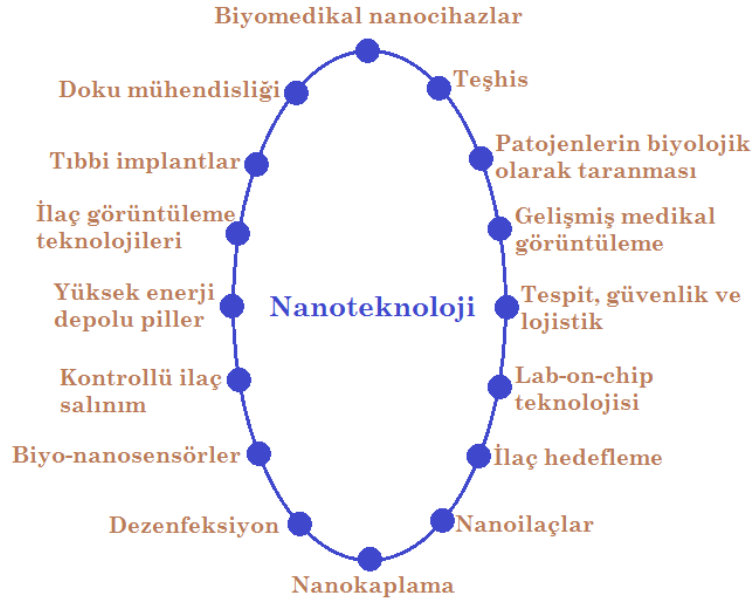
Şekil 1.1. Nano boyut karşılaştırması (Yokel & MacPhail, 2011)

Nanoteknoloji, sağlık ve tıp, elektronik, enerji ve çevre, uzay araştırmaları gibi çeşitli potansiyel uygulama alanlarında kullanılır ve malzemelerin atomik, moleküler ve makromoleküler ölçeklerde özelliklerini ve tepkilerini inceler, nanometre ölçeğinde şekil ve boyut kontrolüne imkan vererek aygıt ve sistemler üretebilir, karakterize edebilir ve inceleyebilir (Mozafari, 2007). Nano ölçekteki bir maddenin özelliği, hacimsel olarak benzeri olan bir başka maddenin özelliğinden önemli ölçüde farklıdır (Logothetidis, 2006). Nano ölçekli malzemeler, küçük boyutlarının yanı sıra yüksek yüzey alanı/hacim oranı sebebiyle de nanotıp alanında çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılabilecek

eşsiz özelliklere sahiptir. Nano ölçekli malzemelerin boyutu insan hücrelerinden daha küçüktür ve bu nedenle hücrelere kolaylıkla girebilir, kan damarlarıyla taşınabilir veya kan beyin bariyerini geçebilir ancak enzim ve reseptörler gibi biyomoleküllerden de daha büyüktür (Wohlfart, Gelperina, & Kreuter, 2012).

Her yıl yaklaşık 7,6 milyon kişi hayatını kaybetmekte; buna sebep olan nedenlerin %13 ünü de kanser oluşturmaktadır ve 2020 yılına kadar kanser sebepli ölüm oranının 13,1 milyona yükselmesi beklenmektedir. Kanser ölümlerinin yaklaşık %30'u sigara kullanımı ve diyet uygulamaları gibi insan davranışı kaynaklı olup istendiğinde bu yaşam şekilleri değiştirilerek birçok durumda kanserden kaçınılabilmektedir (Gmeiner & Ghosh, 2015). Nano cihazların görüntülemeye kullanılması, tümör hücrelerinin saptanmasında oldukça etkilidir. Vücuda enjekte edilen nanoparçacıklar kanserli hücreleri algılar, onlara bağlanırlar ve dahası kanser lezyonunun anatomik olarak sınırlarının tanımlanabilmesi için de çeşitli modifikasyonlarla kontrast ajan gibi davranırlar (Mozafari, 2007).

Mevcut ilaç nesli çoğunlukla 1000 Da ya da daha küçük moleküllere dayandığı için zayıf biyoyararlanım, etkili olması gereken bölgeye hedeflenememiş iletim, terapötik etkisizlik ve çeşitli yan etkiler gibi belli başlı sınırlanmışlıklara sahiptir. Bu yüzden de oldukça seçici ve etkili ilaçlar geliştirebilmek, kronik rahatsızlıkların teşhisi ve görüntülenmesi yanında tedavisi için de ilaç iletim sistemleri olarak kullanılabilecek nano ölçekte malzemelerin uygulanması amacıyla ilaç dağıtımı, moleküler görüntüleme ve tıbbi teşhisler gibi biyomedikal bilimlerde kullanılacak nanoteknolojinin (Şekil 1.2) devrim yaratacağı yıllardır öngörülmektedir. Nitekim nanotıp pazarının yıllık %12,3 büyüme oranıyla 2013-2019 yılları arasında 177,60 milyar ABD doları seviyesine ulaşması beklenmektedir (Yadav, 2016).



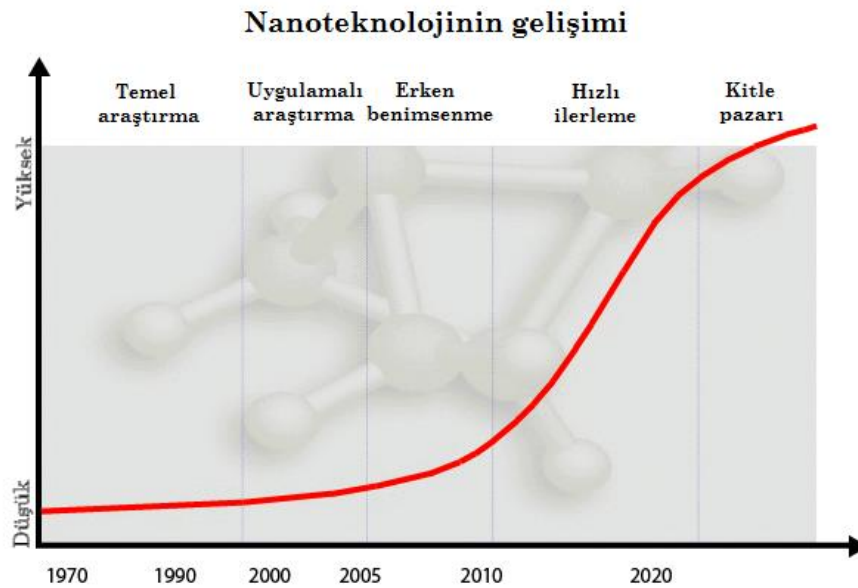
Şekil 1.2. Biyomedikal bilimlerde nanoteknolojinin kullanım alanları (Shrivastava & Dash, 2009)

1970’lerde ortaya çıkan nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler, hücrelere alım ve spesifik hücreye seçici iletimi artırmakla beraber taşıyıcılara koruma da sağlayabildiği için tercih sebebidir. İlacı enkapsüle etmek için özgünlük ve gelişmiş bir etkinlik sunan nano malzemeler vücutta ilaçların spesifik iletimini sağlayan araçlar olarak kullanılırlar (Yadav, 2016). Modern ilaç enkapsülasyon yöntemleri sayesinde ilaçlarla ilgili sistemik toksisite azaltılmış ve hastalıklı bölgede nanokapsüllü ilacın birikimi de artırılabilir. Terapötik ajanların nanoenkapsülasyonu, etkinlik, özgüllük ve hedefleme kabiliyetini artırmakta ve biyolojik ortamdaki erken yıkımı azaltarak biyoyararlanımı artırmaktadır (Kumari vd., 2014). İlaç taşıyıcı olarak adlandırılmalarındaki en büyük sebep, ilacın fiziksel olarak tuzağa düşürüldüğü ve kovalent olarak iletim sistemine bağlanabildiği yerde kontrollü ilaç salınımını kontrol edebilmeleridir (Lallana vd., 2012).

Geleneksel ilaç dağıtım sistemleri fagositik sistem tarafından yabancı maddeler olarak algılanmakta ve sistemik dolaşımdan hızlıca giderilmesi için vücuttan fagositik sistem ile temizlenmektedir. Kan dolaşımında daha uzun süreli bir varlığa ihtiyaç duyulduğunda; fagositozu önlemek amacıyla bu sistemlerin yüzeyleri kolaylıkla modifiye edilebilmektedir (Kumari vd., 2014). Nanoparçacıklar dokuları hedefleyebilmesi, küçük boyutları sebebiyle kılcal damarlara nüfuz edebilmesi ve böylece hedef bölgede ilaç

birikimini etkili bir şekilde sağlaması, hazırlanması aşamasında biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerin kullanımıyla hedeflenen bölgede belirli bir süre etkin ilaç bırakılmasına olanak sağlaması ve hedefe yönelik spesifik ilaç iletimini başarmak amacıyla nanoparçacık yüzeylerinin modifiye edilebilmesi gibi çok yönlülükleri sebebiyle geleneksel ilaç dağıtım sistemlerinde karşılaşılan güçlükleri aşmaya yardımcı olmaktadır. İlaç ürünlerinin büyük bir kısmında katı maddeler kullanıldığı için ilaç ürün geliştirme aşamasında da önemli bir role sahip olmasından dolayı da ilaç taşıyıcı sistemlerde büyük avantajlar sunarak tercih sebebi olmaya devam etmektedir (Gupta & Kompella, 2006).

Sağladığı tüm bu üstünlükler ile şimdi olduğu gibi gelecek yüzyılda da pek çok bilimsel alanda aydınlanma yaratması beklenen nanoteknoloji ve nanoteknoloji temelli uygulamalar üzerine yapılan araştırmaların 2025 yılına kadar öngörülen ilerleyişi (Şekil 1.3) ile uzun vadede insanlığın kökten bir değişim yaşamaya hazırlıklı olması beklenmelidir.



**Şekil 1.3.** Nanoteknolojinin 2025 yılına kadar öngörülen büyümesi (<http://1>)

Nanoteknolojinin hızlı şekilde gelişimi (Şekil 1.3), uzak bir gelecekte kan hücresi boyutundaki cihazların doğrudan vücuda verilerek insan vücudunu patojenlerden arındırıp sağlıklı tutabilme; kuantum bilgisayarlar, görünmez pelerinler ve uzay asansörlerinin bir gün gerçeğe dönüşebilme; insanların biyolojik olmayan formlara geçiş

yapmalarına izin verebilme; beden ve beynin tamamının atom ölçeğinde yeniden yapılandırılarak pratik ölümsüzlük sağlayabilme ihtimalleri üzerine gerçekçi bir yaklaşım ile düşünmemize imkan sağlamaktadır.

Bu çalışmada, mevcut kanser ilaçlarına yenilik getirecek ve dolayısıyla mevcut sınırlılıkları iyileştirecek ilaç taşıyıcı bir sistem geliştirmek amacıyla lipozomal nano yapı kullanılmıştır. Böylece; biyouyumlu, yarılanma ömrü daha uzun, biyobozunabilir ve toksik olmayan özellikteki maddelerin kullanımıyla sentezlenen lipozomal nano yapının diğer ilaç taşıyıcı sistemlere kıyasla daha çok ilaç enkapsülasyonuna izin vermesi ve yüzey modifikasyonu ile tümör hücrelerine spesifik hedefleme sağlamasıyla sağlıklı dokuların gördüğü zararı en aza indirmesi, dolayısıyla tedavide uygulanacak doz sayısının azaltılmış olması ve hasta konforunun da bu şekilde artması öncelikli amacımız olmuştur. Geliştirilmiş bu nano yapının üstünlüğünü, meme, yumurtalık ve pek çok tipte kanserli hücredeki CD44 yüzey reseptörünü hedefleyebilecek HA'yı kullanmamız ve aynı zamanda kanser hücrelerinin gen dizilimlerindeki sorunlu bölgeyi susturarak kanserin ilerlemesini durduracak özellikteki siRNA'yı hedeflenmiş lipozomal yapı içine enkapsüle etmemiz oluşturmaktadır. Ayrıca; kullanılacak HA, *Streptococcus equi* kültüründen saflaştırılmış ve ANADOLUCA yöntemi ile hedeflemede kullanılacak MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA metal şelatlarına dönüştürülmüştür. Hem ikincil hedefleme ajanı olarak kullanılabilecek hem de görüntüleme imkanı sağlayacak floresans özellikteki GFP de lipozom yüzeyindeki modifikasyon içinde yer almıştır. siRNA enkapsüle, HA tabanlı ve hedefli lipozomal nano yapılar, SEM, boyut analizi ve zeta potansiyeli analizleri ile karakterize edilmiştir.

## **2. TEORİK BİLGİ**

### **2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Önemi**

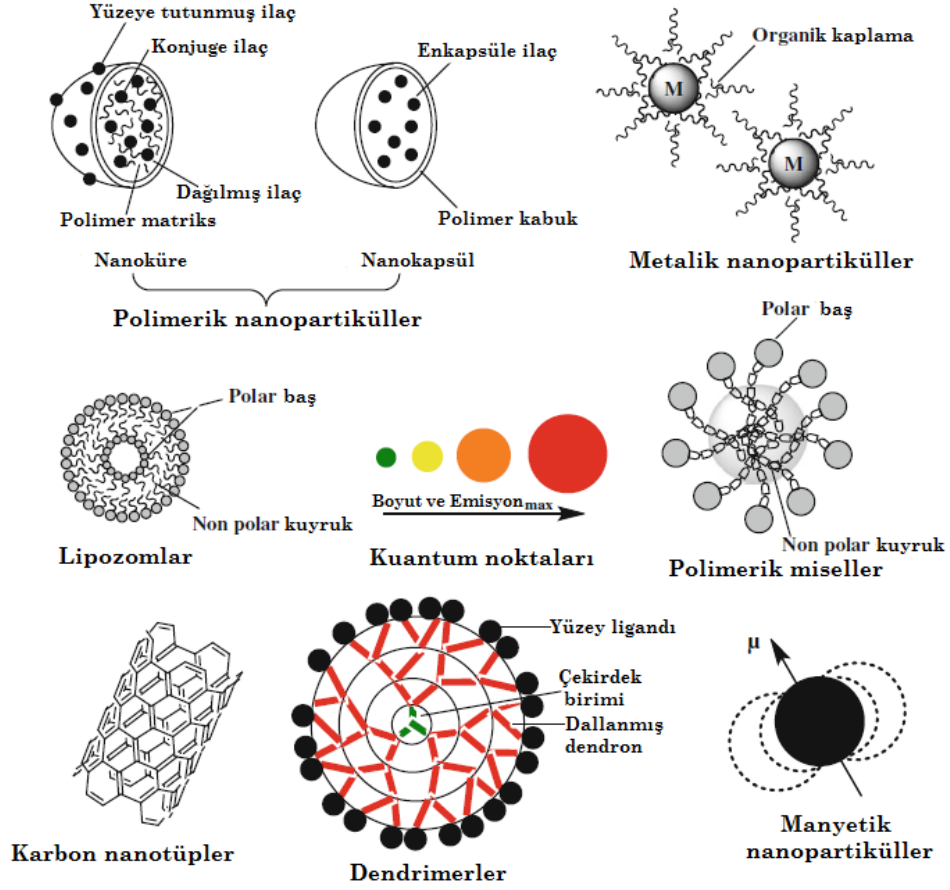
Günümüzdeki çoğu ilaç, arzu edilen farmakolojik etkiyi sağlayabilmek için etki alanına ulaşmadan önce bağırsak bariyeri, kan-beyin bariyeri (BBB) ve metabolik reaksiyonlar sonucu etkisiz hale gelebilme gibi engelleri aşmak zorundadır. Bu nedenle de vücuda dağılan ilacın çok az bir kısmı patolojik hücrelere ulaşır ya da hiç ulaşmadığı gibi sağlıklı hücreler de bu ilaçlara karşı duyarlı olduklarında hücreler ölebilir ve yan etkiler oluşur. İlaçların bu zor engelleri aşmasını sağlamak amaçlı çeşitli biyolojik membranlardan penetrasyona elverişli hale getirebilmek için; belirli fizikokimyasal özelliklere sahip olması, iyi bir çözünürlük, yüksek kimyasal stabilite gereklilikleri dışında reseptör aracılı terapötik ajanlar ile endositoz yoluyla hedef hücrelere girmesi sağlanır. Böylece sağlıklı hücrelerde oluşabilecek hasar da en aza indirgenmektedir (Wang, Siahaan, & Soltero, 2005).

### **2.2. İlaç Taşıyıcı Nano-Sistemler**

Nanoterapinin en önemli uygulamalarından biri insan hastalıklarını iyileştirmek için çeşitli nanoparçacıklar kullanarak istenen doku ve organa ilaç hedefleyebilmektir. Biyolojik ortamda suda çözünmeyen ve kararsız olan ilaçların iletimini düzgün bir şekilde sağlarken aynı zamanda ilaçları hidrolitik ve enzimatik bozulmadan koruyabilmektedir (Caban vd., 2014). Nano-sistemler eşsiz özelliklerinden dolayı biyoyararlanımı iyileştirmekte ve in vivo olarak stabiliteyi artırarak istenen hücrelerde biyolojik aktif konsantrasyonu artırmaktadır (Mozafari, 2007). Ayrıca ilaç taşıyıcı nano-sistemlerin parçacık boyutu, ilaçların vücuttaki etkisini gösterebilmesi için önemli bir parametre olup 200 nm altındaki küçük bir parçacık boyutuna sahip nanoparçacıklar, kan dolaşımında uzun süreli kalışlarıyla tümör bölgelerinde yüksek derişimde bulunabilmektedir (Ha vd., 2016).

İlaç iletimi için geliştirilmiş olan nano ölçekteki malzemeler, yüksek stabilite, yüksek seçicilik, ilacı koruma, hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaç enkapsülasyonu, kontrollü salınım yeteneği, ilaç toksisitesini düşürme, farklı ilaçlar için farklı uygulama yolları gibi geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlere göre üstünlükler sunan polimerik nanopartiküller, lipozomlar, kuantum noktalar, karbon nanotüpler, dendrimerler, polimerik miseller ve manyetik nanopartiküller olmak üzere pek çok çeşide sahip olup

ilaç taşıyıcı nanosistemler olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.1) (Demetzos & Pippa, 2014) (Yadav, 2016).



Şekil 2.1. Çeşitli ilaç taşıyıcı nano-sistemler (Yadav, 2016)

### 2.2.1. Polimerik nanopartiküller

Doğal ve sentetik biyolojik olarak kararlı polimer veya kopolimerlerden oluştuğu bilinen polimerik nanopartiküller, biyolojik olarak parçalanabilmekte olup yüzey modifikasyonu kolaylığı sebebiyle de dikkat çekmektedir (Singh & Lillard, 2009). Polimerik nanopartiküllerde ilaçlar, ya fiziksel olarak çözünmekte veya kapsüle edilmekte ya da polimerik matrise kovalent olarak bağlanmaktadır. Yan etkilerin en aza indirebilmesi ile terapötik yararı artırması için polimerler sıkça ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmaktadır (Soppimath vd., 2001).

### 2.2.2. Metalik nanopartiküller

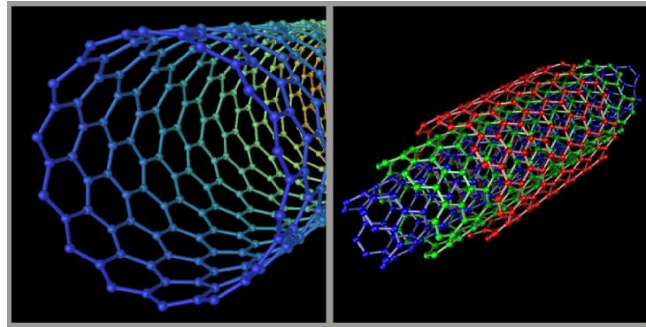
Metalik nanopartiküller, çeşitli metallerin nanopartikülleri henüz yeni çalışılmış olsa da, ilaç ve biyosensör uygulamaları için uygun bir taşıyıcı olabilmektedirler. Altın, gümüş, çinko ve titanyum anti-kanser ajan olarak kullanılmakta, gümüş ve altın nanopartiküller biyomedikal kullanım için özellikle tercih edilmektedir. Yüzey modifikasyonu kolay bir şekilde yapılmakta ve kuantum noktalara alternatif olarak görüntüleme, tespit, ilaç keşif, biyoaktiflerin aktif iletimi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Jain, 2007).

### 2.2.3. Kuantum noktaları

İnorganik yarı iletken nanokristaller olan kuantum noktaları, geniş absorpsiyon, uzun lüminesans ömrü ve iyi fotostabilite gibi benzersiz floresans özelliklere sahiptir. Bu nedenle de teşhis ve görüntüleme alanlarında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayarlanabilir optik özellikleri gibi olumlu yanlarına rağmen biyolojik olarak kuantum noktalarının yüzey fonksiyonlandırılması için biyo-konjugasyon üstüne daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Lallana vd., 2012).

### 2.2.4. Karbon nanotüpler

Karbon nanotüpler (CNTs), 1 nm yarıçap ve 1-100 nm uzunluğundaki bir silindir içine yuvarlanan bir grafit tabakası gibi altıgen karbon atomları ağlarıdır. Grafen silindir düzeninde farklılık gösteren CNT'ler, tek duvarlı karbon nanotüpler (SWNTs) ve çok duvarlı karbon nanotüpler (MWNTs) olmak üzere 2 çeşittir (Şekil 2.2) (Vats vd., 2017).



Şekil 2.2. Tek ve çok duvarlı karbon nanotüplerin yapısı (<http-2>)

Ultra hafif, yüksek mekanik dayanıklılık, yüksek elektrik ve ısı iletkenliği, metalik ve yarı-metalik davranış ve yüksek yüzey alanı gibi düzenlenmiş yapılarıyla ilginç

fizikokimyasal özelliklerinden dolayı CNT'ler ilaç taşıyıcı ve teşhis sistemlerinde yaygın bir şekilde kullanılabilir (Jain, 2007).

#### **2.2.5. Polimerik miseller**

İlaç taşıyıcı olarak kullanılabilen polimerik miseller küresel nanoyapılar olup genellikle suda amfifilik blok kopolimerlerin kendiliğinden bir araya gelmesiyle oluşmaktadırlar (Kataoka, Harada, & Nagasaki, 2001). Hidrofobik ilaçlar için uygun hidrofobik bir çekirdek ve hidrofilik bir kabuktan oluşan miseller, 20-100 nm arasında boyutlara sahiptirler. İlaç çözünürlüğünün artmasına sebep olma ve kan dolaşımında daha uzun süre kalabilmeleri gibi özelliklerinden dolayı tümör dokularında birikebilmektedirler (Lallana vd., 2012).

#### **2.2.6. Dendrimerler**

Dendrimerler, tek tip boyut ve şekilde, nano ölçekte oldukça dallanmış yapıya sahip polimerik makromoleküllerdir ve temel yapısı merkezi bir çekirdek, dallanmış yapılar ve makromolekülün dış yüzeyinde bulunan nükleik asit kompleksleşmesiyle beraber ilaç tutma etkinliğini belirleyen terminal işlevsel gruplardan oluşmaktadır. Tekrarlanan dallanmış yapılardaki artış küresel yapının oluşmasından, yani dendrimerin meydana gelmesinden sorumludur. Mimarileri üzerinde üst düzey kontrole izin vermelerinden dolayı ilaç ve gen iletim uygulamaları için tercih edilebilmektedirler. Aktif maddeler iç boşluklarda kapsüle edilebilir ya da yüzeye bağlanabilmektedirler (Nimesh, 2013) (Palmerston Mendes, Pan, & Torchilin, 2017).

#### **2.2.7. Manyetik nanopartiküller**

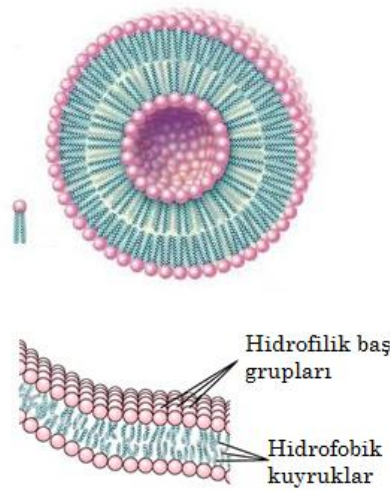
Manyetik kontrol altında hedefleme ve antikör-yüzey konjugasyonuna olanak sağlamasıyla manyetik nanopartiküller, ilaç iletimi için uygunluk göstermektedir. Süperparamanyetik Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopartikülleri sulu kararlılığı korumak için uygun yüzey tabakasına sahip olduklarında en sık kullanılan manyetik nanopartiküllerdir (Bhandare & Narayana, 2014a).

#### **2.2.8. Lipozomlar**

Lipozom (Liposoma) adı iki Yunan kelimesinin birleşiminden oluşmaktadır; yağ anlamındaki “Lipos” ve vücut anlamındaki “Soma”. Lipozomlar, ilk kez İngiliz

hematolojist Dr. Alec D. Bangham tarafından 1961 yılında Cambridge Babraham Enstitüsünde tanımlanmış ve 1964 yılında da yayınlanmıştır (Swain, Patra, & Rao, 2016).

Lipozomlar, kolesterol ve toksik olmayan fosfolipidlerden oluşturulabilen küresel yapıdaki veziküller olup lipozomların özellikleri, lipid bileşimi, boyut, yüzey yükü, hazırlama yöntemi gibi parametrelere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Biyouyumlu olmalarının yanında yapıları gereği (Şekil 2.3) hidrofilik ve hidrofobik özellikleri aynı anda sunabildikleri için amfifilik özellik göstermeleri en çok tercih edilen ilaç taşıyıcı sistem olmasını açıklar niteliktedir (Akbarzadeh vd., 2013).



Şekil 2.3. Temel lipozom yapısı (<http-3>)

### 2.3. İlaç Taşıyıcı Nano-Sistem Olarak Nano-Lipozomlar

Literatürde ayrıntılı bir şekilde en çok tartışılan nano ölçekli malzemelerden biri olan lipozomlar, Bangham ve R. W. Horne'un enstitünün yeni elektron mikroskopunu test ettikleri sırada kuru fosfolipidlere negatif zincir eklenmesiyle keşfedilmiş ve mikroskop görüntüleri lipozomların hücre zarına benzer yapıda, fosfolipid çift tabakalarından oluşan, yapay olarak hazırlanmış küresel veziküller olduğuna ilk kanıt olmuştur. (Swain, Patra, & Rao, 2016) (Yadav, 2016). Lipozomların nanometrik versiyonları nanolipozom olarak adlandırılır ve ilaç enkapsülasyonu ile kontrollü salınım sistemlerinde en çok kullanılan versiyonlarıdır.

İlaç ve gen iletiminde, kanser tedavisinde oldukça yoğun bir şekilde kullanılan lipozomlar, hedef bölgelere iletim sağlamak, hedef proteinleri proteaz bozunumundan korumak, bağışıklık sisteminin fagositlerine ilaç iletiminde, hedeflenmiş iletim için

küçük molekülleri etiketlemeye izin verebilmesi gibi çok yönlülüğe sahiptir (Wang, Siahaan, & Soltero, 2005) (Felnerova vd., 2004). Solunum ile ilgili ilaç taşıyıcı sistemlerde de lipozomlar yaygın bir şekilde kullanılmakta ve lipozomal aerosoller sıradan olanlarına göre azaltılmış toksisite, lokal iritasyonu önleme, sürekli salınım, geliştirilmiş ilaç stabilitesi gibi avantajlara sahiptir.

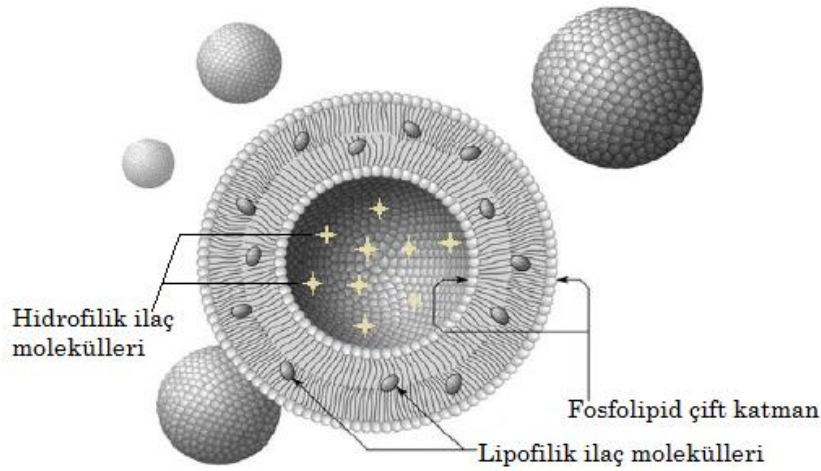
Terapötik bir taşıyıcı olarak lipozom kullanılmasının sebebi de sahip olduğu artan terapötik etki ve fayda ile farklı hidrofilik, hidrofobik ve amfipatik ilaçların enkapsülasyonu için uygunluk ve ilacı dış ortamdan koruma, sürekli salınım, hedeflenmiş iletim için spesifik ligandlarla kolay bir şekilde yüzey modifikasyonu, kanda kalış süresinin artması (RT), farklı yollarla uygulama kolaylığı, biyobozunabilirlik, düşük toksisite, non-immünojenik ve biyouyumluluk gibi özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Swain, Patra, & Rao, 2016).

Bunların yanında fosfolipidlerin oksidasyonu ve hidroliz kaynaklı kimyasal istikrarsızlığı, yüksek üretim maliyeti, kısa yarı ömür, ilaç sızdırma, büyük boyutlu lipozomların retiküloendotel sistemine (RES) az sayıda girişi veya RES nedeniyle hızlı bozulması, düşük termal kararlılık gibi kısıtlamalara da sahip olması göz ardı edilmemelidir. Ancak bu tip zorlukların üstesinden gelebilmek için polietilen glikol (PEG) gibi hidrofilik polimerlerle lipozom yüzeyinin modifikasyonu ve önceden kapsüllenmiş ilaç yüklü lipozomların depo polimer esaslı sistem içine entegresi gibi yaklaşımlar fayda sağlamaktadır (Swain, Patra, & Rao, 2016).

Suda çözünen bileşikler, gastrointestinal sistem içinde kendilerini uzun bir süre koruyamadıkları için vücut tarafından zayıf bir şekilde absorplanamazlar ve bu yüzden etkinlikleri sınırlı olmaktadır. Bu moleküllerin hidrofilik yapıları sebebiyle lipid katmanını geçmeleri olası değildir ve vücuda ulaşılabilirliklerini sağlamak için bu bileşikler, lipid çift tabakalarını geçmelerine yardımcı olacak fosfolipidler ile entegre edilmektedirler (Karimi vd., 2015). Moleküllerin biyoyararlanımı, maddenin plazma membranı aracılığıyla geçişi, moleküllerin sistem içine dağılması ve en son olarak da kan içine girişi ile mümkün olmaktadır.

Sulu ortamda bulunan fosfolipidler, termodinamik olarak kararlı olan kapalı çift tabakalı bir yapı oluştururlar. Bu çift tabaka, yüzü dışarıdaki sulu ortama dönük hidrofilik bir baş grup ve sulu ortamdan kaçan içe doğru yönelen hidrofobik bir kuyruk

içermektedir. Çift tabaka hidrofobik molekülleri kapsüllerken, çekirdek kısmı ise küresel çift tabakanın merkezindeki sulu bir bölmeden oluşup enzim, antibiyotik, hormon, peptid ve antikanser ajanlar gibi suda çözünen hidrofilik molekülleri taşımaktadır (Şekil 2.4). Böylece lipozomun içindeki bir ilaç, onu yok edebilecek metabolik enzimlerden korunarak ilacın vücuttaki ömrünü uzatarak istenen etkiyi elde etmek için gerekli ilaç dozunu azaltmaktadır (Akbarzadeh vd., 2013).



**Şekil 2.4.** Hidrofilik ve lipofilik ilaç moleküllerinin lipozom yapısına yerleşimi (Swain, Patra, & Rao, 2016)

Bunun yanı sıra biyolojik membranların lipid çift katmanlı doğasından dolayı pasif ilaç iletimi hızı hem lipofilik hem de hidrofilik etkilerle değişmektedir. Biyolojik membran boyunca pasif difüzyon oranı lipofiliklik arttıkça katlanarak artmaktadır. Ancak; lipofiliklik arttıkça hidrofiliklik azalacağından membran üzerindeki akış da sonunda azalmaktadır. Bu nedenle; pasif madde taşıyıcılığında lipofiliklik ve hidrofiliklik arasındaki dengenin iyi bir şekilde kurulması gerekmektedir (Wang, Siahaan, & Soltero, 2005).

İlaç taşıyıcı sistem olarak lipozomların başarısı, halen daha klinik araştırmalarda olan lipozom temelli formülasyonların tercih edilme sebebini açıklamaktadır.

### 2.3.1. Lipozomların yapısal bileşeni

Lipozomların temel kimyasal bileşenleri lipid ve/veya fosfolipid molekülleri olup lipidler çeşitli baş grupları içeren yağ asidi türevleridir. Trigeliseritler, 3 yağ asidi ve her bir karbon atomunda 1 hidroksil (OH) grubu ile 3 karbonlu bir alkol olan bir gliserol

molekölünden oluşan lipidlerdir. Mono- ve digliseridler ise yağ asitlerinin gliseril mono- ve di-esterleridir.

Lipozomlar, kullanım şekline ve ilaç enkapsülasyonuna (kapsüllenecek ilaca) göre katyonik, anyonik ya da nötral lipidler kullanılarak sentezlenmektedirler. Lipid bileşimi, yüzey yükü, boyut ve hazırlama yöntemlerindeki her bir farklılık, lipozomun farklı özelliklerinden sorumludur. Lipozom sentezindeki lipid bileşimi belirlenen amaca göre fosfolipidler, sfingolipidler, kolesterol, sentetik fosfolipidler, katyonik lipidler, polimerik malzemeler ve polimer taşıyan lipidler olmak üzere farklılık göstermektedir.

Gliserol içeren fosfolipidler biyolojik membranlardaki lipid miktarının yarısından daha fazlasını oluşturmakta olup lipozom sentezinde en çok kullanılan bileşenlerdir. Fosfatidik asitten türeyen ve molekül omurgasını gliserolün oluşturduğu fosfolipidler, C3 konumunda OH<sup>-</sup> grubu fosforik aside esterleşirken; C1 ve C2 konumundaki OH<sup>-</sup> grubu da lipidik yapıya sebep olan yağ asidinin uzun zinciriyle esterleşmekte olup fosforik asidin geriye kalan OH<sup>-</sup> gruplarından biri de gliserol, etanolamin, serin, inositol ve kolin içeren çeşitli organik alkollere esterleşmektedir. Özetle; bu serinin başlıca bileşeni gliserolün fosforik esteridir (Swain, Patra, & Rao, 2016). Fosfatidil etanolamin (PE), fosfatidilkolin (PC), fosfatidil gliserol (PG), fosfatidil serin (PS) ve fosfatidil inositol (PI) lipozom oluşumu için en yaygın kullanılan önemli fosfolipidlerdir (Dua, Rana, & Bhandari, 2012).

Açıl zincirleri sadece tekli kimyasal bağlardan oluşan fosfolipidler doymuş olarak adlandırılmakla beraber katı ve geçirimsiz bir lipid çift tabaka oluştururken, açıl zincirlerinde bir veya daha fazla çift bağ mevcut olan fosfolipidler doymamış olarak adlandırılır, böylece geçirgen ve daha az stabil bir çift tabaka elde edilmesine katkıda bulunurlar. Dolayısıyla doymuş lipidler fazla hidrojen atomuna sahip lipidlerdir (Weissig, 2010).

Sentetik fosfolipidler, dipalmitoil fosfatidil kolin (DPPC), dipalmitoil fosfatidil etanolamin (DPPE), dipalmitoil fosfatidil serin (DPPS), dipalmitoil fosfatidil gliserol (DPPG), dipalmitoil fosfatidik asit (DPPA), distearoil fosfatidil kolin (DSPC) gibi doymuş ve dioleoil fosfatidil kolin (DOPC), dioleoil fosfatidil gliserol (DOPG) gibi doymamış fosfolipidlerden oluşmaktadır (Swain, Patra, & Rao, 2016).

Kolesterol ve türevleri, doğal hücre zarının başlıca bileşenidir ve lipozom çift tabakalarıyla birleştğinde veziküllerin özelliklerinde büyük değişimlere sebep olabilmektedir. Kolesterol tek başına çift tabaka oluşturamaz ancak yapısal ve hücrel lokalizasyona göre uygun derişimlerde fosfolipid membranlarla birleşmektedir (Betageri, Jenkins, & Parsons, 1993). Lipid çift tabakanın akışkanlığını veya mikroviskozitesini ve de membranın suda çözünen moleküllere geçirgenliğini azaltmayı, plazma gibi biyolojik sıvıların varlığında membranı stabilize etmeyi sağlamak gibi özelliklerinden dolayı nanolipozom bileşenlerine dahil edilmektedirler. Kolesterol, fosfolipidlerin açıl zincirlerinin kristalleşmesine engel olarak ve hareketlerine sterik engel oluşturarak fosfolipid membranların akışkanlığını yönetmektedir (Reineccius, 1995). Kolesterol içermeyen lipozomların transferin, albümin ve makroglobülin gibi plazma proteinleriyle hızlı bir şekilde etkileşime girdiği bilinmekle beraber, bu proteinler fosfolipidleri lipozomal yapıdan uzaklaştırma eğilimi göstermektedir. Böylece veziküllerin dış tarafındaki tabakada oluşan eksiklikler fiziksel kararsızlığa sebep olmaktadır. Ancak; moleküler yapı ve çözünebilirlik gibi özelliklerinden dolayı kolesterol, tıpkı bir harç gibi davranarak çift tabakada bulunan fosfolipidler arasındaki boşlukları doldurmakta ve dolayısıyla fosfolipidleri yapıya daha kuvvetli bir şekilde tutturarak bu tip etkileşimleri önemli ölçüde azaltmaktadır. C3 konumundaki OH<sup>-</sup> grubu küçük polar baş kısmını ve C17 konumundaki hidrokarbon zinciri de polar olmayan kuyruk kısmını oluşturup kolesterol de bu çift tabaka arasına girmektedir (Swain, Patra, & Rao, 2016).

Makro moleküller ile itici etkileşimlerin kararlılığı çoğu zaman itici elektrostatik kuvvetlerden kaynaklanmaktadır ve bu itme kuvveti ile lipozom yüzeyi yüklü polimerler ile kaplanarak indüklenmektedir. Ancak polivinil alkol (PVA), polietilen oksit gibi iyonik olmayan ve hidrofilik kısımlar içeren bu tür kopolimerlerin hidrofobik kısım ile adsorpsiyonu lipozomlarda sızıntıya yol açmaktadır. Bu problem polimer taşıyan lipidler ile yani süksinat bağındaki bir karbon aracılığıyla bağlanmış PEG polimerli diasil fosfotidil etanolamine örneğinde olduğu gibi polimerlerin fosfolipidlere kovalent olarak bağlanmasıyla aşilmektedir (Swain, Patra, & Rao, 2016).

Katyonik lipitlere örnek olarak dioleoil trimetil amonyum propan (DOTAP), dioktadesil dimetil amonyum bromür/klorür (DODAB/C) verilebilir. Katyonik lipitlerle yapılmış katyonik lipozomlar, gen iletimi için deoksiribonükleik asidi (DNA) endozomal yol boyunca sitosol içine aktarabilmekte ancak DNA'nın çekirdeğe girişi çok verimsiz

olmaktadır. Bu nedenle de katyonik lipozomlar, katyonik polimerler ve DNA/ribonükleik asit (RNA) kompleksleri ile yalnızca katyonik lipozom-DNA/RNA kompleksine (lipopleksler) göre gen transferini geliştirebilmek adına viral olmayan bir sistem oluşturulmaktadır (Tros de Ilarduya, García, & Düzgünes, 2010).

Nanolipozomların fiziko kimyasal özellikleri, iyonik kuvvet, sıcaklık ve pH gibi faktörlere bağlıdır. Lipidler, geçirgenliklerini değiştirebilecek yüksek sıcaklıklarda bir faz geçişine maruz kalmakta olup, bu sıcaklık faz geçiş sıcaklığıdır ( $T_c$ ). Fosfolipid bileşenlerinin ve lipid çift tabakanın faz geçiş sıcaklığı,

- Polar baş grup
- Hidrokarbon zincirlerinin doymuşluk derecesi
- Açıl zincir uzunluğu
- Süspansiyon ortamının iyonik gücü gibi parametrelerle değişkenlik göstermektedir (Weissig, 2010).

Doymuş açıl zincirlere sahip lipidler, hidrokarbon zincirlerinin hareketliliğinin baskılandığı düşük sıcaklıklarda katı bir çift katman (jel fazı) oluşturmaktadırlar. Sıcaklığın artmasıyla bu çift katman bir faz geçişi yaşayarak akışkan faza dönmekte ve bu sıcaklığın üstündeki faz sıvı kristal faz olarak adlandırılmaktadır.

$T_c$ , açıl yağ zincir uzunluğu arttıkça artmakta ve açıl zincirin doymamışlığıyla da azalmaktadır (Szoka & Papahadjopoulos, 1980). Kullanılan fosfolipidlerin aynı açıl yağ zincirine sahip olması durumunda PA, PS ve PE polar baş gruplar arasındaki hidrojen bağlarından dolayı PC veya PG'den daha yüksek bir faz geçiş sıcaklığına sahip olmaktadır (Boggs, 1987). Bazı durumlarda lipozom sentezinin  $T_c$ 'nin çok üzerindeki sıcaklıklarda yapılması önerilmektedir. Örneğin DPPC için  $T_c=41$  °C iken DPPC içeren lipozom hazırlama prosedüründe  $T_c=51$  °C olması gerekmektedir (Weissig, 2010). Lipozomal membranlar, jel fazdaki haliyle kıyaslandıklarında sıvı kristal fazda akıcı ve geçirgendir. Doymuş fosfolipidlerden oluşan lipozomlar faz geçişi sırasında sahip olduğu bariyer fonksiyonunu kaybetmekte ve bu özellik, DPPC ve DSPC'den oluşmuş lipozomlarda daha sıcak hedef bölgelerdeki salınım için ilaç enkapsülasyonuna izin vermektedir (Comstock, 1991). Bu nedenle; fosfolipid membranların faz geçişlerini anlamak lipozomların üretiminde ve kullanımında oldukça önemli olmaktadır.

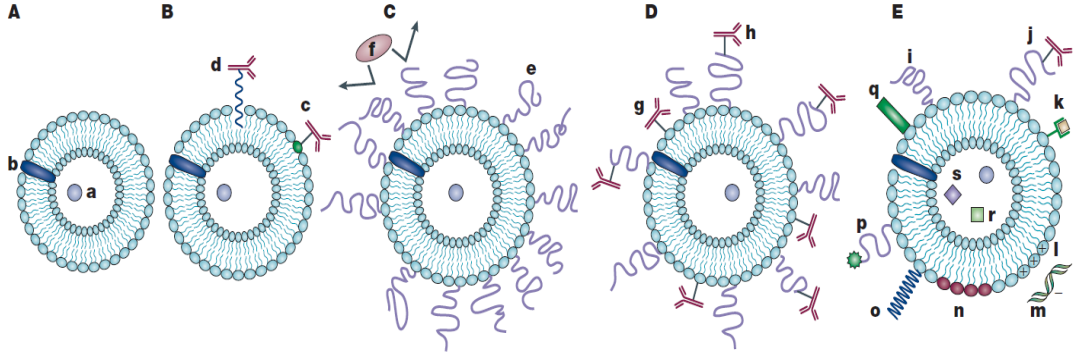
### 2.3.2. Lipozomların sınıflandırılması

Lipozomların boyutu birkaç nanometre (nm) ile mikrometre (µm) arasında değişkenlik göstermekte olup ve ilaç iletim sistemi ve yapısal parametrelere dayanan 2 farklı kategoride değerlendirilmektedir (Yadav, 2016).

#### 2.3.2.1. *Bileşim ve uygulamaya dayalı lipozomlar*

Lipozomal membranlar, çoğunlukla canlı organizmaların membranlarında bulunan doğal bileşiklerden oluşmakla beraber sentetik olarak modifiye edilebilmektedir. Membran bileşenlerini modifiye ederek geleneksel, gizli (görünmez), aktif ve yüklü gibi farklı lipozom türleri şeklinde sentezlenebilmektedirler (Yadav, 2016).

Geleneksel (birinci nesil) lipozomlar, genellikle nötr veya negatif yüklü fosfolipidler ve kolesterolden oluşmaktadır. Bu tür veziküller plazma membranını daha fazla taklit edebilmelerine rağmen karaciğer ve dalaktaki makrofajlar bu geleneksel vezikülleri yabancı cisim olarak değerlendirmekte ve dolayısıyla da kolaylıkla parçalanmaları, kan dolaşımından hızlıca çıkarılması, lipozom içine kapsüle olmuş maddeyi sızdırması, pH, sıcaklık ve iyon değişimlerinden de kolayca etkilenebilmeleri gibi sınırlılıklara sahip olmaktadır (Shaheen vd., 2006). Ayrıca diğer mikropartiküllü sistemlerde olduğu gibi geleneksel lipozomlar da vücuda intravenöz olarak uygulandıktan sonraki ilk 15-30 dak içinde öncelikle karaciğerdeki Kupffer hücreleri daha sonra da RES hücreleri tarafından adsorbe edilmektedir (Laverman vd., 2001). Bu sebeple; bu geleneksel lipozomlar Şekil 2.5 A'da verilen uygun yüzey modifikasyonları ile ikinci nesil ve daha bir çok şekildeki lipozomlara modifiye edilerek lipozomun evrimi gerçekleşmiştir (Wang, Shiahaan, & Soltero, 2005).

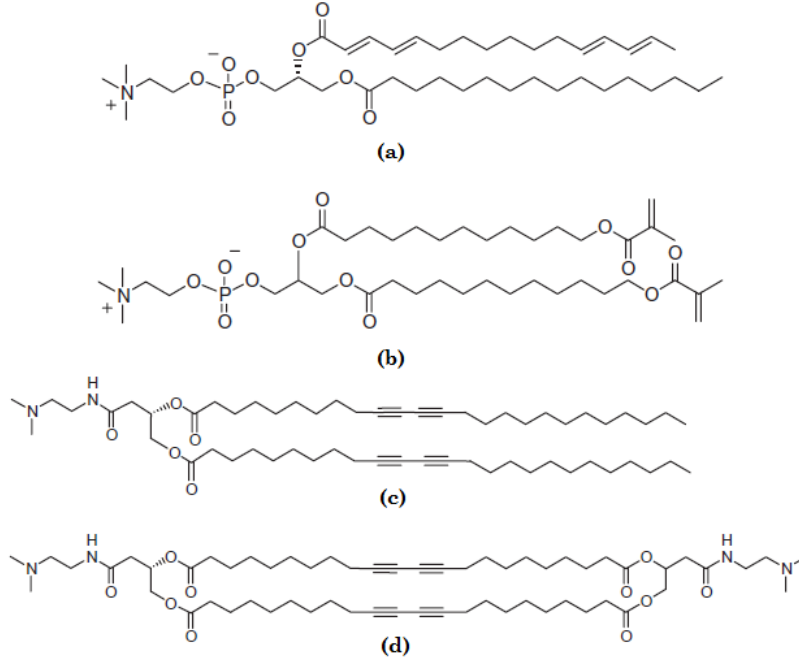


**Şekil 2.5.** Lipozomun evrimi (Torchilin, 2005) A. Geleneksel lipozomda enkapsüle hidrofilik ilaç (a) ve lipofilik ilaç (b); B. Antikor hedefli immünilipozom, membrandaki reaktif fosfolipidlere kovalent olarak bağlanmış antikorlarla (c) veya hidrofobik kısım ile önceden modifiye edilmiş lipozomal membran içine hidrofobik olarak bağlanmış (d); C. Uzun sirkülasyonlu lipozomlar, lipozom yüzeyini opsonize proteinlerle (d) etkileşimden koruyan PEG gibi koruyucu polimerlerle (e); D. Lipozom yüzeyine aynı anda bağlanan, hem koruyucu polimer hem de antikor içeren (g) veya tercihen aşılınmış polimerik zincirin uzak ucuna bağlanmış (h) uzun sirkülasyonlu lipozom; E. Ayrı ayrı veya aynı anda farklı yollarla yüzeyi modifiye edilebilen yeni nesil lipozom, koruyucu polimerlerin (i) veya antikor gibi koruyucu polimer ve hedefli ligandların bağlanması (j); tanıyıcı etiketinin bağlanması (k); pozitif yüklü lipidlerin katılmasıyla (l) veya DNA ile kompleksleşmeye imkan tanıyan (m); uyarıya duyarlı lipidlerin katılmasıyla (n); uyarıya duyarlı polimerlerin bağlanmasıyla (o); hücreye nüfuz eden peptidlerin bağlanmasıyla (p); viral bileşenlerin bağlanması (q). Ek olarak, bir lipozom ilaç dışında manyetik hedefleme için manyetik partiküllerle (r) ve/veya elektron mikroskobu için koloidal altın veya gümüş (s) ile de yüklenebilir.

İkinci nesil lipozomlar, sterik olarak stabilize lipozomlar (SSLs) olarak bilinen; uzun hidrokarbon zincirleriyle kovalent olarak bağlanabilen ya da PEG gibi bazı sentetik polimerlerle yüzeyi örtülebilen görünmez (gizli) lipozomlardır (Şekil 2.5B-C). SSL'ler yüzeyi aşınmış esnek ve hidrofilik polimer zincirlerinin yoğun bir konformasyonel bulut oluşturmasıyla düşük derişimlerde bile koruyucu polimerin diğer makromoleküller ile yüzey etkileşimini önlemektedir (Immordino, Cattel, & Dosio, 2006). Gizli bir etki sağlayan bu örtülme sayesinde immün sistemde görünmeyerek kandaki yarılanma ömrü uzamakta ve vücutta opsonizasyon süreci azaltılmaktadır. Bu tür lipozomlar, yakalanmış ilaç için koruma ve daha iyi bir stabilizasyon sağlamaktadır (Bondurant, Mueller, & O'Brien, 2001).

Metakrilat (metakriloil işlevsel grup içerir) ve diasetilen (işlevsel dien grup içerir) grupları dahil olmak üzere polimerize olabilen gruplar içeren bazı lipidler Şekil 2.6'da gösterilmektedir. Şekil 2.6'daki diğer c ve d lipidleri UV ile çapraz bağlanabilen diasetilen gruplar içemektedir. Stabilize olmamış veziküller kolayca parçalanmakta ve kapsüllenen ilacı sızdırmaktadır. Polimerik veziküllerin oluşmasından sonra monomerlerin çapraz bağlanması, enkapsülasyon uygulamalarında da gelişmiş

stabilizeye sahip veziküller oluşmasına sebep olmaktadır (Wang, Siahaan, & Soltero, 2005).



**Şekil 2.6.** Polimerize olabilen bazı lipidlerin (a) bütadien, (b) metakriloil, (c, d) diasetilen işlevsel gruplar ile yapısı (Wang, Siahaan, & Soltero, 2005)

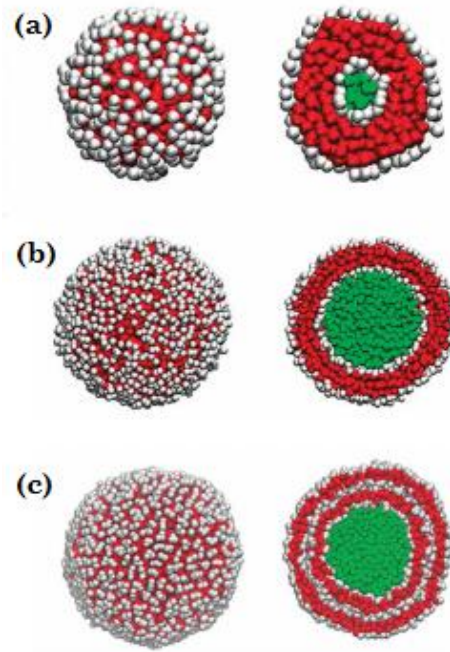
Aktif lipozomlar (long circulation-stealth), içeriğini salmadan önce ortamda daha uzun süre ilerleyebilen böylece yakalanmış moleküllerin hem sürekli hem de kontrollü salınımı ve de seçiciliğini sağlayan veziküllerdir. Bu tür lipozomlar hem sıcaklık hem de pH'ye duyarlı olabildiği için hücreye spesifik olma avantajı sağlamakta ve dolayısıyla hedefleme için de kullanılmaktadır. Lipozomlardaki pH duyarlılığı, çeşitli pH duyarlı polimerler ile spesifik hedefleme için antikorlar, oligosakkaritler, peptidler gibi spesifik ligandlar ile lipozom yüzeyinin üzerine modifikasyonu ile elde edilebilmektedir (Şekil 2.5 D-E).

Yüklü lipozomlar, lipopleksler olarak da bilinen ve yüklü fosfolipidlerle birleşebilen doğada anyonik ve kationik olarak bulunabilen veziküllerdir (Şekil 2.5 E). Bu tip lipozomlar, DNA, RNA ve proteinler gibi karşı yüklü makromoleküllerle birleşme ve bir kovalent bağ oluşturma (Lipid-DNA kompleks) eğilimine sahiptirler. Yüksek molekül ağırlığına sahip moleküller bu tip lipozomlar tarafından içselleştirilir (Yadav, 2016).

### **2.3.2.2. Yapısal parametrelere dayalı lipozomlar**

Lipozomlar, yapısal parametreler üzerine incelendiğinde: 20-1000 nm'lik tek bir fosfolipid tabaka ile çevrelenmiş sulu bir çekirdekten oluşan tek katmanlı, sulu çekirdeği 0,1-0,5 µm olan, 10-12 konsantrik halkalı lipid çift tabaka ile çevrelenmiş az katmanlı ve tek katmanlı lipozomların birbiri ardına konsantrik lipid tabakaları ile çevrelenmiş 0,5 µm'den büyük çok katmanlı lipozomlar olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadırlar (Yadav, 2016). Ancak; bu isimlendirmeler, lipozomların boyutlarıyla ilgili değil; yapısal bloklanmaları ve fosfolipidlerle ilgili olmaktadır (Swain, Patra, & Rao, 2016). İlaç enkapsülasyonu için kullanıldığında; lipozomun boyutu ve homojenliği, bir lipozomdaki katmanların sayısından daha önemli olmaktadır (Mayer, Hope, & Cullis, 1986).

Tek katmanlı lipozomlar, kendi içinde küçük tek katmanlı veziküller (SUVs, genellikle boyutları 20-40 nm), orta tek katmanlı veziküller (MUVs, boyutları 40-80 nm arasında değişen) ve büyük tek katmanlı veziküller (LUVs, çoğunlukla boyutları 100-1000 nm arasında değişen) olmak üzere çeşitlendirilmektedirler (Şekil 2.7) (Yadav, 2016). Hücre iletişimi büyük ölçüde bu veziküllerin trafiğiyle ilgili olup; sinir uyarıları, sinaptik veziküllerde nörotransmitterleri taşıyan sinapslar ve sinir hücreleri arasında hareket etmektedir (Swain, Patra & Rao, 2016). Tek katmanlı veziküller, homojen bir şekilde hazırlanabilmekte ve uygulandıklarında daha uzun süre kan dolaşım sisteminde kalma eğilimi gösterebilmektedirler ancak; lipid derişimine bağılı olarak sınırlı enkapsülasyon verimine sahip olmaktadır (Comstock, 1991). Orta tek katmanlı veziküllerde, su içeriği, farklı şekildeki farklı sayıda lipid çift tabakalarıyla ayrılmakta ve bir soğanın yapısıyla benzerlik göstermektedir (Yadav, 2016). Büyük tek katmanlı veziküller daha büyük bir iç hacme sahip olup büyük malzemeleri kapsüllemek için kullanılabilirler.



**Şekil 2.7.** Vezikül çeşitleri (a) Tek katmanlı vezikül (SUV, 20-40 nm). (b) Orta ve büyük katmanlı vezikül (MUV, 40-80 nm ve LUV,  $\geq 100$  nm). (c) Çok katmanlı vezikül (MLV, 100-1000 nm) (Li, Tang, Liang, & Karniadakis, 2014)

Çok katmanlı veziküller (MLVs), ilk kez Alex D. Bangham tarafından tanımlanmış ve boyutları 100 nm-1 $\mu$ m arasında değişen veziküllerdir (Şekil 2.7). MLVs, fosfolipidlerin hidrasyonu ile kolay bir şekilde hazırlanan, sulu bir çekirdek ile ayrılmış bir dizi konsantrik çift tabakadan oluşan oldukça dengeli yapılardır (Comstock, 1991). Ancak; başlıca problemi, LUVs'a göre nispeten daha az düşük ilaç enkapsülasyonuna imkan vermektedir (Betageri vd., 1993).

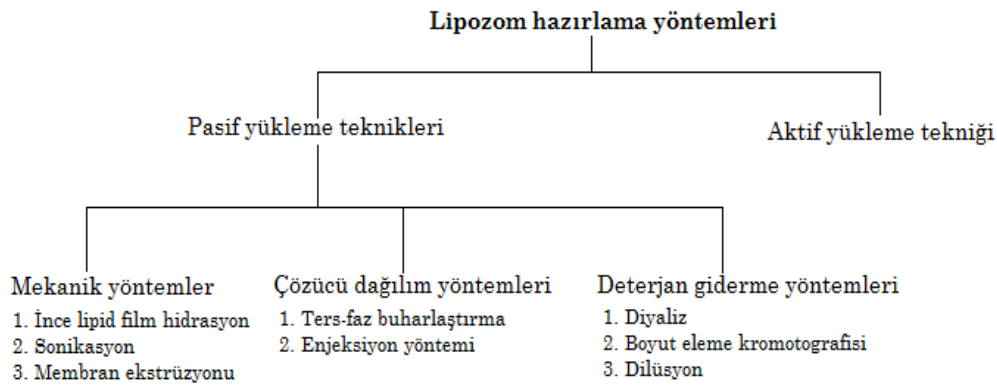
### 2.3.3. Lipozom hazırlama yöntemleri

Hidratlanmış fosfolipidler, Van-der Waals ve hidrofilik/hidrofobik etkileşimler aracılığı ile çift katmanlı yapılar şeklinde düzenlenmektedir. Lipozomlar sulu ortamda, enerji bariyerini aşacak yeterli bir enerji (homojenizasyon, sonikasyon, ısıtma vb.) sağlandıktan sonra fosfolipidlerin hidrofilik baş grupları suya, hidrofobik kuyruk kısımları ise zarın içinde birbirlerine dönerek iki katmanlı veziküller şeklinde oluşmaktadır (Weissig, 2010).

Lipozom hazırlamanın genelinde 4 temel aşama mevcuttur;

- Lipidleri organik çözücüde çözmek ve daha sonra çözücünden uzaklaştırarak kurutmak,
- Sulu ve uygun bir ortamla lipidleri hidratlamak,
- Oluşan lipozomal yapıyı saflaştırmak,
- Nihai ürünü incelemek.

Bangham'ın keşfinden sonra ince film hidrasyonu tekniğinin yanı sıra Şekil 2.8'deki gibi ters-faz buharlaştırma, çözücü enjeksiyon, deterjan diyaliz gibi çeşitli teknikler de oluşturulmuştur. Bunlar en çok kullanılanlar olmakla beraber veziküllerin boyutlarını azaltmaya yönelik sonikasyon, yüksek basınçlı ekstrüzyon ve mikro-fludizasyon gibi teknikler de geliştirilmiştir (Huang vd., 2014).



**Şekil 2.8.** Lipozom sentezi için farklı hazırlama yöntemleri (Yadav, 2016)

## 2.4. Nano-Lipozomlarda İlaç Enkapsülasyonu ve Salınımı

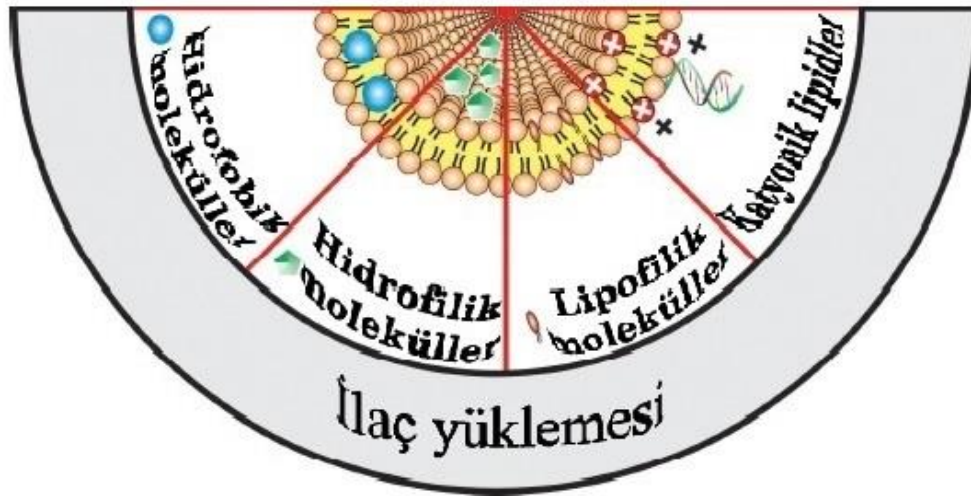
19. yüzyılın sonunda Nobel ödülü sahibi Paul Ehrlich ilk kez ilaç dağıtımına yönelik nano enkapsülasyon tanımını yapmış ve daha sonrasında bu alan verimli bir araştırma konusu olmuştur. Bu yaklaşım ile istenmeyen olası yan etkilerin azaltılarak tedavinin etkinliğinin önemli derecede artması beklenmiştir.

Hedef bölgede bulunduklarında ilaç, difüzyon, şişme, erozyon ve bozunma gibi çeşitli yollarla nano ölçekli malzemelerden salınabilmektedir (Yadav, 2016).

Lipozomlarda kapsüllenen ilaç molekülleri, metabolizma ve atılımdan önce vücutta serbest bırakılmalı ve yüksek bir terapötik etki sağlamalıdır. Kapsüllenen ilacın çözünürlüğü yanı sıra polimer matrisi içerisinde difüzyonu, stabilitesi ve lipozomun

vücut dolaşımından geçişi, lipidlerin düzgün paketlenmesi veya fosfolipid bileşimleriyle belirlenen membran vizkozitesine (akışkanlığına) bağlı olmaktadır (Gupta & Kompella, 2006).

Lipozomlara ilaç yüklemesi, lipozom oluşumu sırasında ilacın kapsüllenmesiyle yani pasif olarak ya da lipozom oluşumundan sonra yani aktif olarak sağlanabilmektedir (Şekil 2.9). Hidrofobik ilaçlar, vezikül oluşumu esnasında lipozomlarla doğrudan birleşebilmekte ve ilaç kapsülasyonu ile salınım ilaç-lipid etkileşimleri tarafından yönetilmektedir. İyi bir kapsülasyon, ilacın lipozom membranındaki çözünürlüğüne bağlıdır. Hidrofilik ilaçlar ise vezikül oluşumu esnasında lipozomların ilaç içeren sulu ortamı tutma kabiliyetine bağlı olarak pasif şekilde kapsüllenebilmektedir. İlacın etkin bir şekilde kapsüllenmesi lipozomun içindeki sıkışmış hacim ve ilacın çözünürlüğüyle ilgilidir. Ancak; protonlanabilir amin fonksiyonlarına sahip hidrofilik bir ilaç pH değişimleriyle daha etkin bir tutulmaya imkan sağlayarak aktif bir şekilde lipozomlara yüklenebilmektedir (Swain, Patra, & Rao, 2016).



Şekil 2.9. İlaç iletiminde lipozomal ilaçların şematik gösterimi (Vieira & Gamarra, 2016)

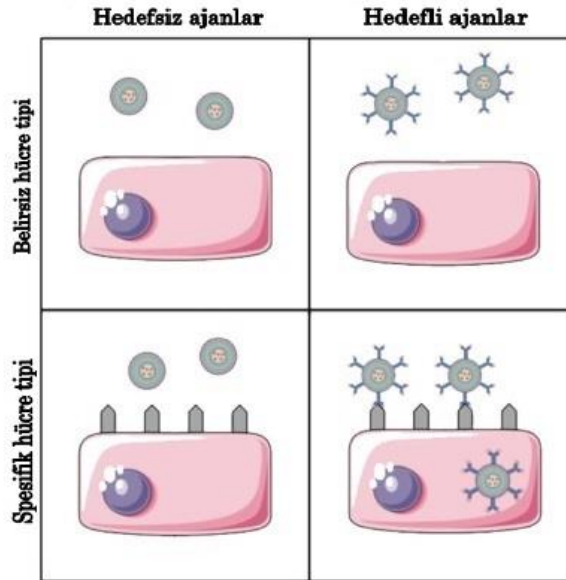
Susturucu RNA (siRNA), RNA molekülünün parçalanmasıyla oluşan 20-25 nükleotidli bir moleküldür ve siRNA'nın keşfiyle in vivo ve in vitro gen ifadesinin susturabilmesi için bu moleküllerin hücrelere taşınması gerekliliği ortaya çıkmış olup lipid-nükleik asit kompleksi oluşturmak yeni bir araştırma konusu olmuştur. Bu yüzden anyonik olan RNA molekülü ile kationik bir lipid arasındaki elektrostatik etkileşimler, hedef dokulara gönderilecek lipid veziküllerin boyutu, artmış verim ve siRNA molekülünün immün sistemin doğal savunmasından korunması gibi kriterler üzerine

yoğunlaşmıştır (Patel, Patel, & Parekh, 2014) (Weissig, 2010). Ancak katyonik lipidlerin oluşturdukları toksik etkiler yüzünden siRNA iletimini daha etkili bir şekilde sağlayabilecek modeller geliştirme ihtiyacı önem kazanmaktadır.

## 2.5. Nano-Lipozomlarda İlaç Hedefleme

Nanoteknolojinin potansiyel temel avantajlarından birisi de kanser tedavisi için tümör hedeflemesidir. Şekil 2.10'da görüldüğü gibi ilaçların hedeflenmiş olması diğer doku ve organlarla karşılaştırıldığında hastalıklı bölgede seçici ve kantitatif olarak artan bir ilaç birikiminin olması anlamına gelmekte ve hedeflenmiş ilaçla hem uygulanacak doz azaltılmış olmakta hem de dolayısıyla artan hasta konforu ve tedavi maliyetinin düşmesi gibi artılar da beraberinde gelmektedir (Kumari vd., 2011).

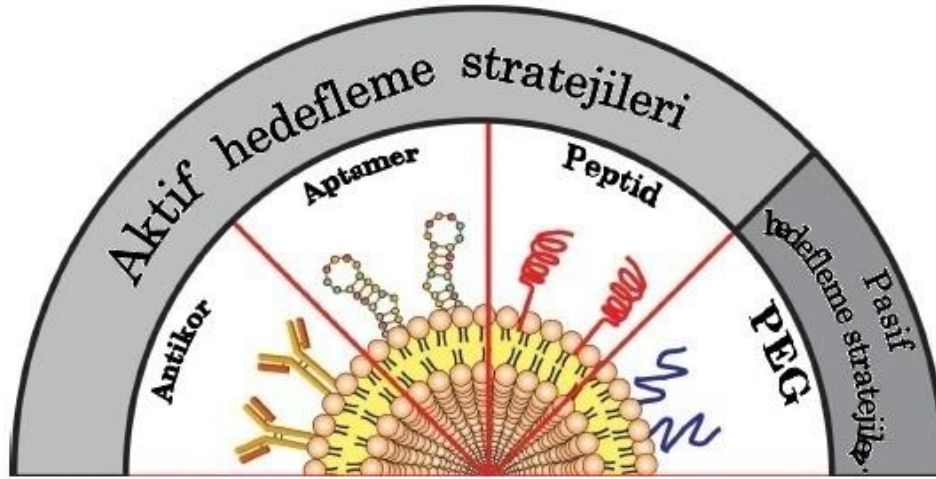
Nano ölçekli malzemeler, ilaç iletiminde ilacın hastalıklı bölgede serbest bırakılması için aktif ya da pasif olarak hedeflendirilebilmektedirler (Şekil 2.11). Her iki strateji de makrofaj fagositik sistemin alımını minimize etmek ve kan dolaşımındaki süreyi maksimize etmek adına nanoparçacıkların yüzey değişikliklerinden yararlanmaktadır (Paefgen, Doleschel, & Kiessling, 2015).



**Şekil 2.10.** *Spesifik yüzey reseptörlerinin ekspresyonu ile terapötik ajanların spesifik hücrelere hedeflenmesi (Ramos-Cabrer & Campos, 2013)*

Pasif hedefleme, dokuların zayıf mimarisine dayanmakta ve tümör dokularının içinde nanoparçacık derişimini artırmak için gelişmiş geçirgenlik ve alıkonma (EPR) ile endotelial boşlukları kullanmaktadır. Bu durum EPR etkisi olarak bilinmektedir (Maeda,

2001). EPR, tümör dokusunun anatomik ve fiziksel anormalliklerini özellikle de normal dokuya kıyasla makromoleküllere oldukça geçirgen olan yani sızdıran tümör vaskülatürünü kullanmaktadır (Ha vd., 2016). EPR etkisi nano ölçekli malzemelerin plazma kalış süreleri ve boyutları tarafından oldukça etkilenmekle beraber nano ölçekli malzemelerin boyutları tümör birikiminin kapsamı ve kinetiğini de etkilemektedir (Greish, 2007). 8 nm'den büyük boyuttaki nano ölçekli malzemeler, EPR etkisi sebebiyle daha büyük tümör dağılımı göstermekte ve nano ölçekli bu malzemeler pasif hedefleme sayesinde kanser hücreleri tarafından aşırı eksprese edilmiş membran reseptörlerinin spesifik olarak tanınabilmesi sağlamakla beraber tümörlerde lokalize de olabilmektedirler (Wang & Thanou, 2010). Bu şekilde de nano ölçekli malzemenin pasif hedeflendirilmesi farklı kanser türlerinin tedavisi için oldukça önemlidir.



**Şekil 2.11.** İlaç iletimi için lipozomun afinite ve seçiciliğini geliştiren hedefleme ajanları (Vieira & Gamarra, 2016)

PEG bağlı nano malzemeler, moleküler ağırlığın artmasıyla (10, 20, 30, 40, 60 kDa) artan bir tümör dağılımı göstermektedir. Moleküler ağırlığı 40-60 kDa nano malzeme 96 saate kadar tümörlerde gözlemlenebilirken, 10 kDa olan PEG bağlı nano malzemeler 24 saat içinde tümörlerde saptanamamıştır. 30, 40 ve 60 kDa PEG bağlı nano malzemeler, 20 kDa PEG bağlı nano malzeme ile karşılaştırıldığında 24 saat içinde tümörlerde sırasıyla 2.1, 5.3 ve 4.1 kat daha yüksek pasif dağılım göstermiş olup; 60 kDa nano malzemeler 40 kDa nano malzeme ile kıyaslandığında 96 saat içinde 1.5 kat daha yüksek tümör dağılımı göstermektedir (Yadav, 2016).

Nötr ve negatif yüklü olanlara kıyasla pozitif yüklü sterik olarak stabilize edilmiş nano malzemeler tümör birikimini güçlendirmiştir. Lipid olarak DOTAP içeren pozitif

yüklü non-PEGlenmiş lipozomlar, nötr veya negatif yüklü olan benzerlerine göre tümör ile çevresindeki dokular arasında daha yüksek bir birikim sergilemektedir (Yadav, 2016).

Doksorubisin yüklü polycaprolactone-PEG nanomalzemeler subkutan C-26 tümörlerine sahip fareleri tedavi etmek için pasif olarak hedeflenlendirildiğinde normal dokudan ziyade tümör dokusunda doksorubisin salımına imkan sağlamaktadır.

Bunun aksine; aktif hedefleme, reseptörler ve hedef dokunun yüzeyinde baskılanmış antijenler arasındaki etkileşimleri kullanmaktadır. Nano ölçekli malzemelerin yüzeyi, bu antijenler ve reseptörlerle bağlanma eğilimine sahip ligandlar veya moleküller ile hastalıklı bölgeye hedeflenmiş ilaç iletimi için modifiye edilmektedirler (Şekil 2.11). Antikorlar, karbonhidratlar, glikolipidler, oligopeptidler ve folik asit, farklı doku ve organları hedeflemek için en çok kullanılan ligandlardır (Weissig, Lasch, & Gregoriadis, 1989). Transferrin, aglütinin, folik asit gibi ligandlar spesifikliğini ve hedefleme yeteneklerini artırmak üzere çeşitli nano malzemelere konjuge edilmiştir (Yadav, 2016).

Akciğer, meme, yumurtalık, karsinoma, epitel kanserden türeyen beyin metastazları, nöroendokrin karsinom hücreleri ve kolorektal yüzeyinde fazlaca folat reseptörü bulunmaktadır. Bu nedenle, nano malzemeler folik asit ile aktif hedeflenerek folat reseptörü bulunan doku ve organlara etkili bir şekilde ilaç iletimi sağlanabilmektedir. Folik asit ile hedeflenmiş lipozomlar, hedeflenmemiş olanlara göre 10 kat daha fazla sitotoksite göstermiş ve folat reseptör bulunan makrofajlara hedeflenmiş iletimin daha spesifik olduğu gözlemlenmiştir (Yadav, 2016).

Transferin ise transferin reseptörlerinin aşırı üretildiği hücrelere hedefleme sağlamak için sıkça kullanılmaktadır. Transferin modifiye polifosfoester miseller, intrakranyal U87 MG glioma taşıyan farelerin tedavisinde daha güçlü ve dolayısıyla etkili anti-glioma aktivitesi sağlamıştır (Yadav, 2016). Pankreas kanserinin tedavisinde bortezomib yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküllerin hedefli iletimi için de yine transferin kullanılmıştır (Frasco vd, 2015).

## **2.6. Kanser Tedavisinde Lipozom**

Kanserin hücre sinyallemesi ve apoptoz gibi çok sayıda hücresel fizyolojik sistem içerdiği ve kanseri karmaşık bir hastalık haline getiren çok aşamalı bir karsinogenez

süreci ile geliştiği bilinmektedir (Reichert & Wenger, 2008). Kanser, gelişmiş dünya düzenindeki en önemli ölüm nedenlerinden biridir ve nanoteknoloji, kansere karşı ilaç taşıyıcı sistemleri kullanarak bu mücadeleye katılmaktadır.

Yaygın kanser tedavileri, kemoterapi, radyasyon ve ameliyatla sınırlı olup anti-kanser ilaçları, uzun süren tedavilerde anti-tümör ajanların spesifik olmayan sistemik dağılımı sonucu birçok toksik yan etkiye ve ilaç direncine sebep olmakla beraber tümör bölgesine yetersiz ilaç derişiminin iletimine de sebep olmaktadır (Singhal, Nie, & Wang, 2010).

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler, tümör hücrelerini hedeflemek için kullanıldığında daha düşük toksisite ve artmış ilaç etkinliği ile kanser tedavilerinde çığır açan bir ilerleme yaratmıştır. Lipozomların istenen bölgeye gönderilebilmesi için spesifik reseptör hücrelerini hedefleyen antikor, protein veya uygun parçaların aminoasit kısmına bağlanması gerekmektedir. Küçük ve kararlı olan lipozomlar, vücutta daha uzun süren bir dolaşım yapabildikleri ve dokudaki artmış vasküler geçirgenlikleriyle farklı tümörlere pasif olarak hedeflenebildikleri bilinmektedir. Klinikte çeşitli anti-kanser ilaç formülasyonları mevcut olup Tablo 2.1’de örnekleri verilmektedir. Mangala vd., in vivo siRNA iletimi için DOPC nötral lipozom kullanarak yumurtalık kanseri için anti-tümör etki sağlamışlardır. Barenholz vd.’nin PEG’lenmiş lipozom içine doksil ilacı enkapsüle ederek oluşturdukları lipozomal formülasyon, FDA tarafından onaylı ve AIDS hastalarında karposi’s sarkomanın tedavisinde kullanılmaktadır. Löhr vd.’nin paklitaksel içeren katyonik lipozomları ise pankreas kanseri hedeflemede bir ajan olarak kullanılmaktadır. Paklitaksel ile kombine edilmiş bir diğer lipozomal sisplatin ise Stathopoulos vd. tarafından akciğer kanseri tedavisi için geliştirilmiş ve Faz III aşamasındadır (Pandey, Rani, & Agarwal, 2016) (Sercombe vd., 2015) (Shi vd., 2017).

Doxil, damardan verilen ve doksorubisinin lipozomal bir formu olan kemoterapötik bir ajan olup gizli (stealth) teknoloji adıyla bilinen yeni bir teknolojiyle hazırlanmıştır. Bunlar; çeşitli yollarla hazırlanmış uzun sirkülasyona sahip lipozomlardır. Aynı şekilde; Myocet ve Caelyx de doksorubisinin lipozomal bir formülasyonudur ve Myocet metastatik meme kanseri için kullanılırken, Caelyx metastatik yumurtalık kanseri tedavisiyle beraber ilerlemiş meme kanseri tedavisinde de kullanılmaktadır (Swain, Patra, & Rao, 2016). Kolesterol içeren ve yaklaşık 100 nm ve 100 nm’den küçük lipozomlar enjeksiyon yoluyla in vivo stabiliteyi önemli ölçüde uzatmakla beraber lenf nodlarında

da %70'e varan yüksek oranlarda iyi bir emilim göstermektedir (Oussoren & Storm, 2001).

**Tablo 2.1.** *Kanser tedavisinde kullanılan piyasadaki lipozomal terapötikler ve ajanlar (Sercombe vd., 2015) (Shi vd., 2017) (Pandey vd., 2016)*

| İlaç                  | Hastalık                                              | Lipozomal iletim tipi | Aşama            | Referans               |
|-----------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------|------------------|------------------------|
| Paclitaksel LEP-ETU   | Paclitaksel EndoTAG-1                                 | siRNA                 | Faz I/II         | Immordino vd., 2006    |
| siRNA                 | Yumurtalık kanseri                                    | DOPC nötral lipozom   | Faz I            | Mangala vd., 2009      |
| Paclitaksel EndoTAG-1 | Paclitaksel EndoTAG-1                                 | Katyonik              | Faz II           | Awada, 2014            |
| Paclitaksel EndoTAG-1 | Pankreas kanseri                                      | Katyonik              | Faz II           | Löhr, 2012             |
| İrinotecan SN-38      | Metastatik kolorektal kanser                          | Geleneksel            | Faz II           | Suenaga vd., 2015      |
| Daunorubisin          | Lösemi                                                | Geleneksel            | FDA onaylı, 1996 | Allen, & Cullis, 2013  |
| Lurtotecan            | Yumurtalık, baş ve boyun kanseri                      | Geleneksel            | Faz I/II         | Chang, & Yeh, 2012     |
| İrinotecan            | İlerlemiş refractory solid tümör ve kolorektal kanser | PEGlenmiş             | Faz I            | Chang vd., 2015        |
| Doksil                | Kaposi's sarkoma                                      | PEGlenmiş             | FDA onaylı       | Barenholz, 2012        |
| Cisplatin             | NSCLC (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri)         | PEGlenmiş             | Faz III          | Stathopoulos vd., 2010 |

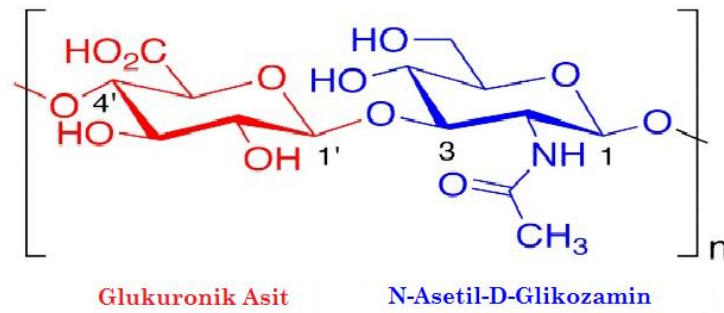
## 2.7. Hiyaluronik Asit ve İlaç Endüstrisindeki Yeri

Yaklaşık 80 yıl önce Karl Meyer ve John Palmer tarafından keşfedilmiş olan Hiyaluronik Asit (HA), diğer adıyla “Hiyaluronan”, glikozaminoglikan sınıfına ait olup bugün bile araştırmacıları kimya, biyoloji ve tıp alanında benzersiz özellikleriyle şaşırtmaya devam etmektedir.

HA, yapısı gereği yüksek viskoelastikiyete sahip olup yüksek su tutma kapasitesi sağlamasıyla kozmetik ürünlerde, kırık implantlarında, göz ile ilgili ilaçlarda, yumuşak doku tedavisinde, ilaç hedeflemeye olduğu gibi pek çok biyolojik işleme katılan ve neredeyse tüm vücut dokularında bulunan, dölleme, embriyonez, yara iyileşmesi, yaşlanma süreci, estetik tıp problemleri, immün cevap gelişimi, enfeksiyon hastalıkları

ve onkoloji gibi konularla da ilgili pek çok role sahip olmaktadır. Ayrıca; HA'nın canlı hücrelerle etkileşime girebilme yeteneğiyle hücre büyümesini hızlandırdığı ve bazı hücre agregasyonlarını başlattığı gözlemlenmiş ve dolayısıyla da bu polisakkaritin hücre yüzeyine eşsiz bir şekilde bağlanmasının ilk kanıtı olarak görülmüştür (Selyanin, Boykov, & Khabarov, 2015) (Vasi vd., 2014).

HA, doğal bir şekilde oluşmuş doğrusal bir polisakkarit olup, Şekil 2.12'de gösterildiği gibi glukuronik asit ve bir N-asetilglukozamin'den oluşan ve  $\beta$ -1,3 veya  $\beta$ -1,4 glikozidik bağlarıyla bağlanarak disakkarit tekrarlarından oluşan yüksek molekül ağırlıklı ( $10^4$ - $10^9$  Da) yapılardır (Akdamar vd., 2009). Vücutta HA, cilt, göbek kordonu, sinoviyal sıvı, birçok yumuşak bağ dokusunda, akciğer, böbrek, beyin ve kas dokularında da önemli miktarlarda bulunmaktadır (Necas vd., 2008).



Şekil 2.12. HA'nın yapısı

HA polisakkarit zinciri, endoglukanaz (hiyaluronidaz) ve ekzoglukanaz (beta-glukoronidaz ve beta-N-asetil heksosaminidaz) ile bozunmaya uğramaktadır. HA, belli bazı tümör hücrelerinde aşırı eksprese olan RHAMM (Hiyaluronan aracılı hareketlilik için reseptör) ve CD44 reseptörüne bağlanabildiği için HA temelli tedavilerde anti-tümör etkinin artması beklenmektedir. HA ailesi molekülleri, prostat, mesane, endometriyal, meme ve yumurtalık gibi çeşitli kanser tipleri için potansiyel tanı ve prognostik belirteçler olup CD44 de, HA reseptörlerinden biri olmasından kaynaklı, önemli bir marker olarak bilinmektedir (Lokeshwar, Mirza, & Jordan, 2014). HA dönüşümü, kötü huylu dokularda daha hızlı bir şekilde meydana gelmekte ve düşük moleküler ağırlıklı HA parçaları, tümörlü bölgelerde normal dokulardakinden daha büyük miktarda bulunmaktadır. Bu değerli HA dönüşümüyle, HA temelli nano-parçacıklar kullanılarak hücre içine başarılı bir şekilde biyolojik olarak aktif bileşiklerin iletimleri sağlanmaktadır (Tiwari & Tiwari,

2013). Tümörlerde HA birikimi, CD44 ve aktive veya inhibe hale gelen diğer hücre yüzey reseptörleri arasındaki ilişkiyi düzenlemektedir (Misra vd., 2011).

HA, ilaç taşıyıcı nano sistemlere konjuge edildiğinde, koruyucu ve hedefleme için bir örtü gibi işlev görmek yanı sıra non-immünojenik, enfeksiyon önleyici ve biyouyumlu olmaları gibi pek çok özelliği de beraberinde getirmektedir (Lokeshwar vd., 2014). Dolaşım süresi ve biyolojik dağılım, HA'nın hedefleme ve hücreye özgü alım özelliklerinin taşıyıcı sistemlere uyarlanmasından etkilenmektedir. CD44 aşırı eksprese olmuş hücrelere gönderilen bu HA konjuge nano sistemler epirubisin, doksorubisin, paklitaksel, mitomisin ve siRNA gibi anti kanser ilaçlar içermektedir (Misra vd., 2011).

Pek çok çalışma, hem in vitro hem de in vivo olarak nano yapıların oluşumunda HA'nın başarılı bir şekilde kullanıldığını ve tedavi etkinliğini artırmak için kullanılan basit fakat etkili bir yol olduğunu göstermektedir.

#### **2.7.1. Mikrobiyal olarak hiyaluronik asit eldesi**

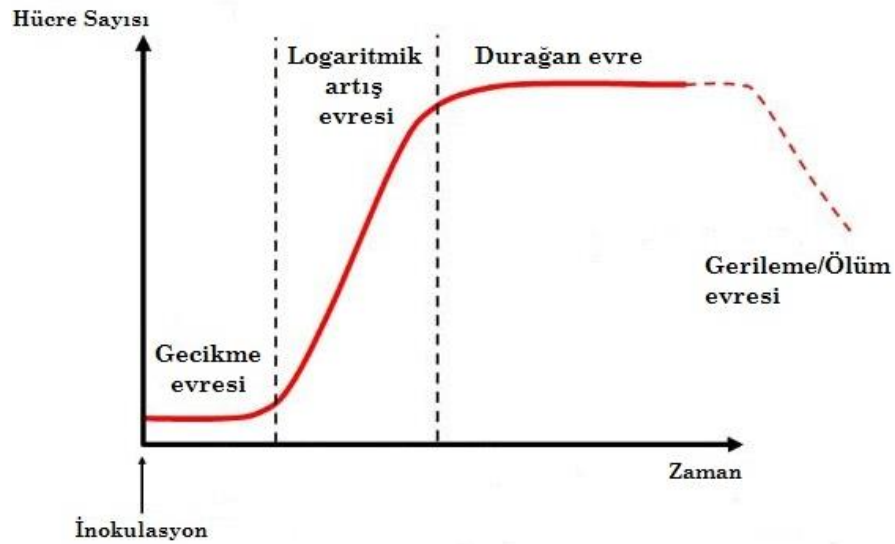
HA, günümüze kadar çeşitli hayvansal organlar olmak üzere pek çok kaynaktan izole edilmiş, ancak daha yüksek derişimlerde endüstriyel üretim için en ekonomik ve en güvenilir kaynak olan streptokok A ve C grupları bugün de bilimsel ve pratik anlamda büyük önem taşımaktadır (Selyanin, Boykov, & Khabarov, 2015) ve HA, bakteri çevresindeki bir mukoid kapsül olarak görünmektedir (Saranraj vd., 2011). Bakteriyel fermentasyon proseslerinin performansı, bakteri türü, kültür ortamı, pH, sıcaklık, iyonik güç, çalkalama hızı ve ortam aerobik ise havalandırma oranı gibi pek çok faktöre bağlı olmaktadır (Liu vd., 2009).

Streptokoklar, zincir veya çiftler oluşturan gram pozitif küresel koklardır ve fakültatif olarak anerobik, katalaz ve oksidaz negatif ve hareketsizlerdir. Lancefield gruplamasına göre 3 farklı şekilde hemoliz ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  hemoliz) sergileyebilmekte olup hemoliz türü, streptokok türüne, kültür ortamında kullanılan kan türüne ve çevresel şartlara bağlı olmaktadır. Streptokoklar için optimum sıcaklık yaklaşık 37 °C'dir (Lindahl, 2013).

En yüksek verimle HA üretimi için kullanılan *Streptococcus equi* (*S. equi*), Lancefield'in C grubuna ait bir streptokok olup  $\beta$  hemoliz zonu üretmektedir ve atlara

patojendir. *S. equi*, HA kapsülü varlığı ile fagositoza karşı oldukça dirençli bir bakteri olarak bilinmektedir (Lindahl, 2013).

Bakteri suşlarından HA üretimi için biyoteknolojik yöntemler, logaritmik büyüme evresinde (exponential phase) HA kapsül oluşturabilecek seçilmiş ortamdaki kùltivasyondan oluşmaktadır. Ancak Şekil 2.13'deki durağan evrede (stationary phase) HA kapsül sıvıya tamamen taşınarak incelip, yok olabilmektedir. Kùltür ortamından HA üretimi, mikroorganizmaların çıkarılması, organik çözücülerle çökeltilmesi, düşük molekül ağırlıklı maddelerin uzaklaştırılmasını içerip daha sonra nihai ürünün saflaştırılmasıyla son bulmaktadır (Selyanin, Boykov, & Khabarov, 2015).



Şekil 2.13. Bakteriyel büyüme evreleri (<https-4>)

1985 yılından beri *S. equi* ekimi ile HA üretimi için en az 20 patent mevcut olmasına ve günümüze kadar anahtar kelimesi HA olan yaklaşık 80.000 çalışma yapılmış olmasına rağmen HA talebi karşılamada dünya çapında hala yetersiz kalınmaktadır.

## 2.8. Amaç

Pankreas, yumurtalık, meme ve akciğer kanseri gibi katı tümörlerde aşırı sentezlendiği bilinen bir hücre yüzey adhezyon reseptörü olup, CD44'ü hedef alan ilaç taşıyıcı nanosistemlerin geliştirilmesiyle sağlıklı ve kötü huylu doku arasındaki ilaç dağılımı, hedef dışı ilaç birikiminin azaltılması ve toksisitesinin engellenmesiyle tümör büyümesi kontrol altına alınabilmektedir. CD44 reseptörünün en çok bilinen ligandları arasında HA, osteopontin, kollojenler ve matriks metalloproteinazlar sayılabilir

(Goodison, Urquidi, & Tarin, 1999). HA ise bir glikozaminoglikan (GAG) olup, ekstraselüler membranın önemli bir bileşenidir (Misra vd., 2015).

Diğer taraftan, ilaç taşıyıcı nanosistemlerden olan lipozomal yapılar, hücre zarlarını taklit edebilmesi ve daha yüksek dozda ilaç çözünümlü ve enkapsülasyonu sağlamasının yanında stabilite ve biyoyararlanımı iyileştirerek enkapsüle olmuş ilacı tümörlü dokulara iletmede de oldukça etkili olmaktadır. Bu nedenle; tez çerçeve amacıyla; lipozom yüzeyinin CD44 ligandı olan HA ile modifikasyonu sayesinde ilaç enkapsüle edilmiş ve HA donatılmış nihai nanotaşıyıcı yapının öncelikli bir şekilde kanser hücrelerinin CD44'lerine hedefleme kabiliyeti ile spesifik iletimin başarılı bir şekilde sağlanması öngörülmüştür. HA'nın biyo-uyumlu, toksik olmayan ve biyo-bozunabilirlik bakımından mükemmel bir ligand ve biyopolimer olması kan bariyer sistemlerinden kolaylıkla geçerek vücutta daha uzun süre dolaşımına da imkan vermiş olacaktır. Tüm bunların yanında; son zamanlarda siRNA kullanarak gen susturulması, kanser tedavilerinde siRNA'nın potansiyel terapötik bir ajan olarak görülmesine yol açmaktadır. Ancak; siRNA, plazma ve hücresel stoplazmada hızlı bir şekilde nükleazlar tarafından parçalanarak hücrelere nüfuz edemediğinden, hedef bölgeye etkili ve spesifik siRNA iletimi için viral olmayan bir vektör olarak belli yüzey özelliklerine sahip, nanolipozomların kullanım alanı bulmaktadır (Yang vd., 2012).

Bu çerçevede; çalışmanın öncelikli amacı; vücutta uzun dolaşım süresine sahip, biyo-uyumlu ve yalnızca spesifik bir hücreye ardışık ve sinerjik hedeflenebilen, HA tabanlı ve hedefli ilaç taşıyıcı lipozomal nanosistem geliştirmektir. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak, hücre zarını en iyi şekilde taklit edebilecek, dolayısıyla vücuttaki yarı ömrü kısa olmayan ve siRNA gibi çeşitli zor kanser tedavilerinde potansiyel olarak umut verici olan terapötik ajanın hedef bölgeye korunarak iletilmesini sağlayacak liposomal bir nanoyapı sentezi hedeflenmiştir.

Bunun için; katyonik ve anyonik fosfolipidlerin sebep olabileceği toksisiteyi sergilemeyen ve in vivo olarak daha etkili bir siRNA iletimine sebep olan nötral bir fosfolipid olan, 1,2-Dioleoil-sn-glisero-3-fosfokolin (DOPC) kullanılmıştır. Ayrıca; amfifilik olma ve makrofajlar tarafından tutulumu önleme özelliğine sahip, hücre zarını en iyi şekilde taklit edebilen biyo-uyumlu biyomonomer olan, 2-Metakriloiloksietil fosforilkolin (MPC) ve lipid çift tabakanın akışkanlığı yöneterek suda çözünen moleküllere geçirgenliği azaltan, lipid çift tabadaki fosfolipid boşluklarını doldurarak

tampon görev yapan kolesterol (Chol) kullanılarak kararlı ve nanoboyutlu modifiye edilmemiş boş lipozom sentezi gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada ikinci olarak; sentezlediğimiz boş nanolipozom yüzeyini modifiye edeceğimiz HA kompleksi için HA polimerinin *S.equi*'den saflaştırılması ve saflaştırılan uzun zincirli HA'nın kısa zincirli HA polimer haline getirilmesi sağlanmış olup, ardından kısa zincirli HA ile ANADOLUCA konseptini de uygulayacağımız fotosensitif metal-şelat yapı (MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA) sentezlenmiş ve nanolipozomlara eklenmiştir. Diğer taraftan, floresans özellikteki “Green Fluorescent Protein” (GFP) de bu nanolipozomlara çapraz bağlanarak hem görüntüleme teknolojisi ile tedavi sürecinin ilerleyişinin gözlemlenmesi hem de bu proteinin ikinci hedefleme ajanı olarak kullanılabilmesi amaçlanmıştır.

Son olarak hedefimiz, gen susturucu görevi ile kanserin ilerlemesini engelleyerek kanser tedavisinde önem kazanmış siRNA'yı meme kanseri yatkınlık geni olarak bilinen BRCA 1 genini susturması amacıyla HA ile kanserli doku yüzey reseptörü olan CD44'ü hedefleyecek nanolipozom içine enkapsülasyonunu verimli bir şekilde sağlamaktır.

### 3. MATERYAL

#### 3.1. Kimyasallar

Deneysel süreçte kullanılan kimyasallar Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1.** *Kullanılan kimyasallar*

| <b>Kimyasalın Adı</b>                                             | <b>Firma, Ülke</b>                         |
|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| APS                                                               | Alfa Aesar, Amerika                        |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                              | Fluka, İsviçre                             |
| CaCO <sub>3</sub>                                                 | Merck, Amerika                             |
| CTAB 95%                                                          | Sigma, Amerika                             |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                              | Sigma, Amerika                             |
| DOPC 99%                                                          | Sigma, Amerika                             |
| Etanol, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O                           | Riedel-deHaen, Almanya                     |
| esiRNA Human brca1                                                | Sigma Aldrich, Amerika                     |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                              | Sigma, Amerika                             |
| D(+)-Glikoz                                                       | Sigma, Amerika                             |
| GFP                                                               | MyBiosource, Amerika                       |
| Glukuronik Asit                                                   | Merck, Amerika                             |
| HEMA                                                              | Sigma, Amerika                             |
| HEPES                                                             | Acros Organics, Amerika                    |
| Hiyaluronidaz                                                     | Sigma, Amerika                             |
| Hiyaluronik Asit Sodyum Tuzu                                      | Fluka, İsviçre                             |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                    | Sigma Aldrich, Amerika                     |
| Karbazol 96%                                                      | Acros Organics, Amerika                    |
| Kloroform, CHCl <sub>3</sub>                                      | Carlo Erba, İtalya                         |
| Kolesterol 95%, Chol                                              | Sigma Aldrich, Amerika                     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                                   | Sigma, Amerika                             |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                   | Fluka, İsviçre                             |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                    | Sigma, Amerika                             |
| MBA                                                               | Sigma, Amerika                             |
| Metanol, CH <sub>3</sub> OH                                       | Merck, Amerika                             |
| MgCl <sub>2</sub>                                                 | Sigma Aldrich, Amerika                     |
| MgSO <sub>4</sub>                                                 | Sigma, Amerika                             |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                              | Sigma, Amerika                             |
| MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                              | Merck, Amerika                             |
| MPC                                                               | Sigma, Amerika                             |
| Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O | Merck, Amerika                             |
| NaCl                                                              | Tekkim, Türkiye                            |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O              | Sigma Aldrich, Amerika                     |
| NaN <sub>3</sub>                                                  | Sigma, Amerika                             |
| NaOH                                                              | Tekkim, Türkiye                            |
| Pepton                                                            | Amresco, Amerika                           |
| SDS                                                               | Alfa Aesar, Amerika                        |
| Sephadex G-75/superfine                                           | Sigma Aldrich, Amerika                     |
| Silika Jel 60                                                     | Fluka, İsviçre                             |
| Soydum Asetat, CH <sub>3</sub> COONa                              | Sigma Aldrich, Amerika                     |
| TEMED                                                             | Sigma Aldrich, Amerika                     |
| Triton X-100                                                      | AppliChem, Almanya                         |
| Tryptic Soy Agar (%5 Koyun Kanlı) Besiyeri                        | OR-BAK, Çağdaş Sağlık Hizmetleri LTD. ŞTİ. |
| Yeast Ekstrakt                                                    | Acumedia, Amerika                          |
| ZnCl <sub>2</sub>                                                 | Sigma, Amerika                             |

### 3.2. Biyolojik Materyal

Bu çalışmada kullanılan bakteri Refik Saydam Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilen *Streptococcus equi* RSKK 679 suşudur.

### 3.3. Besiyerleri

*S. equi* gelişimi için kullanılan besiyerleri ve çözeltileri Tablo 3.2'de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** Kullanılan besiyerleri ve çözeltiler

| Besiyeri                              | İçerik                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| İz Element Çözeltisi                  | CaCl <sub>2</sub> (2 gL <sup>-</sup> ),<br>ZnCl <sub>2</sub> (0,046 gL <sup>-</sup> ),<br>CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O (0,019 gL <sup>-</sup> ).                                                                                                                                                                                                                                                       |
| %5 koyun kanlı Tryptic Soy Agar (TSA) | Kazeinin Pankreatik Dijesti (14,5 gL <sup>-</sup> ),<br>Soya Fasulyesi Küspesi Papaik Dijesti (5 gL <sup>-</sup> ),<br>NaCl (5 gL <sup>-</sup> ),<br>Gelişim Faktörleri (1,5 gL <sup>-</sup> ),<br>Agar (14 gL <sup>-</sup> ),<br>Defibrinleştirilmiş Koyun Kanı (%5).<br>pH 7,3±0,2                                                                                                                           |
| Modifiye Fermantasyon Ortamı (1)      | Glikoz (60 gL <sup>-</sup> ),<br>Yeast Ekstrakt (25 gL <sup>-</sup> ),<br>MgSO <sub>4</sub> (3 gL <sup>-</sup> ),<br>K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2 gL <sup>-</sup> ),<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2 gL <sup>-</sup> ),<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (2,5 gL <sup>-</sup> ),<br>NaCl (1,5 gL <sup>-</sup> ),<br>Pepton (10 gL <sup>-</sup> ).<br>pH 7,3±0,2             |
| Modifiye Fermantasyon Ortamı (2)      | Glikoz (60 gL <sup>-</sup> ),<br>Yeast Ekstrakt (30 gL <sup>-</sup> ),<br>K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1,3 gL <sup>-</sup> ),<br>MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (2 gL <sup>-</sup> ),<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O (6,2 gL <sup>-</sup> ),<br>FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (0,005 gL <sup>-</sup> ),<br>İz Element Çözeltisi (2,5 mL <sup>-</sup> ).<br>pH 7,3±0,2 |
| Modifiye İnokulum Ortamı              | Glikoz (40 gL <sup>-</sup> ),<br>Yeast Ekstrakt (20 gL <sup>-</sup> ),<br>MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (2 gL <sup>-</sup> ),<br>MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O (0,1 gL <sup>-</sup> ),<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2 gL <sup>-</sup> ),<br>CaCO <sub>3</sub> (5 gL <sup>-</sup> ),<br>İz Element Çözeltisi (1mLL <sup>-</sup> ).<br>pH 7,3±0,2                                           |

### 3.4. Çözeltiler ve Tamponlar

Deneysel süreçte kullanılan çözeltiler ve tamponlar Tablo 3.3'de verilmiştir.

**Tablo 3.3. Kullanılan çözeltiler ve tamponlar**

| <b>Çözelti ve Tamponlar</b>                          | <b>Hazırlanışı</b>                                                                                                                                       |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CTAB Çözeltisi                                       | 2,5 g CTAB,<br>%2 (w/v) NaOH,<br>H <sub>2</sub> O (100 mL'ye tamamlanır).                                                                                |
| 5mM HEPES Tamponu, pH 7,4                            | 0,119 g HEPES,<br>pH 7,4'e ayarlanır,<br>H <sub>2</sub> O (100 mL'ye tamamlanır).                                                                        |
| 0.15 M NaCl                                          | 109,5 mg NaCl,<br>H <sub>2</sub> O (12,5 mL 'ye tamamlanır).                                                                                             |
| %0,02 (w/v) NaN <sub>3</sub> Çözeltisi               | 0,02 g NaN <sub>3</sub> ,<br>H <sub>2</sub> O (100 mL'ye tamamlanır).                                                                                    |
| 5M NaOH                                              | 2 g NaOH,<br>H <sub>2</sub> O (10 mL'ye tamamlanır).                                                                                                     |
| %2 (w/v) NaOH                                        | 2 g NaOH,<br>H <sub>2</sub> O (100 mL'ye tamamlanır).                                                                                                    |
| %3 (w/v) Sodyum Asetat Çözeltisi                     | 3 g Sodyum Asetat,<br>H <sub>2</sub> O (100 mL'ye tamamlanır).                                                                                           |
| 0,1 M Sodyum Asetat Tamponu (0,15 M NaCl),<br>pH 5,4 | 320 mg Sodyum Asetat (40 mL),<br>230 µL Asetik asit (40 mL),<br>pH 5,4 'e ayarlanır,<br>350 mg NaCl eklenir,<br>H <sub>2</sub> O (40 mL 'ye tamamlanır). |
| %0,1 (w/v) SDS Çözeltisi                             | 0,1 g SDS,<br>H <sub>2</sub> O (100 mL'ye tamamlanır).                                                                                                   |
| 0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu, pH 7,0                  | 156 mg monobasic Sodyum Fosfat (10 mL),<br>117,9 mg dibasic Sodyum Fosfat (10 mL),<br>pH 7,0'a ayarlanır,<br>H <sub>2</sub> O (10 mL'ye ayarlanır).      |

### 3.5. Cihazlar ve Laboratuvar Sarf Malzemeleri

Deneysel süreçte kullanılan cihazlar ve laboratuvar sarf malzemeleri Tablo 3.4'de verilmiştir.

**Tablo 3.4. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar sarf malzemeleri**

| <b>Cihazlar ve Sarf Malzemeleri</b>   | <b>Firma, Ülke</b>                |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| +4 Buzdolabı                          | Liebherr, Medline, Almanya        |
| -20 Buzdolabı                         | Liebherr, Medline, Almanya        |
| Büyük Santrifüj                       | Sigma, Amerika                    |
| Çalkalayıcı                           | Thermo, Amerika                   |
| Döner Buharlaştırıcı (R-300)          | Büchi Rotavapor, İsviçre          |
| Mikroplaka Okuyucu                    | BioTek Synergy H1, Amerika        |
| Etüv                                  | Innovens, Jouan, Amerika          |
| FT-IR Spektrofotometri (Spectrum 100) | PerkinElmer,                      |
| Hassas Terazi                         | Ohaus, Pioneer, Amerika           |
| Küçük Santrifüj                       | Hettich, Almanya                  |
| Liyofilizatör                         | Labconco, Freezone, Amerika       |
| Manyetik Karıştırıcı                  | Jeio Tech, Lab Companion, Amerika |
| Mikropipet Uçları                     | Isolab, Almanya                   |
| Otoklav (JSAC-40)                     | JSR, Hindistan                    |
| pH Metre (H1 2211 pH/ORP)             | Hanna, Amerika                    |
| Pipetör                               | Brand, Transferpette, Almanya     |
| Steril Kabin                          | Nükleon, Türkiye                  |

**Tablo 3.4. (Devam)** *Kullanılan cihazlar ve laboratuvar sarf malzemeleri*

|                                    |                                    |
|------------------------------------|------------------------------------|
| Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) | Zeiss Ultra Plus, Almanya          |
| Ultrasonik Prob Sonikatör          | Bandelin Sonopuls HD 2070, Almanya |
| Ultrasonik Su Banyosu              | Lab Companion, Amerika             |
| Vorteks                            | Stuart, İngiltere                  |
| Zetametre                          | Malvern, İngiltere                 |

## 4. YÖNTEM VE UYGULAMA

### 4.1. HA Üretimi

#### 4.1.1. Hücre kültivasyonu

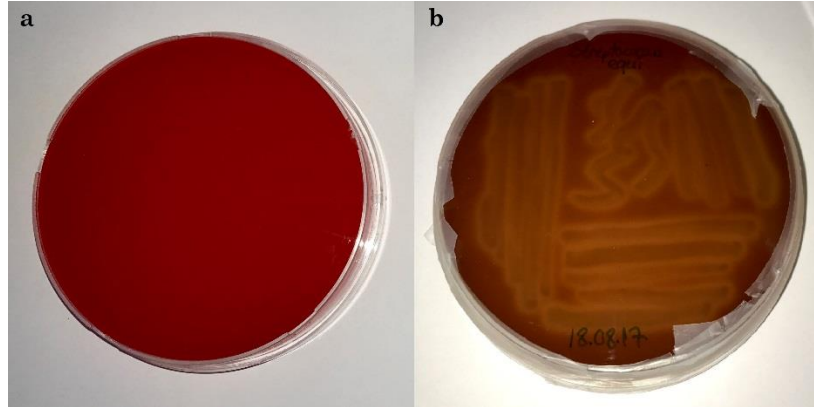
HA üretimi için *Streptococcus equi* RSKK 679 suşu kullanılmış ve hücre kültivasyonu için % 5 koyun kanlı Tryptic Soy Agar (TSA) katı besiyerinin (American Type Culture Collection, 2013) yanı sıra içeriğini kendi oluşturduğumuz modifiye inokulum ve modifiye fermentasyon ortamları (1 ve 2) (Liu vd., 2009) (Baksi vd., 2017) kullanılmıştır.

##### 4.1.1.1. *Streptococcus equi* bakterisinin gelişimi ve saflık kontrolü

-80 °C'de % 20'lik gliserol içinde muhafaza edilen stok kültürünü canlandırmak için % 5 koyun kanı içeren TSA katı besiyeri kullanılmıştır.

Petrilerdeki kültürlerin saflık kontrolü, katı besiyerine yapılan çizgi ekimiyle gözlemlenmiştir (Görsel 4.1).

Aseptik koşullar altında, TSA besi ortamına stok kültürden çizgi ekimi yapılmış ve 37 °C'de 24-48 s etüv içinde inkübasyona bırakılmıştır (American Type Culture Collection, 2013).



**Görsel 4.1.** TSA katı besiyerinde saflık kontrolü; ekim yapılmamış (a) ve ekim yapılmış petri (b)

##### 4.1.1.2. İnokulum ortamı hazırlama ve bakteri ekimi

Hücre gelişiminin sağlandığı TSA petrilerinden, sterilize edilmiş öze yardımıyla aseptik koşullarda, hücreler modifiye inokulum sıvı besiyerine aktarılmıştır.

Tablo 3.2'de açıklanan modifiye inokulum ortamı 50 mL olacak şekilde hazırlanmış ve 121 °C'de 15 dak otoklavlanmıştır\*. TSA'da gelişen hücreler,

hazırladığımız bu inokulum ortamına aktararak 37 °C’de 24 s boyunca 200 rpm hız ile inkübasyona bırakılmıştır.

Tüm pH ayarlamaları için 5 M NaOH kullanılmıştır.

\*İnokulum ortamındaki glikoz ve  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ayrı bir şekilde otoklavlanarak besiyeri ortamına sterilizasyonu bozulmadan ilave edilmiştir (Baksi vd., 2017).

#### **4.1.1.3. *Fermantasyon ortamı hazırlama ve bakteri ekimi***

Mevcut inokulum ortamında gelişen hücreler, modifiye fermantasyon ortamlarına (1, 2) %1’lik inokülasyon eklenerek aseptik koşullarda bakteri ekimi gerçekleştirilmiş ve 37 °C’de 200 rpm hızda 20 s inkübasyon süresiyle hücre gelişimi izlenmiştir (Reddy & Karunakaran, 2013).

Modifiye fermantasyon ortamları (1 ve 2), Tablo 3.2’de açıklandığı gibi 200’er mL olacak şekilde hazırlanmış ve 121 °C’de 15 dak otoklavlanmıştır\*.

Tüm pH ayarlamaları için 5 M NaOH kullanılmıştır.

\*Glikoz ayrı bir şekilde otoklavlanarak besiyeri ortamına steril bir şekilde ilave edilmiştir.

#### **4.1.2. HA izolasyonu**

Fermantasyon süreci sonunda erlen çalkalayıcıdan alınmış ve hücre duvarına yapışık HA kapsülünü sıyırmak için fermantasyon ortamının hacmine göre %0,1 olacak şekilde SDS eklenmiştir (Huang, Chen, & Chen, 2006). 10 dak SDS ile muamele edilen fermantasyon ortamı 12.000 rpm’de 30 dak +4 °C’de santrifüj edilerek hücrelerden uzaklaştırılmıştır. HA peletleri elde etmek için süpernatant, 1:1,5 (v/v) süpernatant:etanol oranında +4 °C’de 1 gece iyileştirilmeye bırakılmıştır (Benedini & Santana, 2013).

+4 °C’de 1 gece bekletilen HA içeren süpernatant, 3000 rpm’de 20 dak +4 °C’de santrifüj edilerek HA peleti toplanmıştır. HA peleti, 0,15 M NaCl:Etanol %25:%75 (v/v) oranındaki çözeltinin 25’er mL’si ile süspanse edilerek 2 kez yıkanmıştır.

HA peleti, 25 mL %3’lük (w/v) sodyum asetat çözeltisi ile muamele edilip, vortekslenmiştir. Besiyer ortamındaki glikozu ortamdan uzaklaştırmak amacıyla Silika jel, son hacimde %2 olacak şekilde (w/v), içinde HA bulunan numuneye eklenmiş ve 2 s

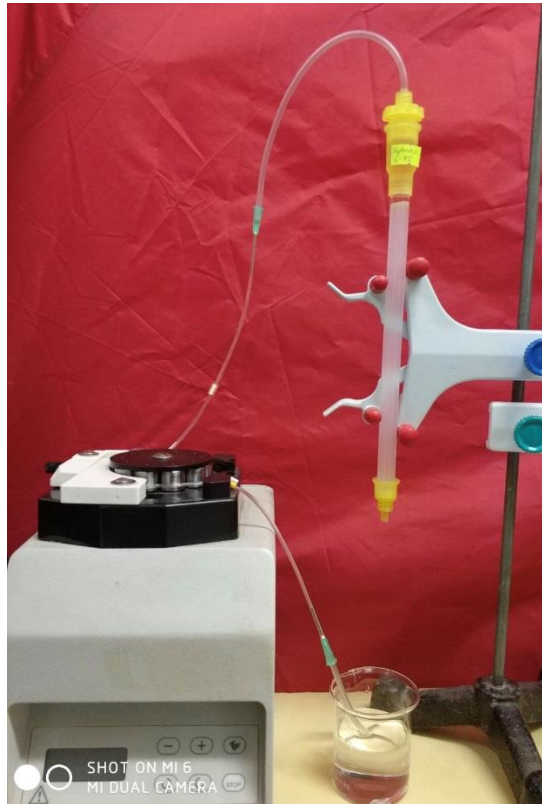
boyunca 150 rpm’de oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır. 2 s sonunda 12.000 rpm’de 20 dak +4 °C’ de santrifüj edilerek Silika içeren pelet atılmış ve HA içeren süpernatant liyofilize edilmiştir (Schiraldi, Gatta, & Rosa, 2010).

#### 4.1.3. HA saflaştırılması

Liyofilize HA numunesine Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi yöntemi uygulanmış, Sephadex G-75 (superfine) kolon (1 cm x 20 cm) hazırlanarak HA saflaştırılması mümkün olmuştur. Böylece numune içindeki tuz ve safsızlıklar da elimine edilmiştir (K. Kumari & Weigel, 1997).

1 cm x 20 cm kolon kurabilmek için total hacim hesaplanmış; 1,2 g Sephadex G-75 tartılmış ve 30 mL H<sub>2</sub>O ile 1 gece oda sıcaklığında şişmesi beklenmiştir.

Kolon sistemi kurulduktan sonra, şişmiş olan jel düzgün bir şekilde kolona doldurulduktan sonra H<sub>2</sub>O ile kolon yıkanmıştır (Görsel 4.2).



**Görsel 4.2.** *Sephadex G-75 kolon sistemi*

Numune yüklemesinden sonra 14 fraksiyon toplanmış; her biri için HA miktar tayini ve iletkenlik ölçümü yapılmıştır. Son olarak HA içeren numuneler birleştirilmiştir.

#### 4.1.4. HA miktar tayini için standart grafiği oluşturulması

HA miktar tayini için Karbazol (Bitter & Muir, 1962) ve CTAB (Oueslati vd., 2015) yöntemleriyle standart grafiği oluşturulmuştur. Her iki yöntemle de HA miktar tayini için farklı derişimlerde (0-1000 ppm aralığında) ticari HA ve 96 kuyucuklu mikropłaka kullanılmıştır. Ayrıca, her iki yöntemin de ortamdaki glikoz ile reaksiyonunu gözlemlemek amacıyla kontrol grubu olarak da farklı derişimlerde (0-1000 ppm aralığında) glikoz çözeltisi kullanılmıştır (Song vd., 2009). Kullanılacak standartlar (HA ve glikoz) 1000 ppm olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmış ve seri dilüsyon ile seyreltilerek her standart madde için 6 farklı derişimde (1000-0 ppm aralığında) numune hazırlanmıştır.

Karbazol yönteminde; ticari HA standartı için farklı derişimdeki (0-1000 ppm aralığında) numuneler ve kör 50 µL olmak üzere kuyucuklara konulmuştur. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içinde hazırlanmış 25 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O çözeltisinden 200 µL her bir numune üzerine eklenmiştir. Mikropłaka, 100 °C’de 10 dak inkubasyona bırakılmış ve daha sonra 15 dak oda sıcaklığında soğumaya alınmıştır. Etanol içinde hazırlanmış %0,125’lik karbazol çözeltisinden 50 µL her bir kuyucuğa eklenmiş ve tekrar 100 °C’de 10 dak inkubasyona bırakılmıştır. 15 dak oda sıcaklığında soğutulduktan sonra 590/550/530 nm’de absorbans değerleri ölçölmüş ve standart grafiği çizilmiştir (Kanchana vd., 2013) (Cesaretti vd., 2003).

Karbazol yöntemi ile glikoz standartı için de yukarıdaki prosedür tekrarlanmıştır.

CTAB yönteminde; ticari HA standartı için farklı derişimdeki (1000-0 ppm aralığında) numuneler ve kör 50 µL olacak şekilde olmak üzere kuyucuklara eklenmiştir. 50 µL 0,1 M sodyum fosfat (pH 7,0) tamponu kuyucuklara ilave edilmiş ve 37 °C’de 15 dak inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa %2 NaOH içeren CTAB çözeltisinden 100 µL eklenerek 37 °C’de 10 dak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu 37 °C’de 600 nm’de absorbans değerleri ölçölmüş ve standart grafiği çizilmiştir (Oueslati vd., 2015) (Oueslati vd., 2014).

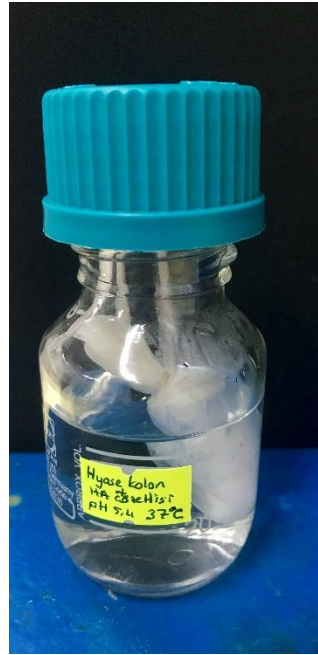
CTAB yöntemi ile glikoz standartı için de yukarıdaki prosedür tekrarlanmıştır.

#### 4.2. Hiyaluronidaz (Hyase) Kriyojel Kolon Hazırlanması ve Kullanımı

Elde edilen yüksek moleköl ağırlıklı HA'nın düşük moleköl ağırlıklı HA'ya dönüştürülmesi için Hyase enzimi içeren kriyojel kolon şu şekilde hazırlanmıştır:

2,5 mL kolon hacmi için; 2612,5 µL H<sub>2</sub>O, 53,06 mg MBA ve 281,25 µL HEMA'dan oluşan stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stokdan alınan 1900 µL çözelti, 553,85 µL 3000 ppm Hyase enzimi ve 76,875 µL MATry-Ru(bipy)<sub>2</sub>-MAT ile 2 s inert bir ortamda (azot gazı altında) muamele edildikten sonra reaksiyon başlatıcı ajanlar APS ve TEMED soğuk ortamda ilave edilmiş ve kriyojel kolon polimerizasyon sürecinin tamamlanması için 1 gece -20 °C'deki buzdolabına kaldırılmıştır. Hazırlanan kolon H<sub>2</sub>O ile yıkanarak kullanım için +4 °C'de muhafaza edilmiştir (Say vd., 2009).

Hyase kolon ile immobilize sistemi kurmadan önce kolon saf su ve daha sonra 0,1 M Sodyum asetat tamponu (0,15 M NaCl içeren, pH 5,4) ile yıkanmış (Ingham vd., 1979) ve 40 mL HA numunemiz Görsel 4.3'deki içinde immobilize Hyase kolon bulunan immobilize sisteme eklenmiştir.



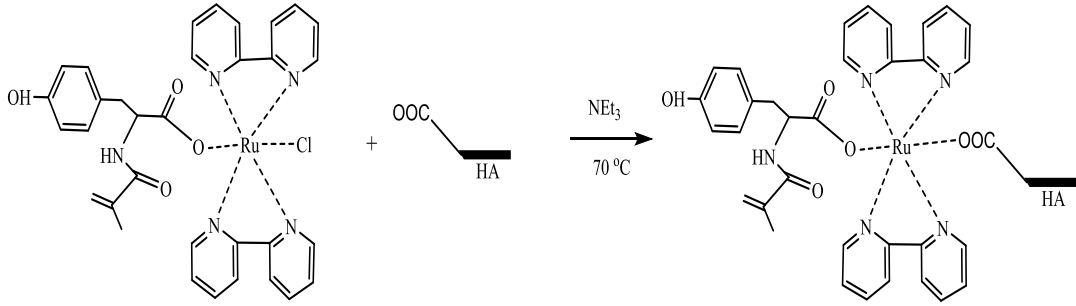
Görsel 4.3. Immobilize Hyase kolon sistemi

İmmobilize sistem Hyase enziminin çalıştığı pH 5,4 ve 37 °C'de 100 rpm hız ile inkübasyona bırakılmıştır. 2 s'de 1 ve her seferinde 5'er mL olmak üzere toplamda 5 numune toplanmıştır.

### 4.3. MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA Sentezi

MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA sentezi için (Say vd., 2009)'nin geliştirdiği RuCl(bipy)<sub>2</sub>MAT kompleks kullanılmış ve sentez süreci şu şekilde açıklanmıştır (Şekil 4.1);

RuCl(MAT)(bipy)<sub>2</sub> (0,1 g, 1,4x10<sup>-4</sup> mmol), 10 mL etanolde çözülerek, çözelti 0 °C'ye soğutulmuştur. 100 µL Net<sub>3</sub> eklenerek 30 dak. karışmaya bırakıldıktan sonra oda sıcaklığına getirilen karışımın üzerine HA (0,1 M, 1 mL) çözeltisi azot ortamında ilave edilmiştir. Reaksiyon 6 s 70 °C'de reflaks edildikten sonra 12 s oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır. Reaksiyon bitiminde çözücü uzaklaştırılmış ve elde edilen katı madde eterle yıkanarak kurutulmuştur.



Şekil 4.1. bis(2-2'-bipiridil)MAT-HA Rutenyum(II), Ru(bipy)<sub>2</sub>MATyr-HA reaksiyonu

### 4.4. Lipozom Sentezi

#### 4.4.1. Boş lipozom sentezi

Lipozomdaki lipid çift tabakayı oluşturmak için fosfolipid olarak DOPC ve MPC biyomonomer, lipidler arası tampon bölgeyi oluşturması adına da Chol kullanılmıştır. DOPC:MPC:Chol, 4:2:1 molar oranında olmak üzere kloroform:metanol 3:1 (v/v) karışımı içinde çözülmüştür. İnce film oluşturmak üzere RotaVap cihazı ile çözücü tamamen uzaklaştırılmıştır (Arpicco vd., 2013) (Jiang vd., 2012) (Qi vd., 2016).

Oluşan ince film, 5mM HEPES tamponu (pH 7,4) ile hidratlanmış ve 60 °C'de 15 dak sonike edilmiştir. Daha sonra, süzülen numune +4 °C'de 1 gece bekletilmiştir (Park vd., 2014).

#### 4.4.2. siRNA enkapsülasyonu

siRNA kapsüllenmiş lipozom sentezi için ince film ve sonikasyon prosedürü yukarıdaki boş lipozom sentezine göre aynı şekilde yapılmıştır. Ancak; lipozom içine kapsüllenecek olan siRNA (stok çözelti,  $80 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ )  $100 \mu\text{L}$  stok çözeltiden alınarak,  $8 \text{ mL}$ 'lik hidratlama çözeltisine eklenmiş ve hidratlama bu çözeltiyle yapılmıştır. Sonraki aşamalar boş lipozom örneğindeki gibi devam etmiş ancak bağlanmayan siRNA'yı uzaklaştırmak için  $30 \text{ kDa}$ 'luk ultrasantrifüj tüpü kullanılarak  $+4^\circ\text{C}$ 'de  $4000 \text{ rpm}$ 'de  $45 \text{ dak}$  santrifüj yapılmıştır. Bağlanmayan siRNA'nın bulunduğu kısmın absorbands değerleri  $260$  ve  $280 \text{ nm}$ 'de ELISA okuyucu ile okunarak, bağlanmayan siRNA miktarı not edilmiştir. Ölçümler 3 tekrarlıdır.

#### 4.4.3. MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA ve GFP ile yüzey modifikasyonu

Lipozom yüzeylerinin modifikasyonu, MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA ve GFP ile yapılmıştır. İlk olarak, siRNA enkapsüle lipozom içeren  $2 \text{ mL}$  örnek içine  $100 \text{ ppm}$  olacak şekilde MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA eklenmiş ve azot ortamında  $10 \mu\text{L}$  reaksiyon başlatıcı amonyum persülfat (APS,  $100 \text{ mgmL}^{-1}$ ) ilavesiyle  $1$  gece karışmaya bırakılmıştır. Daha sonra  $10 \text{ kDa}$ 'luk ultrasantrifüj tüpü kullanılarak bağlanmayan MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA'yı uzaklaştırmak için  $+4^\circ\text{C}$ 'de  $4000 \text{ rpm}$ 'de  $45 \text{ dak}$  santrifüj yapılmıştır.

Aynı şekilde; GFP ( $1 \text{ ppm}$ ) stok çözeltisinden, santrifüj edilmiş siRNA enkapsüle ve MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA modifiye  $2 \text{ mL}$  lipozom örneğine  $250 \mu\text{L}$  eklenmiş ve azot ortam altında  $10 \mu\text{L}$  reaksiyon başlatıcı APS ( $100 \text{ mgmL}^{-1}$ ) ilavesiyle  $1$  gece karışmaya bırakılmıştır. Bağlanmayan GFP'yi uzaklaştırmak için  $10 \text{ kDa}$ 'luk ultrasantrifüj tüpü kullanılarak  $+4^\circ\text{C}$ 'de  $4000 \text{ rpm}$ 'de  $45 \text{ dak}$  santrifüj yapılmıştır.

#### 4.4.4. Enkapsüle olmamış siRNA, bağlanmamış MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA ve GFP'nin uzaklaştırılması

Enkapsüle olmuş siRNA ve yüzey modifikasyonu yapılmış lipozom (nihai lipozom) çözeltisi içinde mevcut bağlanmamış maddelerin uzaklaştırılması amacıyla ultrasantrifüj (Lavanya vd., 2016) yöntemi kullanılmıştır.

Ultrasantrifüj işlemi ( $10$  ve  $30 \text{ kDa}$ 'luk tüpler ile),  $+4^\circ\text{C}$ 'de  $4000 \text{ rpm}$ 'de  $45 \text{ dak}$ , lipozom numunesinin  $3$  kez HEPES tamponu ( $\text{pH } 7,4$ ) ile yıkanmasıyla yapılmış, sırasıyla bağlanmayan MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA, siRNA ve GFP maddelerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Enkapsüle siRNA verimini öğrenmek için Triton X-100 ile lipozomların hidrolizi sağlanmış, santrifüj sonucu süpernatanta salınan siRNA'nın derişimi 260 ve 280 nm'de UV absorbans değeri ölçülerek hesaplanmıştır.

Bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırıldığı nihai lipozomlar 2 hafta içinde kullanılacaksa +4 °C'de, kullanılmayacaksa da nihai lipozom süspansiyonuna %10'luk (w/v) sukroz çözeltisinin süspansiyon:sukroz oranı 1:2 (v/v) olacak şekilde eklenmesi ve ardından liyofilize edilmesiyle -80 °C'de daha uzun süre saklanması sağlanmıştır (Ravar vd., 2016) (Hayward, Wilson, & Kidambi, 2016).

#### **4.5. Karakterizasyon Çalışmaları**

HA hedefli lipozom sentezi için saflaştırılan HA'nın miktar tayini, moleküler ağırlık ve FT-IR analizi; Hyase kolonunun şişme testi, yüzey morfolojisi ve FT-IR analizi; MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA kompleksi için FT-IR analizi gibi karakterizasyon çalışmalarının yanı sıra lipozomlar için de boyut analizi, zeta potansiyeli, yüzey morfolojisi ve enkapsülasyon verimi, gibi karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve sonuçlar yorumlanmıştır.

##### **4.5.1. HA**

*Streptococcus equi* bakterisinden fermentasyon yolu ile HA üretimi sonucu HA miktar tayini, CTAB yöntemiyle ticari HA kullanılarak oluşturulmuş standart grafiğı ile hesaplanmıştır.

Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) cihazı kullanılarak saflaştırılan HA'nın sahip olduğu moleküler ağırlık, kromatografik olarak belirlenmiştir. GPC'de PL aquagel-OH 8µm'lik kolon kullanılmış ve %0,02'lik NaN<sub>3</sub> çözeltisiyle kolon yıkanmıştır. 1mLdak<sup>-1</sup> akış hızı ile GPC cihazında refraktif indeks dedektörü ile hem ticari hem de izolasyonu sağlanan HA tayin edilmiştir.

Saflaştırılan HA'nın fonksiyonel grupları da ticari HA'ninkilerle karşılaştırılmak üzere FT-IR analizi ile gözlemlenmiştir.

##### **4.5.2. Hyase kriyojel kolon**

Kuru Hyase kriyojel kolon ±0,0001 duyarlılıkla tartılmış ve bu değer w<sub>i</sub> olarak kaydedilmiştir. Kuru olan polimer oda sıcaklığında 50 mL H<sub>2</sub>O içinde 24 s boyunca

bekletilmiş ve şişen polimer tartılmıştır, bu değer de  $w_s$  olarak kaydedilmiştir. Denklem 4.1 ile kolonun yüzde su tutma kabiliyeti hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme Oranı (\%)} = \left[ \frac{w_s - w_i}{w_i} \right] \times 100 \quad (4.1)$$

Hyase kriyojel kolona ait, alınmış ince bir kesit oda sıcaklığında kurutulmuş ve daha sonrasında vakum altında altın ile kaplanarak SEM cihazı ile yüzey morfolojisine ait görüntüler alınmıştır.

Hyase kriyojel kolondan belli bir kesit alınmış ve KBr ile tablet haline getirilen maddenin spektrumu FT-IR cihazı ile alınmıştır.

#### 4.5.3. MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA

ANADOLUCA yöntemine göre sentezlenmiş olan MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA metal şelat komplekslerine ait fonksiyonel grupları görüntülemek amacıyla KBr tablet yardımıyla FT-IR spektrumunu ile belirlenmiştir.

#### 4.5.4 Lipozom

Tüm lipozomların boyut analizi dynamic light scattering (DLS) prensibine dayanarak ZetaSizer cihazı ile ve zeta potansiyeli de aynı şekilde uygun kuvvetler kullanılarak ölçülmüştür. Zeta boyut analizi için numuneler ultrasonik su banyosunda 10 dak dispers edildikten sonra akabinde analizler gerçekleştirilmiştir.

Lipozomların yüzey morfolojisini incelemek için SEM cihazı ile görüntüler alınmıştır. Lipozom numuneleri, ultrasonik banyoda dispers edildikten hemen sonra Piranha çözeltisiyle temizlenmiş olan silisyum yüzeylere 3'er µL olacak şekilde damlatılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra numunelerin olduğu silisyum yüzeyler vakum altında altın ile kaplanmış ve SEM cihazının örnek haznesine yerleştirilerek lipozomların yüzey morfolojisine ait görüntüler alınmıştır.

Ayrıca: siRNA enkapsüle lipozomun kapsülleme verimi de ultrasantrifüj tekniği ile Denklem 4.2'ye göre belirlenmiştir. Denklem 4.2'deki  $w_{top}$ , ince filmi hidratlamak için kullanılan çözelti içindeki toplam siRNA derişimi olup,  $w_{bağ}$  da enkapsüle olmayan siRNA derişimini ifade etmektedir.

$$EE (\%) = \left[ \frac{w_{top} - w_{bag}}{w_{top}} \right] \times 100 \quad (4.2)$$

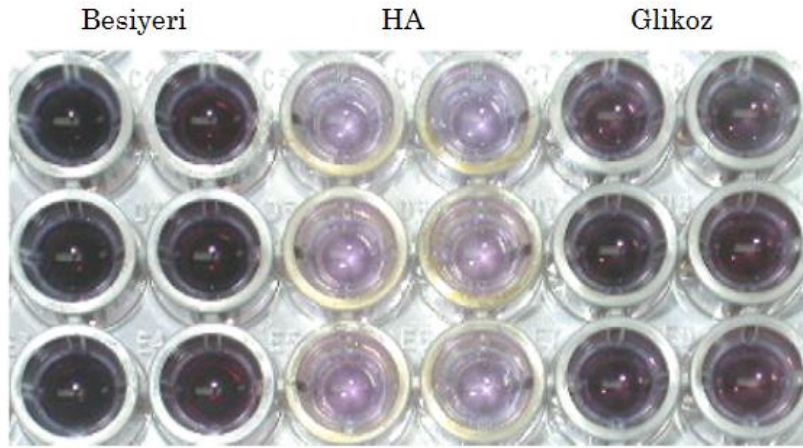
Bağlanmayan MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA ve GFP'yi uzaklaştırmak için de ultrasantrifüj tekniği kullanılmış; sırasıyla CTAB yöntemi ve floresans ölçümü ile belirlenmiştir.

## 5. BULGULAR

### 5.1. HA

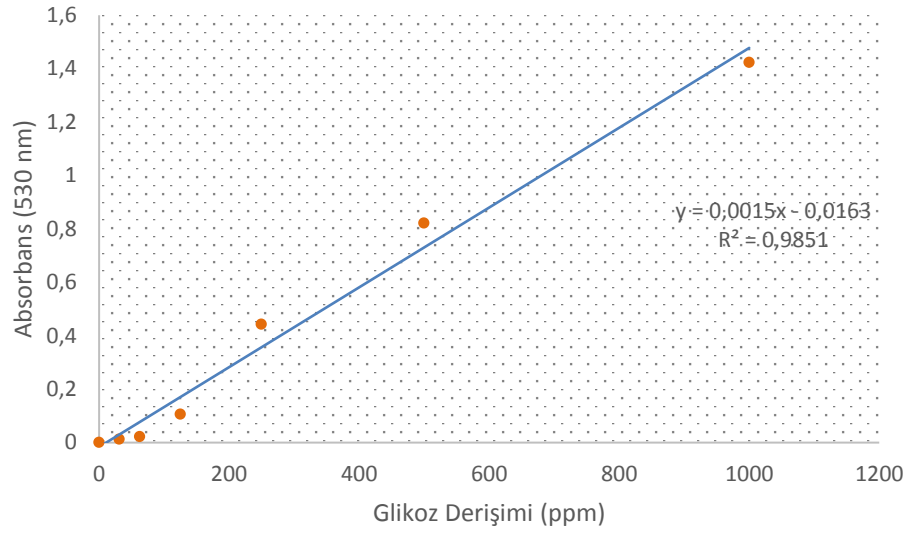
#### 5.1.1. HA miktar tayini

CTAB yöntemi ile besiyer ortamındaki HA ile setiltrimetilamonyum bromür arasında çözünmeyen komplekslerin oluşumu sonucu HA miktarı türbidimetrik olarak kolaylıkla ve hızlı bir şekilde ölçülebilen, Karbazol yöntemi kültür besiyeri içindeki glikoz ve polisakkaritler sülfürik asit ve karbazol ile de reaksiyon oluşturarak sonuçları yanılttığı (Görsel 5.1), protein denatürasyonu ile yöntemin uygulanmasını zorlaştırdığı ve de derişik asit ile çalışılmasından kaynaklı tehlike oluşturduğu için daha az tercih sebebi olmaktadır (Song vd., 2009).

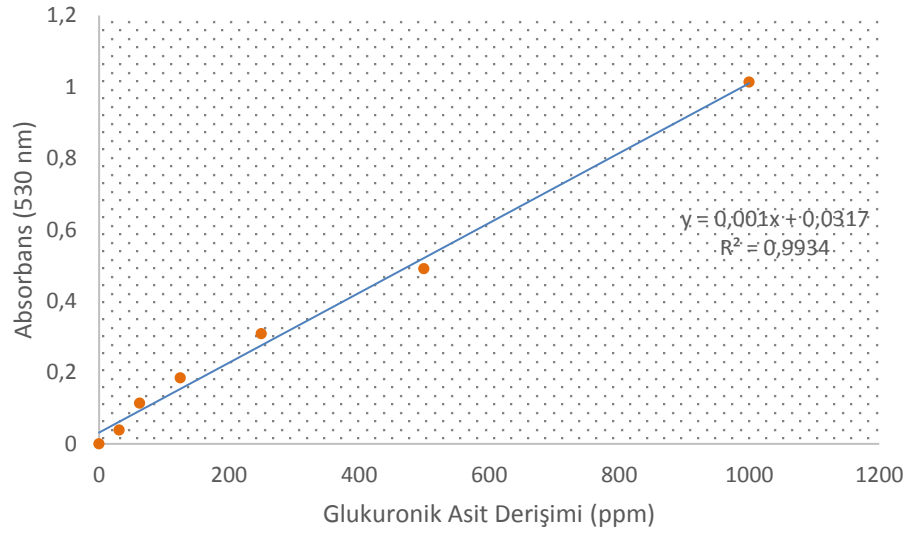


**Görsel 5.1.** Karbazol ile besiyeri, HA ve glikoz reaksiyonu (Song ve vd., 2009)

Şekil 5.1’de görüldüğü gibi karbazol’ün glikoz çözeltisi ile göstermiş olduğu reaksiyon sonucu elde edilen absorbans değerleriyle Şekil 5.2’deki karbazol’ün HA ile göstermiş olduğu reaksiyon sonucundaki absorbans değerleri hemen hemen aynı çıkmaktadır.

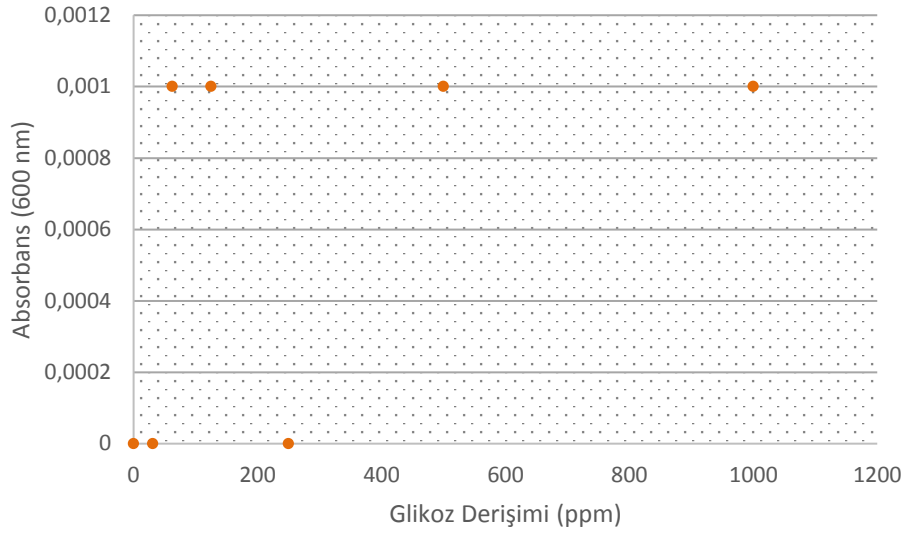


**Şekil 5.1.** Karbazol yönteminin glikoz ile reaksiyonunu gösteren kalibrasyon grafiği

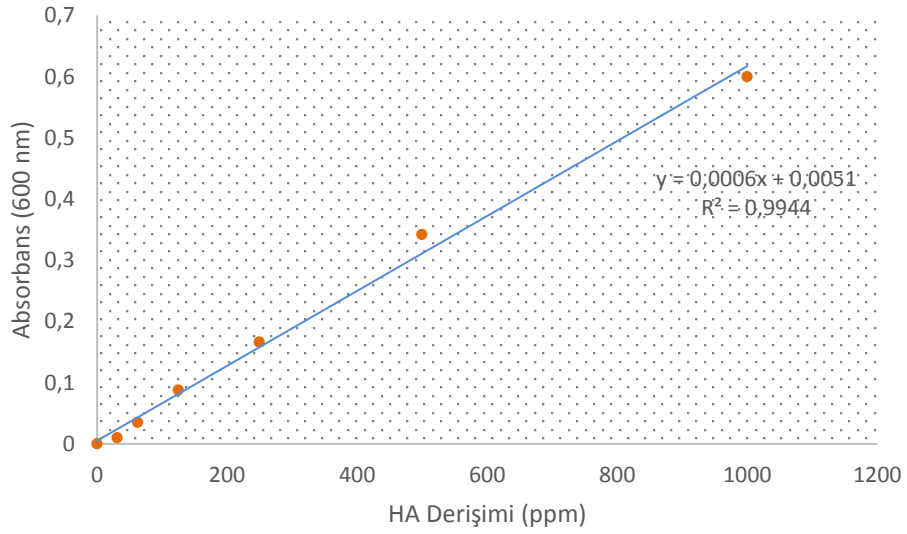


**Şekil 5.2.** Karbazol yöntemi ile HA standart grafiği

Karbazol yönteminin sınırlılıklarından dolayı HA miktar tayini için CTAB yöntemi uygulanmış ve Şekil 5.3’de CTAB’ın glikoz ile reaksiyon göstermediği görülmektedir. HA miktar tayini için CTAB yöntemiyle ticari HA kullanılarak standart grafiği Şekil 5.4’deki gibi oluşturulmuştur.



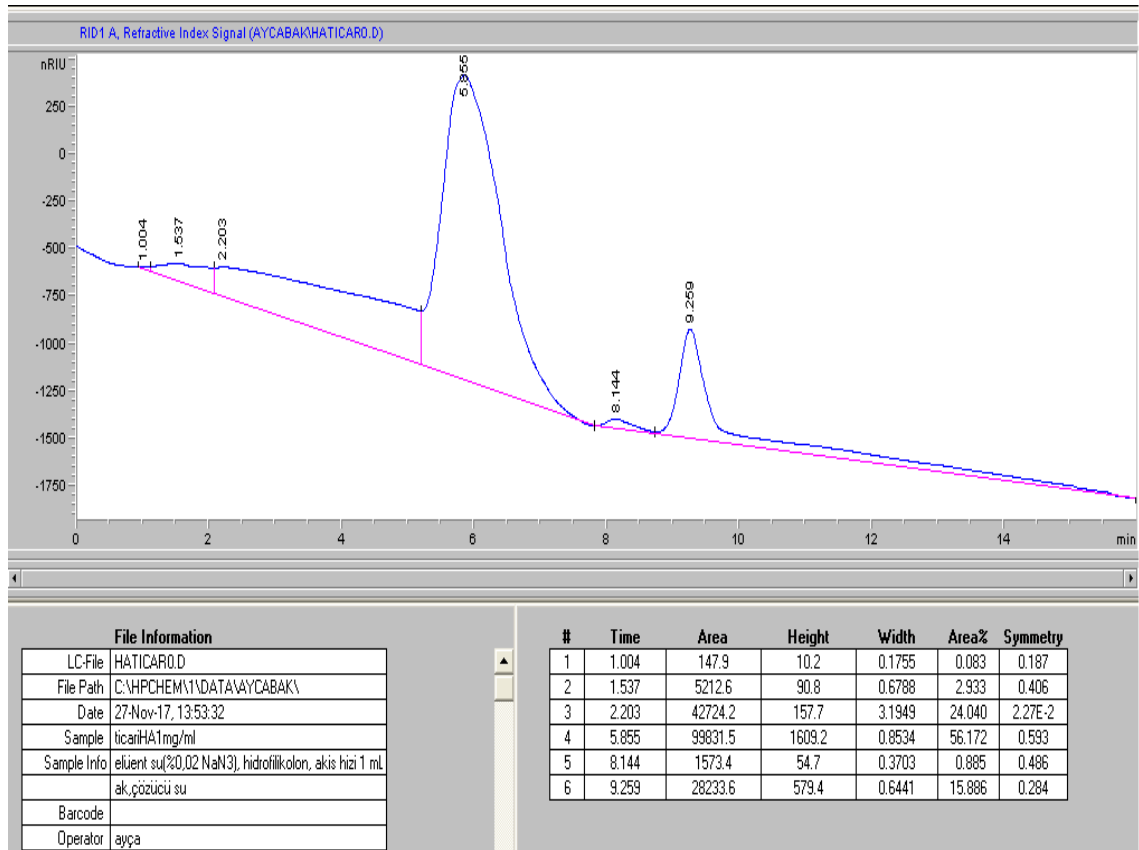
**Şekil 5.3.** CTAB yöntemi ile glikozun reaksiyonu



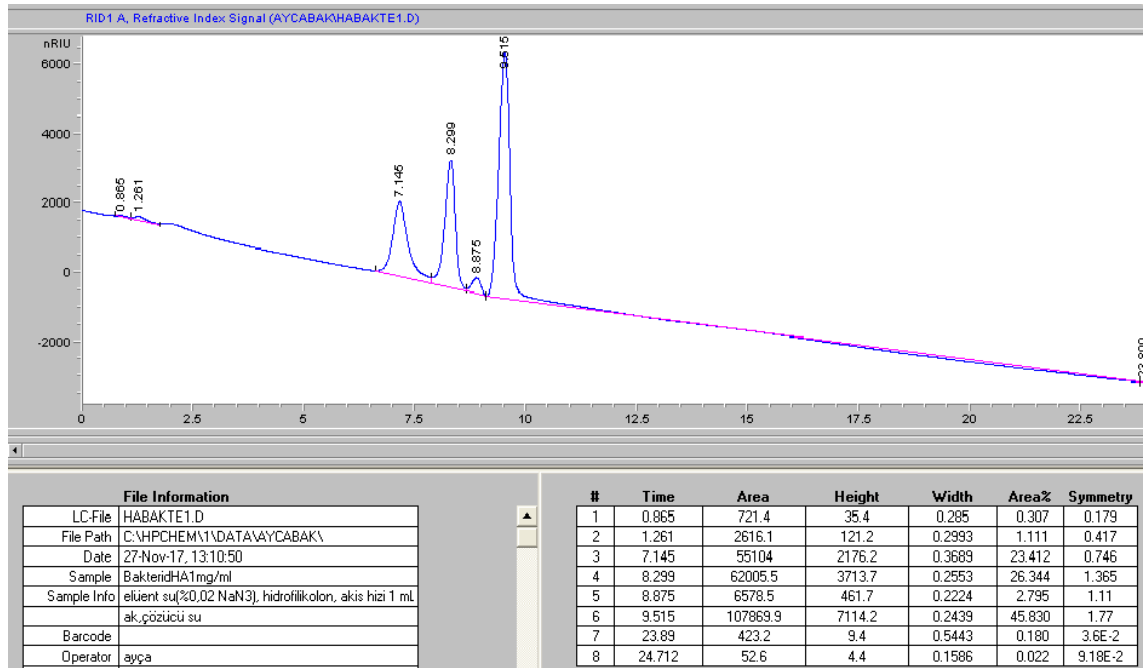
**Şekil 5.4.** CTAB yöntemi ile HA standart grafiğı

### 5.1.2. HA moleküler ağırlık analizi

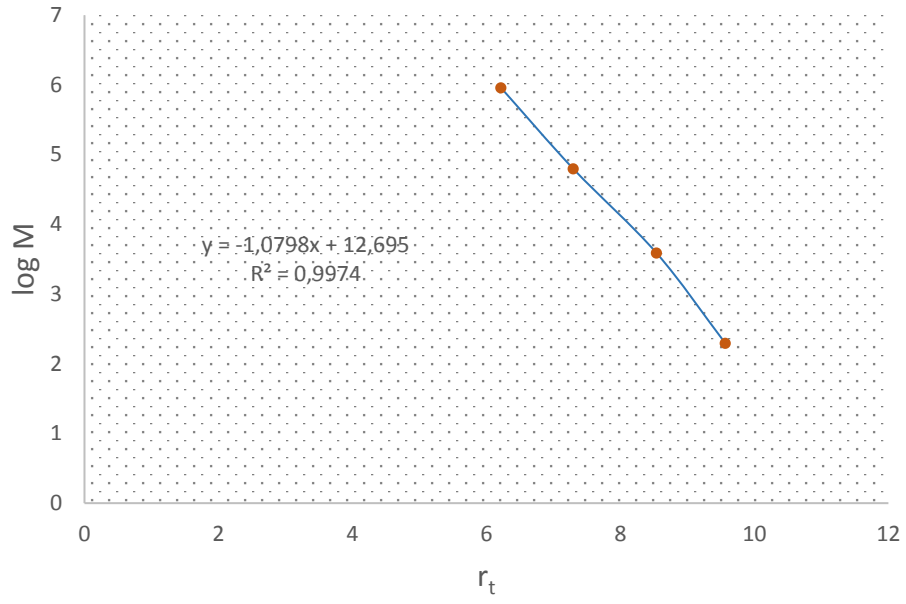
*S. equi*'den izole edilmiş HA'nın moleküler ağırlık analizi için GPC cihazı kullanılmış; karşılaştırma için öncelikle Şekil 5.5'deki ticari HA kromotogramı ve daha sonra izole edilen HA için Şekil 5.6'daki kromotogram elde edilmiştir. Şekil 5.6'daki mevcut piklerin sahip olduğu değerler, Şekil 5.7'de gösterilen Sarı Vial Kalibrasyon grafiğine göre hesaplanmış ve HA'nın moleküler ağırlığı yaklaşık 95 kDa olarak ölçülmüştür.



Şekil 5.5. Ticari HA kromotogramı (GPC)

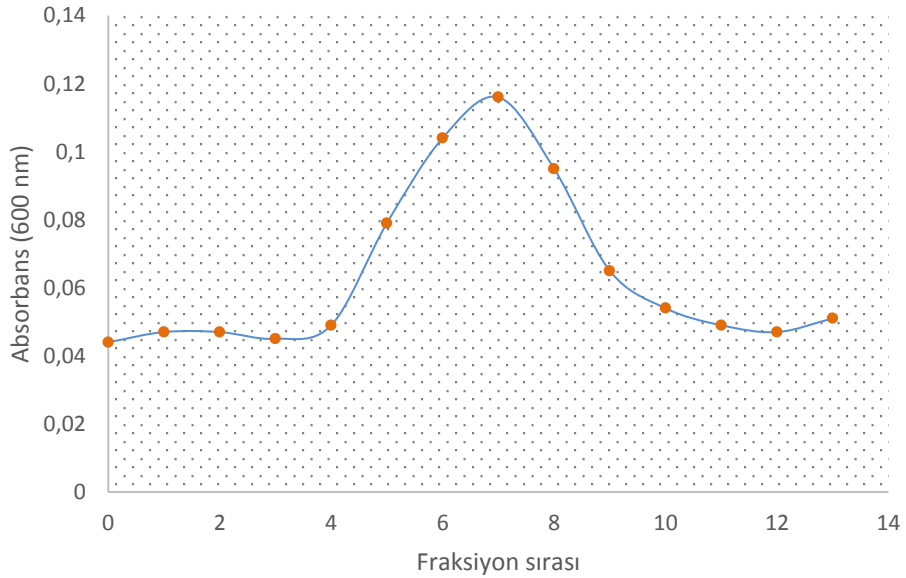


Şekil 5.6. S.equi'den saflaştırılan HA kromotogramı (GPC)



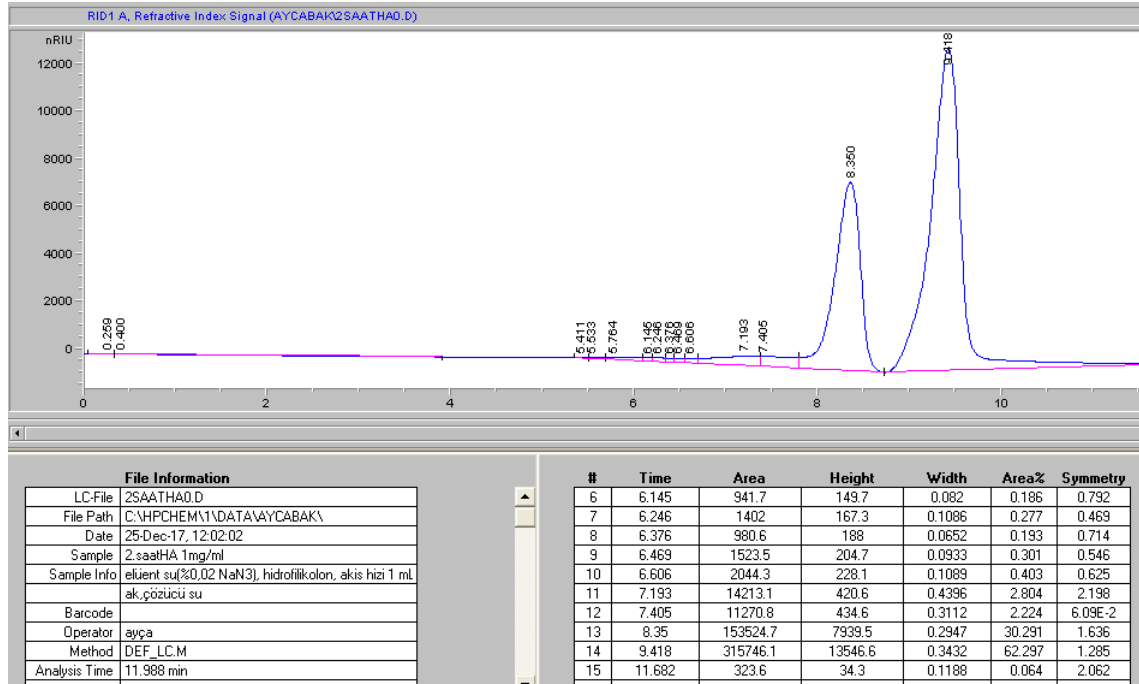
**Şekil 5.7.** Sarı vial kalibrasyon grafiği (GPC)

Şekil 5.6 kromotogramı incelendiğinde geç gelen piklerin çok küçük molekül ağırlıklarına sahip olduğu ve bunların da numune içindeki safsızlıklar olduğu düşünüldüğü için Sephadex G-75 ile boyut ayrımı prensibine göre HA'nın saflaştırılması mümkün olmuştur. Böylece toplanan her bir fraksiyon için CTAB ile HA tayini yapılmış (Şekil 5.8) ve HA içeren fraksiyonlar toplanarak, diğer maddelerden daha yüksek molekül ağırlığına sahip HA'nın safsızlıklardan kurtulması sağlanmıştır.



**Şekil 5.8.** Sephadex G-75 ile toplanan fraksiyonlarda CTAB ile HA tayini

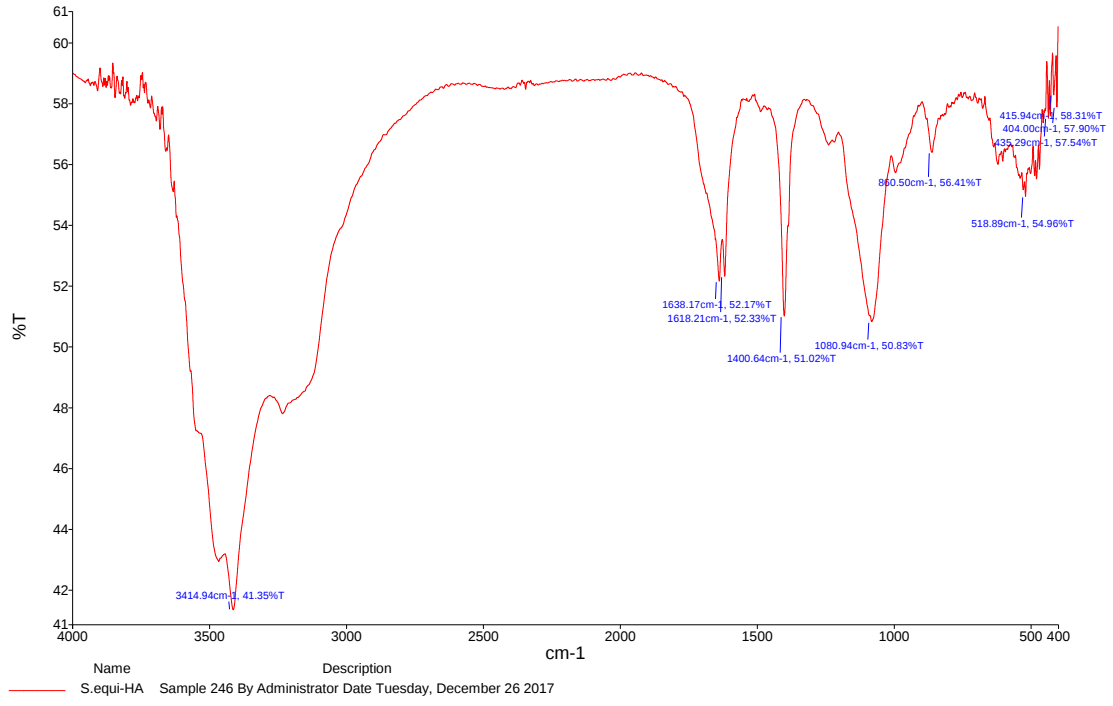
Sephadex G-75 ile saflaştırılan yaklaşık 95 kDa olan HA'nın daha kısa zincirli hale getirilmesi için kullanılan Hyase kolon sonrası her 2 saatte 1 alınan 5 örneğin tümü için GPC cihazı ile molekül ağırlık tespiti yapılmış ve sonuçların aynı olduğu bu nedenle 2 s'lik bir sürecin yeterli olduğu görülmüş olup (Şekil 5.9) ve yaklaşık olarak 5 kDa olmak üzere kısa zincirli HA elde edilmiştir.



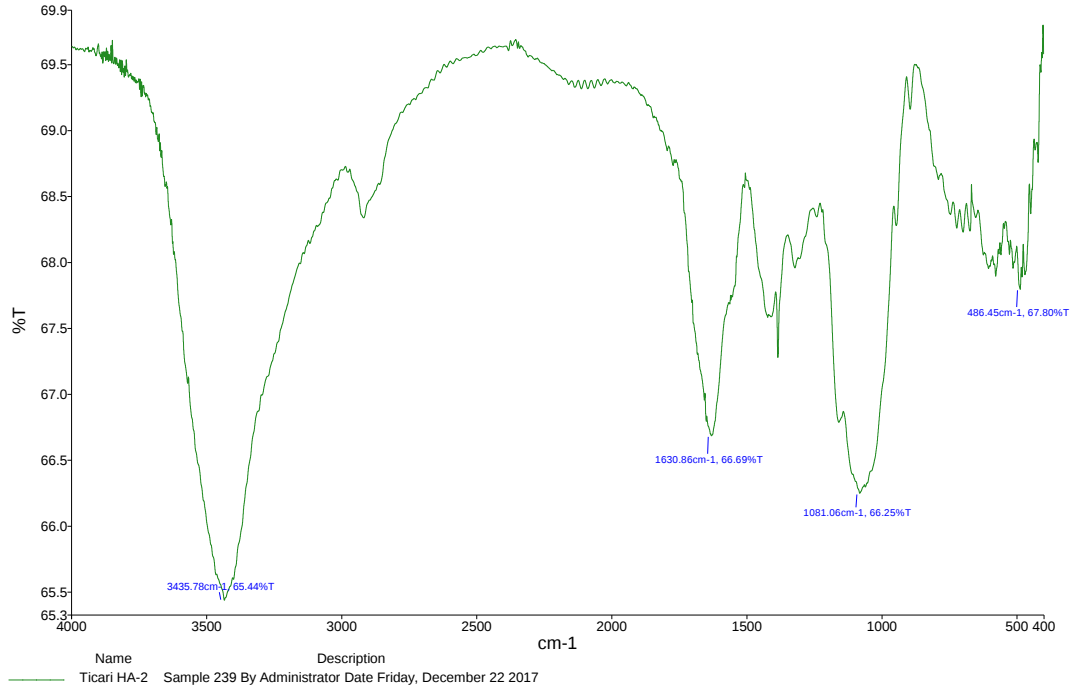
Şekil 5.9. Hyase kriyojel kolon ile HA zincirlerinin kırıldığını gösteren kromotogram (GPC)

### 5.1.3. HA, FT-IR analizi

S. equi'den saflaştırılan HA'nın fonksiyonel gruplarını incelemek için FT-IR analizi (Şekil 5.10) yapılmış ve bu sonucu ticari HA ile karşılaştırmak için ticari HA'nın da Şekil 5.11'daki FT-IR analizi incelenmiştir. Şekil 5.10'daki saflaştırılan HA spektrumu için 3414,94  $\text{cm}^{-1}$  frekansında (-OH) ve (-NH) gerilme titreşimleri, 1638,17  $\text{cm}^{-1}$  frekansında (C=O) gerilme titreşimi, 1618,21  $\text{cm}^{-1}$  frekansında (-COO<sup>-</sup>) grubunun (C=O)'nun asimetrik gerilimi, 1400,64  $\text{cm}^{-1}$  frekansında (COO<sup>-</sup>) simetrik gerilimi, 1081,06  $\text{cm}^{-1}$  frekansında (-C-O-C-) sakkarit birimlerine ait bantlar gözlemlenmiş ve Şekil 5.11'daki ticari HA'nın FT-IR analiziyle de örtüşmektedir.



**Şekil 5.10.** *S. equi*’den saflaştırılan HA’nın FT-IR spektrumu



**Şekil 5.11.** Ticari HA’nın FT-IR spektrumu

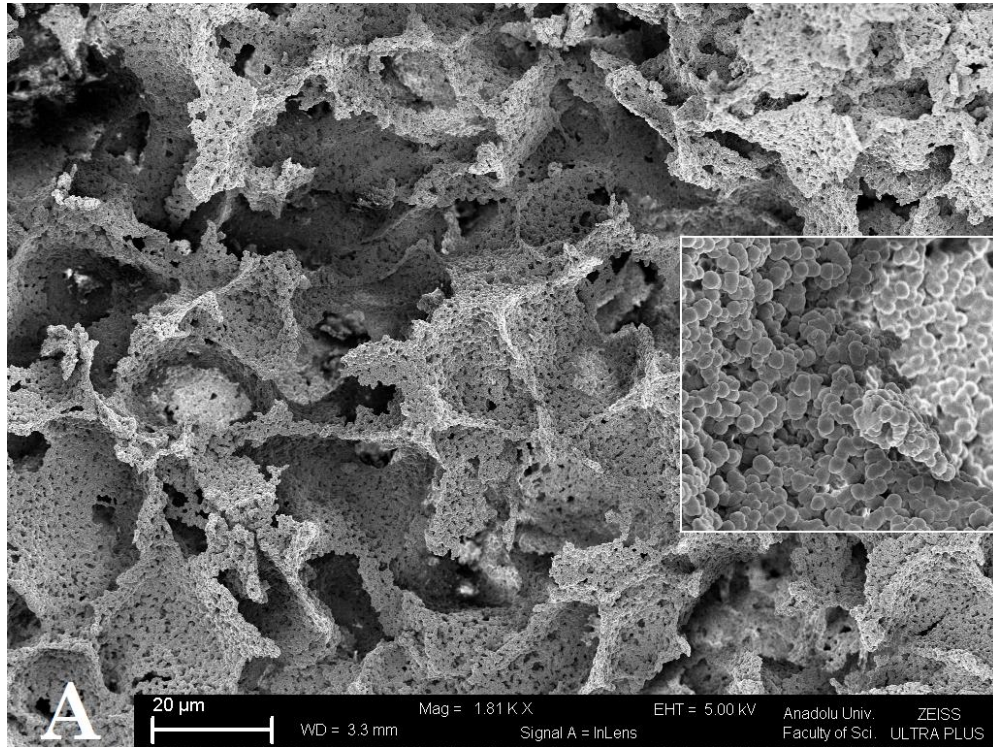
## 5.2. Hyase Kriyojel Kolon

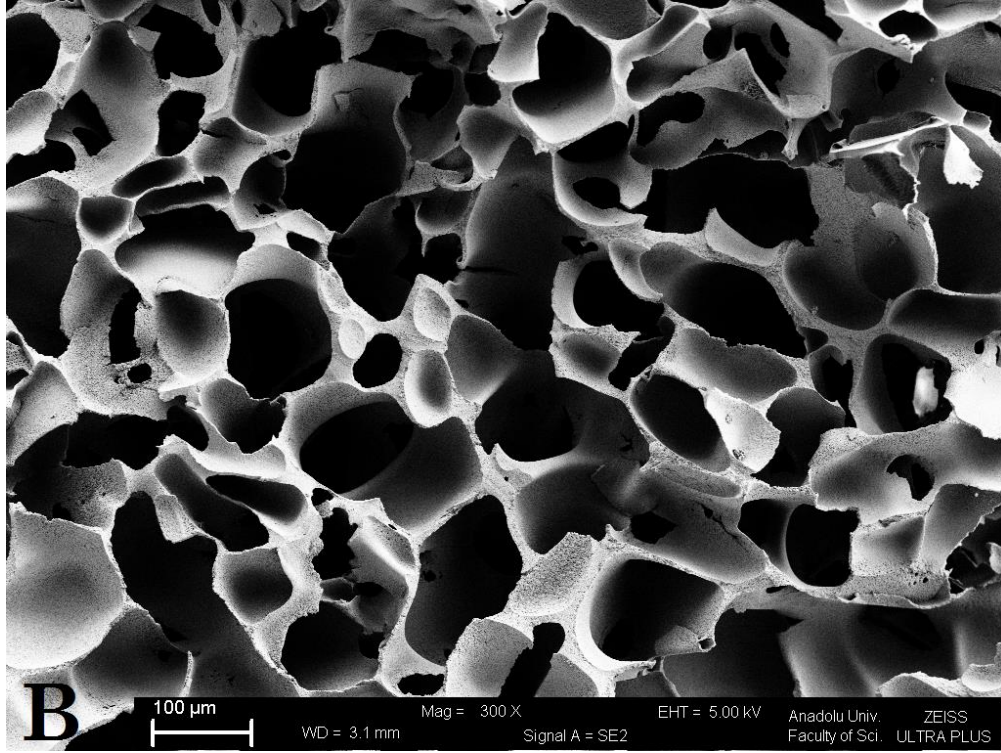
### 5.2.1. Şişme testi

Hyase kriyojeli çapraz bağlar içeren ve hidrofilik özellik gösteren bir polimer olup, polimerik yapısı gereği yüksek molekül ağırlığına sahip ve suda çözünmemektedir. Yapısına su alma ve şişme özelliği kriyojelinin çapraz bağ derecesine ve hidrofilitesine bağlıdır. Sentezlenen Hyase kriyojel kolonun kuru ağırlığı 183,6 mg olup, su ile doyurulmuş kriyojelin ağırlığı ise 1891,1 mg olarak tartılmış ve su tutma kapasitesi %930 olarak hesaplanmıştır. Yüksek şişme derecesine sahip kriyojeller, makro gözenekliliğe sahip olmaktadır.

### 5.2.2. Yüzey morfolojisi

Hyase kriyojelinin yüzey morfolojisi SEM cihazı kullanılarak incelenmiş ve Şekil 5.12-A'deki çapraz bağlı polimerik yapının oldukça geniş gözeneklere ve büyük yüzey alanına, boş kriyojelin de (Şekil 5.12-B) aynı özelliklere sahip olduğu SEM görüntüleri ile gözlemlenmiştir.

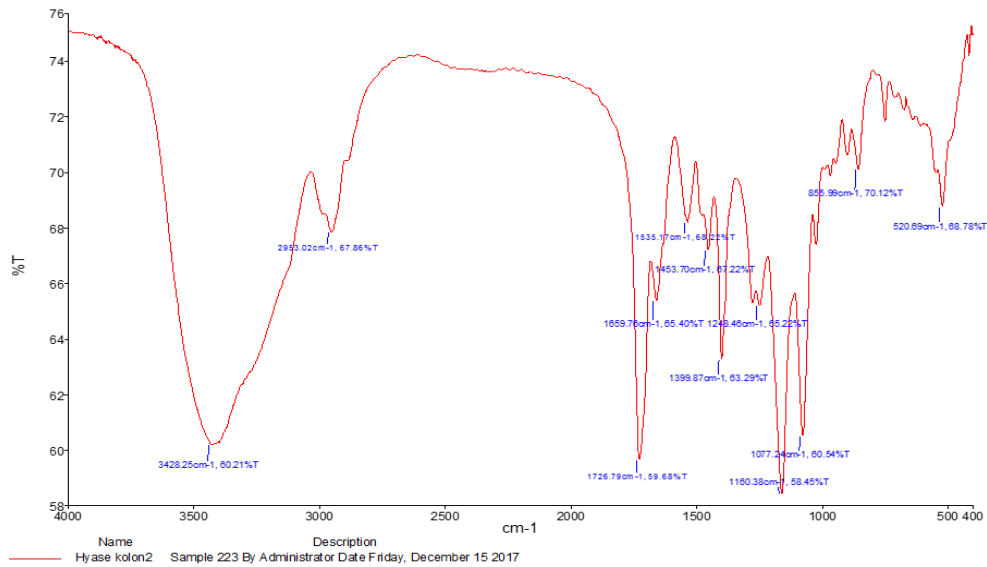




Şekil 5.12. Kriyojel kolona ait SEM görüntüleri; Hyase kriyojel (A), Boş kriyojel (B)

### 5.2.3. FT-IR analizi

Hyase kriyojelinde (Şekil 5.13) HEMA ve bis-akrilamid için;  $3428,25\text{ cm}^{-1}$  frekansında (-OH),  $2953,02\text{ cm}^{-1}$  frekansında (C-H) gerilimi,  $1726,79\text{ cm}^{-1}$  frekansında (C=O),  $1399,87\text{ cm}^{-1}$  frekansında (CH<sub>3</sub>) bükülmesi ve  $1160,38\text{ cm}^{-1}$  frekansında (C-N) gerilimi olmak üzere fonksiyonel gruplara ait pikler gözlemlenmektedir.

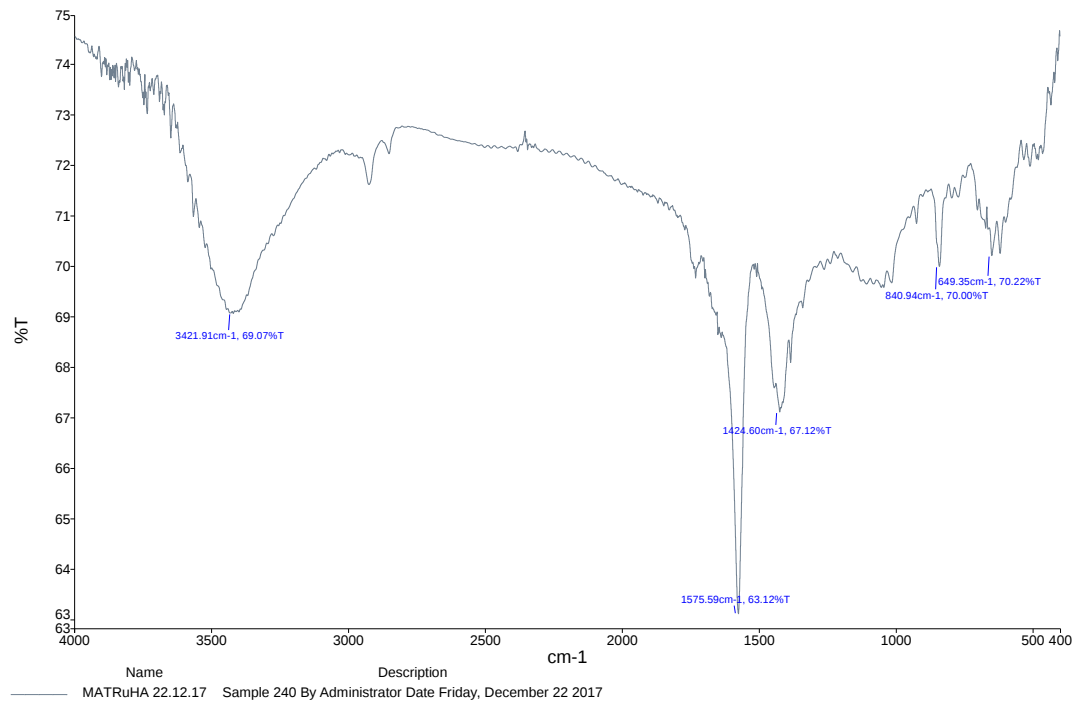


Şekil 5.13. Hyase kriyojel kolon FT-IR spektrumu

### 5.3. MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA

#### 5.3.1. FT-IR analizi

ANADOLUCA yöntemine göre sentezlenmiş MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA kompleksine ait FT-IR spektrumu Şekil 5.14'deki gibidir. Buna göre; 3421,91 cm<sup>-1</sup> frekansında (-OH) grupları mevcut olmakla beraber HA'ya ait (-OH) grupları 3421,91 cm<sup>-1</sup> frekansına kaydığı için MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>'ye koordine olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 5.14. MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA FT-IR spektrumu

### 5.4. Lipozom

#### 5.4.1. Boş lipozom

Sentezlenen içi boş ve yüzeyi modifiye edilmemiş lipozom için boyut analizi ve zeta potansiyeli, numune 10 dak ultrasonik su banyosunda dispers edildikten sonra lipozomların ortalama boyutu (Şekil 5.15) 92,58 nm ve PDI değeri 0,266; ayrıca zeta potansiyeli de -8,02 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 5.16).

## Size Distribution Report by Intensity

v2.2



### Sample Details

Sample Name: DOPC:MPC:Chol 24.11.17.3

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

|                            |                                                     |
|----------------------------|-----------------------------------------------------|
| File Name: ycbkr.dts       | Dispersant Name: Water                              |
| Record Number: 37          | Dispersant RI: 1,330                                |
| Material RI: 1,59          | Viscosity (cP): 0,8872                              |
| Material Absorbance: 0,010 | Measurement Date and Time: 24 Kasım 2017 Cuma 16... |

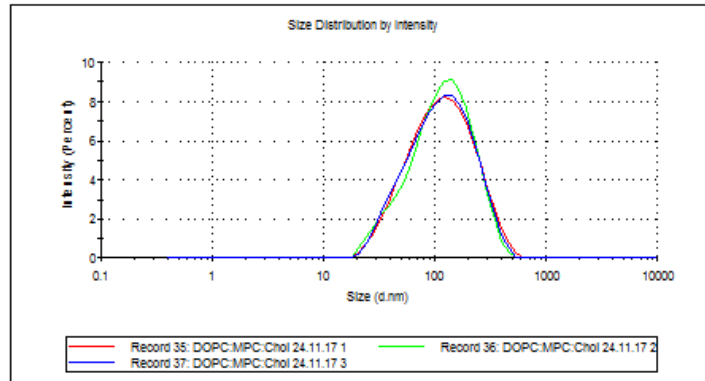
### System

|                                              |                                 |
|----------------------------------------------|---------------------------------|
| Temperature (°C): 25,0                       | Duration Used (s): 70           |
| Count Rate (kcps): 213,1                     | Measurement Position (mm): 5,50 |
| Cell Description: Clear disposable zeta cell | Attenuator: 7                   |

### Results

|                                | Size (d.n...) | % Intensity: | St Dev (d....) |
|--------------------------------|---------------|--------------|----------------|
| <b>Z-Average (d.nm): 92,58</b> | Peak 1: 134,1 | 100,0        | 84,83          |
| <b>Pdl: 0,266</b>              | Peak 2: 0,000 | 0,0          | 0,000          |
| <b>Intercept: 0,896</b>        | Peak 3: 0,000 | 0,0          | 0,000          |

Result **Good**



Şekil 5.15. Boş lipozom için boyut analizi

## Zeta Potential Report

v2.3



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

### Sample Details

Sample Name: DOPC:MPC:Chol-zeta potansiyeli-24.11.17 3  
SOP Name: mansettings.nano  
General Notes:

File Name: ycbkr.dts Dispersant Name: Water  
Record Number: 40 Dispersant RI: 1,330  
Date and Time: 24 Kasım 2017 Cuma 16:47... Viscosity (cP): 0,8872  
Dispersant Dielectric Const... 78,5

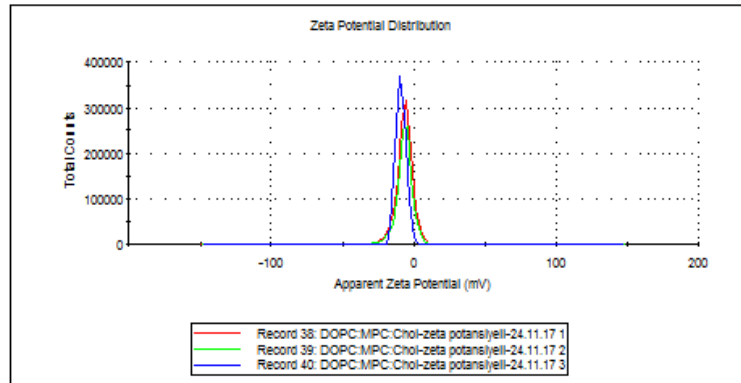
### System

Temperature (°C): 25,0 Zeta Runs: 12  
Count Rate (kcps): 124,1 Measurement Position (mm): 2,00  
Cell Description: Clear disposable zeta ... Attenuator: 9

### Results

|                             | Mean (mV)     | Area (%) | St Dev (mV) |
|-----------------------------|---------------|----------|-------------|
| Zeta Potential (mV): -8,62  | Peak 1: -8,62 | 100,0    | 3,48        |
| Zeta Deviation (mV): 3,48   | Peak 2: 0,00  | 0,0      | 0,00        |
| Conductivity (mS/cm): 0,161 | Peak 3: 0,00  | 0,0      | 0,00        |

Result **Good**



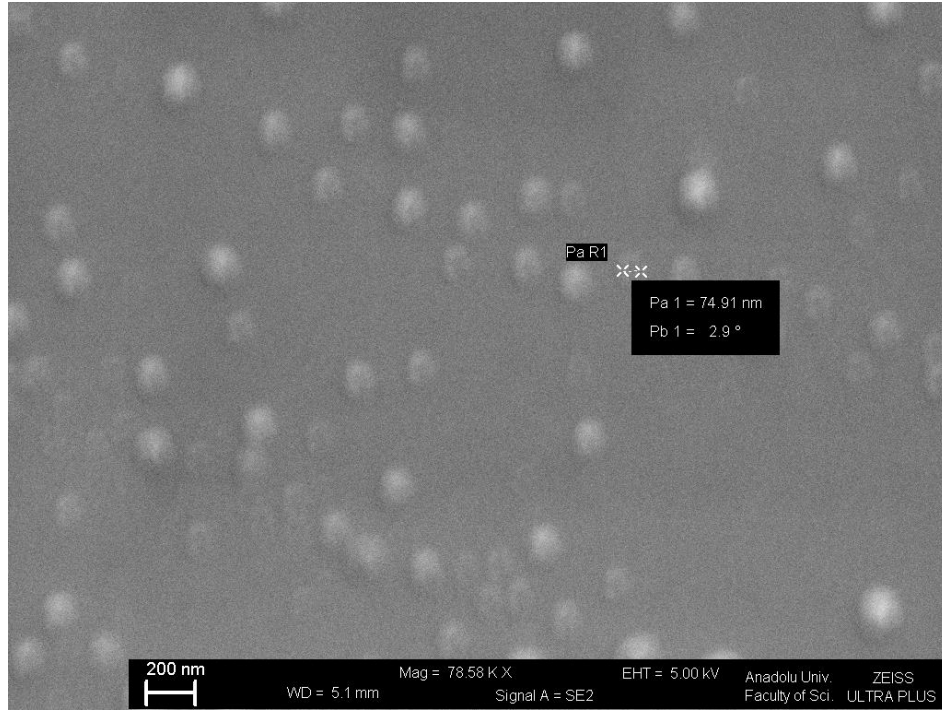
Malvern Instruments Ltd  
www.malvern.com

Zetasizer Ver. 7.10  
Serial Number: MAL500973

File name: ycbkr  
Record Number: 40  
24 Kas 2017 16:50:27

Şekil 5.16. Boş lipozom için zeta potansiyeli

Sentezlenen boş lipozomların yüzey morfolojisi SEM cihazı kullanılarak incelenmiş (Şekil 5.17) olup numuneye 78.58 K X ve 40.12 K X büyütme uygulandığında yaklaşık 74,91 ve 95,54 nm boyutlarında küresel yapıya sahip veziküllerin mevcut olduğu ve zeta boyut analiziyle örtüştüğü görülmüştür.



Şekil 5.17. Boş lipozomun SEM görüntüleri

#### 5.4.2. siRNA enkapsüle, MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA ve GFP modifiye lipozom (nihai lipozom)

Numune 10 dak ultrasonik su banyosunda dispers edildikten sonra nihai lipozomların boyutu (Şekil 5.18) ortalama 89,23 nm, Pdl değeri 0,268; ayrıca zeta potansiyeli de -2,76 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 5.19).

#### Size Distribution Report by Intensity

v2.2



#### Sample Details

Sample Name: esiRNA enk. ve MATRuHA modifiye lipozom 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

|                            |                                                       |
|----------------------------|-------------------------------------------------------|
| File Name: ycbkr.dts       | Dispersant Nam... Water                               |
| Record Number: 50          | Dispersant RI: 1,330                                  |
| Material RI: 1,59          | Viscosity (cP): 0,8872                                |
| Material Absorbtion: 0,010 | Measurement Date and Time: 27 Aralık 2017 Çarşamba... |

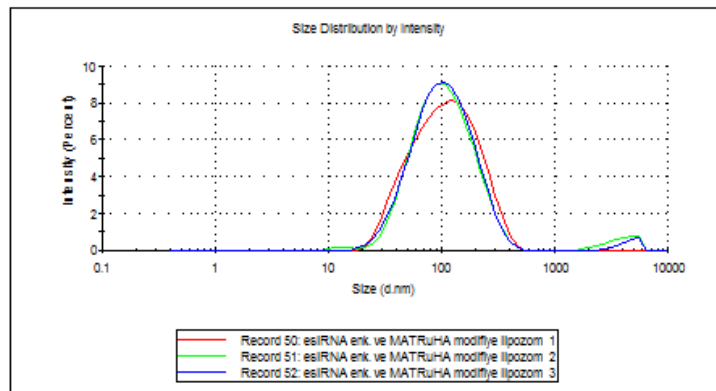
#### System

|                                              |                                 |
|----------------------------------------------|---------------------------------|
| Temperature (°C): 25,0                       | Duration Used (s): 70           |
| Count Rate (kops): 198,4                     | Measurement Position (mm): 5,50 |
| Cell Description: Clear disposable zeta cell | Attenuator: 7                   |

#### Results

|                                | Size (d.n...  | % Intensity: | St Dev (d.... |
|--------------------------------|---------------|--------------|---------------|
| <b>Z-Average (d.nm): 89,23</b> | Peak 1: 126,0 | 100,0        | 80,25         |
| <b>Pdl: 0,268</b>              | Peak 2: 0,000 | 0,0          | 0,000         |
| <b>Intercept: 0,928</b>        | Peak 3: 0,000 | 0,0          | 0,000         |

**Result** **Good**



Şekil 5.18. Nihai lipozom için boyut analizi

## Zeta Potential Report

v2.3



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

### Sample Details

Sample Name: esiRNA enk.ve MATRuHA modifiye lipozom 2

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

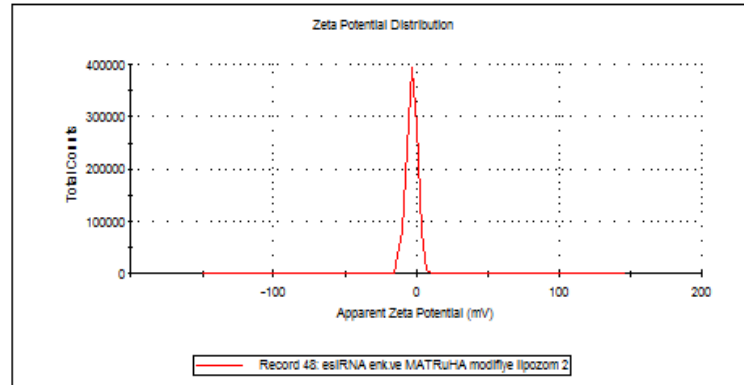
File Name: ycbkr.dts Dispersant Nam... Water  
Record Number: 48 Dispersant RI: 1,330  
Date and Time: 27 Aralık 2017 Çarşamba 11:... Viscosity (cP): 0,8872  
Dispersant Dielectric Const... 78,5

### System

Temperature (°C): 25,0 Zeta Runs: 12  
Count Rate (kcps): 82,9 Measurement Position (mm): 2,00  
Cell Description: Clear disposable zeta ... Attenuator: 8

### Results

|                             | Mean (mV)     | Area (%) | St Dev (mV) |
|-----------------------------|---------------|----------|-------------|
| Zeta Potential (mV): -2,76  | Peak 1: -2,76 | 100,0    | 3,82        |
| Zeta Deviation (mV): 3,82   | Peak 2: 0,00  | 0,0      | 0,00        |
| Conductivity (mS/cm): 0,770 | Peak 3: 0,00  | 0,0      | 0,00        |
| Result                      | Good          |          |             |



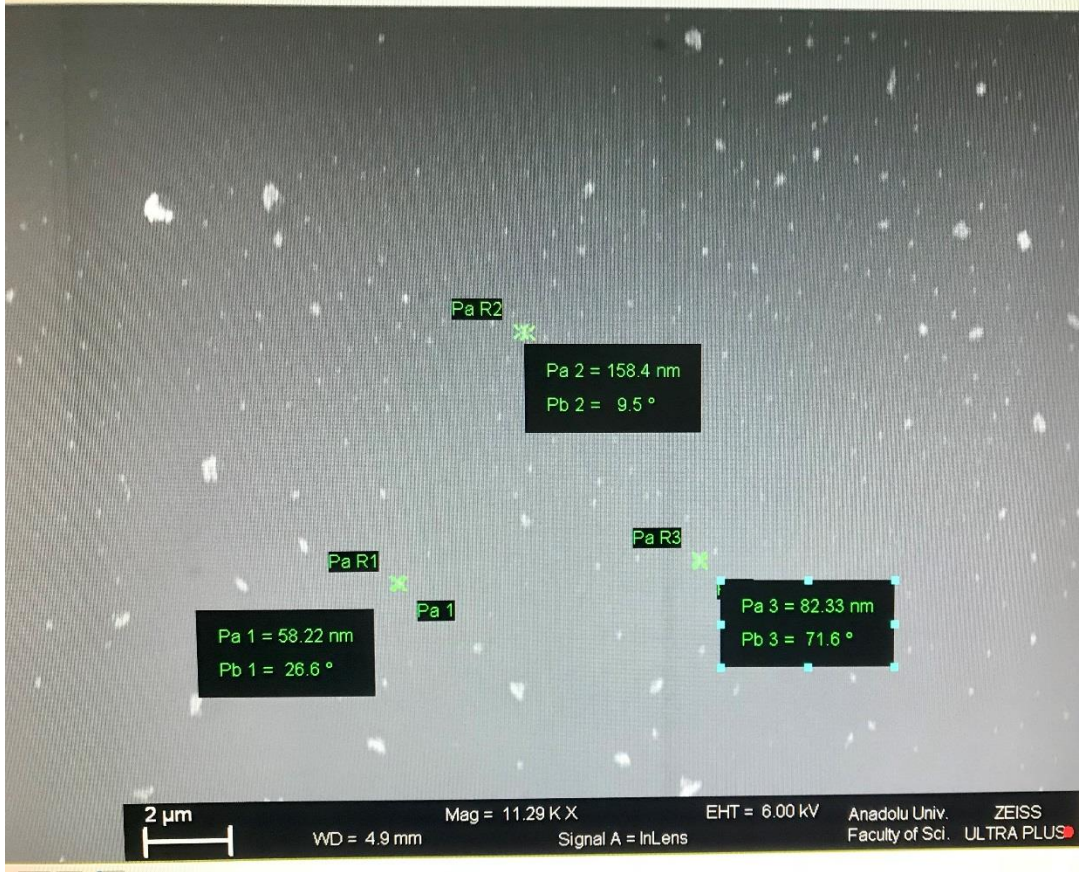
Malvern Instruments Ltd  
www.malvern.com

Zetasizer Ver. 7.10  
Serial Number: MAL500912

File name: ycbkr  
Record Number: 48  
27 Aralık 2017 16:15:02

Şekil 5.19. Nihai lipozom için zeta potansiyeli

Nihai lipozomun yüzey morfolojisi SEM cihazı kullanılarak incelenmiş ve 11.29K X büyütme gücü uygulandığında Şekil 5.20'deki gibi yaklaşık olarak 58,22, 82,33 ve 158,4 nm boyutlarına sahip küresel veziküller gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar da ZetaSizer ile edinilen boyut bilgisiyle örtüşmektedir.



Şekil 5.20. Nihai lipozomun SEM görüntüsü

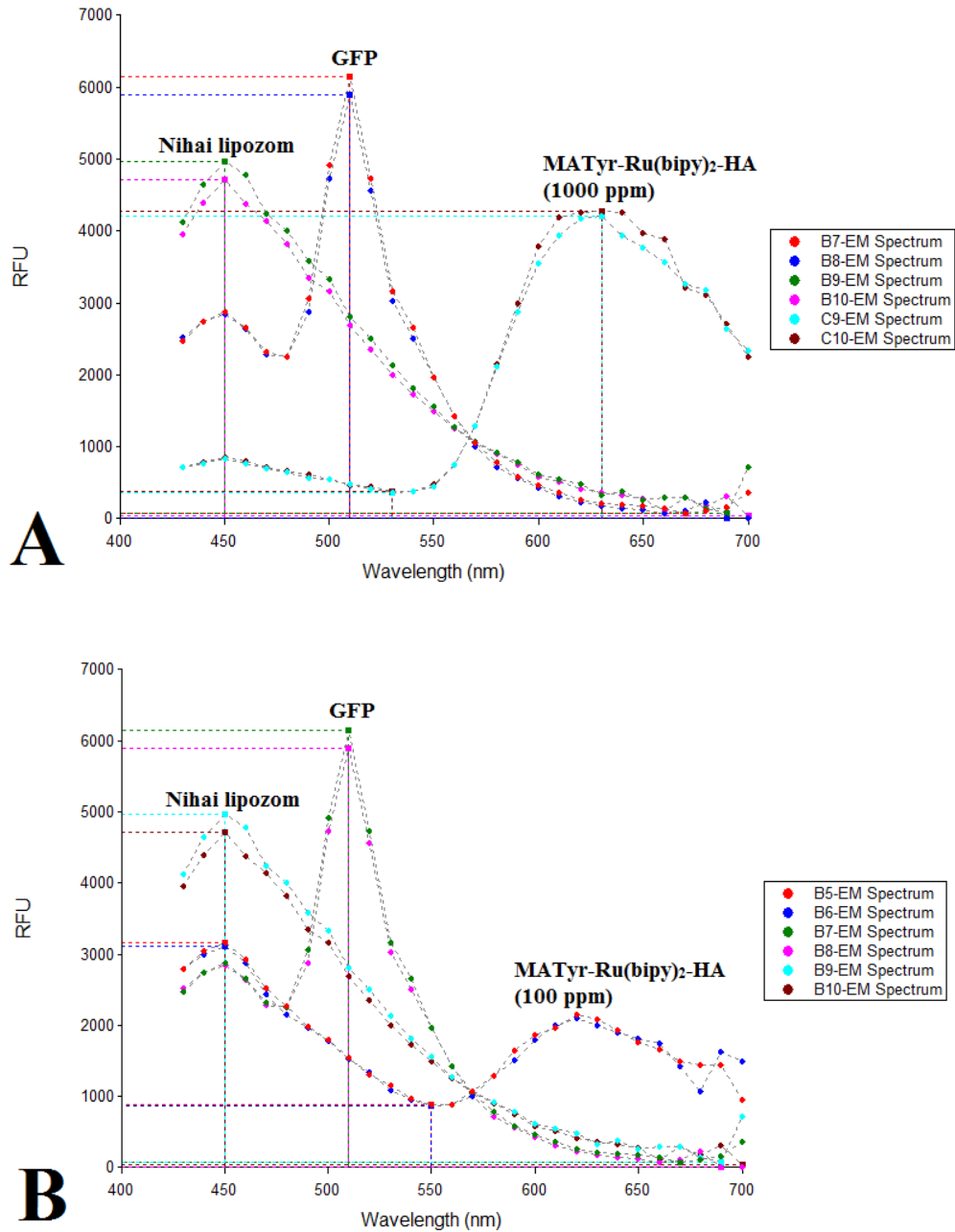
Yüzde enkapsülasyon verimini (%EE) hesaplamak için hidratlama aşamasında derişimi bilinen siRNA ( $w_{top}$ ) ile ultrasantrifüj sonucu süpernatant içindeki bağlanmayan siRNA derişimi ( $w_{bağ}$ ) not edilip Denklem 5.1' e göre hesaplanmış ve % 57,4 bulunmuştur.

$$EE (\%) = \left[ \frac{w_{top} - w_{bağ}}{w_{top}} \right] \times 100 \quad (5.1)$$

Modifikasyonu değerlendirmek için de bağlanmamış MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA ve GFP'ler uzaklaştırıldıktan sonra sırasıyla floresans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

GFP (100 ppb), 395 nm'de uyarıldığında 510 nm'de nispi floresans ünitesi (RFU) değeri 6000 olan emisyon piki vermiştir. Tek başına MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA (100 ppm), 450 nm'de daha kuvvetli olmak üzere 630 nm'de emisyon piki vermekteyken (Şekil 5.21-B); MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA (1000 ppm) yalnızca 630 nm'de kuvvetli bir emisyon piki vermiştir (Şekil 5.21-A).

Bu durumda ortamda; MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA 100 ppm ve GFP 1 ppb derişiminde bulunduğu için bu doğrultuda floresans karşılaştırması yapıp, Şekil 5.21-B’de görüldüğü gibi MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA’nın GFP’nin 510 nm’deki floresansını sönümlendiğı ancak GFP’nin de MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA’nın 450 nm’deki emisyon pikini kuvvetlendirdiğı gözlemlenmiştir.



Şekil 5.21. Nihai lipozom floresans grafikleri; MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA (1000 ppm) (A), MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA (100 ppm) (B)

## 6. SONUÇ VE YORUM

Kanser tedavileri için kullanılan pek çok ilaç taşıyıcı sistemin sahip olduğu sınırlılıklar dolayısıyla yeni yaklaşımlarla sağlık sektöründe üstünlükleriyle kendinden söz ettiren nanosistemleri spesifikleştirmek, hem daha etkin bir tedavi süreci sunmakta, hem de daha az yan etkiyle hasta konforunu artırmaktadır. Pek çok kanser tipinde tümörlü dokular CD44 adı verilen yüzey reseptörlerine sahip olmakta ve bu reseptörleri tanıyan biyolojik moleküller ile kanserli dokular hedeflenerek spesifik ilaç iletimi mümkün kılınmaktadır.

Bu çalışmada; meme kanseri geni olan brca 1 genini susturmak ve böylece hem tedavi hem de kanserin ilerlemesini önlemek amacıyla etkin siRNA iletimini sağlayacak nanotaşıyıcı bir sistem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Model olarak, biyouyumlulukları, etkin ilaç enkapsülasyonu sağlaması, non-toksik etkisi ve biyobozunabilirlik gibi özellikleri sebebiyle lipozomal bir nano yapı geliştirilmiştir. Bu doğrultuda çalışmanın ilk aşamasında, lipozomal nano yapının kanserli dokuda bulunan CD44 reseptörünü iyi tanıyan ligandlardan biri olan HA ile modifikasyonu için, HA biyopolimeri yaklaşık 95 kDa molekül ağırlığında ve 586 ppm derişiminde *Streptococcus equi*'den Sephadex G-75 kolon kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan HA'nın uzun zincirleri Hyase kriyojel kolon ile kırılarak nihai HA'nın molekül ağırlığı yaklaşık 5kDa'a düşürülmüştür. Elde edilen HA'nın karakterizasyonunda miktar tayini için Karbazol ve CTAB yöntemleri; moleküler ağırlık tespiti için (GPC cihazı ile) Jel Geçirgenlik Kromatografisi; fonksiyonel gruplarının analizi için FT-IR spektrofotometrisi kullanılmıştır. HA miktar tayin için kullanılan Karbazol yönteminin besiyeri ortamından glikozla reaksiyonu sonucu direk ölçüme imkan vermemesi dolayısıyla CTAB yöntemi tercih edilmiştir. Literatürle kıyaslandığında saflaştırdığımız HA miktarının daha az miktardaki eldesinin, sürekli bir pH, glikoz derişimi ve hücre artışı kontrolünün mümkün kılınamaması yani fermentor sisteminin eksikliğinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. FT-IR analizleri incelendiğinde saflaştırılan HA ve ticari HA'nın benzer sonuçlar verdiği de gözlemlenmiştir.

Hedefleme ajanı olarak kullanılacak HA, ANADOLUCA yöntemi uygulanarak fotosentetif metal şelat yapı MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA şeklinde sentezlenmiş ve nanolipozom yüzeyine bağlanmıştır. MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA karakterizasyonu için FT-IR analizi yapılmıştır.

Çalışmada ikinci olarak, spesifik hedefleme yapacağımız lipozomal nano yapının sentezi gerçekleştirilmiş ve lipozom sentezi için katyonik ve anyonik fosfolipidlerin sebep olabileceği toksik etkileri sergilemeyecek nötral bir fosfolipid olan DOPC kullanılmıştır. Fosfolipidler, hücre membranlarının yapılarıyla benzer özellik gösterdikleri için son derece biyouyumludurlar ve yine lipozom sentezinde bu biyouyumluluğu bozmayacak amfifilik, makrofajlar tarafından tutulumu önleyen MPC biyomonomeri kullanılmıştır. Lipozom çift tabakasının boşluklarını doldurarak daha stabil bir yapı elde etmemizi sağlayan kolesterol de lipozom sentezinde yer almıştır. İlk aşamada, boyut olarak da stabil bir lipozom sentezi gerçekleştirmek ve yöntemi oturtmak adına boş lipozom sentezi gerçekleştirilmiş ve karakterizasyonu için SEM görüntüleri, zeta potansiyeli ve zeta boyut analizi yapılmıştır. Her boş lipozom sentezinde yaklaşık olarak aynı sonuçların alınmasıyla beraber lipozom boyutu 92,58 nm olarak belirlenmiş ve bu ortalama boyut SEM görüntüleriyle de desteklenmiştir. Ayrıca lipozomal yapının küresel veziküler şekli de aynı şekilde SEM görüntüleriyle gözlenmektedir. Boş lipozomların zeta potansiyeli de -8,62 mV olarak ölçülmüştür.

Boş lipozom sentezinin ardından öncelikle bir model olarak meme kanseri geni BRCA 1 genini susturacak olan siRNA brca 1'in lipozom içine enkapsülasyonu sağlanmıştır. Enkapsülasyon verimini belirlemek için bağlanmayan siRNA'lar uzaklaştırılmış ve daha sonra mevcut lipozomların fosfolipid tabakaları parçalanarak enkapsüle olan siRNA'nın ortama salınımı sonucu UV absorbans ölçümleri yapılmış ve enkapsülasyon verimi % 57,4 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada son olarak; çalışmanın asıl amacı olan spesifik hedeflemeyi sağlayacak MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA ve ikincil hedefleme ajanı olarak kullanılacak floresans özellikteki GFP ile siRNA enkapsüle lipozomun yüzey modifikasyonu sırasıyla yapılmıştır. Öncelikle ANADOLUCA yöntemine göre MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA kompleksi nanolipozomlara bağlanmış ve ardından Floresans özellikteki ikincil hedefleme ajanı olarak da kullanılabilecek GFP, nanolipozomlara çapraz bağlanmıştır. GFP (100 ppb)'nin floresansı tek başına ölçüldüğünde 510 nm'de nispi floresans ünitesi (RFU) değerinin 6000 olduğu, bağlandıktan sonra RFU değerinin 5000'e düşmesinin yanı sıra emisyon pikinin 450 nm'ye kaydığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçla; bağlanmanın gerçekleştiği, ancak MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA'nın GFP'nin 510 nm'deki floresansını sönmlediği; aynı şekilde GFP'nin de MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA'nın (100, 1000 ppm) 630 nm'deki floresansını

sönümlediği, ancak GFP'nin bağlanmasıyla beraber MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA'nın (100 ppm) 450 nm'deki floresansını kuvvetlendirdiği, böylece daha yüksek bir RFU değerinde ve 450 nm'de floresans özellik gösterdiği gözlemlenmiştir. Bağlanmayan moleküller ultrasantrifüj tekniği ile uzaklaştırılmış ve nihai lipozomların karakterizasyonu için SEM görüntüleri, zeta potansiyeli ve zeta boyut analizi yapılmıştır. Zeta boyut analizine göre ortalama boyut 90 nm olarak bulunmuş ve bu sonuçların SEM görüntüleri ile aynı çerçevede olduğu görülmekte olup küresel vezikül şeklini de korumaya devam etmiştir. Ayrıca yüzey modifikasyonu sonucu nihai lipozomun zeta potansiyelinin, boş lipozomun zeta potansiyeli ile farklılık göstermesi beklenmiş ve -2,76 mV değeri ile beklenen değişim gerçekleşmiştir.

Literatürde HA modifiye ya da siRNA enkapsülasyonu ile ilgili pek çok çalışma olup; Tiantian vd., lenfatik hedeflemeyi değerlendirmek için dositaksel yüklü hem yüksek hem de düşük molekül ağırlığına sahip HA ile modifiye lipozomlar hazırlamış ve düşük molekül ağırlıklı HA ile modifiye lipozomların lenfatik drenajı ve lenf nodu alımını geliştirdiğini bu yüzden de tedavi için daha etkin olduğunu gözlemlemişlerdir (Tiantian vd., 2014). Ravar vd., meme kanseri için HA modifiye ve Paklitaksel enkapsüle, boyutları ortalama 107 nm ve zeta potansiyeli yaklaşık -9 mV olan, %92'lik bir enkapsülasyon verimi ile lipozom sentezi gerçekleştirmişlerdir (Ravar vd., 2016b). Başka bir çalışmada da; gemsitabin yüklü ilaç içeren ve pankreatik adenokarsinoma hücrelerine yönelik HA ile hedeflenmiş ortalama 150-190 nm boyutlarında lipozomlar sentezlenmiş olup HA ile hücresel lokalizasyonun daha iyi anlaşıldığı ayrıca HA modifiye lipozomların hücre büyümesini geleneksel lipozomlardan daha fazla inhibe ettiği görülmüştür (Arpicco vd., 2013). Floresans özellikteki R8 ve polyarginin hedefli, ortalama 50-200 nm boyutlarında, pozitif bir zeta potansiyeline sahip ve ile lipozom geliştiren Zhang vd. siRNA enkapsülasyonu gerçekleştirerek gen iletiminin bu şekilde mümkün olabileceğini saptamışlardır (Zhang vd., 2006). siRNA gen iletimi için sadece lipozomlar değil diğer nanopartiküller de kullanılmış; Patil vd. ortalama lusiferaz hedefli siRNA yüklü PLGA nanopartiküller sentezlemişler ancak stabilite ve sitotoksikite gibi sorunlarla karşılaşmışlardır (Patil & Panyam, 2009). Bahsedilen çalışmalardaki eksiklikleri iyileştirebildiğimiz daha küçük boyutlu ve hücre membranını birebir taklit edebilen yapılar olarak lipozomun kullanımıyla beraber yalnızca HA ile değil ANADOLUCA yönteminin tüm üstünlükleriyle beraber sentezlenen MATyr-Ru(bipy)<sub>2</sub>-HA kompleksi ile

diğer hedefleme ajanlarının da kolayca çapraz bağlanabilmesi sağlanmış, böylece hedeflemenin kalitesi artırılmıştır. Ayrıca lipozom yapısında DOPC nötr fosfolipidinin yanı sıra MPC gibi son derece biyoyumlu, hidrofilik bir biyomonomerin kullanımıyla lipozomun stabilitesi artırılmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda, kanser tedavisi için kullanılan geleneksel pek çok sisteme üstünlük sağlayacak, hücre membranını taklit edebilen ve son derece biyoyumlu, non toksik nanolipozomal yapının bir model olarak geliştirilmesinin yanı sıra yüzey modifikasyonları ile vücutta daha uzun süre dolaşıma imkan vermesiyle ve spesifik hedefleme sağlayarak uygulanacak doz sıklığının azalması, etkin tedavi imkanı, daha çok ilaç iletimi ve hedefe ulaştığında kontrollü salınım sağlaması gibi değerli özellikleri barındıran nanolipozom sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

## KAYNAKÇA

- Akbarzadeh, A., Rezaei-sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., & Zarghami, N. (2013). Liposome : classification , preparation , and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Akdamar, H. A., Sariözlü, N. Y., Özcan, A. A., Ersöz, A., Denizli, A., & Say, R. (2009). Separation and purification of hyaluronic acid by glucuronic acid imprinted microbeads. *Materials Science and Engineering C*, 29(4), 1404–1408. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.038>
- American Type Culture Collection. (2013). *Streptococcus equi subsp . equi*. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.11.003>
- Arpicco, S., Lerda, C., Dalla Pozza, E., Costanzo, C., Tsapis, N., Stella, B., ... Palmieri, M. (2013). Hyaluronic acid-coated liposomes for active targeting of gemcitabine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.06.003>
- Baksi, S., Khan, M., Panchal, M., & Rao, N. (2017). Optimization of extraction and production methods of Hyaluronic Acid ( HA ) from *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Biomedical & Therapeutic Sciences*, 4(1), 7–10.
- Benedini, L. J., & Santana, M. H. A. (2013). Effects of soy peptone on the inoculum preparation of *Streptococcus zooepidemicus* for production of hyaluronic acid. *Bioresource Technology*, 130, 798–800. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.161>
- Betageri, G. V., Jenkins, S. A., & Parsons, D. L. (1993). *Liposome Drug Delivery Systems*.
- Bhandare, N., & Narayana, A. (2014a). Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. *Nuclear Medicine & Radiation Therapy*, 5(4), 9. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9619.1000195>
- Bhandare, N., & Narayana, A. (2014b). Applications of Nanotechnology in Cancer: A Literature Review of Imaging and Treatment. *Journal of Nuclear Medicine & Radiation Therapy*, 5(4). <https://doi.org/10.4172/2155-9619.1000195>

- Bitter, T., & Muir, H. M. (1962). A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction. *Analytical Biochemistry*, 334, 330–334.
- Boggs, J. M. (1987). Lipid intermolecular hydrogen bonding: influence on structural organization and membrane function. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 906(3), 353–404. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(87\)90017-7](https://doi.org/10.1016/0304-4157(87)90017-7)
- Bondurant, B., Mueller, A., & O'Brien, D. F. (2001). Photoinitiated destabilization of sterically stabilized liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1511(1), 113–122. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00388-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00388-6)
- Caban, S., Aytekin, E., Sahin, A., & Capan, Y. (2014). Nanosystems for drug delivery. *OA Drug Design and Delivery*, 2(1), 1–7.
- Cesaretti, M., Luppi, E., Maccari, F., & Volpi, N. (2003). A 96-well assay for uronic acid carbazole reaction. *Carbohydrate Polymers*, 54(1), 59–61. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00144-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00144-9)
- Comstock, M. J. (1991). *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*.
- Demetzos, C., & Pippa, N. (2014). Advanced drug delivery nanosystems (aDDnSs): a mini-review. *Drug Delivery*, 21(4), 250–257. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.844745>
- Dua, J. S., Rana, A. C., & Bhandari, A. K. (2012). Liposome : Methods of Preparation and Applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research*, 3(2), 14–20. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Felnerova, D., Viret, J. F., Glück, R., & Moser, C. (2004). Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(6), 518–529. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2004.10.005>
- Frasco, M. F., Almeida, G. M., Santos-Silva, F., Do Carmo Pereira, M., & Coelho, M. A. N. (2015). Transferrin surface-modified PLGA nanoparticles-mediated delivery of a proteasome inhibitor to human pancreatic cancer cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103(4), 1476–1484. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35286>

- Gmeiner, W. H., & Ghosh, S. (2015). HHS Public Access. *Nanotechnol Rev.*, 3(2), 111–122. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2013-0013>. Nanotechnology
- Goodison, S., Urquidi, V., & Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Molecular Pathology*, 52(4), 189–196. <https://doi.org/10.1136/mp.52.4.189>
- Greish, K. (2007). Enhanced permeability and retention of macromolecular drugs in solid tumors: A royal gate for targeted anticancer nanomedicines. *Journal of Drug Targeting*, 15(7–8), 457–464. <https://doi.org/10.1080/10611860701539584>
- Gupta, R. B., & Kompella, U. B. (2006). *Nanoparticle Technology for Drug Delivery* (Vol. 159). <https://doi.org/10.1201/9780849374555>
- Ha, P. T., Nguyen, H. N., Do, H. D., Phan, Q. T., Thi, M. N. T., Nguyen, X. P., ... Phan, V. H. (2016). Targeted drug delivery nanosystems based on copolymer poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate for cancer treatment. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(1). <https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/1/015001>
- Hayward, S. L., Wilson, C. L., & Kidambi, S. (2016). Hyaluronic acid-conjugated liposome nanoparticles for targeted delivery to CD44 overexpressing glioblastoma cells. *Oncotarget*, 7(23), 34158–34171. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8926>
- Huang, W. C., Chen, S. J., & Chen, T. L. (2006). The role of dissolved oxygen and function of agitation in hyaluronic acid fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 32(3), 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.10.011>
- Huang, Z., Li, X., Zhang, T., Song, Y., She, Z., Li, J., & Deng, Y. (2014). Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9(4), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.06.001>
- Immordino, M. L., Cattel, L., & Dosio, F. (2006). Stealth Liposomes : Review of the Basic Science , Rationale , and Clinical Applications , Existing and Potential Stealth liposomes : review of the basic science , rationale , and clinical applications , existing and potential. *International Journal of Nanomedicine*, (February), 297–315.
- Ingham, E., Holland, K. T., Gowland, G., & Cunliffe, W. J. (1979). Purification and Partial Characterization of Hyaluronate Lyase (EC 4.2.2.1) from *Propionibacterium*

- acnes. *Journal of General Microbiology*, 115, 411–418.
- Jain, N. (2007). Pharmaceutical Technology. *Pharmaceutical Technology*, 59, 1–19. <https://doi.org/10.1211/002235707781850041>
- Jiang, T., Zhang, Z., Zhang, Y., Lv, H., Zhou, J., Li, C., ... Zhang, Q. (2012). Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery. *Biomaterials*, 33, 9246–9258. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.027>
- Kanchana, S., Arumugam, M., Giji, S., & Balasubramanian, T. (2013). Isolation, characterization and antioxidant activity of hyaluronic acid from marine bivalve mollusc *Amussium pleuronectus* (Linnaeus, 1758). *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.06.001>
- Karimi, N., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Keivani, F., Pezeshki, A., & Gholian, M. M. (2015). Phytosome and Liposome: The Beneficial Encapsulation Systems in Drug Delivery and Food Application. *Applied Food Biotechnology*, 2(3), 17–27.
- Kataoka, K., Harada, A., & Nagasaki, Y. (2001). Block copolymer micelles for drug delivery: Design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 113–131. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00124-1)
- Kumari, A., Singla, R., Guliani, A., & Yadav, S. K. (2014). Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI Journal*, 13, 265–286. <https://doi.org/10.17877/DE290R-15592>
- Kumari, A., Yadav, S. K., Pakade, Y. B., Kumar, V., Singh, B., Chaudhary, A., & Yadav, S. C. (2011). Nanoencapsulation and characterization of *Albizia chinensis* isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.08.046>
- Kumari, K., & Weigel, P. H. (1997). Molecular Cloning , Expression , and Characterization of the Authentic Hyaluronan Synthase from Group C *Streptococcus equisimilis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32539–32546.
- Lallana, E., Sousa-Herves, A., Fernandez-Trillo, F., Riguera, R., & Fernandez-Megia, E. (2012). Click chemistry for drug delivery nanosystems. *Pharmaceutical Research*,

29(1), 1–34. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0568-5>

Lavanya, N., Muzib, Y. I., Aukunuru, J., & Balekari, U. (2016). Preparation and evaluation of a novel oral delivery system for low molecular weight heparin. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 6(3), 148. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.187351>

Laverman, P., Carstens, M. G., Boerman, O. C., Dams, E. T., Oyen, W. J., van Rooijen, N., ... Storm, G. (2001). Factors affecting the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-liposomes upon repeated injection. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(2), 607–612. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11454922>

Li, X., Tang, Y.-H., Liang, H., & Karniadakis, G. E. (2014). Large-scale dissipative particle dynamics simulations of self-assembled amphiphilic systems. *Chem. Commun.*, 50(61), 8306–8308. <https://doi.org/10.1039/C4CC03096F>

Lindahl, S. (2013). *Streptococcus equi subsp . equi and Streptococcus equi subsp . zooepidemicus*. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.11.003>

Liu, L., Du, G., Chen, J., Wang, M., & Sun, J. (2009). Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(6), 755–763. <https://doi.org/10.1007/s00449-009-0300-6>

Liu, L., Sun, J., Zhang, D., Du, G., Chen, J., & Xu, W. (2009). Culture conditions optimization of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* based on radial basis function neural network and quantum-behaved particle swarm optimization algorithm. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.09.015>

Logothetidis, S. (2006). Nanotechnology in medicine: The medicine of tomorrow and nanomedicine. *Hippokratia*, 10(1), 7–21.

Lokeshwar, V. B., Mirza, S., & Jordan, A. (2014). *Targeting hyaluronic acid family for cancer chemoprevention and therapy*. *Advances in Cancer Research* (1st ed., Vol. 123). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800092-2.00002-2>

- Maeda, H. (2001). The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in Enzyme Regulation*, 41(0), 189–207. [https://doi.org/10.1016/S0065-2571\(00\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2571(00)00013-3)
- Mayer, L. D., Hope, M. J., & Cullis, P. R. (1986). Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *BBA - Biomembranes*, 858(1), 161–168. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(86\)90302-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90302-0)
- Misra, S., Hascall, V. C., Markwald, R. R., & Ghatak, S. (2015). Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer. *Frontiers in Immunology*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00201>
- Misra, S., Heldin, P., Hascall, V. C., Karamanos, N. K., Skandalis, S. S., Markwald, R. R., & Ghatak, S. (2011). Hyaluronan-CD44 interactions as potential targets for cancer therapy. *FEBS Journal*, 278(9), 1429–1443. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x>
- Mozafari, M. R. (2007). *Nanomaterials and Nanosystems for Biomedical Applications*.
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., & Kolar, J. (2008). Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Veterinarni Medicina*, 53(8), 397–411.
- Nikalje, A. P. (2015). Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Medicinal Chemistry*, 5(2), 81–89. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000247>
- Nimesh, S. (2013). Dendrimers. *Gene Therapy*, 259–285. <https://doi.org/10.1533/9781908818645.259>
- Oueslati, N., Leblanc, P., Bodin, A., Harscoat-Schiavo, C., Rondags, E., Meunier, S., ... Kapel, R. (2015). A simple methodology for predicting the performances of hyaluronic acid purification by diafiltration. *Journal of Membrane Science*, 490, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2015.04.024>
- Oueslati, N., Leblanc, P., Harscoat-Schiavo, C., Rondags, E., Meunier, S., Kapel, R., & Marc, I. (2014). CTAB turbidimetric method for assaying hyaluronic acid in complex environments and under cross-linked form. *Carbohydrate Polymers*, 112,

102–108. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.039>

Oussoren, C., & Storm, G. (2001). Liposomes to target the lymphatics by subcutaneous administration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(1–2), 143–156. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00154-5)

Paefgen, V., Doleschel, D., & Kiessling, F. (2015). Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6(SEP), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00197>

Palmerston Mendes, L., Pan, J., & Torchilin, V. (2017). Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy. *Molecules*, 22(9), 1401. <https://doi.org/10.3390/molecules22091401>

Pandey, H., Rani, R., & Agarwal, V. (2016). Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016150477>

Park, J. H., Cho, H. J., Yoon, H. Y., Yoon, I. S., Ko, S. H., Shim, J. S., ... Kim, D. D. (2014). Hyaluronic acid derivative-coated nanohybrid liposomes for cancer imaging and drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 174(1), 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.11.016>

Patel, S., Patel, P., & Parekh, B. (2014). Application of nanotechnology in cancers prevention, early detection and treatment. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(3), 479–486. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.138196>

Patil, Y., & Panyam, J. (2009). Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. *International Journal of Pharmaceutics*, 367(1–2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.039>

Qi, P., Cao, M., Song, L., Chen, C., Liu, M., Li, N., ... Zhao, J. (2016). The biological activity of cationic liposomes in drug delivery and toxicity test in animal models. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 47, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.015>

Ramos-Cabrera, P., & Campos, F. (2013). Liposomes and nanotechnology in drug development: Focus on neurological targets. *International Journal of*

- Nanomedicine*, 8(March), 951–960. <https://doi.org/10.2147/IJN.S30721>
- Ravar, F., Saadat, E., Gholami, M., Dehghankelishadi, P., Mahdavi, M., Azami, S., & Dorkoosh, F. A. (2016a). Hyaluronic acid-coated liposomes for targeted delivery of paclitaxel, in-vitro characterization and in-vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 229, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.012>
- Ravar, F., Saadat, E., Gholami, M., Dehghankelishadi, P., Mahdavi, M., Azami, S., & Dorkoosh, F. A. (2016b). Hyaluronic acid-coated liposomes for targeted delivery of paclitaxel, in-vitro characterization and in-vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 229, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.012>
- Reddy, K. J., & Karunakaran, K. T. (2013). Purification and characterization of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *J. BioSci. Biotech*, 2(3), 173–179. Retrieved from [http://www.jbb.uniplovdiv.bg/documents/27807/59547/jbb\\_2013-2\(3\)-pages\\_173-179.pdf%5Cnhttp://www.doaj.org/doaj?func=fulltext&aId=1949935](http://www.jbb.uniplovdiv.bg/documents/27807/59547/jbb_2013-2(3)-pages_173-179.pdf%5Cnhttp://www.doaj.org/doaj?func=fulltext&aId=1949935)
- Reichert, J. M., & Wenger, J. B. (2008). Development trends for new cancer therapeutics and vaccines. *Drug Discovery Today*, 13(1–2), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.09.003>
- Reineccius, G. A. (1995). Liposomes for Controlled Release in the Food Industry. *American Chemical Society*, 113–131. <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0590.ch011>
- Sandhu, S. K., Singh, M., & Sharma, G. (2016). Contemporary Applications and Concerns with Nanotech Based Drug Delivery. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 4(4), 247–248.
- Saranraj, P., Sivakumar, S., Sivasubramanian, J., & Geetha, M. (2011). Production , Optimization And Spectroscopic Studies Of Hyaluronic Acid Extracted From *Streptococcus pyogenes*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2(3), 954–959.
- Say, R., Ersoz, A., Hur, D., Yilmaz, F., Denizli, A., Ozcan, A., ... Findik, T. (2009). Patent No. 13/203,833. <https://doi.org/US 20100322867A1>
- Schiraldi, C., Gatta, A. La, & Rosa, M. De. (2010). Biotechnological Production and

- Application of Hyaluronan. In *Biopolymers* (pp. 387–412). <https://doi.org/978-953-307-109-1>
- Selyanin, M. A., Boykov, P. Y., & Khabarov, V. N. (2015). *Hyaluronic Acid*.
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in Pharmacology*, 6(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>
- Shaheen, S. M., Shakil Ahmed, F. R., Hossen, N., Ahmed, M., Amran, S., & Anwar-Ul-Islam. (2006). Liposome as a carrier for advanced drug delivery. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2006.1181.1191>
- Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R., & Farokhzad, O. C. (2017). Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, 17(1), 20–37. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108>
- Shrivastava, S., & Dash, D. (2009). Applying Nanotechnology to Human Health: Revolution in Biomedical Sciences. *Journal of Nanotechnology*, 2009, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2009/184702>
- Singh, R., & Lillard, J. W. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.*, 86(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>. Nanoparticle-based
- Singhal, S., Nie, S., & Wang, M. D. (2010). Nanotechnology Applications in Surgical Oncology. *Annual Review of Medicine*, 61(1), 359–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.052907.094936>
- Song, J. M., Im, J. H., Kang, J. H., & Kang, D. J. (2009). A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth. *Carbohydrate Polymers*, 78(3), 633–634. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.04.033>
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70, 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00339-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4)
- Swain, S., Patra, C. N., & Rao, M. E. B. (2016). *Pharmaceutical drug delivery systems*

and vehicles.

- Szoka, F., & Papahadjopoulos, D. (1980). Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 9(1), 467–508. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.09.060180.002343>
- Tiantian, Y., Wenji, Z., Mingshuang, S., Rui, Y., Shuangshuang, S., Yuling, M., ... Weisan, P. (2014). Study on intralymphatic-targeted hyaluronic acid-modified nanoliposome: Influence of formulation factors on the lymphatic targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 471(1–2), 245–257. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.05.027>
- Tiwari, A., & Tiwari, A. (2013). *Nanomaterials in Drug Delivery, Imaging, and Tissue Engineering*. <https://doi.org/10.1002/9781118644591>
- Torchilin, V. P. (2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), 145–160. <https://doi.org/10.1038/nrd1632>
- Tros de Ilarduya, C., García, L., & Düzgünes, N. (2010). Liposomes and lipopolymeric carriers for gene delivery. *Journal of Microencapsulation*, 27(7), 602–8. <https://doi.org/10.3109/02652048.2010.501396>
- Vasi, A. M., Popa, M. I., Butnaru, M., Dodi, G., & Verestiuc, L. (2014). Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Materials Science and Engineering C*, 38(1), 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.01.052>
- Vats, S., Singh, M., Siraj, S., Singh, H., & Tandon, S. (2017). Role of nanotechnology in theranostics and personalized medicines. *Journal of Health Research and Reviews*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.4103/2394-2010.199328>
- Wang, B., Siahaan, T., & Soltero, R. (2005). *Drug Delivery Principles and Applications*. *Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1002/0471475734>
- Wang, M., & Thanou, M. (2010). Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, 62(2), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.03.005>

- Weissig, V. (2010). *Liposomes Methods and Protocols Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers*. Humana Press (Vol. 605). <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2>
- Weissig, V., Lasch, J., & Gregoriadis, G. (1989). Covalent coupling of sugars to liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 1003(1), 54–57. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(89\)90097-0](https://doi.org/10.1016/0005-2760(89)90097-0)
- Wohlfart, S., Gelperina, S., & Kreuter, J. (2012). Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.017>
- Yadav, S. K. (2016). *Nanoscale Materials in Targeted Drug Delivery, Theragnosis and Tissue Regeneration*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-0818-4>
- Yang, C., Cao, M., Liu, H., He, Y., Xu, J., Du, Y., ... Gao, F. (2012). The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 43094–43107. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349209>
- Yokel, R. A., & MacPhail, R. C. (2011). Engineered nanomaterials: exposures, hazards, and risk prevention. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 6:7, 1–27. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-6-7>
- Zhang, C., Tang, N., Liu, X. J., Liang, W., Xu, W., & Torchilin, V. P. (2006). siRNA-containing liposomes modified with polyarginine effectively silence the targeted gene. *Journal of Controlled Release*, 112(2), 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.01.022>
- http-1: <http://www.futuretimeline.net/subject/nanotechnology.htm>
- http-2: <http://sustainable-nano.com/2014/03/04/turning-plastic-bags-into-carbon-nanotubes/>
- http-3: <http://fortiferrum.com/liposomal-microencapsulated-iron?lang=en?>
- http-4: <https://www.kullabs.com/classes/subjects/units/lessons/notes/note-detail/3367>