

**BEYİN TÜMÖRLERİNİN TEDAVİSİ İÇİN ÇİFT ETKİLİ DOKU
İSKELESİ-NANOPARTİKÜL SİSTEMLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF DOUBLE-EFFECTIVE TISSUE
SCAFFOLD-NANOPARTICLE SYSTEMS FOR BRAIN
TUMOUR THERAPY**

CEREN KUTLU

Hacettepe Üniversitesi

Lisanüstü Eğitim-Öğretim Sınav Yönetmeliğinin

BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2011

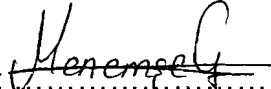
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

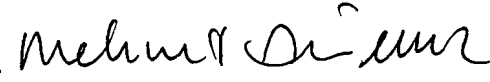
Başkan


:.....
Prof. Dr. Serpil TAKAÇ

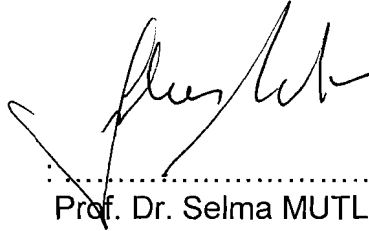
Üye (Danışman)


:.....
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

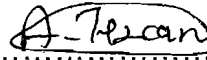
Üye


:.....
Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Üye


:.....
Prof. Dr. Selma MUTLU

Üye


:.....
Doç Dr. Ayşen TEZCANER

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından 16/06/2011 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil DENİZLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYİN TÜMÖRLERİNİN TEDAVİSİ İÇİN ÇİFT ETKİLİ DOKU İSKELESİ- NANOPARTİKÜL SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Ceren KUTLU

ÖZ

Sunulan tez çalışmasında, beyin tümörlerinin tedavisinde lokal olarak kullanılmak üzere, antikanserojen ve antivaskülaritif etkilere sahip doku iskelelerinin üretimi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak, ilk olarak bir antikanser ilaç olan 5-Flourourasil (5-FU) poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA) nanopartiküllere yüklenmiştir. Ardından, 5-FU yüklü nanopartiküller ve antivaskülaritif ajan olarak seçilen Bevacizumab, kitosan doku iskelesine yerleştirilmiş, böylelikle çift etkili bir doku iskelesi üretimi gerçekleştirilmiştir. 5-FU ile mevcut tümör dokusunun ortadan kaldırılması amaçlanmış, Bevacizumab ile de tümör hücrelerinin çoğalmaları engellenmeye çalışılmıştır. Oluşturulan bu sistemin *in-vitro* etkinliği, tümör ve endotel hücre hatları ile yürütülen hücre kültürlerinde araştırılmıştır.

Tez kapsamındaki çalışmaların ilk aşamasında farklı poli-laktik asit/poli-glikolik asit (PLA/PGA) (85:15, 65:35 ve 50:50) bileşimlerine sahip PLGA kopolimerlerinden, boş ve 5-FU yüklü nanopartiküller, emülsiyon-çözücü-buharlaştırma tekniği kullanılarak sentezlenmiştir. Zetasizer, AFM (atomik kuvvet mikroskobu) ve SEM (taramalı elektron mikroskobu) kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde partikül büyüklüklerinin yaklaşık 200 nm olduğu saptanmıştır. Ağırlıkça %10 ve %20 oranında (ilaç/polimer) 5-FU içeren partiküllerin salım profilleri belirlenmiş ve en uygun taşıyıcı sistemin %10 5-FU içeren 50:50 PLGA nanopartiküllerle oluşturulabildiği gözlenmiştir. Üretilen PLGA nanopartiküllerin 5-FU enkapsülasyon verimlerinin ~%55 olduğu UV spektrofotometre ve HPLC kullanılarak hesaplanmıştır. Doku iskeleleri, %2'lik kitosan (>% 85 deasetilasyon derecesi) çözeltilerinden dondurarak-kurutma yöntemiyle hazırlanmıştır. Kitosan iskelelerin ~100 µm gözenek büyüklüğüne, % 88 gözenekliliğe ve içsel bağlantılı gözenek yapısına sahip oldukları belirlenmiştir.

Floresan izotiyosiyanat (FITC) işaretli PLGA nanopartiküller üretim aşamasında karıştırma ve üretim sonrasında emdirme yöntemleriyle kitosan doku iskelelerine

yüklenmiş ve floresan mikroskop görüntülerinden en uygun PLGA/kitosan oranının, 35:65 (w/w); en uygun partikül yükleme yönteminin de doku iskelesi üretimi sırasında karıştırarak yükleme olduğu belirlenmiştir. PLGA nanopartikül yüklü kitosan doku iskelesinden 21 günlük sürede ortalama 18 µg 5-FU salındığı tespit edilmiş, *in-vitro* çalışmalarda kullanılacak ilaç miktarı belirlenirken, bu değer göz önünde bulundurulmuştur.

Doku iskelelerine yüklenecek Bevacizumab konsantrasyonları T98G insan glioblastoma hücre hattı ve HUVEC'ler (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) için ayrı ayrı yapılan hücre kültür çalışmaları ile belirlenmiştir. 5-FU içeren PLGA nanopartiküller ve Bevacizumab'ın yüklendiği kitosan doku iskelelerinin, T98G ve HUVEC hücre hatları üzerindeki etkileri MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) analizlerinin yanısıra SEM, optik mikroskop, CLSM (konfokal lazer taramalı mikroskopu) ve floresan mikroskop görüntüleri eşliğinde incelenmiştir. Analiz sonuçları, 95.42 µg 5-FU ve 0.05 mg Bevacizumab içeren 2 mm kalınlığında ve 9 mm çapındaki çift etkili kitosan doku iskelesinin *in-vitro* koşullarda tümör oluşumunu engelleme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: PLGA, nanopartikül, beyin tümörü, 5-FU, Bevacizumab, T98G, HUVEC.

Danışman: Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği / Biyomühendislik Anabilim Dalı.

DEVELOPMENT OF DOUBLE-EFFECTIVE TISSUE SCAFFOLD-NANOPARTICLE SYSTEMS FOR BRAIN TUMOUR THERAPY

Ceren KUTLU

ABSTRACT

The aim of the present study was to fabricate double-effective chitosan scaffold which has anticancer and antivascularization effects for using in local therapy of brain tumours. For this purpose, at first, an anticancer drug, 5-Fluorouracil (5-FU), was loaded into the poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles. Then, 5-FU loaded nanoparticles and Bevacizumab which was chosen as antivascularization agent were placed into the chitosan scaffold. While 5-FU is destroying tumour tissue, Bevacizumab prevent the proliferation of tumour cells. *In-vitro* effectiveness of this double-effective system was investigated on cell cultures which were performed with tumour and endothelial cell lines.

In the first part of the study, free and 5-FU loaded nanoparticles were synthesized from different poly-lactic acid/poly-glycolic acid (PLA/PGA; 85:15, 65:35 and 50:50) PLGA copolymers by using emulsion-solvent evaporation technique. Zetasizer, AFM (atomic force microscope) and SEM (scanning electron microscope) analysis detected that particle sizes were approximately 200 nm. Release profiles of 10 % and 20 % 5-FU (drug/polymer, w/w) loaded PLGA nanoparticles were determined and it was observed that optimum carrier system can be prepared with 10 % (w/w) 5-FU loaded PLGA (50:50, w/w) nanoparticles. Encapsulation efficiency of PLGA nanoparticles was calculated as ~55 % by using UV spectrophotometer and HPLC. Chitosan scaffolds were prepared with 2 % (w/v) chitosan (deacetylation degree of >85) solution by freeze-drying technique. It was detected that chitosan scaffolds has ~ 100 µm pore size and 88 % porosity with interconnected pore structure.

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled PLGA nanoparticles were loaded into the chitosan scaffolds by two ways i.e. during manufacturing by stirring or after manufacturing by embedding. The optimum PLGA nanoparticle/chitosan ratio was determined as 35:65 (w/w) by loading during manufacturing. Approximately 18 µg

5-FU was released from PLGA nanoparticle loaded chitosan scaffold in 21 days and this data was taken into account to determine the drug quantity for *in-vitro* studies.

The amounts of Bevacizumab which was loaded into the chitosan scaffolds were determined by cell culture studies carried out by T98G (human glioblastoma cell line) and HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cell). The effects of chitosan scaffolds that contain 5-FU loaded PLGA nanoparticles and Bevacizumab, on T98G and HUVEC cell lines were examined by MTT ((3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) analysis, also SEM, optical microscope, CLSM (confocal laser scanning microscope), and fluorescence microscope views. The results showed that the double-effective chitosan scaffold (in 2 mm thickness and 9 mm diameter) containing ~100 µg 5-FU and 0.05 mg Bevacizumab had a potential to prevent the tumour formation *in-vitro* conditions.

Keywords: PLGA, nanoparticle, brain tumour, 5-FU, Bevacizumab, T98G, HUVEC.

Advisor: Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe University, Chemical Engineering / Bioengineering Department.

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve tecrübeleriyle, çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesi için gerekli desteği hiçbir zaman esirgemeyen, bir bilim insanı ve birey olarak hayatım boyunca örnek alacağım çok değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na, yoluma tuttuğu ışık, verdiği cesaret ve sağladığı olanaklar için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı tamamlamam için gerekli izinleri almama yardımcı olan saygıdeğer hocam Doç. Dr. H. Soner Altundoğan'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde çok büyük emeği olan, bilgisi, deneyimi ve özverisi ile her işimi kolaylaştıran; sevgi dolu kalbiyle her umutsuzluğa kapıldığım anda beni yüreklendiren değerli dostum Anıl Sera Kahraman'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında karşılaştığım her zorluğu çözmeme yardımcı olan, kısa çay molalarımaya doyumsuz sohbetleriyle renk katan, dostluklarını hiçbir zaman kaybetmek istemeyeceğim canım arkadaşlarım Işıl Gerçek Beşkardeş, Fatma Betül Kaya ve Soner Çakmak'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında hiçbir yardımı esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Damla Çetin, Zeliha Soran, Sevcan Dalkıran, Berna Başbağ ve değerli hocam Dr. Seda Tıgılı Aydın'a teşekkürlerimi sunarım.

Bana her zaman ve koşulda destek olan can arkadaşlarım Müşra, Aylin, Nuray, Deroy, Tuyku, Niyan, Sağıdık, Hakkı ve UID-DER ailesine sevgilerimi sunarım.

Sevgisiyle hayatıma kattığı değerler için Emrah'a sevgimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bana evinin kapılarını açan sevgili teyzem Aynur Akyapı'ya ve içine sevgisini kattığı enfes yemekleriyle karnımı doyuran teyzem Fadime Uğur ve ailesine teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan sevgili annem ve canım kardeşime, hiç bitmeyen sevgi ve destekleri için teşekkür ederim. Şayet dünyaya gelirken seçme şansım olsaydı, yine sizi seçerdim!

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Doku Mühendisliği	3
2.2. Tümör Tedavilerinde Doku Mühendisliği	4
2.2.1. Tümörlerin yapısı ve özellikleri	6
2.2.1.1. Beyin tümörleri	8
Beyin tümörü tedavi yöntemleri	11
2.2.1.2. Tümör hücreleri ve hücre hatları	12
T98G hücre hattı	14
HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)	15
2.3. Tümör Tedavilerinde Kullanım Potansiyeline Sahip Doku Mühendisliği	
Malzemeleri	17
2.3.1. Mikropartiküller	17
2.3.2. Nanopartiküller	18
2.3.2.1. Nanopartiküllerin özellikleri	18
2.3.2.2. Nanopartikül üretiminde kullanılan polimerler	19
Poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA)	20
2.3.2.3. Nanopartikül sentez yöntemleri	22
Mikroheterojen sistemlerden nanopartikül üretimi	24
İyon saçılımı	25
Kimyasal buhar kaplama	25
Kimyasal buhar çöktürme (CVC) yöntemi	25
Ultrasonik sprey piroliz (USP) yöntemi	27
Mekanik aşındırma tekniği	28

Hidrojen indirgenmesi tekniği.....	28
Asal gaz yoğuşturma (IGC) tekniği.....	29
2.3.2.4. Nanopartiküllerin biyomedikal uygulamaları.....	30
Salım sistemleri.....	31
2.3.2.5. Nanopartiküllere ilaç yüklenmesi ve nanopartiküllerden ilaç salım mekanizmaları.....	34
2.3.3. Doku iskeleleri.....	35
2.4. Tümör Tedavilerinde Kullanılan İlaçlar.....	38
2.4.1. Tümör tedavilerinde kullanılan ilaçların özellikleri.....	38
2.4.1.1. 5-Florourasil (5-FU).....	38
2.4.1.2. Bevacizumab (Altuzan®).....	40
3. DENEYSEL ÇALIşMALAR.....	43
3.1. Malzemeler.....	45
3.2. 5-FU İçeren PLGA Nanopartikül Sentezi.....	46
3.2.1. PLGA nanopartikül sentezi.....	46
3.2.2. PLGA nanopartiküllere ilaç yüklenmesi.....	46
3.3. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları.....	46
3.3.1. Partikül büyüklüğü ölçümü.....	46
3.3.2. FTIR analizi.....	46
3.3.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi.....	47
3.3.4. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi.....	47
3.4. PLGA Nanopartiküllerde 5-FU Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması ve Nanopartiküllerden İlaç Salımı.....	47
3.4.1. Enkapsülasyon veriminin hesaplanması.....	47
3.4.2. Salım sistemlerinin hazırlanması.....	48
3.4.3. Salım sistemlerinden alınan örneklerin analizi.....	49
3.5. PLGA Nanopartikül İçeren ve İçermeyen (Boş) Kitosan Doku İskelelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	49
3.5.1. Boş kitosan doku iskelesi sentezi.....	49
3.5.2. Boş kitosan doku iskelesi karakterizasyonu.....	50
3.5.3. PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelesi sentezi ve karakterizasyonu.....	50
3.5.3.1. FTIR analizi.....	51
3.5.3.2. Floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretilenen	

nanopartiküllerin görüntülenmesi.....	51
3.5.3.3. SEM ile görüntüleme.....	51
3.5.4. Kitosan doku iskelelerine Bevacizumab yüklenmesi.....	52
3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	52
3.6.1. T98G hücre karakterizasyon çalışmaları.....	53
3.6.1.1. MTT analizi.....	53
3.6.1.2. Hücre sayımı.....	53
3.6.1.3. Floresan mikroskopu ile analiz.....	54
3.6.1.4. Kristal viyole ile boyama.....	54
3.6.2. T98G hücrelerinin ekileceği kitosan doku iskelesine yüklenecek Bevacizumab miktarının ve yükleme şeklinin belirlenmesi.....	54
3.6.2.1. MTT analizi.....	54
3.6.2.2. SEM analizi.....	55
3.6.3. T98G hücreleri ve çift etkili kitosan doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar.....	55
3.6.3.1. Hücrelerin doku iskeleleriyle doğrudan etkileşimi.....	55
3.6.3.2. Hücrelerin doku iskeleleriyle dolaylı etkileşimi.....	55
3.6.3.3. MTT analizi.....	56
3.6.3.4. SEM analizi.....	56
3.6.3.5. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) analizi.....	56
3.6.3.6. Invert mikroskop ile analiz.....	57
3.6.4. HUVEC'lerin karakterizasyon çalışmaları.....	57
3.6.4.1. MTT analizi.....	57
3.6.4.2. Hücre sayımı.....	57
3.6.4.3. Floresan mikroskopu ile analiz.....	57
3.6.4.4. Kristal viyole ile boyama.....	58
3.6.5. HUVEC'lerin ekileceği kitosan doku iskelesine yüklenecek Bevacizumab miktarının ve yükleme şeklinin belirlenmesi.....	58
3.6.5.1. MTT analizi.....	58
3.6.5.2. Kristal viyole ile boyama.....	58
3.6.6. Çift etkili kitosan doku iskelelerine ekilen HUVEC'lerle yapılan çalışmalar.....	58
3.6.6.1. MTT analizi çalışmalar.....	58
3.6.6.2. Kristal viyole ile boyama.....	59

3.7. İstatistiksel Analiz.....	59
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR.....	60
4.1. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	60
4.2. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	63
4.2.1. Boy ve boy dağılımı.....	63
4.2.2. FTIR analizi.....	64
4.2.3. SEM analizi.....	64
4.2.4. AFM analizi.....	65
4.2.5. 5-FU enkapsülasyon veriminin hesaplanması.....	66
4.3. Gözenekli Kitosan Doku İskelesinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	68
4.4. PLGA Nanopartiküllerin Kitosan Doku İskelesine Yüklenmesi ve Karakterizasyonu.....	70
4.4.1. FTIR analizi.....	70
4.4.2. Floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretleme.....	71
4.4.3. SEM ile analiz.....	73
4.5. PLGA Nanopartiküllerden İlaç Salımı.....	74
4.6. PLGA Nanopartikül Yüklü Doku İskelelerinden İlaç Salımı.....	76
4.7. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	77
4.7.1. T98G hücrelerinin karakterizasyon çalışmaları.....	77
4.7.1.1. MTT analizi ve hücre sayım sonuçları.....	77
4.7.1.2. Floresan mikroskobu ile analiz.....	80
4.7.1.3. Optik mikroskobu ile analiz.....	81
4.7.2. T98G hücrelerinin doku iskeleleriyle etkileştirilmeleri.....	83
4.7.2.1. Doku iskelelerine yüklenen Bevacizumab miktarının belirlenmesi.....	83
4.7.2.2. T98G hücrelerinin doku iskeleleriyle doğrudan etkileşimi.....	85
4.7.2.3. T98G hücrelerinin doku iskeleleriyle dolaylı etkileşimi.....	91
4.7.3. HUVEC'lerin karakterizasyon çalışmaları belirlenmesi.....	95
4.7.3.1. MTT analizi ve hücre sayım sonuçları.....	95
4.7.3.2. Floresan mikroskobu ile analiz.....	96
4.7.3.3. Optik mikroskobu ile analiz.....	98
4.7.4. HUVEC'lerin doku iskelesi ile etkileşimleri.....	99
4.7.4.1. Doku iskelelerine yüklenen Bevacizumab miktarının belirlenmesi.....	99

4.7.4.2. HUVEC'lerin doku iskeleleriyle dolaylı etkileşimi.....	101
5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	106
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	110
EKLER.....	123
ÖZGEÇMİŞ.....	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Tümörlerdeki damar oluşumunun antianjiyogenik tedaviye Cevabı (Jain, 2005).	9
Şekil 2.2. Monolayer morfoloji gösteren HUVEC primer kültürünün mikroskopik görüntüsü a) elektron mikroskobu, b) ışık mikroskobu.	16
Şekil 2.3. PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapısı.	21
Şekil 2.4. Biyobozunur polimerik partiküllere tutunan biyoaktif ajanların partiküllerden salımı. Aktif ajan ile birleştirilen polimerik sistem, çevre ile etkileştiriliyor ve çevresindeki ortam sıvısı matrise giriyor (A), ardından sistemin şişmesine neden oluyor (B), sıvı difüzyon kanalları oluşturuyor (C) ve malzemenin bozunmasıyla birlikte oluşan polimerik sistem de yok oluyor (D), (Silva et al., 2007).	22
Şekil 2.5. Nanopartiküllere ait elektron mikroskobu görüntüleri (a) altın nanoçubuklar, (b) altın çekirdek silika kabuk nanopartiküller ve (c) iç boşluklu platin nanopartiküller.	23
Şekil 2.6. Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar.	23
Şekil 2.7. Kimyasal buhar kaplama metodunun şematik görünümü.	26
Şekil 2.8. Kimyasal buhar çöktürme (CVC) yönteminin şematik gösterimi.	27
Şekil 2.9. Mekanik aşındırma işleminin şematik görünümü (a), bilyalı öğütücü (b).	28
Şekil 2.10. Hidrojen indirgenmesi yöntemi.	29
Şekil 2.11. Asal gaz yoğunlaştırma yönteminin şematik görünümü.	30
Şekil 2.12. Salım sistemlerinin plazma konsantrasyon profilleri.	32
Şekil 2.13. (a) Kitosan doku iskelesi fabrikasyon yöntemlerinin şematik gösterimi (Di Martino et al., 2005), (b) hızlı prototipleme yöntemiyle elde edilmiş kitosan jel iskele ve taramalı elektron mikroskop görüntüsü (Ang et al., 2002), (c) dondurarak kurutma yöntemiyle üretilmiş kitosan doku	

iskelesi elektron mikroskop görüntüsü (Suh and Matthew, 2000), (d) elektroçirime yöntemiyle hazırlanmış nanofiber kitosan doku iskelesi elektron mikroskop görüntüsü (Bhattarai, 2005).	37
Şekil 2.14. 5-FU'nun kimyasal yapısı.	39
Şekil 2.15. 5-FU metabolizması.	39
Şekil 3.1. Deneysel çalışmaların akış şeması.	44
Şekil 3.2. PLGA nanopartikül içeren selüloz membranların yerleştirildiği PBS rezervuarlar.	49
Şekil 3.3. (a) Liyofilize edilen kitosan doku iskelelerinin genel görünümü, (b) stabilize edilmiş ve şişmiş doku iskeleleri (Tıǧlı et al., 2007).	50
Şekil 3.4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan gruplar.	52
Şekil 4.1. Nanopartikül üretiminde kullanılan malzemelere ve nanopartiküllere ait FTIR spektrumları. 50:50 PLGA polimeri (a), 50:50 PLGA nanopartikül (b), 5-FU içeren 50:50 PLGA nanopartikül (c), DMAB (d).	64
Şekil 4.2. 50:50 PLGA nanopartiküllerin SEM fotoğrafları (X40,000). (a) 5-FU içermeyen PLGA nanopartiküller; (b) 5-FU içeren PLGA nanopartiküller.	65
Şekil 4.3. PLGA nanopartiküllerin 2D AFM görüntüleri. (a) 5-FU içermeyen PLGA nanopartiküller; (b) 5-FU içeren PLGA nanopartiküller.	66
Şekil 4.4. PLGA nanopartiküllerin 3D AFM görüntüleri. (a) 5-FU içermeyen PLGA nanopartiküller; (b) 5-FU içeren PLGA nanopartiküller.	66
Şekil 4.5. PLGA nanopartiküllere yüklenen 5-FU'ya ait HPLC kromatogramı.	68
Şekil 4.6. Kitosan doku iskelesi SEM görüntüsü (250X).	69
Şekil 4.7. Nanopartikül içeren ve içermeyen kitosan doku iskelelerine ait FTIR spektrumları. Boş kitosan doku iskelesi (a), 50:50 PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelesi (b).	71
Şekil 4.8. 25:75 PLGA/kitosan oranındaki FITC işaretli partiküllerin, doku iskelelerinde farklı büyütme ölçeklerindeki floresan mikroskop görüntüleri a)20X; b)40X.	72
Şekil 4.9. 35:65 PLGA/kitosan oranındaki FITC işaretli partiküllerin, doku iskelelerinde farklı büyütme ölçeklerindeki floresan mikroskop görüntüleri a)4X; b)10X; c)20X.	72
Şekil 4.10. 17:83 PLGA/kitosan oranındaki FITC işaretli partiküllerin	

doku iskelelerinde farklı büyütmelerdeki floresan mikroskop görüntüleri a)4X; b)10X.	73
Şekil 4.11. PLGA (50:50) nanopartikül yüklü kitosan iskelelerin farklı büyütmelerde çekilmiş kesit SEM görüntüleri (a)500X, b)1500X).	73
Şekil 4.12. %10 oranında ilaç yüklü nanopartiküllerden 5-FU'nun kümülatif salım değerleri.	74
Şekil 4.13. %10 oranında ilaç yüklü 85:15 ve 50:50 PLA/PGA oranındaki PLGA nanopartiküllerden 5-FU'nun kümülatif salım değerleri.	75
Şekil 4.14. %20 oranında ilaç yüklü 85:15 ve 50:50 PLA/PGA oranındaki PLGA nanopartiküllerden 5-FU'nun kümülatif salım değerleri.	75
Şekil 4.15. %10 5-FU içeren 50:50 PLGA nanopartiküller kitosan doku iskelesine yüklendiğinde elde edilen salım grafiği.	77
Şekil 4.16. 1:2 oranında seyreltilen ortamların MTT testleri sonucu elde edilen T98G üreme grafiği.	78
Şekil 4.17. Hemositometrik hücre sayımı sonucu elde edilen T98G üreme grafiği.	78
Şekil 4. 18. T98G hücrelerinin floresan boyanması: (a) 2. gün (10X), (b) 2. gün (20X), (c) 4. gün (10X), (d) 4. gün (20X), (e) 6. gün (10X), (f) 6. gün (20X).	81
Şekil 4. 19. Kristal viyole ile boyanan T98G hücreleri (a) 1. gün (10X), (b) 1. gün (40X), (c) 3. gün (10X), (d) 3. gün (40X), (e) 5. gün (10X), (f) 5. gün (40X).	82
Şekil 4.20. Hücre ortamına serbest halde eklenen farklı miktarlardaki Bevacizumab'ın hücre üremesi üzerindeki etkileri.	84
Şekil 4.21. Kitosan doku iskelelere enjekte edilen farklı miktarlardaki Bevacizumab'ın hücre üremesi üzerindeki etkileri.	84
Şekil 4.22. Boş kitosan, Bevacizumab, 5-FU yüklü ve 5-FU+Bevacizumab yüklü kitosan doku iskeleleriyle doğrudan etkileştirilen T98G hücrelerinin MTT sonuçları.	85
Şekil 4.23. Kitosan doku iskelelerindeki T98G hücrelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: a) boş kitosan doku iskelesi 5. gün (x4000), b) boş kitosan iskele 8. gün (2000x), c)0.025 mg Bevacizumab yüklü iskele 3. gün (x5700), d) 0.025 mg Bevacizumab yüklü iskele 3. gün (x750),	

e) 0.05 mg Bevacizumab yüklü iskele 3. gün (x3200),	
f) 0.025 mg Bevacizumab yüklü iskele 5. gün (x2500),	
g) 0.025 mg Bevacizumab yüklü iskele 3. gün (x2500),	
h) 0.025 mg Bevacizumab yüklü iskele 5. gün (x7500),	
ı) 5-FU yüklü iskele 8. gün(x1000) , i) 5-FU+Bevacizumab yüklü iskele 8. gün (x500).	87
Şekil 4.24. Kitosan doku iskelelerindeki T98G hücrelerinin farklı koşul ve günlerdeki CLSM görüntüleri: (a) boş kitosan doku iskelesi (8. gün), (b) Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelesi (8. gün), (c) 5-FU yüklü kitosan doku iskelesi (8. gün), (d) 5-FU ve Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelesi (8. gün), (e) boş kitosan doku iskelesi (15. gün), (b) Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelesi (15. gün).	89
Şekil 4.25. Kültürün 8. gününde kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki T98G hücre yoğunluklarını gösteren CLSM fotoğrafları.	89
Şekil 4.26. Kültürün 8. gününde Bevacizumab içeren kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki T98G hücre yoğunluklarını gösteren CLSM fotoğrafları.	90
Şekil 4.27. Kültürün 8. gününde 5-FU içeren kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki T98G hücre yoğunluklarını gösteren CLSM fotoğrafları.	90
Şekil 4.28. Kültürün 8. gününde 5-FU ve Bevacizumab içeren kitosan iskelelerinde farklı derinliklerdeki T98G hücre yoğunluklarını gösteren CLSM yoğunlukları.	91
Şekil 4.29. TCPS'te boş kitosan, 5-FU yüklü ve 5-FU+Bevacizumab yüklü kitosan doku iskeleleriyle dolaylı etkileştirilen T98G hücrelerinin MTT sonuçları.	92
Şekil 4.30. Kültür kabına ekilen T98G hücrelerinin doku iskeleleriyle dolaylı etkileşimlerini gösteren optik mikroskop görüntüleri (x20); a) TCPS 3. gün, b) TCPS 5. gün, c) boş kitosan 3. gün, d) boş kitosan 5. gün, e) kitosan+5-FU 3. gün, f) kitosan +5-FU 5. gün, g) kitosan + 5-FU + Bevacizumab 3. gün, h) kitosan + 5-FU + Bevacizumab 5. gün.	94
Şekil 4.31. 1:2 oranında seyreltilen ortamların MTT testleri sonucu elde	

edilen HUVEC üreme grafiği.	95
Şekil 4. 33. HUVEC'lerin floresan mikroskop görüntüleri (a) 2. gün (10X), (b) 2. gün (20X), (c) 4. gün (10X), (d) 4. gün (20X), (e) 6. gün (10X), (f) 6. gün (20X).	97
Şekil 4. 34. Kristal viyole ile boyanan HUVEC'ler: (a) 1. gün (10X), (b) 1. gün (40X), (c) 3. gün (10X), (d) 3. gün (40X), (e) 5. gün (5X), (f) 5. gün (40X).	99
Şekil 4.35. Hücre kültür ortamına serbest halde eklenen farklı miktarlardaki Bevacizumab'ın HUVEC üremesi üzerindeki etkileri.	100
Şekil 4.36. Kitosan doku iskelelerine enjekte edilen farklı miktarlardaki Bevacizumab'ın HUVEC üremesi üzerindeki etkileri.	100
Şekil 4.37. Boş, Bevacizumab yüklü, 5-FU yüklü ve 5-FU+Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelelerinde HUVEC MTT sonuçları.	101
Şekil 4.38. Kültürün 1. gününde kristal viyole ile boyanan HUVEC'ler (10X): (a) boş kitosan, (b) Bevacizumab içeren kitosan doku iskelesi, (c) 5-FU içeren kitosan doku iskelesi, (d) hem Bevacizumab hem de 5-FU içeren kitosan doku iskelesi.	102
Şekil 4.39. Kültürün 3. gününde kristal viyole ile boyanan HUVEC'ler (20X): (a) boş kitosan, (b) Bevacizumab içeren kitosan doku iskelesi, (c) 5-FU içeren kitosan doku iskelesi, (d) hem Bevacizumab hem de 5-FU içeren kitosan doku iskelesi.	103
Şekil 4.40. Kültürün 5. gününde kristal viyole ile boyanan HUVEC'ler (40X): (a) boş kitosan, (b) Bevacizumab içeren kitosan doku iskelesi, (c) 5-FU içeren kitosan doku iskelesi, (d) hem Bevacizumab hem de 5-FU içeren kitosan doku iskelesi.	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. WHO tarafından yapılan beyin tümörleri sınıflandırması (Vescovi et al., 2006).	10
Çizelge 4.1. Farklı bileşimlerdeki PLGA kopolimerlerinden üretilen boş (5-FU içermeyen) nanopartiküllerin boy ve boy dağılım değerleri. ...	63
Çizelge 4.2. Farklı bileşimlerdeki PLGA kopolimerlerinden üretilen 5-FU içeren nanopartiküllerin boy ve boy dağılım değerleri.	63

KISALTMALAR

5-FU	5-Florourasil
ACE	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CCM	Curcumine
CLSM	Konfokal Lazer Taramalı Mikroskobu
CVC	Kimyasal Buhar Çöktürme
DCM	Diklorometan
DD	Deasetilasyon Derecesi
DMAB	Didodesildimetilamonyumbromür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DPBS	Dulbecco's Fosfat Tampon Çözeltisi
ECM	Ekstraselüler Matris
Eto	Etilen Oksit Fırını
F-aktin	Filamentöz Aktinleri
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	Floresan 5(6) İzotiyosiyanat
FTIR	Fourier Transform Infrared
GBM	Glioblastoma Multiforme
gy	Gray
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
HUVSMC	Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cells
IGC	Asal Gaz Yoğuşturma
MTT	3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OSM	Oncostatin M
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PDI	Çoklu Dağılım Endeksi
PEG	Poli(etilen glikol)

PGA	Poli(glikolik asit)
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
RES	Retikuloendotelyal Hücreleri
RT	Radyoterapi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SSS	Santral Sinir Sistemi
TCPS	Polistiren Hücre Kültür Kapları
USP	Ultrasonik Sprey Piroiliz
USP	United States Pharmacopeia
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Tümör, kontrolsüz büyüyen çoğalan hücreler topluluğudur. Beyin tümörleri ise kaynağı genellikle beyin hücreleri olan ve nadir olarak vücudun diğer kısımlarına dağılan hücrelerden meydana gelir. Metastatik (veya ikincil) beyin tümörlerinin oluşmasına vücudun farklı bölgelerinde bulunan kanser hücreleri neden olur. Hastalıklı hücreler, kan dolaşımıyla taşınarak beyne ulaşır ve beyinde yayılır. Buna **metastaz** denir. Beyin tümörleri, çocukluk çağında en sık görülen solid tümör türüdür. Yapılan araştırmalar beyin tümörlerinin, çocuklarda gözlenen tüm kanser vakalarının %20'sini oluşturduğunu göstermektedir (Demirkaya and Sevinir, 2005).

Oluşum nedenleri tam olarak bilinmeyen beyin tümörleri, tümör kitlesi beyin fonksiyonları açısından kritik bir bölgede yer almadıkça cerrahi müdahale ile bölgeden uzaklaştırılmaktadır. Şayet tümör kitlesi kanser hücresi içeriyorsa, tümörün operasyon sonrası tekrar etme olasılığı yüksektir. Tümör oluşumunun tekrarlamasını engellemek amacıyla hastaya ameliyat sonrasında da kemoterapi verilmektedir. Bu aşamada karşılaşılan en büyük sorun klinikte kullanılan antikanser ilaçların yan etkileridir. Söz konusu zararlı yan etkileri en aza indirebilmek için antikanser ilaçların müdahale edilen bölge ile yakından temas etmesi ve sadece ilgili bölgede istenilen zaman ve dozda bulunması gerekmektedir.

“Kontrollü ilaç salımı” kavramını, etken maddenin bir sistem içerisinde istenilen sürede, belirlenmiş bir hızla ve gereken miktarda çıkacak şekilde tasarlandığı bir yöntem olarak tanımlamak mümkündür (Qiu and Park, 2001). Antikanser ilaçları tümör bölgesi ile kontrollü bir biçimde etkileştirebilmek için genellikle polimerik taşıyıcılar kullanılmaktadır. Tercih edilen doza ve salım süresine göre seçilen taşıyıcıların aynı zamanda vücutta herhangi bir toksik özellik göstermemesi gerekmektedir. Bu nedenle çalışmalarda kolay işlenebilen, toksik olmayan ve hatta vücut ile uyum içerisinde olan biyobozunur polimerler tercih edilmektedir.

Doku Mühendisliği; canlı hücrelerin, destek malzemeleri ve/veya biyolojik moleküllerin yardımıyla, biyolojik dokuları oluşturmalarıdır (Gümüşderelioğlu, 2010). Doku iskeleleri ise, hücrelere fiziksel destek sağlayarak hücre gelişmesi ve farklılaşmasının gerçekleşmesi, doku rejenerasyonunun sağlanması,

kematerapötik ajan taşınması v.b. amaçlarla doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılan malzemelerdir.

Sunulan tez çalışmasında biyobozunur bir polimer olan poli-laktik-ko-glikolik asitten (PLGA) nanopartiküller sentezlenmiş ve bu partiküllere üretim esnasında DNA sentez mekanizmasını inhibe eden bir antimetabolit olan 5-Florourasil (5-FU) yüklenmiştir. Üretilen nanopartiküller Zetasizer ve SEM (taramalı elektron mikroskobu) ile karakterize edilmiştir. İlaç yüklü partiküllerin tümör bölgesine lokal olarak yerleştirilebilmeleri ve operasyon sonrası bölgede doku oluşumuna destek sağlanması amacıyla nanopartiküller, biyobozunur bir polimer olan kitosandan üretilen doku iskelelerine yüklenmiştir. Nanopartiküllerin kitosan doku iskeleleri içerisindeki dağılımları floresan mikroskop ve SEM kullanılarak görüntülenmiştir. Cerrahi müdahalenin ardından yeni bir tümör oluşumunun engellenmesi amacıyla bir antivaskülaritif ajan olan Bevacizumab da nanopartikül içeren kitosan doku iskelelerine yüklenmiştir. Çalışmada kullanılan kitosan doku iskelelerinin 5-FU ve Bevacizumab için birer taşıyıcı vazifesi görmesi amaçlanmış, aynı zamanda ameliyat sonrası bölgede yer alan sağlıklı hücrelerin çoğalmasında mekanik destek sağlaması hedeflenmiştir. 5-FU ve Bevacizumab'ın beyin tümör hücreleri ve hücre organizasyonu üzerindeki etkilerini öngörebilmek amacıyla insan glioblastoma hücre hattı olan T98G ve endotel hücre hattı olan HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) model olarak seçilmiş ve ilaçların bu hücreler üzerindeki etkileri MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), SEM, CLSM (konfokal lazer taramalı mikroskobu), floresan ve optik mikroskop kullanılarak belirlenmiştir.

Kanser tedavisinde kullanılan 5-FU ve Bevacizumab'ın aynı sistem içerisinde yer aldığı ve kontrollü bir biçimde salındığı başka bir uygulamaya literatürde rastlanmamıştır. Aynı zamanda mevcut klinik uygulamalarda 5-FU ve Bevacizumab'ın oral ve/veya vasküler yolla hastaya verildiği ve buna bağlı olarak hastaların yüksek oranda yan etkiye maruz kaldıkları bilgisi göz önünde bulundurulduğunda, üretilen bu çift etkili sistemin lokal olarak uygulanmasının önemi ortaya çıkmaktadır. Yukarıda açıklanan nedenler çalışmanın özgün değerini ortaya koymaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, yapılan çalışmanın temelini oluşturan konular hakkında genel bir literatür bilgisi yer almaktadır. Öncelikle doku mühendisliğine kısa bir giriş yapılmıştır. Daha sonra tümörler ve özellikle beyin tümörleri hakkında bilgi verilmiş, ardından tümör tedavilerindeki doku mühendisliği yaklaşımlarından, kullanılan malzemelerden, bu malzemelerin üretim yöntemlerinden ve kullanım alanlarından bahsedilmiştir. Son kısımda ise tümör tedavilerinde kullanılan ilaçlar hakkında genel bilgi verilmiş ve ardından çalışmada kullanılan iki ilaç (5-Flourourasil ve Bevacizumab) ayrıntılı bir biçimde açıklanmıştır.

2.1. Doku Mühendisliği

Doku veya organ kayıplarında uygulanan en yaygın tedavi, organ/doku naklidir. Ancak her zaman nakil işlemi için yeterli donör bulunamaz. Bu sorunu aşmak için, işlevini yitiren doku/organların yenilenebilmesi veya ikame bir ürünle değiştirilebilmesi amacıyla Teflon® ve silikon gibi yapay malzemeler kullanılmaya başlanmıştır. Her ne kadar kullanılacak yapay bir malzeme ile organların işlevsel bir biçimde yenilenebilmesi tam anlamıyla mümkün olmasa da araştırmacılar 1960'lı yıllarda bu konudaki çalışmalara hız vermiş ve ortaya **Doku Mühendisliği** denilen, malzeme bilimi ile hücre biyolojisini birleştiren yeni bir çalışma alanı çıkmıştır (Nomi et al., 2002).

Doku mühendisliği, normal ve patolojik memeli dokuları arasındaki yapı/fonksiyon ilişkisinin kavranması ve biyolojik birimlerin onarımı, korunması veya fonksiyonlarının geliştirilmesini amaçlar. Kısaca doku mühendisliği tüm mühendislik metod ve uygulama prensiplerini yaşam bilimlerinde buluşturan bir alandır (Nerem,1992).

Doku mühendisliğinin en çok kabul gören tanımı ise şöyledir: Doku mühendisliği; biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerinin tek başlarına veya birlikte kullanılarak canlı dokuların tamiri veya yeniden yapılanması için biyoloji, kimya ve mühendislik ilkelerinin uygulanmasıdır (Gümüşderelioğlu et al., 2007).

Geleneksel tedavi yöntemlerine bir alternatif sunan doku mühendisliği yaklaşımları dört ana başlık altında toplanmıştır. İlk yaklaşımda hasarlı bölgeye sadece

biyomalzeme yerleştirilerek tedavi amaçlanmıştır. İkinci yaklaşımda ise ya hastadan izole edilip in vitro ortamda çoğaltılan hücrelerin tekrar hastaya verilmesi yoluyla, ya da genetik olarak işlem görmüş hücrelerin hasarlı bölgeye yerleştirilmesiyle sağlıklı doku oluşumu hedeflenmiştir. Üçüncü yaklaşımda hücrelerin yapışma ve farklılaşma gibi eğilimlerini arttıran biyosinyal molekülleri ile biyomalzemelerin birlikte kullanımı sayesinde hasarlı bölgenin tedavi edilmesi öngörülmüştür. Son zamanlarda en çok üzerinde durulan dördüncü yaklaşımda ise hücre, biyomalzeme ve biyosinyal moleküllerinin bir arada kullanımı ile hasarlı dokunun yeniden yapılması amaçlanmaktadır. Ayrıca bu üç parametreyi aynı anda **biyoreaktör** adı verilen ve canlı doku mikroçevresinde bulunan mekanik kuvvetleri taklit edebilen ortamlarla birleştirerek yapılan çalışmalarda, diğer yaklaşımlara nazaran daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

Yukarıda yer alan yaklaşımlar kullanılarak geliştirilen çeşitli doku mühendisliği ürünleri, deri dokusu, kıkırdak dokusu ve kemik dokusu hasarları ile kalp damar hastalıkları ve merkezi ve çevresel sinir sistemi tedavisinde kullanılmaktadır (Gümüşderelioğlu, 2010).

Doku mühendisliği, klinikte birçok alanda olduğu gibi tümör tedavisinde de uygulama potansiyeline sahiptir. Piyasada küçük çaplı kemik tümör tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş ticari ürünlerin yer alması bu potansiyelin bir göstergesidir. Bir yandan yeni malzemelerin ve görüntüleme tekniklerinin kullanılmasıyla doku hasarına uygun şekilde ve akıllı doku iskeleleri üretilmesi, diğer yandan da doku iskelelerinde hücresel işlevlerin ve farklılaşmanın kontrolü konusundaki bilgilerin netlik kazanması, tümör tedavilerinde doku mühendisliği uygulamalarının daha geniş yer bulacağına sinyalini vermektedir.

2.2. Tümör Tedavilerinde Doku Mühendisliği

Tümör tedavilerinde en sık başvurulan yöntem, cerrahi müdahale ile tümör dokusunun bulunduğu bölgeden alınmasıdır. Ancak her zaman çıkarılan dokunun yerine aynı görevi görebilecek bir implant yerleştirmek mümkün değildir. Bunun nedeni olarak hem donör sıkıntısı, hem yaşlanan dünya popülasyonu, hem de bağışıklık sistemi gibi birkaç ana başlık sıralanabilir (Hipp and Atala, 2004). Hastaya ait sağlıklı hücrelerin in vitro ortamda çoğaltılıp belli bir aşamaya

gelindikten sonra tekrar hastaya aktarılmasını öngören doku mühendisliği yaklaşımı yukarıda belirtilen problemlerin üstesinden gelmeyi vaad eden önemli bir alternatiftir. Bu nedenle tümör tedavisinde; hücre transplantasyonunun, malzeme biliminin ve biyomühendisliğin de içerisinde yer aldığı doku mühendisliği yaklaşımlarının kullanıldığı araştırmalar hız kazanmıştır (Godbey and Atala, 2002).

Yeniden üretilen büyük, karmaşık dokularda ve olası organlarda damar oluşumu, doku mühendisliği açısından aşılması gereken en önemli engeldir (Mooney and Mikos, 1999). Nomi ve arkadaşlarının da belirttiği gibi, çevre dokulardaki kan damarlarından tümörlü dokuya doğru bir damarlanma gerçekleşmedikçe, tümörler birkaç milimetreden fazla büyüyemezler (Nomi et al., 2002). Bu nedenle tümör tedavileri ile ilgili yapılan yeni çalışmalarda amaç sadece tümör dokusunu yok etmek değil aynı zamanda tümör dokusu etrafındaki damar oluşumunun da önüne geçmektir.

Beyin tümör tedavi yöntemleri göz önüne alındığında, mevcut olan geleneksel cerrahi, radyoterapi (RT) ve kemoterapi dışında bir yöntem geliştirmenin gerekliliği ve aciliyeti öne çıkmaktadır. Bu nedendir ki beyin tümörleri üzerindeki araştırmalar daha çok moleküler ve hücrenel olarak tümör kitlesi üzerine odaklanmıştır (Singh et al., 2003).

Nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların farmakolojik tedavisindeki en önemli zorluklardan biri, terapötik amaçla kullanılan aktif maddelerin beyne taşınması ve özellikle hedeflenen belirli bir bölgeye ulaştırılıp sabit bir hızla salımının sağlanmasıdır. Bu sorunun ortaya çıkmasında ve çoğu maddenin geçişinin engellenmesinde rol oynayan en önemli faktör ise kan-beyin engelidir. Santral sinir sistemi (SSS) hastalıklarının tedavisine yönelik olarak geliştirilen terapötik stratejiler, kan-beyin engelinin endotel hücrelerindeki sıkı kavşakların varlığından dolayı çok etkin olamamaktadır. Günümüzde Parkinson, Alzheimer ve beyin tümörleri gibi pek çok SSS hastalığının tedavisinde, kan-beyin engelinin aşılabilmesi için, nanopartiküller gibi polimerik ve vücutla uyumlu aktif madde taşıyıcı sistemlerin kullanılabilirliği yoğun bir şekilde araştırılmaktadır.

2.2.1. Tümörlerin yapısı ve özellikleri

Kanser, hücrelerin sürekli olarak birikmesi ile karakterize edilen bir düzen bozukluğudur. Bu durum, sürekli çoğalarak aşırı miktarda artan hücre sayısının, normal olarak gerçekleşen uygun miktarda hücre kaybıyla dengelenememesi sonucu ortaya çıkar. Bu hücreler invazyon yaparlar ve organizmanın organlarını hasara uğrattırır. Tümör hücreleri kaynaklandıkları normal hücrelere göre daha kısa zamanda ölmelerine rağmen yeni hücre oluşumu o kadar hızlıdır ki, sonuçta hücreler devamlı birikir. Bu dengesizlik (aşırı hücre birikimi), hem tümör hücrelerindeki genetik anormalliklerden hem de organizmanın bu hücreleri tanımada ve yok etmedeki başarısızlığından kaynaklanmaktadır. Klonal orijin, immortalite, genetik kararsızlık, kontakt inhibisyonun ve substrata tutunarak büyüme özelliklerinin kaybı, proliferasyonun büyüme faktörlerinden ve besinlerden bağımsız olarak devamlı artışı ve metastaz yapabilme özellikleri, tümör hücrelerinin sahip oldukları benzersiz özelliklerdir (Casciato and Lowitz, 2009).

Tümörlerin girintili çıkıntılı bölmeleri çoğunlukla bir kollajen ve elastik fiber ağından oluşmuştur. Hidrofilik jeli oluşturan makromolekül bileşenleri (hiyaluronat ve proteoglikanlar) ve girinti çıkıntıları dolduran sıvı, bu çapraz bağlı yapı içinde dağılmaktadır (Brigger et al., 2002).

Solid tümörlerden oluşan kanserlerin %85'inden fazlası ölümle sonuçlanır (Jain, 2005). Bir solid tümör sadece malin hücre yığından oluşmayan, tümör hücrelerinin yanı sıra normal hücreleri de içeren organize bir yapıdır. Tümörlü dokudaki normal hücreler; fibroblastlar, bağışıklık sistem hücreleri ve kan damarlarındaki endotel hücrelerinden oluşur. Tümörlerin organizasyon yapısını anlamak için önemli bir yol tümör hücrelerinin terapötik ajan geçirgenliklerini incelemektir. Şayet terapötikler, tümör hücrelerine doğrudan geçiş yapabilirlerse, terapötik etkinin hem daha kolay gözleneceği hem de terapötik ajanların malin tümör hücrelerine ulaşana kadar geçtikleri normal hücre tabakalarına zarar vermeyeceği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca ekstraselüler matris (ECM) varlığında terapötiklerin tümör hücrelerine ulaşımı incelendiğinde; ECM proteinlerinin hücreler arası boşlukları doldurmasının, terapötik ajanların tümör hücrelerine taşınmasını engellediği görülmektedir (Kuppen et al., 2001). Tümörler ve stroma hücreleri çoğalıp; kollajen matrisiyle, proteoglikanlarla ve diğer moleküllerle

birleşerek tümör ECM'sini oluşturur ve bu matris, makromoleküllerin taşınması için bir engel teşkil eder. Kansere tedavilerinde kullanılması amaçlanan gen ve immün tedavilerinin de önündeki en büyük engel, yüksek molekül ağırlıklı kemoterapötik ajanları tümörlü hücrelere ulaştıramamaktır (Netti et al., 2000).

Solid tümörlerin devamlı olarak büyümeleri, bu tümörlerin yeni damar oluşumunu uyarma yeteneği ile ilişkilidir. Çünkü bu damarlar tümör hücrelerine oksijen ve esansiyel yapısal elementleri taşırlar (Mooney and Mikos, 1999). Fizyolojik durumlarda yeni damar oluşumu güçlü bir şekilde önlenmektedir. Onkojen aktivasyonu ve tümör baskılama gen kaybı ile solid tümörlerdeki normal baskılama ortadan kalkmaktadır. Anjiyogenik fenotip, anjiyogenez düzenleyen negatif ve pozitif düzenleyiciler arasındaki dengenin değişmesi ile ortaya çıktığından, anjiyogenez sırasında tümör hücrelerinin çok miktarda anjiyogenik faktör salgıladıkları kabul edilmektedir (Baykal and Gök, 2000).

Anjiyogenez, daha önce var olan damarlardan yeni damarların oluşması anlamına gelir ve embriyogenez, endometrial proliferasyon ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik olayların yanı sıra diyabetik retinopati örneğinde olduğu gibi retinal neovaskülarizasyonda, hemanjiom, psöriaz, artrit gibi selim hadiselerde, tümörün büyümesinde ve metastaz yapmasında rol alır (Erguvan-Önal et al., 2008).

Tüm tümör tiplerinin büyüyüp yayılmaları anjiyogeneze bağlıdır. Kan damarlarının büyüyüp yayılmasını engellemek, tümörlerin çoğalmasını ve metastazlarını da engellemek anlamına gelir. Ek olarak; embriyonik gelişim, üreme döngüleri ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik koşullar da anjiyogeneze bağlı olarak gelişir. Ulusal Kansere Enstitüsü tarafından şimdiye kadar 20'den fazla anjiyogenez inhibitörü tanımlanmıştır. Tanımlanan bu anjiyogenez inhibitörleri hayvanlarda antitümör etkeni olarak rol oynamaktadır ve bu inhibitörler tedavi sırasında hem hayvanlara hem de hastalara sistemik enjeksiyon yoluyla verilmektedir (Brakenhielm et al., 2001).

Bazı tümörlerde anjiyogenezin yalnızca tümör gelişiminde değil, tümör hücrelerinin dolaşıma karışması ve metastaz yapmasında da rol oynadığı düşünülmektedir. Tümör bölgesinde damarların artmasıyla tümör hücrelerinin dolaşıma girmesi

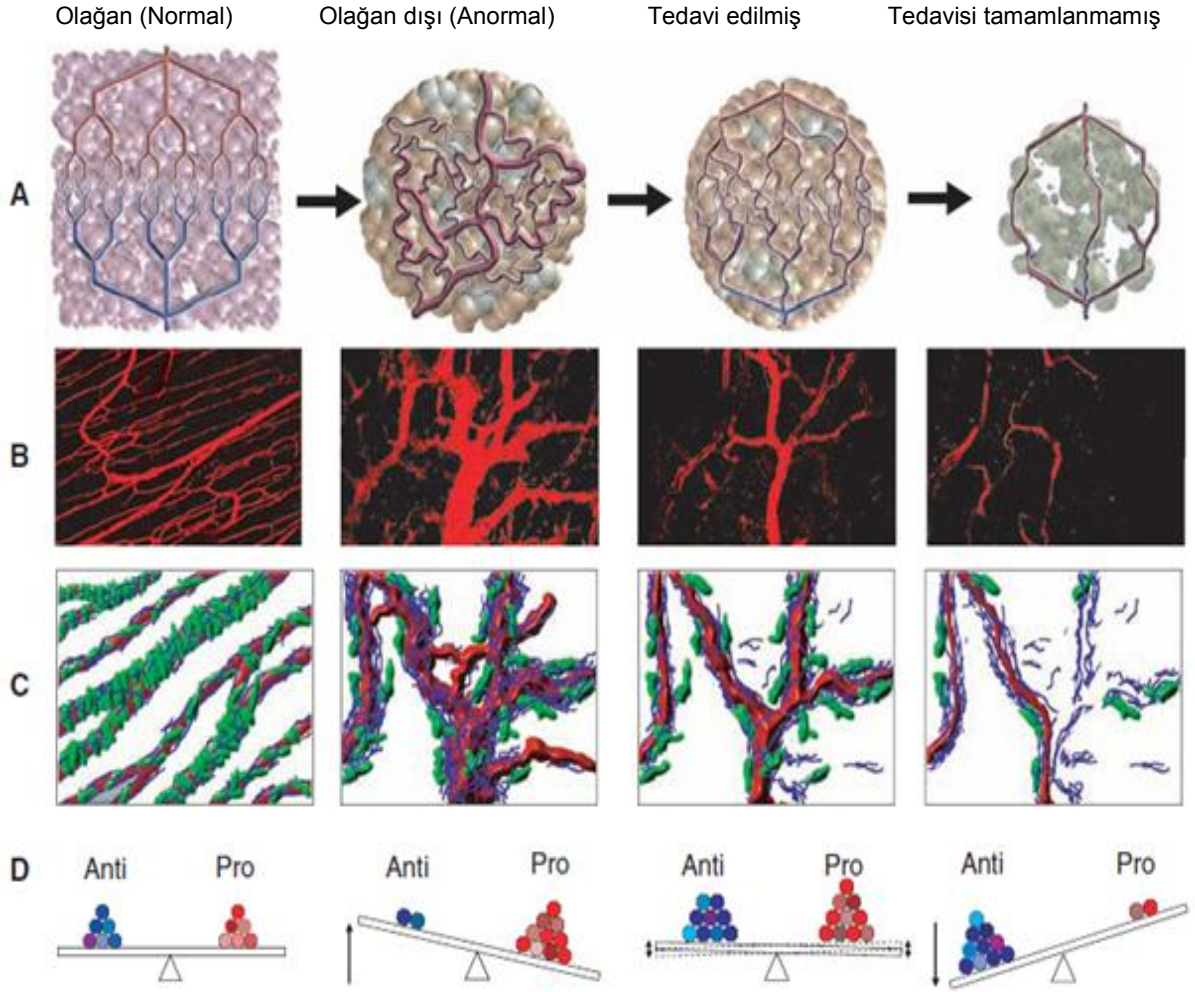
kolaylaşır. Ayrıca, yeni oluşan kılcal damarların bazal membranlarının parçalanması da bu bölgelerden tümör hücrelerinin daha fazla penetre olmasını sağlar. Tüm bu nedenlerle yeni anti-kanser tedavilerinde anjiyogenik olay hedeflenmektedir (Erguvan-Önal et al., 2008).

Jain (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, tümör dokularındaki anjiyogenezin önüne geçebilmek amacıyla öncelikle tümör dokusundaki damarlaşmanın nasıl engellenebileceği araştırılmış, sonrasında ise Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sinyalizasyonunu engellemenin tümör dokusundaki damarlaşmayı normalize edip edemeyeceğine bakılmıştır (Şekil 2.1).

2.2.1.1. Beyin tümörleri

Beyin tümörleri oluşum nedenleri bilinmeyen, bulaşıcı olmayan, en çok 3-12 ve 40-70 yaş grubunda görülen, sınırsız büyüyüp, çoğalabilen hücre topluluğudur (Koo et al., 2006). İyi huylu (benin) ve kötü huylu (malin) olmak üzere iki tipi vardır. Benin beyin tümörleri kanser hücresi içermez, genellikle sınırları düzgündür, beynin diğer alanlarına baskı yapmaz ve belirti vermezler. Bu tümörler genellikle ameliyatla ortadan kaldırılırlar ve tekrarlamazlar. Malin beyin tümörleri ise kanser hücresi içerirler. Beyinde yaşamsal önemi olan hücreleri etkiler ve yaşamı tehdit ederler. Malin beyin tümörleri hızlı büyür, çevre dokulara ilerler ve bir ağaç gibi kök salarak beynin sağlıklı dokularını tahrip ederler (Singh et al., 2003).

Nörositom, meningiom, kolloid kist, koroid pleksus papilloma ve karsinoma, ependimom, subependimal dev hücre astrositom, subependimal pilositik astrositom, oligodendrogliom, metastaz, şivannom, jerminom, gangliositom ve malin astrositom kafatası içindeki ventriküler sistemde yer alan tümör çeşitleridir (Lee and Manzano, 1997). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından hazırlanan beyin tümörleri sınıflandırması Çizelge 2.1'de yer almaktadır (Vescovi et al., 2006).



Şekil 2.1. Tümörlerdeki damar oluşumunun antianjiyogenik tedaviye cevabı (A) Tümörlerde yapısal ve fonksiyonel olarak anormal damar oluşumu. Antianjiyogenik terapide öncelikli amaç, tümörleri besleyen damarları yapısal ve fonksiyonel olarak güçlendirmektir. Daha sonra yönlendirilmiş veya agresif antianjiyogenik rejimler uygulanarak sayıları artmakta olan kan damarlarına zarar verilir. (B) VEGFR2 inhibitörü ile indüklenen damar normalizasyon dinamiği. Solda iskelet kasındaki normal kan damarlarının iki-foton görüntüsü yer almaktadır. Yanındaki fotoğraflarda ise kolon kanserli bir farenin VEGFR2'ye özgül antikor muamelesi yapıldıktan sonraki 0., 3. ve 5. gün görüntüleri yer almaktadır. (C) Damar normalizasyonu sırasında bazal membran (mavi) ile sarılmış perisitlerin (kırmızı) değişim diyagramı. (D) Dokularda yer alan pro- ve antianjiyogenik faktörlerin, damar oluşumunda ne kadar etkili olduklarının bir kaldıraç sisteminde ağırlıkla ilişkilendirilerek şematize edilmesi (Jain, 2005).

Çizelge 2.1. WHO tarafından yapılan beyin tümörleri sınıflandırması.

Astrositler	<ul style="list-style-type: none">• Diffuse astrositoma (grade II)• Anaplastik astrositoma (grade III)• Glioblastoma (grade IV)
Oligodendrogial tümörler	<ul style="list-style-type: none">• Oligodendroglioma
Karma gliomalar	<ul style="list-style-type: none">• Oligoastrositoma
Ependimal tümörler	<ul style="list-style-type: none">• Ependimoma
Nöronal ve karma tümörler	<ul style="list-style-type: none">• Gangliositoma
Nöronal/glial tümörler	<ul style="list-style-type: none">• Disembriyoplastik nöroepitel tümör• Ganglioglioma
Embriyonal tümörler	<ul style="list-style-type: none">• Medulloepitelioma• Ependimoblastoma• Nöroblastoma
Primitif nöroektodermal tümörler	<ul style="list-style-type: none">• Medulloblastoma

Lezyonlar genellikle; kolloid kist, meningiom, subependimal dev hücre astrositom ve koroid pleksus papillomanın da bulunduğu üçüncü ventrikülde yer alırlar. En sık görülen (%25) beyin tümörü olan glioblastomlar, en az farklılaşmış ve en agresif tümör çeşitleri olmalarına rağmen, intraventriküler tümörler arasında oldukça az bulunurlar (Lee and Manzano, 1997). Yerleşim yerlerine ve büyüklüklerine göre değişik semptomlar verirler. Çoğunluğu hemisferik yerleşimli olduğundan genellikle epilepsi nöbeti, disfazi ve hemiparezi sendromlarıyla karşımıza çıkabildikleri gibi tümörün çok büyük olması ya da beyin omurilik sıvısının dolaşımını engellemesi durumunda artmış kafa içi basıncına bağlı olarak baş ağrısı, bulantı, kusma, papil ödemi ve bulanık görme gibi belirtiler de verebilirler (Hakan et al., 2005).

İntrakraniyal (kafatası içerisinde yer alan) tümörlerin % 40-45'ini oluşturan glial tümörlerin mortalite ve morbiditesi yüksektir. Beyin tümörlerinin klinik gidişi kişinin savunma sistemi, lezyonun konumu, proliferasyon kapasitesi, infiltrasyonu ve tedaviye direnci gibi pek çok etmene bağlıdır. Histolojik faktörlerin iyileşmedeki (prognoz) etkisi belirgin değildir. Tümörün histolojik derecesinin ve proliferasyon

kapasitesinin glioma prognozunda önemli olduğu kabul edilmektedir (Erguvan et al., 2008).

Beyin tümörü tedavi yöntemleri

Beyin tümörlerinin tedavisi, ilerleyen tıp bilimi ve tedavileri destekleyici alternatif yöntemlere rağmen oldukça zordur (Singh et al., 2003). Çocukluk çağı beyin tümörlerinde cerrahi ve RT standart tedavi yaklaşımlarıdır. Tümör dokusu tam olarak çıkarılamazsa RT ve kemoterapinin yararı azalmaktadır.

Histolojik tanıyı koymak ve tümör kitlesini küçültmek için tedavinin ilk basamağı cerrahidir. Cerrahinin amaçları intrakraniyal basıncın azaltılması, tümör basısına bağlı diğer nörolojik kusurların giderilmesi, doku tanısının sağlanması ve tümörün tamamının, mümkün olduğu oranda, çıkarılmasıdır.

Cerrahi yanında radyoterapi uygulanmasının hastaların yaşam sürelerini uzattığı gösterilmiştir. Spinal kord boyunca yayılma eğilimi yüksek olan tümörlerde, kraniyal ışınlamaya ek olarak spinal kord ışınlaması standart tedavilerde kullanılmaktadır. Geniş alan ışınlamasının entellektüel, gelişimsel ve endokrin bozuklukları içeren geç şekilleri çok belirgindir. Bu nedenle çevre dokuların radyasyondan etkilenmesini en aza indirmek amaçlanır. Geç etkilerin en önemlileri entellektüel kötüleşme, endokrinopati ve lökoensefalopatidir. RT sırasında hastanın yaşının küçük olması en önemli risk faktörlerinden biridir. Bu nedenle küçük yaş grubunda (özellikle ilk üç yaşta) radyoterapinin mümkün olduğunca verilmemesi veya cerrahi ve kemoterapiden sonraya ertelenmesi uygun görülmektedir.

Beyin gelişiminin hızlı olduğu 3 yaş altındaki çocuklarda RT yerine kemoterapi kullanımı ile RT'nin geç etkilerinden korunma amaçlanmaktadır. Kan-beyin engeli birçok maddenin SSS'ye ulaşmasını etkilemektedir. Fakat tümör varlığında bu engel bozulmakta ve ilaçların tümör dokusuna ulaşması kolaylaşmaktadır. SSS tümörlerinin kemoterapiye cevap oranındaki ilerlemelerle birlikte birçok çalışmada yüksek doz kemoterapi uygulanmıştır. İlaç penetrasyonunu artırmak için uygulanan diğer bir girişim, bölgesel (karotid arter) infüzyonlardır. İlaçların küçük dozlarda sistemik toksisiteyi de azaltarak tümör dokusuna daha fazla verilmesi

amaçlanmıştır. İntratekal veya intraventriküler kemoterapi, bölgesel tedavi olarak düşünülebilir. Ancak verilen tedavinin beyin omurilik sıvısından (BOS), beyin parankimine geçişinin sınırlı olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. İmmunoterapi, kullanılan diğer bir tedavi yöntemidir. İnterferonun insan gliom hücrelerinin büyümesini engellediği ve sitotoksik cevap oluşturduğu gösterilmiştir. Tedavide endokrinolojik ve nörolojik geç yan etkiler uzun süreli sağ kalımda karşılaşılan sorunlardır (Demirkaya and Sevinir, 2005).

2.2.1.2. Tümör hücreleri ve hücre hatları

Tümör oluşumunun, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu sonucu gerçekleştiği ilk olarak 1970'lerin başlarında Alfred G. Knudson tarafından belirtilmiştir (Knudson, 1971).

Bir tümör kitlesi içerisinde bulunan polimorf serebral gliomlar (glioblastoma multiforme (GBM)), morfolojik olarak çeşitlilik gösteren hücrelerden oluşmuştur. Geliştirilen yeni tedavi yöntemlerine rağmen GBM'lerin hastalığa ve ölüme neden olma oranları oldukça yüksektir. GBM içerisinde yer alan çeşitli hücrelerin tümör oluşumunda farklı rolleri vardır. Bu durum kanserin oluşumunun ve ilerlemesinin kök hücrelerden kaynakladığını göstermektedir. Lösemi ve akciğer kanseri üzerinde yapılan araştırmalarda tümör kitlesi içerisinde bulunan küçük bir grup hücrenin tümör oluşumundan ve büyümesinden sorumlu olduğu sonucuna varılmıştır (Yuan et al., 2004).

2010 yılı itibariyle Riken Biyokaynak Merkezi'nde 227 tane (<http://www2.brc.riken.jp>), Amerikan Kültür Koleksiyonu'nda (ATCC) 1100 tane (<http://www.atcc.org>), Avrupa Kültür Koleksiyonu'nda 59 tane (<http://www.hpacultures.org.uk>), Alman Mikroorganizma ve Hücre Kültürü Koleksiyonu'nda (DSMZ) 162 tane (<http://www.dsmz.de>), Coriell Hücre Depo'sunda 61 tane (<http://ccr.coriell.org>) ve Japon Biyokaynak Araştırma Koleksiyonu'nda (JCRB) 323 tane (<http://cellbank.nibio.go.jp>) farklı türlerden elde edilen tümör hücre hattı bulunmaktadır.

Kanser kök hücreleri hipotezine göre neoplastik klonlar, sadece kök hücre özellikleri gösteren ender bir hücre grubu tarafından oluşturulurlar. Bu hipotezden

hareketle yapılan son dönem çalışmalarında insan beyin tümörlerinden kök hücre özelliği gösteren CD133 isimli bir hücre altpopulasyonu *in vitro* koşullarda izole edilmiştir (Singh et al., 2004).

Gliyal orijinli insan beyin tümörü hücrelerinde EGF reseptör geninin ekspresyonuna bakılan çalışmada tümör hücresi olarak GM1, GM2(6), GM3, GM4, GM5, GM6, GM7(20), GM8, GM9 ve GM10 gibi glioblastoma hücrelerinin yanı sıra; CGM1(10) ve CGM2 gibi serebellar glioblastomalar; ACII1(2) ve ACII2 gibi ikinci dereceden astrositomalar, ODG1, ODG2, ODG3 gibi oligodendrogliomalar; MEN1, MEN2 ve MEN3 gibi meningiomalar ve primitif nöroektodermal tümör hücreleri de kullanılmıştır (Liebermann et al., 1985).

Basu ve arkadaşları tarafından, yedi farklı insan beyin tümörü hücre hattında bir poliamin analogu olan 1,19-bis-(etilamin)-5,10,15-triazanonadekan (BE-4-4-4-4)'nin DNA ile etkileşimi incelenmiş aynı zamanda bu analogun büyüme ve yaşam döngüsü içerisindeki etkisine bakılmıştır. Bu çalışmanın *in vitro* basamağında U-87 MG, U-251 MG, SF-126, SF-188, SF-763, SF-767 ve DAOY insan beyin tümör hücre hatları kullanılmıştır. Çalışmanın sonunda poliamin analoglarına en fazla duyarlılığı olan hücrelerin DAOY ve SF-767 hücre hatlarına ait olduğu görülmüş ve DNA affinitesi yüksek olan bu poliamin analoglarının hücre büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir (Basu et al., 1993).

Tıpkı diğer ergin kök hücreleri gibi, nöral kök hücreler veya progenitör hücreleri de, kötü huylu tümör transformasyonu için ciddi bir alternatif olarak göz önünde bulundurulur. Bu varsayımın temel dayanağı, sağlıklı nöral hücre oluşumunu düzenleyen birçok moleküler tanımlayıcının aynı zamanda tümör hücresi oluşumunda da rol oynamasıdır. Beyin tümörü kök hücreleri, yeni hücre oluşumu konusunda diğer kök hücrelerin sahip oldukları tüm özelliklere sahiptirler. Bu hücrelerden özellikle glioblastomanın çoklu formu ve medullablastomalar beyin tümörlerinin birçok farklı bölgesinden izole edilebilirler (Vescovi et al., 2006).

Sunulan tez çalışmasında beyin tümör hücresi olarak T98G insan glioblastoma hücre hattı ve damarlanma çalışmaları için HUVEC (Human Umbilical Vein

Endothelial Cell) kullanılmıştır. Bu nedenle aşağıda T98G hücre hattı ve HUVEC ile ilgili ayrıntılı bilgi yer almaktadır.

T98G hücre hattı

T98 ve T98G, insan glioblastoma multiform tümörlerinden izole edilmiş birbirine bağlı iki hücre hattıdır (Stein, 1979). T98G hücrelerinin çoğalma sırasında kaydedilen görüntüleri, normal ve transforme hücrelere ait görüntülerin bir kombinasyonu gibi olmasına rağmen; durgun koşullarda G1 fazındaki hücre görüntüleri incelendiğinde, görüntüler normal hücre görüntülerine benzemektedir. Bu durum, hücreler yüzeyden bağımsız transforme karakteristiklerini ve ölümsüzlük özelliklerini gösterene kadar devam etmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda, T98G gibi transforme hücre hatlarının, transformasyon sonucu ortaya çıkan biyokimyasal değişimlerin anlaşılması amacıyla kullanılabileceği öngörülmektedir.

Stein'in (1979) yaptığı karakterizasyon çalışmalarında, T98 ve T98G hücrelerinin pasajlama oranının bir haftalık periyotta 1:4-1:8 oranında değişebileceği, ikilenme süresinin 26 ± 2 saat olduğu ve yüksek yoğunluklu kültürasyonlarda T98 ile T98G hücrelerinin birbirlerinden farklı davranış gösterdikleri belirtilmiştir. T98G hücreleri kültür kabında belli bir sayıya ulaşmış, durağan faza geçene kadar çoğalmaya devam ederken, T98 hücrelerinde ortamdaki hücre konsantrasyonu belli bir değerin üstüne çıkarsa bile DNA sentezinin devam ettiği görülmüştür. Aynı zamanda durağan faza geçen T98G hücrelerinde, DNA sentezinin hücre kolonilerinin merkezinde tamamen durduğu gözlenirse de T98 hücrelerinde DNA sentezinin koloni merkezinde kısmen durduğu gözlenmiştir.

Kanser hücrelerinde çoğalmayı ve farklılaşmayı inhibe eden bir reseptör olan 'peroxisome proliferator-activated receptor' (PPAR)- γ 'nın ciglitazone ligandının aktivasyonuna bakılan bir çalışmada T98G, U-87 MG, A172 ve U-118 MG glioblastoma hücre hatları kullanılmıştır. Çalışma sonunda p27Kip1 ve p21Waf1/Cip1'in artan ekspresyonuna bağlı olarak ortaya çıkan ciglitazone'un T98G hücre hattında apoptozu indüklediği sonucu elde edilmiştir. Sonuç olarak; ciglitazone'ların T98G gibi glioblastoma hücre hatlarında apoptoz indüklenmesini

kontrol altına almasının, merkezi sinir sistemi neoplazmaları için yeni bir tedavi alternatifi olabileceği ifade edilmiştir (Strakova et al., 2004).

Curcuma longa bitkisinin rizomlarında (kök kısmında) bulunan ve fenolik bir bileşik olan Curcumine'nin (CCM) glioblastomalar üzerindeki terapötik etkisi henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. CCM'nin apoptozu nasıl indüklediğini ve sahip olduğu proteolitik mekanizmaları açıklayabilmek için T98G hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada, CCM dozu arttıkça hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir (Karmakar et al., 2006). Yapılan analizler sonrası elde edilen bulgular, CCM ile indüklenen hem reseptör aracılı hem de mitokondri aracılı proteolitik mekanizmaların T98G hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermektedir.

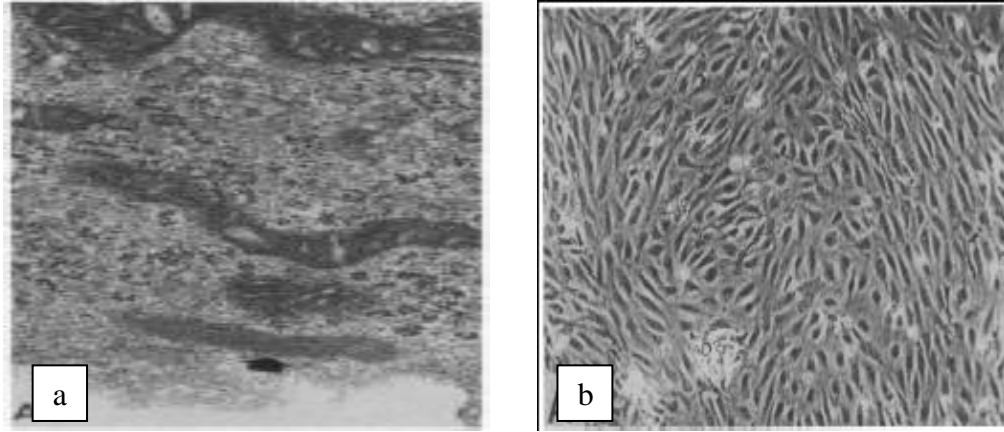
HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)

Vasküler sistem, kalbin çeşitli organ ve dokularla iletişimini sağlayan, aynı zamanda dokuların fizyolojik ve patolojik değişikliklere karşı homeostatik dengelerini korumalarında görev alan karmaşık bir ağıdır. Kan ve lenf damarlarının iç yüzeyinde yer alan endotel hücreler, damarlanmanın gelişmesi ve tekrar oluşmasında, damar niteliğinin korunmasında, kan akışkanlığında, koagülasyonda, besin alışverişinde ve organ gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Chi et al., 2003).

Endotel hücreleri, fizyolojik fibrinolizin, kan damarı geçirgenliğinin, kan damarlarının farklı fizyolojik ve patolojik uyarılara verdikleri cevapların ve tümör damarlanmasının incelendiği çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadırlar (Takahashi et al., 1990). HUVEC'ler de uzun zamandan beri damar oluşumu çalışmalarında kullanılan, birçok alt hatları (subline) bulunan, göç edip farklılaşabilen ve göbek kordonundan elde edilen bir endotel hücre hattıdır. Aynı zamanda epiteliyal nitrik oksit sentetaz (eNOS), HSP 90, cav-1 ve -2, cPLA2, COX-1 ve -2 içeren damar genişleticiler için gerekli olan anahtar proteinler de HUVEC'lerde eksprese edilmektedir (Gifford et al., 2004).

Takahashi ve arkadaşlarının 1990 yılında yayınlanan çalışmalarında HUVEC'lerin %20 serum içeren ortamda ikilenme süresi 89,3 saat olarak belirtilmiştir (Takahashi et al., 1990). Aynı süre Ne`gre-Aminou ve arkadaşlarının çalışmalarında 1- 1,8 gün; Hla ve Maciag'ın çalışmasında ise 48 saat olarak

belirlenmiştir (Ne`gre-Aminou et al., 1997; Hla and Maciag, 1991). Şekil 2.2.a'daki elektron mikroskobu görüntülerinde görüldüğü gibi, HUVEC'ler bol miktarda mikrofilamente sahipken, az sayıda orta boy filament içerirler. Ayrıca HUVEC'lerin hücre membranı yakınlığında çok sayıda pinositik kese ve vezikül yer alırken, sitoplazmalarında Weibel-Palade cisimcikleri bulunmaktadır. Aynı zamanda monolayer olarak kültüre edilen HUVEC'lerin primer kültüründe hücrelerin içsi bir morfolojiye sahip oldukları elde edilen ışık mikroskobu görüntülerinden anlaşılmaktadır (Şekil 2.2.b).



Şekil 2.2. Monolayer morfoloji gösteren HUVEC primer kültürünün mikroskobik görüntüsü a) elektron mikroskobu, b) ışık mikroskobu.

HUVEC'lerin, renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminde önemli rolleri olan ve inhibitörleri klinikte tedavi amaçlı kullanılan, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) oranı, bir başka endotel hücresi olan ECV304 ile kıyaslandığında, HUVEC'lerdeki enzim miktarının daha yüksek olduğu kanıtlanmıştır (Takahashi et al., 1990).

Dokularda damar oluşumunu ve yapısını aydınlatmak için HUVEC'ler ve HUUSMC'ler (human umbilical vein smooth muscle cells) biyolojik lazer işaretleme (BioLP) kullanılarak işaretlenmiş ve bu hücrelerin kök/dal yapısı taklit edilmiştir. Yapının doğal dokulardaki damar ağına çok benzediği aynı zamanda kök ve dallarından yeni hücrelerin oluşmasına da izin verdiği gözlenmiştir (Wu and Ringeisen, 2010).

2.3. Tümör Tedavilerinde Kullanım Potansiyeline Sahip Doku Mühendisliği Malzemeleri

Doku mühendisliği, hasarlı ya da hastalıklı dokuları onaracak ya da bu dokuların tam anlamıyla yerlerini tutabilecek malzeme ve metodlar geliştirmeyi amaçlar. Bu amaçlarda biyomalzemelerin rolü büyüktür. Bu biyomalzemeler doku rejenerasyonunu yönlendirmek amacıyla kullanılan matrisler, büyüme faktörü salımı için kullanılan mikro/nanopartiküller ve tümör tedavisinde kullanılan iskeleler olarak sıralanabilir (Hubbell, 1995).

Partiküler formdaki malzemelerin biyomedikal alanda yer almasıyla başlayan süreç, günümüzde doku mühendisliği çalışmalarındaki kullanımlarıyla devam etmektedir. Birçok yöntemle sentezlenebilen partiküllerin boyut aralığı, yapılacak çalışmaya göre, nano boyuttan mikron boyutuna kadar değişebilmektedir (Silva, 2007).

2.3.1. Mikropartiküller

Mikropartiküllerin büyüklükleri 1-1000 µm arasında değişmektedir (Couvreur, 1993). Afinite kromatografisi, immobilizasyon çalışmaları, nükleer görüntüleme ve hücre kültürü çalışmaları olmak üzere birçok biyomedikal uygulamada kullanımları söz konusu olmaktadır (Çakmak et al., 2009; Kamyshny, 2000; Shinkai, 2002). Polimerik partiküllere biyoaktif ajanlar yüklenerek ilaç taşıma sistemleri geliştirilmektedir (Pillai, 2001). Bu sistemlerde ilaç salım hızı kontrol edilebilmekte ve hedef bölgeye özgü bir tedavi uygulanabilmektedir (Tao, 2003). Taşıyıcı mikropartiküller biyobozunur polimerlerden de üretilebilmekte, böylece ilaç salımı bittiğinde vücuttan uzaklaştırılmaları için herhangi bir müdahaleye gerek kalmamaktadır (Baldwin, 1998).

Mikropartiküllerin avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Boyut: Boyutlarının küçük oluşundan dolayı vücut içerisindeki dar bölgelerde kolayca hareket edebilirler.

Boy dağılımı: Yapılacak çalışmaya göre geniş bir boyut aralığına sahiptirler.

Gözeneklilik: Mikropartiküllerin yapısında gözeneklerin bulunması ilaç salım profilini daha uygun hale getirebilmektedir.

Yüzey alanı: Büyük yüzey alanı ve biyoaktif molekül yükleme kapasitesine sahiptirler (Kahraman, 2008).

2.3.2. Nanopartiküller

Büyüklikleri 100 nanometrenin (nm) altında olan nanopartiküller, hacimsel yapıları malzemelerden çok daha farklı ve üstün olarak kabul edilen özellikler sergilemektedirler. Nanoyapılı partiküller gösterdikleri üstün özellikler sayesinde elektrik, elektronik, biyomedikal, otomotiv ve kimya sektörleri başta olmak üzere birçok endüstriyel alanda kullanıma sahiptirler (Gürmen and Ebin, 2008). Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar; nanokristaller, nanopartiküller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar veya nano ince filmler gibi farklı gruplara ayrılmaktadır (Goldstein, A., 1997; Rao et al., 2005).

Nanopartiküller üzerine ilk çalışmalar 1970'li yıllarda yapılmıştır. Başlarda nanopartiküller, aşılarda ve kanser ilaçları için taşıyıcı olarak tasarlanmıştır. Kanser ilaçlarının tümör hücreleri tarafından hücre içine alınma oranlarının yükseltilmesi için ilaç hedefleme stratejileri geliştirilmiştir. Geliştirilen bu stratejilerin ilk basamağı, nanopartiküllerin retikuloendotelyal hücreleri (RES) tarafından reddedilmemesini sağlamak olduğundan, çalışmalar bu alanda yoğunlaşmıştır. Daha sonraları nanopartiküllerin oftalmolojik alanda ve oral salım sistemlerinde kullanımı için çalışmalar yapılmıştır (Kumar, 2000).

2.3.2.1. Nanopartiküllerin özellikleri

Nanopartiküller, mikropartiküllere nazaran daha geniş yüzey alanına sahiptirler çünkü yüzey alanı, partikül çapının üçüncü kuvvetiyle ters orantılıdır. Nanopartiküller sistemlerde biyoaktif ajanlar, matris içinde çözünebilir, enkapsüle veya immobilize edilebilir, matrise emdirilebilir, tutundurulabilir veya adsorbe edilebilirler (Orive et al., 2004). Üretim yöntemine bağlı olarak nanopartiküller, nanoküreler ya da nanokapsüller şeklinde elde edilebilir. Nanopartiküller, biyoaktif ajanın çevresinin bir polimer membranla kaplandığı veziküller sistemleridir. Nanoküreler ise biyoaktif ajanların içerisinde çözündüğü ve düzenli bir dağılım gösterdiği matris sistemleridir (Silva et al., 2007).

Nanopartiküllerin uygulamalardaki avantajları şöyle sıralanabilir:

Kararlılık: Nanopartiküllerin kararlılıkları, lipozomlardan daha fazladır ve sahip oldukları bu kararlılık özelliği biyoaktif ajanların partiküllere tutundurulmasıyla arttırılabilir.

Yüzey alanı: Mikropartiküllere kıyasla daha yüksek yüzey alanına sahiptirler.

Büyükölçük: Büyükölçüklerine bağlı olarak fagosite edilebilir ya da kan dolaşımına katılıp, yeterli terapötik etkiyi gösterecek kadar uzun süre dolaşımda kalabilirler.

Gizlilik (stealth) etkisi: Partikülün büyükölçüğü veya bir polimer (örneğin; polietilen glikol (PEG)) ile kaplanarak modifiye edilmesiyle kontrol edilen bir özelliktir.

Hedef bölgede salım: İnvazif uygulamalara gerek kalmadan enjeksiyon yöntemiyle salımları kolaylıkla gerçekleştirilebilir (Silva et al.,2007).

Nanopartiküller (10nm–100nm) yüksek aktif madde yükleme kapasitesine sahiptir. Hapsettikleri aktif maddenin hedefe ulaşana kadar bozunmasını engellerler. Salımın kontrollü ve sürekli olmasını sağlarlar. Nano ölçekteki partikül boyutları ve uygun yüzey modifikasyonları sayesinde partiküllerin küçük kapillere penetrasyonuna imkan verir ve hücreler tarafından tutulmalarını sağlarlar. Böylece, vücutta hedeflenen bölgede, istenen aktif madde salımı sağlanır ve söz konusu aktif maddenin hücre içi konsantrasyonu yüksek olur. Bu durum aktif maddenin çevre dokular ve organlardaki sistemik toksisitesini azaltır (Şengel-Türk et al., 2007).

2.3.2.2. Nanopartikül üretiminde kullanılan polimerler

Sentetik polimerler, kimyasal ve fiziksel özelliklerinden dolayı doğal polimerlere göre daha kontrollü yapılar olup, mekanik dayanımları ve biyobozunma özellikleri de daha düzenli olduğu için doku iskelesi, partikül ve membran gibi tıbbi malzeme bileşenlerinin üretiminde tercih edilmektedirler.

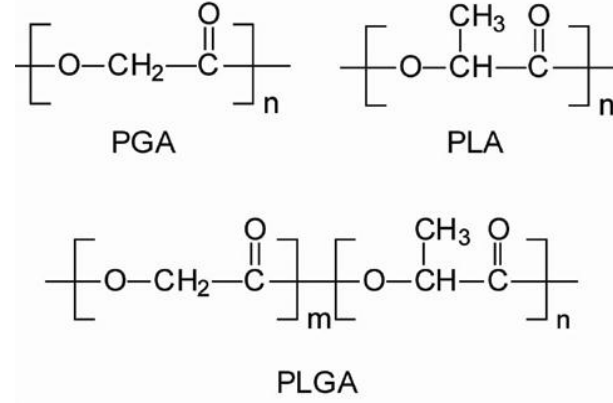
Sunulan tez çalışmasında nanopartiküllerin hazırlanması amacıyla poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) kopolimeri kullanılmıştır. Bu nedenle aşağıda PLGA kopolimerlerine ait ayrıntılı bilgi sunulmuştur.

Poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA)

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nce (FDA) onaylanmış bir sentetik polimer olan PLGA, vücutta şeker metabolizması sırasında bir ara ürün olarak bulunan laktik aside dönüştüğü için zehirli etkisi olmayan ve ilaç salım sistemlerinde sıkça kullanılan ticari bir üründür. PLGA, toksisitesi ve güvenilirliği hayvan testleri ile onaylanmış; dikiş ipliği, kemik implantı, kemik vidası ve kontraseptif implant olarak kullanılabilen sentetik bir polimerdir (Gümüşderelioğlu, 2002; Panyam and Labhasetwar, 2003). Bu polimer aynı zamanda yapay organlar için graft materyal olarak ve doku mühendisliği çalışmalarında doku iskelesi olarak kullanılabilir (Langer, 1997).

Poliester bazlı poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve kopolimerleri olan PLGA; en iyi tanımlanmış polimerlerdir. PLGA biyobozunur polimerlerin altın standardı olarak kabul edilir ve kullanılır, ancak bozunma hızını arttırmak için polimerin asiditesinin artırılması, polimerin bozunma rejiminde istenmeyen ve beklenmeyen etkilere neden olabilir.

PGA bugün en çok kullanılan polimerlerdendir. Hidrofilik yapısı nedeniyle sulu ortamda veya hücre içi koşullarda hızla çözünmekte ve mekanik bütünlüğünü iki ila dört hafta arasında kaybetmektedir. Kimyasal yapı açısından karşılaştırıldıklarında, PLA'nın tekrar eden birimlerinde fazladan bir metil grubunun bulunduğu görülmektedir (Şekil 2.3). Bu fazla metil grubu PLA'yı daha hidrofobik yapmakta, suya karşı afinitesini azaltmakta ve hidroliz hızını yavaşlatmaktadır. Hücre içi veya hücre dışına implante edilen PLA yapının çözünüp yok olması birkaç aydan birkaç yıla kadar sürebilmektedir. Üretilen biyomalzemelerin istenilen sürelerde çözünüp yok olmaları, PGA ve PLA'nın farklı oranlarda bir araya getirilmesiyle oluşan PLGA yapılar ile sağlanabilmektedir (Akça-Can and Duran, 2009).



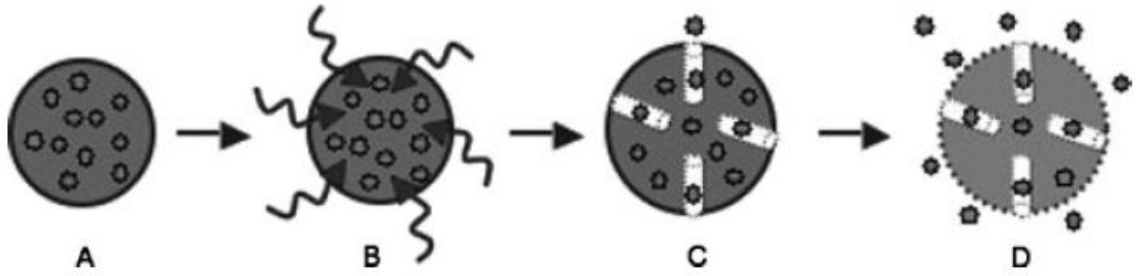
Şekil 2.3. PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapısı.

İlaç salım sistemlerinde sıklıkla tercih edilen PLGA'dan emülsifikasyon-difüzyon, çözücü emülsiyon-buharlaştırma, arayüzde depolama ve nanoçöktürme teknikleriyle nanopartiküller üretilmektedir (Kumari et al., 2010). Bu sentez metodları, PLGA nanopartiküllerin, üretim esnasında birçok kanser ilacını da enkapsüle edebileceği şekilde optimize edilmiştir. İlaç içeren bu nanoartiküller, çözünürlüğü düşük, biyolojik ortamlarda kararsız, endozomlar tarafından yakalanıp hücre içine alınabilecek ve kılcal damarlardan geçebilecek kadar küçük yapılar olabilmektedirler (Panyam et al., 2002). Ayrıca partikül yüzeyleri içerdikleri moleküllerin hedef tümör dokusuna veya farklı bir dokuya taşınıp, orada salınabilmesi için modifiye edilebilmektedir (Nobs et al., 2004). Kısmen büyük boyuta sahip tek bir partiküle yerleştirilebilecek bir prob vasıtasıyla da salım, hedefleme ve görüntüleme gibi birçok işlem gerçekleştirilebilmektedir (Torchilin, 2006). Tüm bu avantajlarına rağmen nanopartiküllerin performansı tam anlamıyla tatmin edici değildir, bu nedenle fizikokimyasal özelliklerinin ve sentez yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Partikül büyüklüğü, boy dağılımı, yüzey morfolojisi, yüzey kimyası, yüzey yükü, yüzey adezyonu, yüzey erozyonu, gözeneklilik, ilaç geçirgenliği, ilaç enkapsülasyon verimliliği, ilaç kararlılığı, ilaç salım kinetiği ve hemodinamik, nanopartiküllerin nanotıpta kullanılabilmesini sağlayan geliştirilebilir özelliklerdir.

PLGA nanopartiküller; protein ve peptidlerin nanotıp uygulamalarında, nano-aşılar, gen taşıyıcı sistemlerde, nano-antijen ile büyüme faktörlerinin taşınım ve salımında kullanılmaktadır. PLGA nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu, ilaç enkapsülasyon yöntemi, partikül büyüklüğü, formülasyon sırasında kullanılan katkı

maddeleri, ilacın molekül ağırlığı, polimerdeki laktik asit/glikolik asit oranı gibi özellikler üretilen nanotıp ürünlerindeki salım ve etkinlik performansını etkileyen önemli parametrelerdir (Kumari et al., 2010).

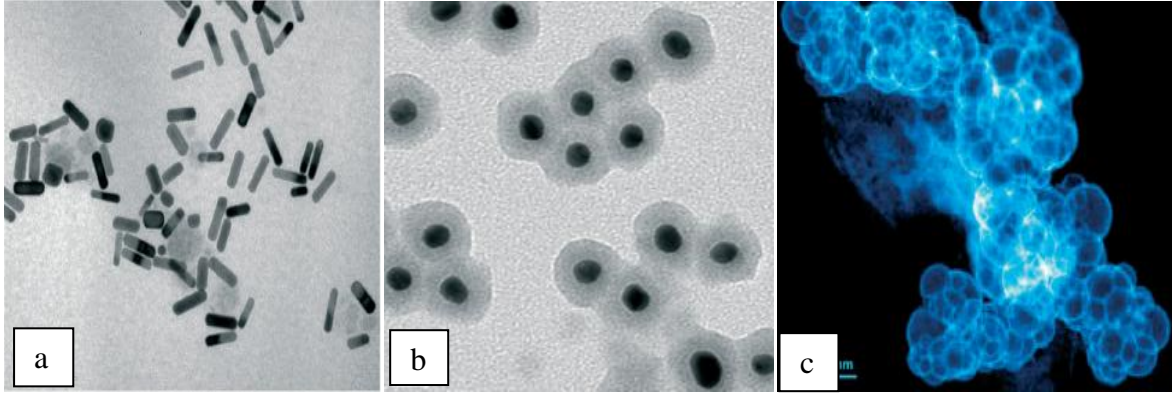
PLGA matrislere yerleştirilen ilaçlar, ortama, Şekil 2.4'te de şematize edildiği gibi, polimer matristen difüzyon yoluyla ve polimerin bozunmasına bağlı olarak salınır. Polimerin bozunması, değişen blok kopolimer bileşimine ve moleküler ağırlığına bağlı olarak günler veya aylar sürebilir (Panyam and Labhassetwar, 2003).



Şekil 2.4. Biyobozunur polimerik partiküllere tutunan biyoaktif ajanların partiküllerden salımı. Aktif ajan ile birleştirilen polimerik sistem, çevre ile etkileştiriliyor ve çevresindeki ortam sıvısı matrise giriyor (A), ardından sistemin şişmesine neden oluyor (B), sıvı difüzyon kanalları oluşturuyor (C) ve malzemenin bozunmasıyla birlikte oluşan polimerik sistem de yok oluyor (D), (Silva et al., 2007).

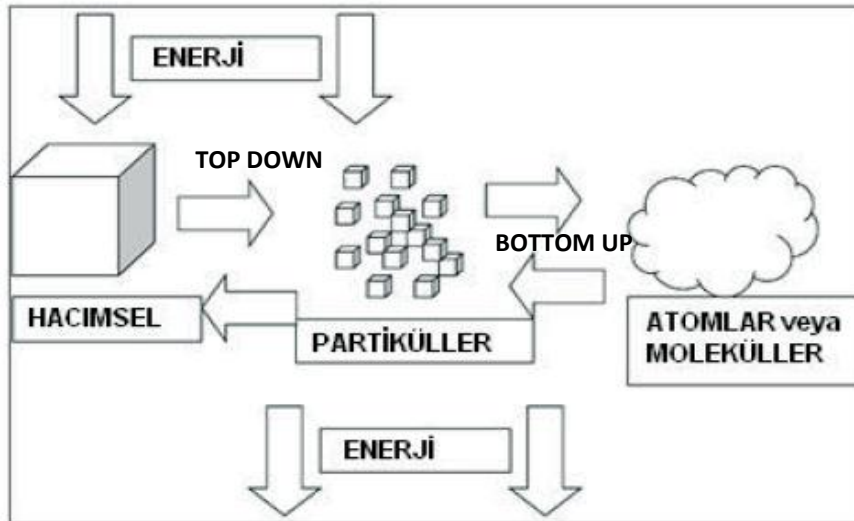
2.3.2.3. Nanopartikül sentez yöntemleri

Günümüzde çekirdek-kabuk, katkılı, sandviç, boşluklu, küresel, çubuk benzeri ve çok yüzlü gibi farklı morfolojilere sahip metal, metal alaşımı, seramik ve polimer esaslı veya bunların karışımından istenilen özelliklere sahip nanopartiküller hazırlanabilir (Şekil 2.5) (Liveri, 2006).



Şekil 2.5. Nanopartiküllere ait elektron mikroskobu görüntüleri (a) altın nanoçubuklar, (b) altın çekirdek silika kabuk nanopartiküller ve (c) iç boşluklu platin nanopartiküller.

Nanopartiküllerin üretiminde kullanılan nanoteknolojik yöntemler; Şekil 2.6'da görüldüğü gibi aşağıdan yukarı "Bottom Up" ve yukarıdan aşağı "Top Down" olarak adlandırılan iki ana yaklaşım altında incelenmektedir.



Şekil 2.6. Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar.

Yukarıdan aşağıya yaklaşımına dahil olan yöntemlerde, hacimsel malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilmesi sonucunda malzemenin nano boyuta kadar inebilecek küçük parçalara ayrılması esas alınmaktadır. Bu yaklaşım ile çalışan yöntemlere verilebilecek en genel örnekler; mekanik öğütme ve aşındırma olabilir. Bu tekniklerde klasik öğütme işlemlerinden

çok daha fazla enerji tüketimi gerçekleştiğinden yüksek enerjili öğütme veya yüksek hız değirmenleri olarak da adlandırılmaktadırlar. Aşağıdan yukarıya yaklaşımına dahil yöntemler ise; atomik veya moleküler boyuttaki yapıları kimyasal reaksiyonlar ile büyüterek partikül oluşumunun gerçekleştirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Nanokristalin metal ve alaşımlarının üretiminde kullanılan ilk yöntem olan gaz yoğunlaştırma tekniği aşağıdan yukarıya yaklaşımıyla çalışmaktadır. Kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol jel ve sprey piroliz yöntemleri de bu yaklaşımın en çok bilinen diğer örnekleridir (Gürmen and Ebin, 2008). Aşağıda bu yöntemlerle ilgili açıklamalara yer verilmiştir.

Mikroheterojen sistemlerden nanopartikül üretimi

Aşağıdan yukarıya yaklaşımla moleküler seviyeden nanopartikül üretimi için kullanılan sentetik metotlar, farklı mikroheterojen sistemlerin kullanımını temel alır. Bahsedilen mikroheterojen sistemler sıvı kristaller, jeller, misel çözeltileri ve mikroemülsiyon formunda olabilirler. Bunlar hızlı ve düşük maliyetli teknikler olup, metaller, oksitler, sülfatlar ve suda çözünmeyen maddeler ile birlikte suda çözünebilir inorganik ve organik malzemelerin nano boyutta sentezlenmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca yöntem, çekirdek-kabuk, katkılı, sandviç veya gözenekli nanopartiküllerin üretiminde kolaylıkla kullanılabilir. Mikroheterojen sistemler son ürün olarak pratik uygulamalara sahiptir. Manyetik, elektrik, ıslatma ve/veya yağlayıcı özelliklere sahip olabilen ve günden güne ilginin arttığı bu tür sistemlere *nano akışkanlar* denmektedir. Özellikle manyetik nano akışkanlar günümüzde medikal sektörden otomotiv sektörüne kadar geniş kullanım alanı bulmuştur (Liveri, 2006).

Sunulan tez çalışmasında nanopartikül üretimi için bir mikroheterojen sistem olan emülsiyon-difüzyon-buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır (Mittal et al., 2007). Partikül oluşumunda ve salım davranışında polimerin molekül ağırlığının ve bileşiminin etkisini görebilmek amacıyla farklı molekül ağırlıklarında ve bileşimlerinde PLGA kopolimerlerinden nanopartiküller üretilmiştir. Öncelikle PLGA ve aktif ajan olan 5-Fluorourasil'in (5-FU) etil asetat içerisinde çözünmesi sağlanarak organik faz oluşturulmuş ve oluşan bu faz, içerisinde stabilizatörün bulunduğu sulu faza aktarılmıştır. Oluşan yeni çözelti yüksek hızlı homojenizatör ile karıştırılmış ve içerisine sıcak su eklenerek organik çözücünün ortamdaki

uzaklaşması sağlanmıştır. Böylece etken madde içeren PLGA nanaopartiküllerin oluşumu gerçekleşmiştir.

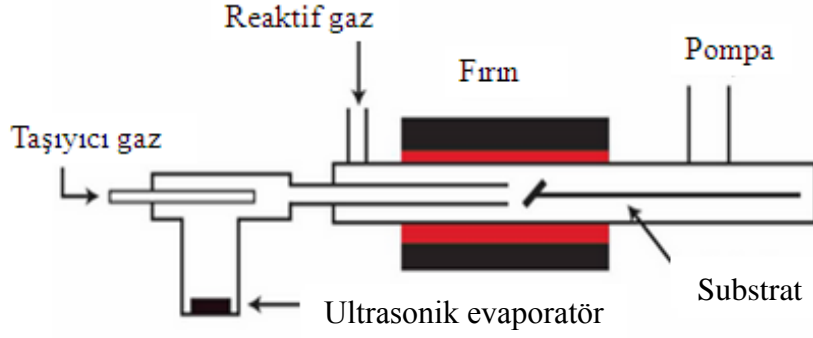
İyon saçılımı

Yöntem, 1 Torr'dan daha düşük bir basınçta ve inert gaz atmosferinde, gaz fazı yoğunlaşmasıyla, hedef materyalden iyon saçılması olarak tanımlanmaktadır. Yoğunlaşan nanopartiküller düşük hızlı ışınla şekillendirilebilmek için 3 mm çaplı yakınsayan-uzaksayan bir nozzle ile süpürülürler. Işın, substrat olarak depolanan film üzerine yönlendirilir. Nanoyapılı filmler, Al, Cr, Fe, Ni, Cu_{1-x}, Co_x, Cu, Zr, Mo, Ag, Ta, W, Pt, ve Au'nun belli bir akıda depolanması ile oluşturulurlar (Urban et al., 2002). Kısacası, nanopartikül oluşumu; farklı metallere magnetron saçılımı ile gerçekleşmektedir (Swihart, 2003).

İyon saçılımının karakteristiği incelendiğinde; hem metastabil hem de denge fazı oluşumuna bağlı, geniş bir sentezleme esnekliği gösteren bir yöntem olduğu görülmektedir. Nanopartiküllerin oluşmasında ve büyümesinde; iyon implantasyonunda kullanılan maddelerin kimyasal reaktiviteleri önemli bir rol oynamaktadır (Armela et al., 2002).

Kimyasal buhar kaplama

Kimyasal buhar kaplama, levha ve benzeri malzemeler üzerinde ince filmler biriktirmeye dayalı bir yöntemidir. Bu yaklaşımda, buhar faz öncülleri sıcak duvarlı bir reaktör içerisine konmaktadır. Kullanılan faz öncülleri (prekürsor) normal koşullarda katı, sıvı veya gaz formunda olabilmekle beraber, reaktöre gaz fazında aktarılırlar. Reaktör içerisindeki öncüller öncelikle reaksiyon odasına girerler, ardından ısı ve yüksek frekanslı yüksek gerilime (RF Power) maruz kalırlar. Bu aşamada reaktör içerisindeki buhar fazında yer alan partiküllerin, kullanılan faz öncüllerinin etkisi ile reaktör duvarında oluşan filmde depolanmak yerine, başarılı bir şekilde çekirdeklenmesi sağlanmaktadır. Şekil 2.7'de kullanılan sistem şematize edilmiştir.



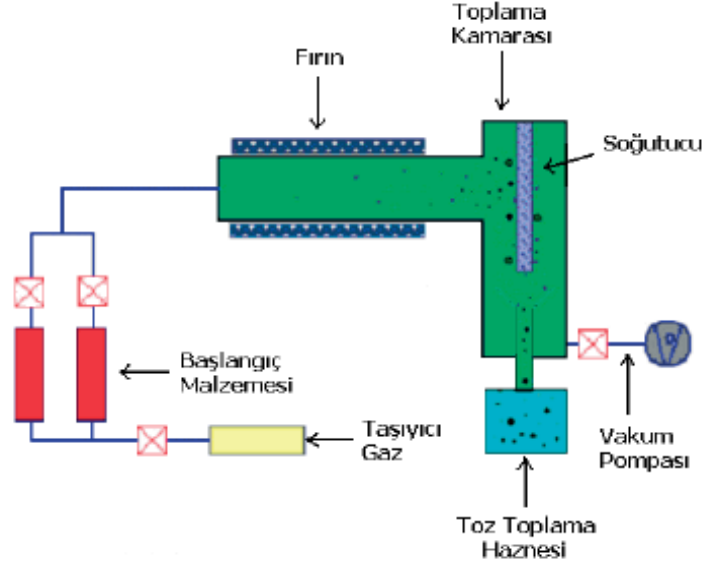
Şekil 2.7. Kimyasal buhar kaplama metodunun şematik görünümü.

Bu metod, hem çok çeşitte ve sayıda öncüllerin varlığından dolayı hem de birçok malzemeye uygulanabildiği için oldukça esnek ve kullanışlı bir metottur (Swihart, 2003).

Kimyasal buhar çöktürme (CVC) yöntemi

Kimyasal buhar çöktürme yönteminin en büyük avantajı farklı kimyasal içerikli başlangıç malzemelerinin ticari olarak kolaylıkla temin edilmesinden dolayı neredeyse her çeşit malzemenin geniş bir kimyasal bileşimde üretiminin mümkün olmasıdır (Wang et al., 2003a; Wang et al., 2003b).

Yöntem temel olarak gaz fazındaki malzemenin ısı parçalanması ile partiküle dönüşümüne dayanmaktadır. İşlem akışı; kısaca başlangıç malzemesinin gaz fazına geçtiği bölgeye gaz akışı sağlanarak buharın reaktör olarak da adlandırılan fırın içine taşınıp burada ısı parçalanmasının sağlanması üzerine kuruludur. Isı parçalanma sonucu oluşan atom kümeleri veya nanopartiküller fırın çıkışında farklı toz toplama yöntemleriyle toplanmaktadır. Şekil 2.8'de CVC yönteminin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.8. Kimyasal buhar çöktürme (CVC) yönteminin şematik gösterimi.

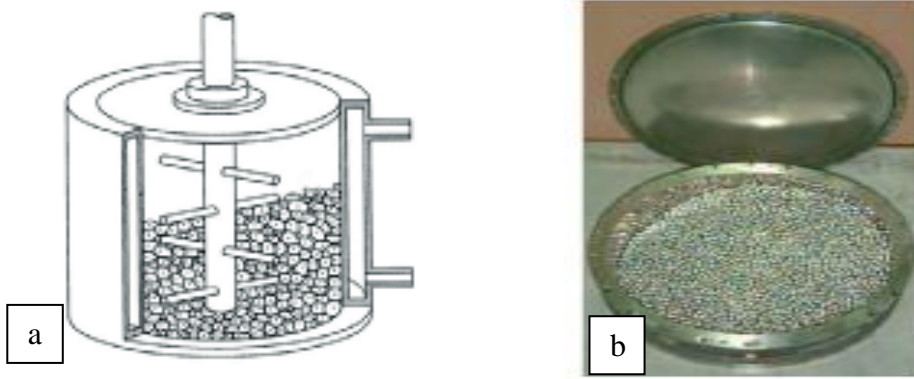
CVC yönteminde üretilen partikülün boyutu, morfolojisi ve kristalinitesi üzerine taşıyıcı gazın akış hızı, başlangıç malzemesinin bileşimi, işlem sıcaklığı, taşıyıcı gazın cinsi ve reaktör geometrisi etki etmektedir (Gürmen and Ebin, 2008).

Ultrasonik spre piroliz (USP) yöntemi

Toz üretim teknolojisi açısından 'Ultrasonik Sprey Piroliz' yöntemi, küresel ve aglomere olmamış, çok geniş bir aralıkta değişen kimyasal bileşime, boyuta ve morfolojiye sahip nano boyutlu partiküllerin üretilmesine imkan veren çok yönlü bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (Gürmen et al., 2006). Proses birbirinden ayrılmış haldeki damlacıkların aerosol formunda başlangıç çözeltilisinden oluşumunu, ısıl parçalanmanın gerçekleşmesini ve faz değişiminin kontrolünü içermektedir. Sprey piroliz yönteminin ilk adımını oluşturan buharlaşma sırasında, çözücü buharının ve çözünenin difüzyonu damlacık sıcaklığının değişmesiyle eş zamanlı gerçekleşmektedir. Bu olay çözünen tuzların, yüzey veya hacim çökmesiyle katı veya gözenekli partiküllerin oluşumuna neden olmaktadır. Bundan dolayı oluşan partikül boyutu; damlacık boyutuna, kullanılan başlangıç çözeltilisinin özelliklerine ve sıcaklık, süre gibi proses parametrelerine bağlıdır. Çökme işleminin tamamlanmasından sonra sıcaklık–zaman profili spre piroliz yönteminin diğer işlem adımlarında oluşacak primer (ilk kristallenen) partiküllerin büyümesini, birleşmesini ve agregasyonunu etkilemektedir (Tsai et al., 2004).

Mekanik aşındırma tekniği

Mekanik aşındırma yönteminde alaşım, intermetalik, seramik ve kompozit gibi amorf veya nano-yapılı malzemelerin geniş bir bileşim aralığında nanopartikül üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Tekniğin endüstriyel kullanımı, işlem sırasında kolaylıkla kırılabilen sert ve gevrek özellikli malzemeler ile sınırlıdır. Bu amaç için aşındırma öğütücüler, gezegen öğütücüler, titreşimli öğütücüler ve yüksek enerjili bilyalı değirmenler kullanılmaktadır (Şekil 2.9) (Gürmen and Ebin, 2008).

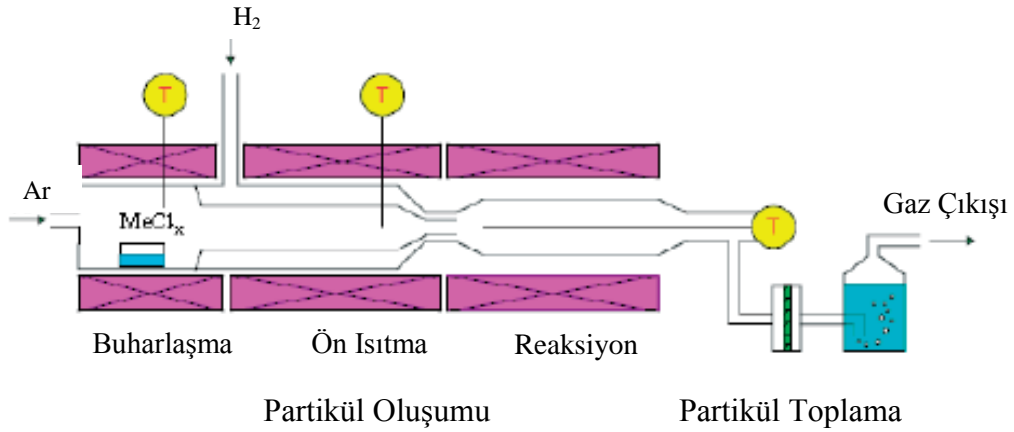


Şekil 2.9. Mekanik aşındırma işleminin şematik görünümü (a), bilyalı öğütücü (b).

İşlemin en büyük dezavantajı, mekanik aşınma sırasında öğütülen malzeme bileşiminin kullanılan bilyalardan kaynaklanan safsızlık içermesidir. Ayrıca atmosferik ortamda gerçekleşen proseslerde metalik partiküller de oksitlenmekte veya yüzeyde azotlu yapılar oluşmaktadır. Fakat bu sorun öğütücü haznesinin asal gaz ile doldurulması ve sızdırmaz uygun contaların kullanılmasıyla zor da olsa ortadan kaldırılabilir (Edelstein and Cammarada, 2001).

Hidrojen indirgenmesi yöntemi

Gaz fazında indirgenme ile metalik nanopartiküllerin üretimini gerçekleştiren bir yöntem olan hidrojen indirgenmesi yöntemi Şekil 2.10'da görüldüğü gibi; partikül oluşumu, partikül toplanması ve gaz yıkama adımlarından oluşmaktadır (Jang et al., 2004).

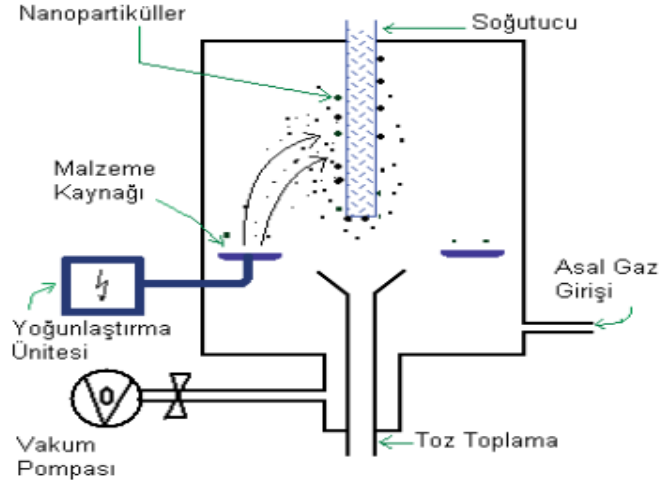


Şekil 2.10. Hidrojen indirgenmesi yöntemi.

Yöntemin ilk aşamasında, kullanılan başlangıç çözeltisi buharlaştırılarak taşıyıcı ve/veya indirgeyici bir gazla ön ısıtılmış bölgeye ve daha sonra indirgenmenin gerçekleşeceği daha sıcak bölgeye taşınarak partikül oluşumu gerçekleştirilmektedir. İşlem sırasında hidrojen gazı tek başına hem indirgeyici hem de taşıyıcı olarak kullanılabilirdiği gibi bununla birlikte azot ve argon gibi inert gazlar da taşıyıcı olarak kullanılabilirler. Reaktantların konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı, ön ısıtılmış bölgenin sıcaklığı ve buhar/partikülün fırın içerisinde kalış süresi; partikül boyutu, boyut dağılımı ve kristalinitesini kontrol eden başlıca faktörlerdir (Jang et al., 2004; Suh et al., 2006).

Asal gaz yoğunlaştırma (IGC) tekniği

Isınan su, bulunduğu ortamla etkileşiminden dolayı buharlaşarak ısı kaybetmeye başlar ve soğuk cam yüzeyinde su damlacıklarının yoğunlaşması gerçekleşir. Bu prensibe dayanan asal gaz yoğunlaştırma tekniği Şekil 2.11'de gösterilen basamaklardan oluşmaktadır.



Şekil 2.11. Asal gaz yoğuşurma yönteminin şematik görünümü.

Buhar oluşumundan önce sistem vakuma alınıp 1–50 mbar asal gaz ile doldurulduktan sonra başlangıç malzemesi ısı, lazer veya elektron demeti gibi herhangi bir enerji kaynağı kullanılarak buharlaştırılmaktadır. Buharlaşan atomlar veya moleküller homojen olarak toplanarak ısı kaynağının hemen yakınlarında atom kümelerini oluştururlar. Buhar kaynağının üzerinde aşırı doygunluğa ulaşılır ve başlangıç malzemesinin buharlaşan atomları ile sistem içinde var olan gaz moleküllerinin çarpışması sonucu atom kümelerinin enerjilerini kaybetmelerinin ardından çekirdeklenme ve partikül oluşumu sıvı metale yakın bölgede gerçekleşir. Bu nedenle yüksek gaz basıncının varlığı çarpışma sayısını artıracığından daha hızlı soğuma ile çok ince partiküllerin oluşmasını sağlamaktadır (Gürmen and Ebin, 2008).

2.3.2.4. Nanopartiküllerin biyomedikal uygulamaları

Nanopartiküller sahip oldukları boyut avantajı, modifiye edilebilirlik, çok çeşitlilik v.b. özgül özelliklerinden dolayı görüntüleme, defektlerde birikim, aşı uygulamaları, hücre kültürü çalışmaları, hücre saflaştırılması, ilaç salım teknolojisi, doku mühendisliği uygulamaları, immobilizasyon, optik uygulamalar ve gen terapi gibi biyomedikal uygulamaların yanısıra kozmetik, boya endüstrisi, arıtım, manyetik, elektronik, mekanik, depolama, ayırma teknolojisi ve kromatografi gibi birçok farklı alanda da kullanılmaktadırlar.

Biyobozunur nanopartiküller yüksek biyoyararlanım, iyi enkapsülasyon, kontrollü salım ve düşük toksisite özelliklerine sahip olduklarından sıklıkla ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadırlar. Nanopartiküller bu özelliklerden dolayı özellikle suda çözünen/çözünmeyen çeşitli tıbbi ilaçların ve biyoaktif moleküllerin hasta üzerindeki terapötik etkilerini arttırmak amacıyla tercih edilmektedir (Shenoy and Amiji, 2005). Çünkü oluşturulan nanopartikül-ilaç formülasyonları hem toksisite riskini hem de hasta harcamalarını azaltmaktadır. Tıbbi ilaçların nanoenkapsülasyonu ilaçların verimliliğini, özgüllüğünü, tolere edilebilirliğini ve benzerlerine kıyasla terapötik indeksini arttırmaktadır. Nanoenkapsülasyon sayesinde hasta, ilaçların ilk bozunmalarına bağlı olarak oluşan toksik etkiden korunurken; ilaçların biyolojik çevre ile etkileşimi artmakta, istenilen doku tarafından absorpsiyonu ve hücreler arası geçişi kolaylaşmaktadır (Alexis et al., 2008).

Tıp ve elektronik alanında yaygın kullanıma sahip olan nanoparçacıklar, doku mühendisliğinde kullanılan nanoyapıların da başında gelmektedir. Boyutları 100 nm'den küçük olan bu yapılar kan dolaşımında çökelmeden hareket edebilmekte ve mikrovasküler yapılardan rahatlıkla geçebilmektedir. Bu özelliklerinden dolayı, doku mühendisliği çalışmalarında, büyüme faktörlerinin taşınması ve salımında sıklıkla tercih edilmektedirler. Yine boyutlarından dolayı, hücre içine çok kolay alınabildiklerinden, hücrelerin işaretlenmesinde de nanoparçacıklar kullanılmaktadır. Yapılacak çalışmanın amacına göre, geniş yüzey alanına sahip bu yapıların çeşitli malzemelerle kaplanarak yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ve seçilen antikor ya da peptid yapılarının yüzeye bağlanması söz konusu olabilmektedir. Böylece nanoparçacıkların sadece hedeflenen hücre ve dokularla etkileşmesi sağlanmaktadır (Gümüşderelioğlu et al., 2007).

Salım sistemleri

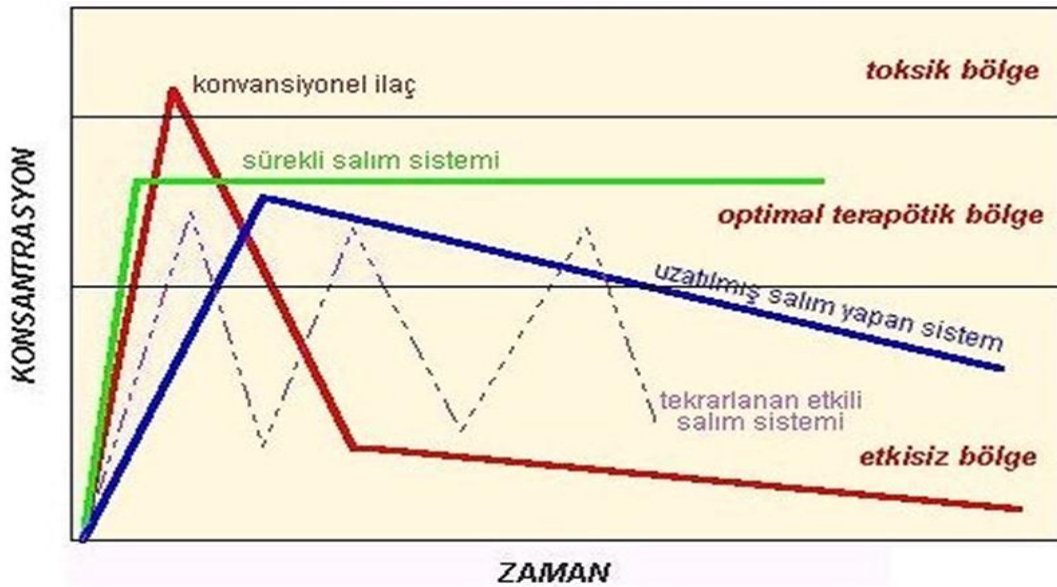
United States Pharmacopeia (USP) XXIV'e göre salım sistemleri; geciktirilmiş salım sistemleri (delayed release systems) ve uzatılmış salım sistemleri (extended release systems) olarak iki ana başlık altında toplanmaktadır. Uzatılmış salım sistemleri de, sürekli salım sistemleri (sustained release systems) ve kontrollü salım sistemleri (controlled release systems) olarak iki alt başlığa ayrılmaktadır. Ayrıca tekrarlanan etkili salım sistemleri (repeat action release systems) de

USP'nin son yaptığı sınıflandırmada yer almayan ancak literatürde sıkça karşılaşılan bir başka salım sistemidir (Şekil 2.12).

Geciktirilmiş salım sistemlerinde; etken maddenin sistemden salımı belli bir bölgede olmaktadır. Bu sistemler ilacı hemen değil, bağırsakta dağılan tabletlerde olduğu gibi, belli koşullarda açığa çıkaracak şekilde hazırlanmışlardır. Genellikle enterik kaplı tabletler için bu tanım kullanılmaktadır. Uzatılmış salım sistemlerinde ilaçlar, sistemden uzun bir sürede düşük hızda salınmakta ve zaman içerisinde salım hızı giderek azalmaktadır.

Sürekli salım sistemlerinde etken maddenin plazma veya doku düzeyi, alışılmış şekillere göre çok daha uzun süre devam etmektedir. Bu sistemlerde öncelikle istenen etkiyi sağlayacak miktarda etken madde, preparattan ilk doz olarak salınmaktadır. Sonrasında da sürdürme dozundan, etken maddenin eliminasyon hızına eşit miktarda madde, belli sürede sabit hızda salınmaktadır (Gürsoy, 2002).

Kontrollü salım sistemleri, ilaç taşıyan ve taşıdıkları ilacı istenilen hız ve sürede salabilen dozaj şekilleridir (Robinson and Lee, 1987). Tekrarlanan etkili salım sistemleri ise, bir dozaj içerisinde etken maddenin birden fazla (iki veya üç) dozunun bulunduğu ve bu dozların belli zaman aralıkları ile salındığı sistemlerdir (Gürsoy, 2002).



Şekil 2.12. Salım sistemlerinin plazma konsantrasyon profilleri.

Kontrollü salım sistemlerinin, konvansiyonel (geleneksel) salım sistemlerine kıyasla sahip olduğu avantajlar; arttırılmış verim, azaltılmış toksisite, uzun yarılanma ömrü ve hasta konforunda artış olarak sıralanabilir. İlaç tedavisinde verim artışı sağlanırken; yan etki şiddeti artmamalı, tedavi sırasında kullanılan ilaç çeşidi azaltılmalı veya tekrarlanan dozajlama ihtiyacı ortadan kaldırılmalıdır. Bu sistemlerde kullanılan ilaçların taşınmasında genellikle sentetik polimerlerden yararlanılır (Uhrich et al., 1999).

Etken maddelerin bu salım sistemlerinden herhangi birinde kullanılabilmesi için polimerik partiküllerce enkapsüle edilmesi sıkça kullanılan bir yöntemdir. Nanoyapılar tarafından enkapsüle edilen ilaçların salım profili kullanılan polimerin molekül ağırlığı ile yakından ilgilidir. Yüksek molekül ağırlıklı polimerce enkapsüle edilen ilaçların *in vitro* koşullardaki salım hızı düşüktür (Zambaux, et al., 1999). Yeni nesil aktif moleküllerin salımı için geliştirilen sistemlerin başarılı olması, salım profilinin kontrol edilmesine ve hedeflemeye bağlıdır (Kumari et al., 2010).

Taşıyıcı olarak kullanılan polimerin yüzey modifikasyonu, ilaç enkapsülasyon metodu, partikül büyüklüğü, üretim sırasında kullanılan katkı maddeleri, ilacın molekül ağırlığı, polimerin bileşimi ve molekül ağırlığı, kontrollü salım sistemlerinde salım profilini etkileyen başlıca parametrelerdir (Kumari et al., 2010). Bu nedenle kontrollü ilaç salım sistemlerinde ilaç taşıyıcı sistemler olarak, yüksek yüzey alanına sahip, yüzey modifikasyonuna uygun, üretildiği polimere bağlı olarak molekül ağırlığı geniş bir aralıkta değişebilen nanopartiküller tercih edilmektedir.

Hedeflenen dokuda salımın gerçekleşebilmesi için nanopartiküllerin sistemik dolaşımında uzun bir süre kalmaları gerekmektedir. Ancak hidrofobik yüzeyli geleneksel nanopartiküller, makrofajlar tarafından hızlı bir biçimde tanınmakta ve yok edilmektedir. Nanopartiküllerin kandaki dayanıklılıklarını ve dolaşım sürelerini arttırmak amacıyla, partikül yüzeyleri farklı moleküllerle modifiye edilmektedir. Partiküller hidrofilik polimerle kaplanarak partikül yüzeyinde plazma proteinleri tarafından fark edilmeyen zincirden bir bulut oluşturulmakta ve böylece uzun süre fagosite edilmeden dolaşımında kalabilmektedir (Brigger et al., 2002).

2.3.2.5. Nanopartiküllere ilaç yüklenmesi ve nanopartiküllerden ilaç salım mekanizmaları

Başarılı bir nanopartikül sistemi, en az taşıyıcı ile en çok etken madde salımı yapabilen yani en yüksek yükleme kapasitesine sahip olan sistemlerdir. Nanopartiküllere iki farklı şekilde ilaç yüklenmektedir. İlki, ilacın nanopartiküllere, partikül üretim aşamasındayken yüklenmesi, ikincisi ise nanopartikül üretildikten sonra, partiküllerin ilaç çözeltisinde inkübasyonu ile ilacın partiküllere adsorbe olmasıdır (Soppimath, et al, 2001). Bu iki metod için de; katı çözelti, polimer içerisinde dağılmış ilaç, nanopartikül yüzeyine adsorbe olmuş ilaç ve polimere kimyasal bağlı ilaçtan bahsedilir. Nanopartiküllere bağlanan ilacın bağ çeşidi ve miktarı; ilacın ve polimerin kimyasal yapısına ve ilaç yükleme koşullarına bağlıdır (Shenoy and Amiji, 2005). Adsorpsiyon izotermelerini saptamak, ilacın partiküle bağlanma tipini ve bağlanma oranını (mg ilaç/mg nanopartikül) analiz etmek için kullanılacak bir yoldur. Adsorpsiyon izotermi, nanopartikül/ilaç salım sistemleri için en iyi formülasyonun sağlandığı koşullarda, nanopartikül yüzeyine ilaç bağlanması ve adsorpsiyon kapasitesi hakkında en iyi bilgiyi verir. Doğrusal sorpsiyon izotermi katı çözeltileri, Langmuir S-tipi izotermi ise yüzey adsorpsiyonunu ifade etmek için kullanılır. Çünkü nanopartiküller gibi kolloidal sistemlerde, partiküllerin içerdiği ilaç miktarını tahmin etmek en büyük problemdir. Bu nedenle nanopartiküllerin ilaç içeriklerini tespit etmenin en güvenilir yolu, partiküle bağlanmayan ilacın ultrasantrifügasyon veya jel filtrasyon yöntemiyle partikülden ayrılıp, tayin edilmesidir. Buradan yola çıkarak enkapsülasyon verimi (EE) aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 2.1) kullanılarak hesaplanabilmektedir.

$$EE = \frac{\text{Bağlanan ilaç miktarı}}{\text{Nanopartikül üreti min de kullanılan toplam ilaç miktarı}} \quad (2.1.)$$

Amaçlanan uygulamanın geciktirilmiş veya kontrollü ilaç salımı olduğu durumlarda, ilaç salım mekanizması ilaç-polimer formülasyonu kadar önemlidir. İlaç salım süresini ve oranını değiştirebilmek için ilaç salım mekanizmasının iyi tanımlanmış ve kavranmış olması gerekmektedir. Nanopartiküllerden ilaç salım kinetiği bir biexponansiyel fonksiyonla tanımlanmaktadır (Eşitlik 2.2).

$$C = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad (2.2.)$$

C= t anında partikülde bulunan ilaç konsantrasyonu

A= Difüzyon kontrol sistemi sabiti

B= Erozyon kontrol sistemi sabiti

α, β = Oran sabitleri (Ringe et al., 2004).

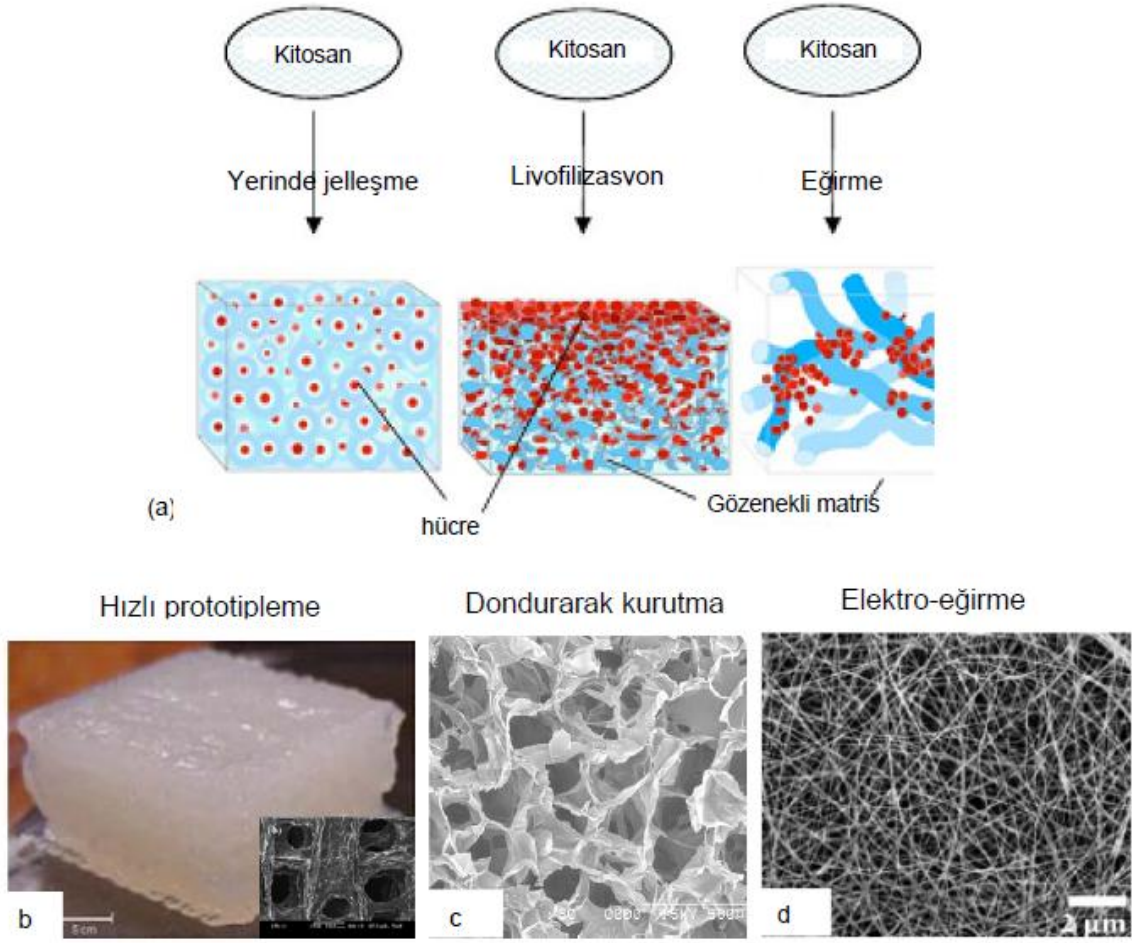
Genel olarak ilaç salım oranı çözünürlüğe, difüzyona ve matris materyalinin biyobozunurluğuna bağlıdır. Dolayısıyla salım mekanizması, polimer matris seçimine bağlı olarak değiştirilebilir. İlaç salımı aynı zamanda ilaç yükleme verimine ve nanopartikül büyüklüğüne de bağlıdır. Büyük partiküller, küçük partiküllere göre daha düşük bir patlama etkisine (burst effect) sahiptir. İlaç yükleme kapasitesi patlama etkisi ve salım oranı ile doğrudan orantılıdır. Hızlı ilk salım veya patlama etkisi zayıf bağlanmadan veya geniş nanopartikül yüzeyine adsorbe olmuş çok miktarda ilaçtan kaynaklanmaktadır (Chen et al., 2003). Aynı zamanda patlama etkisi kopolimer içerisindeki düşük molekül ağırlıklı polimer miktarının azaltılmasıyla da düşürülebilmektedir (Kumari et al., 2010).

2.3.3. Doku iskeleleri

Doku mühendisliği yaklaşımlarında genellikle doku iskeleleri kullanılarak, organizma hücrelerinin kendini yenileyebilme kabiliyetinden yararlanılır. Bu iskeleler vücut tarafından yabancı olarak nitelendirilmeyecek yapıda, biyoyumlu, hücre büyümesinin ve dokudaki besin alışverişinin desteklenmesi için gözenekli, iyileşme sürecinde doku iskelesinin vücuttan kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi için ise biyobozunur özelliklere sahip olmalıdır (Zmora et al., 2002). Doku iskelesi malzemeleri, vücut içinde bozunmaya ve resorpsiyona uğrarken aynı zamanda dokudaki hücrelerin doku iskelesine yapışıp yayılmasını ayrıca sayıca olduğu kadar nitelikçe de iyileşmesini sağlayacak şekilde seçilmelidir. Böylece hücre üremesi ve hücre dışı matris sentezi ile doku rejenerasyonu gerçekleşirken, doku iskelesi hem gerekli fiziksel desteği sağlayacak hem de bozunarak yeni oluşan dokuya gerekli olan boşluğu oluşturacaktır (Gerçek-Beşkardeş, 2008). Bu özelliklere ek olarak hasara özgü bir yapının üretilebilmesi için malzemenin işlenebilir olması, orijinal dokunun taklit edilebilmesi açısından ise doku iskelesinin gerekli mekanik dayanıma sahip olması beklenmektedir (Zmora et al., 2002).

Kitosan, bir doku iskelesinde bulunması gereken özelliklere sahip, kitinin alkalik deasetilasyonu ile elde edilen amorf yapıda bir poliaminosakkarit ve doğal olarak meydana gelebilen birkaç katyonik polielektrolitten biridir. Kitosan üretiminde hammadde olarak kitin kullanılır ve Japonya ile ABD'de ticari olarak üretilmektedir (Gümüşderelioğlu, 2002).

Dođada selülozdan sonra en fazla bulunan polimer olan kitosanın en önemli özelliklerinden biri, yapısının, membran, mikro/nano küre, ince filmler, kapsüller, fiberler, sünger yapıları ve jeller halinde doku iskelesi olarak kullanılabilmesidir. Tüm bu yapıların eldesi için kitosan doku iskelelerinde en çok kullanılan fabrikasyon yöntemleri, dökme-kalıplama (casting-molding) (Ma et al., 2001), eğirme (spinning) (Bhattarai, 2005), elektrobirikim (Yi et al., 2005), dondurarak kurutma (Lu et al., 2006, Tığlı et al., 2007) ve iyonotropik jelleşme yöntemleridir (Krajewska, 2005). Alternatif olarak, hızlı prototipleme (rapid prototyping) ve yerinde (in-situ) jelleşme teknikleri ile kitosan jel formunda doku iskeleleri (Ang et al., 2002; Di Martino et al., 2005), gaz köpüklendirme yöntemi ile ise gözenekli kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir (Chow and Khor, 2000). Şekil 2.13'te kitosan doku iskeleleri üretimi için en çok kullanılan fabrikasyon yöntemleri özetlenmiştir.



Şekil 2.13. (a) Kitosan doku iskelesi fabrikasyon yöntemlerinin şematik gösterimi (Di Martino et al., 2005), (b) hızlı prototipleme yöntemiyle elde edilmiş kitosan jel iskele ve taramalı elektron mikroskop görüntüsü (Ang et al., 2002), (c) dondurarak kurutma yöntemiyle üretilmiş kitosan doku iskelesi elektron mikroskop görüntüsü (Suh and Matthew, 2000), (d) elektroeğirme yöntemiyle hazırlanmış nanofiber kitosan doku iskelesi elektron mikroskop görüntüsü (Bhattarai, 2005).

Doku iskelesi eldesinde kullanılan tekniğin gözeneklilik, gözenek boyutu, gözenek dağılımı ve gözeneklerin birbirleriyle olan bağlantısı açısından tutarlı olması gereklidir (Salgado et al., 2004). Dondurarak kurutma yöntemi ile çok daha homojen gözenek yapılarına ve daha büyük gözenek boyutlarına sahip kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir. Bununla beraber, üretim koşullarındaki kolaylık ve maliyet açısından geleneksel yöntemler, kitosan doku iskelesi üretiminde halen popülerliğini korumaktadır (Tıǧlı, 2010).

2.4. Tümör Tedavilerinde Kullanılan İlaçlar

Çoğu hücrenin kemoterapi ve radyoterapi ile yok edilebilmesi için hücre döngüsüne girmesi zorunludur. Tümör tedavilerinde kullanılan birçok sitotoksik ajan hücre döngüsünün bir fazına daha fazla etkilidir ve bu ajanlar 'faz spesifik' olarak sınıflandırılır. Kullanılan bazı ilaçlar ise tümör hücrelerinin biyolojik karakteristiklerine bağlı olarak geliştirilmiştir. Bu ilaçlar; hücrelerin apoptoz mekanizmalarına, hücrelerde proliferasyonu kontrol eden faktörlere, hücrelerdeki matürasyon anomalilerine veya anjiyogenez inhibisyonuna yöneliktir.

2.4.1. Tümör tedavilerinde kullanılan ilaçların özellikleri

Sitotoksik ajanlar hücre döngüsüyle ilişkili aktivitelerine göre, 'faz spesifik olanlar' ve 'faz spesifik olmayanlar' olarak kategorize edilirler. Faz spesifik olanlar; hücre döngüsünün sadece bir fazında etkin olan siklus spesifik-faz spesifik ilaçlardır. Bu ilaçlar her zaman ve her konsantrasyonda etkilidirler ancak belirli dozların üzerinde ilaç dozunu arttırmak daha fazla hücre ölümüyle sonuçlanmaz. Bu ilaçların etkinliği tedavi süresinin uzamasına bağlı olarak artmaktadır.

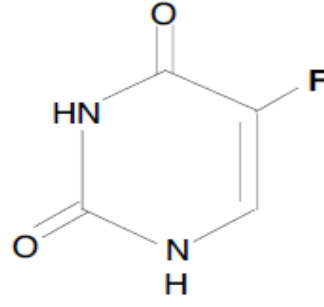
Faz spesifik olmayanlar ise bölünmeyen hücreleri öldüren 'siklus spesifik olmayan ilaçlar' ve hücre döngüsüne girmiş tüm hücrelere hasar veren 'siklus spesifik ancak faz spesifik olmayanlar' olarak ikiye ayrılırlar. Bu gruplarda yer alan ilaçlar genel olarak doğrusal bir doz-cevap eğrisine sahiptirler yani ne kadar fazla dozda ilaç verilirse o oranda fazla hücre ölür.

Tümör tedavilerinde kemoterapötik olarak; alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antitümör antibiyotikler, mitoz inhibitörleri, topoizomeraz inhibitörleri ve hiçbir gruba girmeyen diğer ajanlar kullanılır (Casciato and Lowitz, 2009).

Sunulan tez kapsamında kullanılan ajanlar olmaları nedeniyle aşağıda 5-Flourourasil (5-FU) ve Bevacizumab hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir.

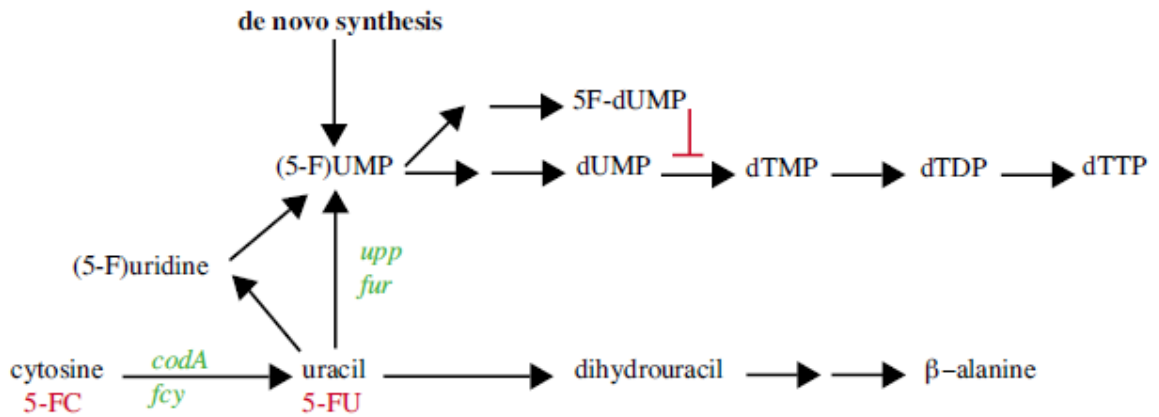
2.4.1.1. 5-Flourourasil (5-FU)

Fluoroprimidin ailesinin bir üyesi olan 5-FU'nun kimyasal formülü $C_4H_3FN_2O_2$ ve molekül ağırlığı 130.2 g/gmol'dür. Kimyasal yapısı ise Şekil 2.14'te gösterilmektedir (<http://www.invivogen.com>).



Şekil 2.14. 5-FU'nun kimyasal yapısı.

Bir antimetabolit olan 5-FU; deoksiüridilik asidi, timidilik aside dönüştüren timidilat sentetaz enzimini bloke ederek DNA sentezini inhibe eder (Şekil 2.15). Birçok RNA tipiyle birleşerek RNA fonksiyonunu ve protein sentezini bozabilir. Hücre döngüsünün S fazına spesifiktir, fakat diğer hücre döngüsü fazlarında da etkili olmasından dolayı logaritmik hücre öldürme etkisine sahiptir.



Şekil 2.15. 5-FU metabolizması.

5-FU, BOS ve malign efüzyonlar dahil tüm dokulara hızlıca dağılır ve ilacın hücre içi aktivasyonu gereklidir. Bu işlemde önce fosforilleyci enzim sonra da fosforil transferazlar rol alır. İlacın çoğu karaciğerde yıkılır. Cevap veren tümörlerde ilacı parçalayan enzimlerin olmadığı görülür. Metabolizma tarafından ilacın %90'ı metabolize edilir. İnaktif metabolitleri de idrarla, safrayla ve solunumla (CO₂ şeklinde) atılırlar.

Uygulama metodu tartışmalı olmakla beraber genellikle intravenöz bolus, 15 dakikalık infüzyon, sürekli infüzyon, intrakaviter, topikal veya oral olarak kullanılır (Casciato and Lowitz, 2009).

Cerrahi müdahale ile glioblastomları uzaklaştırılan 8 hastanın tümör yatağı duvarlarına, ortalama 45 µm büyüklükte PLGA mikrokürelere yüklenmiş 2 farklı dozda (70 mg and 132 mg) 5-FU verilmiş ve hastalara, cerrahi müdahalenin 7. gününden itibaren 59,4 gray (gy) ışın uygulanmıştır. Yapılan analizler 5-FU'nun beyin omurilik sıvısında en az 1 ay belli bir konsantrasyonda kaldığını, ancak kandaki konsantrasyonunun çok düşük ve süresiz olduğunu göstermiştir. Sistemik toleransın oldukça iyi olduğu ancak yüksek doz uygulamalarında beyin tümör oluşumunun tekrarlandığı tespit edilmiştir. Tedavi sonrasında hastaların sağkalım sürelerinin ortalama 98 hafta olduğu hatta iki hastanın 139 ve 153 hafta yaşamlarını devam ettirebildikleri belirtilmiştir (Menei et al., 1999).

Yapılan bir çalışmada, oncostatin M (OSM)'nin kanser kök hücrelerindeki hepatositlerde yer alan hepatoblastların farklılaşmasını indüklemedeki etkisi incelenmiştir. OSM muamelesinin kök hücrelerle benzer özelliklere sahip hepatocellular karsinoma hücrelerinde hepatosit farklılaşmasını indüklediği belirtilmiştir. OSM'nin 5-FU ile kombine edilerek kullanılması durumunda in-vitro ortamda bulunan apoptotik hücre sayısında muazzam bir artış gözlenmiş, in vivo koşullarda ise tümör büyümesinin baskılandığı belirtilmiştir (Yamashita et al., 2010).

2.4.1.2. Bevacizumab (Altuzan®)

Damar oluşumunu olumlu yönde etkileyen en önemli faktörlerden biri Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dür. VEGF endotelial hücrelerin yaşamlarını devam ettirmelerini ve farklılaşabilmelerini sağlar. Normal dokularda VEGF gibi büyümeyi sitümüle eden moleküller, damar oluşumunun olağan seyrinde gerçekleşebilmesi için thrombospondin gibi anti-anjiyogenetik moleküllerle bir denge içinde çalışır. Ancak solid tümörlerde VEGF bol miktarda bulunur ve düzensiz, fonksiyonel olmayan damar oluşumuna neden olur. Tümör, kan damarlarının aktivitesini normalize etmek için ya VEGF molekülünün üzerine

bağlanan bir antikora ya da VEGF reseptörlerine bağlanan bir antikora VEGF molekülünün hücreleri uyarması sonucu engellenebilir (Forough, 2006).

VEGF inhibisyonu ile ilgili klinik öncesi çalışmalar, bir murinden elde edilen antihuman monoklonal antikora insan tümör ksenograflarında büyümeyi inhibe ettiğini göstermiştir. Bevacizumab isimli bu antikora insanlarda kullanılmak amacıyla saflaştırılmış ve çeşitli kanser tedavilerinde yerini almıştır. Günümüzde hala kullanılmakta olan Bevacizumab'ın, damar oluşumunu engelleyici etkisinin yanısıra tümör damarlanmasını engelleyerek kemoterapötiklerin etkilerini arttırdığı ve tümör iç basıncının azaltılmasında rol oynadığı tespit edilmiştir (Hurwitz et al., 2004).

Bevacizumab (Altuzan®), VEGF'nin, endotelial hücreleri yüzeyindeki Flt-1 ve KDR reseptörlerine bağlanmasını inhibe eden ve biyolojik aktivitesini nötralize ederek tümörlerin damarlanmalarını ve dolayısı ile tümörlerin büyümelerini yavaşlatan bir rekombinant hümanize monoklonal antikordur. Bevacizumab 214 amino asitten oluşmaktadır ve molekül ağırlığı yaklaşık 149.000 daltondur.

Bevacizumab, 5-FU/folinik asit veya 5-FU/folinik asit/irinotekan ile kombine olarak metastatik kolon ve metastatik rektum kanserinin birinci basamak tedavisinde kullanılır. Daha önceki basamaklarda Bevacizumab'ın kullanılmadığı durumlarda 5-FU/folinik asit veya 5-FU/folinik asit/irinotekan ile kombine olarak ikinci ve sonraki basamaklarda kullanılır.

Bevacizumab ile tedavi edilen hastalarda hipertansiyon insidansında bir artış gözlenmiştir. Klinik güvenilirlik verileri hipertansiyon insidansının doza bağımlı olabileceği izlenimini vermektedir. Bevacizumab yara iyileşme sürecini olumsuz etkileyebileceğinden büyük cerrahi operasyonlardan sonraki 28 gün içinde veya ameliyat yarası tamamen iyileşinceye kadar Bevacizumab tedavisi başlatılmamalı, tedavi sırasında yara iyileşmesinde komplikasyonlar yaşayan hastalarda, yara tamamen iyileşinceye kadar Bevacizumab uygulaması durdurulmalıdır.

Bevacizumab'ı kemoterapi ile birlikte veya kemoterapisiz alan hastalar üzerinde yapılan klinik çalışmalarda en sık gözlenen yan etkiler asteni, ishal, bulantı,

gastrointestinal perforasyonlar, hemoraji, arteriyel tromboemboli ve non–spesifik ağrılardır (<http://www.roche.com.tr>).

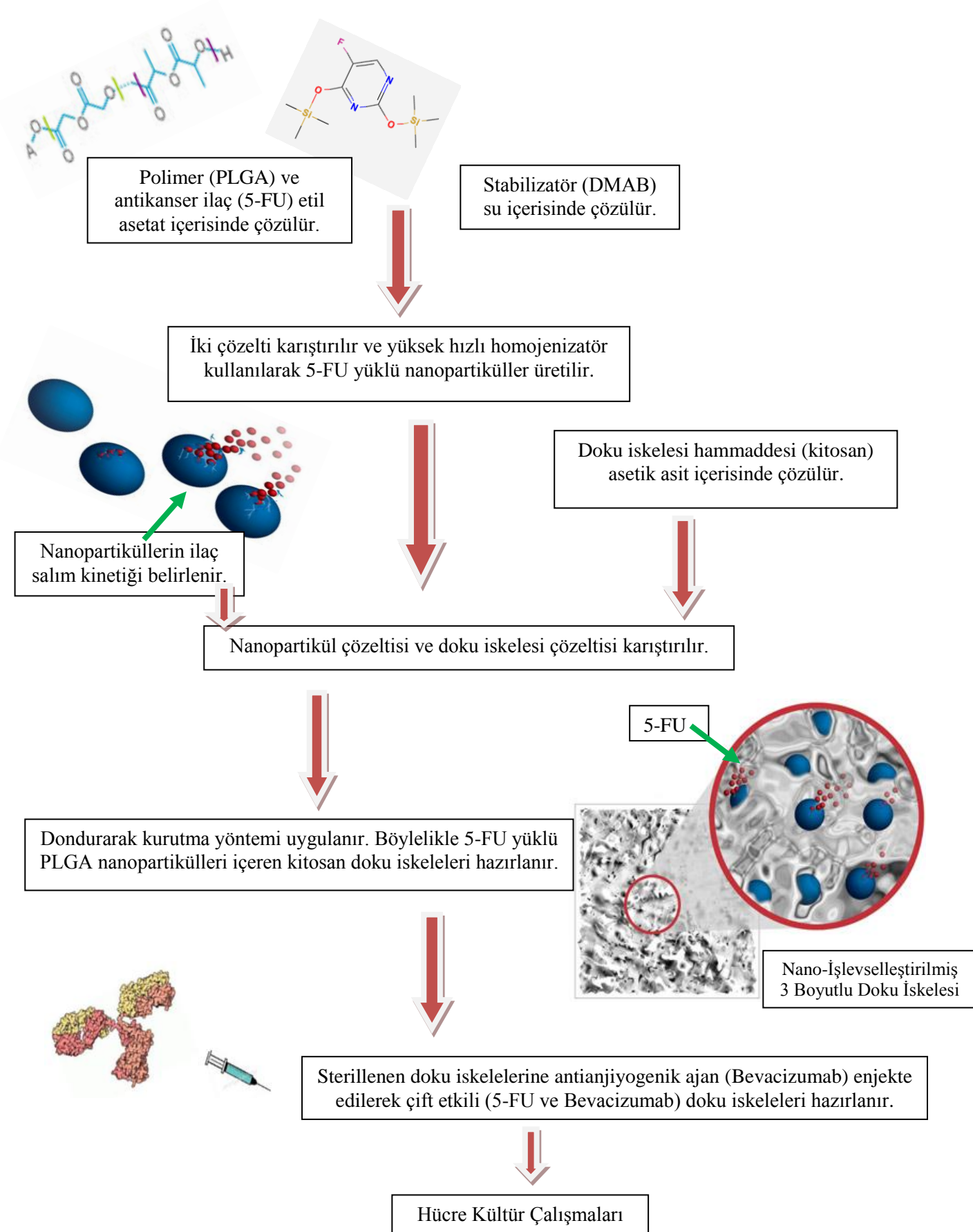
İnsan tümör hücre hattı aktarılan fındık fareleriyle yapılan deneylerde, Bevacizumab'ın tümör büyümesini inhibe ettiği, maksimum inhibisyon dozunun da haftada iki kez uygulanan 1-2 mg/kg olduğu belirtilmiştir. İnhibisyonun etkisi, tümör ksenograflarında bulunan fare VEGF'i miktarı ile ters orantılıdır. İnsan/fare VEGF oranı yüksek olan tümörlerde inhibisyon oranı %90'a kadar çıkabilmektedir.

Bevacizumab adına, 2004 yılında metastatik kolon kanserinin standart kemoterapisi için, 2008 yılında ise metastatik akciğer kanserinin tedavisinde kullanımı için FDA onayı alınmıştır (Forough, 2006).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ve kullanılan yöntemler özetlenmiştir. Öncelikle, PLGA nanopartiküllerin sentezi, partiküllere 5-FU yüklenmesi ve bu partiküllerle yapılan karakterizasyon çalışmaları anlatılmış, ardından partiküllerden salınan ilaç miktarı ve salım kinetikleri hakkında bilgi verilmiştir. Daha sonra kitosan doku iskelelerinin sentezi, bu iskelelere partiküllerin yerleştirilmesi, oluşan doku iskelesi-partikül kompleksinin görüntülenmesi ve iskelelere Bevacizumab yüklenmesi ile ilgili bilgiler aktarılmıştır. En son bölümde ise üretilen çift etkili sistemlerin, T98G hücreleri ve HUVEC'ler üzerindeki etkileri *in vitro* koşullarda incelenmiş ve elde edilen sonuçlar istatistiksel metodlar kullanılarak değerlendirilmiştir.

Tez kapsamındaki deneysel çalışmaların aşamaları Şekil 3.1'de şematik olarak açıklanmıştır.



Şekil 3.1. Deneysel çalışmaların akış şeması.

3.1 Malzemeler

Nanopartikül yapımında kullanılan poli-laktik-ko-glikolik asit (PLGA) kopolimerleri, partiküllere yüklenen 5-florourasil (5-FU), stabilizatör olarak kullanılan didodesildimetilamonyumbromür (DMAB) ve salım çalışmalarında kullanılan selüloz membran (molekül ağırlığı 12,000'den büyük maddeleri gözeneklerinden geçirmeyen) Sigma-Aldrich'den (Almanya) satın alınmıştır. Bileşimleri farklı olan PLGA kopolimerlerinden poli-laktik asit/poli-glikolik asit (PLA/PGA) oranı (w/w) 50:50 olan kopolimerin molekül ağırlığı 40,000-75,000 g/gmol; 65:35 olan kopolimerin ağırlığı 40,000-75,000 g/gmol ve 85:15 olan kopolimerin ağırlığı da 50,000-75,000 g/gmol'dür. Polimerler Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edilen etil asetat içerisinde çözülmüştür. Partikül üretimi sırasında Heidolph (Almanya) marka yüksek hızlı homojenizatör kullanılmıştır.

Doku iskelesi hammaddesi olarak kullanılan deasetilasyon derecesi >% 85 ve molekül ağırlığı 190–375 kD olan kitosan Sigma-Aldrich'ten satın alınmıştır ve çözücü olarak asetik asit (Riedel-de Haen) kullanılmıştır. Doku iskeleleri Christ (Almanya) marka dondurarak kurutma cihazında hazırlanmış ve etanol (Sigma) ile stabilize edilmiştir. Doku iskelelerine yerleştirilen nanopartiküllerin görüntülenmesinde kullanılan floresan 5(6) izotiyosiyanat (FITC), Fluka (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Damar oluşumunu engellemek amacıyla doku iskelelerine yüklenen Bevacizumab (Altuzan[®]), Roche (İsviçre) firması tarafından üretilmiştir.

Hem doku iskelesi üretiminde hem de hücre kültüründe kullanılan 24 gözlü Petri kapları Techno Plastic Products (İsviçre) firmasından alınmıştır. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan Dulbecco's fosfat tampon çözeltisi (DPBS), RPMI-1640 hücre kültür ortamı, fetal sığır serumu (FBS) ve Tripsin/EDTA çözeltisi Hyclone'dan (ABD) temin edilmiştir. MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), sodyum dodesil sülfat (SDS), DMEM-F12 hücre kültür ortamı ve penisilin-streptomisin Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Kullanılan 6 gözlü polistiren hücre kültür kapları Nunclon Delta Surface (Danimarka) firmasından; 75 cm²'lik hücre kültür kapları ise Orange Scientific'ten (Belçika) temin edilmiştir. Hücrelerin mitokondriyal aktivite tayinleri ASYS Hitech

UVM 340 Plate Reader (Avusturya) ile 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de yapılmıştır.

3.2. 5-FU İçeren PLGA Nanopartikül Sentezi

3.2.1. PLGA nanopartikül sentezi

Farklı PLA/PGA (85:15, 65:35 ve 50:50) bileşimlerine sahip PLGA kopolimerleri etil asetat içerisinde çözülerek %2'lik (w/v) organik faz oluşturulmuştur. Elde edilen organik faz, içerisinde %1 (w/v) oranında çözünmüş DMAB bulunan sulu faza ilave edilmiş ve oluşan karışım yüksek hızlı homojenizatörde 15,000 rpm'de karıştırılmıştır. Karışıma sıcak su eklenerek içerisinde bulunan organik fazın uçması beklenmiş ve sulu fazda süspansiyon halinde PLGA nanopartiküller elde edilmiştir.

3.2.2. PLGA nanopartiküllere ilaç yüklenmesi

Farklı konsantrasyonlarda 5-FU, PLGA kopolimeri ile birlikte etil asetat içerisinde çözülmüştür. Bölüm 3.2.1'de ayrıntılı bir biçimde anlatılan metod uygulanarak 5-FU/polimer oranı (w/w) %10-20 olan PLGA nanopartiküller üretilmiştir.

3.3. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmaları

3.3.1. Partikül büyüklüğü ölçümü

Üretildikten sonra sulu faz içerisinde muhafaza edilen PLGA nanopartiküllerin boy dağılımlarının ölçülebilmesi için, nanopartiküllerin bulunduğu çözelti 1:10 oranında seyreltilmiş ve Zetasizer (Nano series, İngiltere) ile partiküllerin boy dağılımlarının yanısıra moleküler ağırlıkları, agregasyon sayıları ve çapları belirlenmiştir.

3.3.2. FTIR analizi

5-FU içeren PLGA nanopartiküllerin kimyasal yapılarının belirlenebilmesi için partikül haline getirilmemiş PLGA polimerinin, DMAB'nin, 5-FU'nun, 5-FU içeren ve içermeyen (boş) PLGA nanopartiküllerin 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında FTIR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) ile spektrumları alınmıştır.

3.3.3. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

Sulu fazda bulunan boş ve 5-FU içeren PLGA nanopartiküller, analiz yapılacak yüzeye damlatılıp, kurutulduktan sonra altın-paladyum ile kaplanmış ve Zeiss marka (Evo-50, Almanya) taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

3.3.4. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi

Üretim sonrası sulu ortamda muhafaza edilen PLGA nanopartiküller, 1/100 oranında seyreltilip, homojenize edildikten sonra 100 mm²'lik cam yüzeylere damlatılmıştır. Işık altında kuruması beklenen partiküllerin iki ve üç boyutlu fotoğrafları AFM (Vecoo MultiMode V, Fransa) ile tıklama modunda (tapping mode) çekilmiştir.

3.4. PLGA Nanopartiküllerde 5-FU Enkapsülasyon Veriminin Hesaplaması ve Nanopartiküllerden İlaç Salımı

PLGA nanopartiküllerin, üretim esnasında ortamda bulunan 5-FU'nun ne kadarını enkapsüle edebildiği ve ne kadarlık zaman zarfında, partiküllerden ortama ne miktarda 5-FU salındığını analiz edebilmek amacıyla 3'er paralel örnek kullanılarak salım sistemleri hazırlanmıştır.

3.4.1. Enkapsülasyon veriminin hesaplanması

5-FU'nun nanopartiküllere enkapsülasyon verimliliği 2 farklı şekilde hesaplanmıştır:

İlk yöntemde enkapsülasyon çözeltisindeki başlangıç ilaç konsantrasyonu ve kapsülasyon sonrasındaki çözeltide kalan ilaç konsantrasyonu arasındaki fark ölçülmektedir. Söz konusu yöntem, içerisinde belli bir miktar nanopartikül bulunan ortamların santrifügasyonla yıkama sonrası süpernatantlarında bulunan 5-FU miktarının UV spektrofotometre (265 nm'de) yardımıyla hesaplanıp; toplam 5-FU miktarından çıkarılması esasına dayanmaktadır. Bu metot izlenerek hesaplanan 5-FU'nun ya partiküllere bağlandığı ya da partiküller tarafından enkapsüle edildiği söylenebilir.

PLGA nanopartiküllerin üretim sırasında ne kadar 5-FU'yu içlerine alabildiklerini hesaplamak amacıyla Eşitlik 3.1.'den yararlanılmıştır.

$$\% \text{ ilaç yüklemesi} = \frac{[\text{ortama eklenen 5-FU } (\mu\text{g}) - \text{yıkamayla uzaklaştırılan 5-FU } (\mu\text{g})]}{[\text{ortama eklenen 5-FU } (\mu\text{g})]} \times 100$$

(3.1.)

Enkapsülasyon veriminin hesaplanmasında kullanılan ikinci yöntemde ise nanopartiküller uygun çözücü içerisinde çözülerek kapsüle olan ilacın dışarıya alınması sağlanmış ve ardından HPLC ile miktar tayini yapılmıştır. Yöntemin ayrıntıları şöyledir:

İçerisinde 1 mg partikül bulunduğu hesaplanan ortam, 5-FU yüklenmiş PLGA nanopartikül stok çözeltisinden alınmış ve üzeri toplam hacim 1 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Sulu ortamda bulunan partiküller santrifüj edilmek suretiyle yıkanmış ve böylece enkapsüle olmayan ilaçlar partikül yüzeyinden uzaklaştırılmıştır. Yıkanan nanopartiküllerin üzerlerine 1'er mL distile su eklenmiş ve partiküller bir gece dondurarak kurutma cihazında -80°C 'de kurumaya bırakılmıştır. Liyofilize olan partiküllere 1'er mL diklorometan (DCM) eklenmiş ve üzerlerine de 5 mL 0.02 M fosforik asit ve metanolden (98:2 (v/v)) oluşan mobil faz ilave edilmiştir. Oluşan karışım 5 dakika boyunca vortekslenmiş ve karışımda bulunan DCM'in ortamdaki uzaklaştırılabilmesi amacıyla, karışım 5 dakika azot gazına maruz bırakılmıştır. Şeffaf ve homojen bir görünüm kazanan çözelti mobil fazla seyreltilmiş ve kalan safsızlıkların giderilmesi amacıyla $0.22 \mu\text{m}$ 'lik filtrelerden geçirilmiştir. Elde edilen çözelti farklı akış hızlarında HPLC cihazı (UltiMate 3000) C18 kolonuna beslenmiş ve 274 nm 'de, UV dedektör kullanılarak elde edilen spektrumlarla partiküllere ne kadar 5-FU yüklenebildiği hesaplanmıştır (Gupte and Çiftçi, 2004).

3.4.2. Salım sistemlerinin hazırlanması

Bölüm 3.4.1'de anlatılan yöntemle yıkanan 1 mg 5-FU yüklü PLGA nanopartikül, fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7.4) içerisinde önceden şartlanmış olan selüloz membranlara yerleştirilmiş ve bu membranlar da içerisinde 5 mL PBS (pH 7.4) bulunan rezervuarlara konmuştur (Şekil 3.2). İn-vitro salım çalışmaları 37°C 'de, çalkalamalı etüvde yürütülmüştür.



Şekil 3.2. PLGA nanopartikül içeren selüloz membranların yerleştirildiği PBS rezervuarlar.

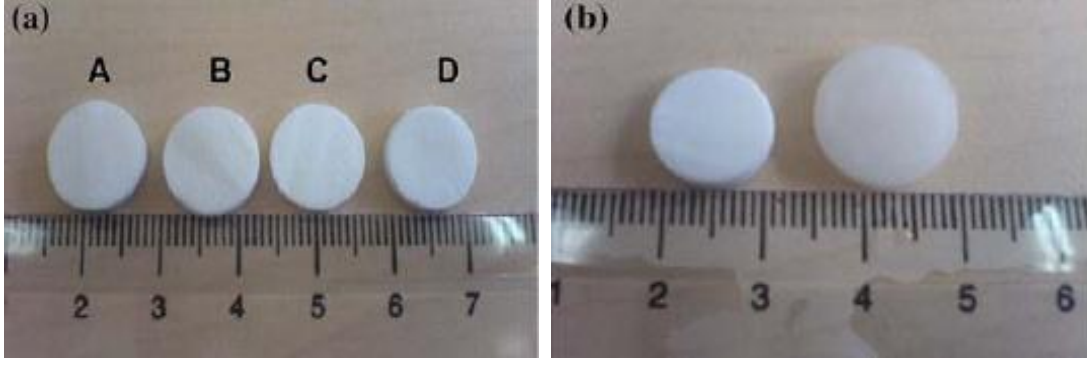
3.4.3. Salım sistemlerinden alınan örneklerin analizi

Hazırlanan salım sistemi rezervuarlarından belirli zaman aralıklarıyla alınan örnekler, 3'er paralel halinde 265 nm'de UV spektrofotometrede ölçülerek, partiküllerden ortama salınan kümülatif 5-FU miktarı hesaplanmıştır.

3.5. PLGA Nanopartikül İçeren ve İçermeyen (Boş) Kitosan Doku İskelelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

3.5.1. Boş kitosan doku iskelesi sentezi

>%85'lik deasetilasyon derecesine (DD) sahip kitosan, 0.2 M asetik asit çözeltisinde çözüne kadar karıştırılarak, %2 (w/v) konsantrasyona sahip kitosan jel karışımları elde edilmiştir. Elde edilen kitosan jel karışımları, safsızlıkların giderilmesi için filtreden (0.45 µm) geçirilmiş ve 1.5 cm çapa sahip 24 gözlü Petri kaplarına aktararak -20°C'de dondurulmuştur. Bu işlemi takiben "dondurarak kurutma" (freeze-drying) yöntemi ile gözenekli kitosan doku iskeleleri hazırlanmıştır. Bu yöntemle, -20°C'de donmuş kitosan çözeltisi, -80°C'de 3 gün süreyle liyofilize edilmiş, böylece gözenekli yapıda ve içsel bağlantıları olan, 9 mm çaplı ve 2 mm kalınlığa sahip kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir (Şekil 3.3). Elde edilen kitosan doku iskelelerinin stabilizasyonu için iskeleler önce %96'lık (v/v) etanol çözeltisi içerisinde 1 gün, sonrasında ise %70'lik (v/v) etanol çözeltisi içerisinde 2 saat bekletilmiştir.



Şekil 3.3. (a) Liyofilize edilen kitosan doku iskelelerinin genel görünümü, (b) stabilize edilmiş ve şişmiş doku iskeleleri (Tıǧlı et al., 2007).

3.5.2. Boş kitosan doku iskelesi karakterizasyonu

Üretilen doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları önceden grubumuz tarafından yapılmış olup (Tıǧlı et al., 2007), tez çalışması kapsamında sadece gözeneklilik testi uygulanmıştır. Doku iskelelerinin gözenekliliği, sıvı değişimi (liquid displacement) yöntemi ile belirlenmiştir (Zhang and Zhang, 2001). Değişim sıvısı olarak, iskele şişmesine ya da büzülmesine neden olmayan n-hekzan kullanılmıştır. Doku iskelesi, 5 dakika bilinen hacimdeki n-hekzan içerisine daldırılmış ve hekzan emdirilmiş iskelenin hacmi V_2 olarak kaydedildikten sonra iskele içerisine girmeden kalan hekzan hacmi V_3 olarak kaydedilmiştir. Malzemenin toplam hacmi (V) 3.2. numaralı eşitlikte verilmiştir:

$$V = (V_2 - V_1) + (V_1 - V_3) = V_2 - V_3 \quad (3.2.)$$

Eşitlikte $V_2 - V_1$, polimer yapının hacmini, $V_1 - V_3$ ise doku iskelesi içerisindeki hekzan hacmini vermektedir. Yapının gözenekliliği (ϵ), 3.3. numaralı eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\epsilon (\%) = (V_1 - V_3) / (V_2 - V_3) \times 100 \quad (3.3.)$$

3.5.3. PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelesi sentezi ve karakterizasyonu

Sulu fazdaki PLGA nanopartiküller, 30:70 nanopartikül/kitosan (w/w) oranında %2'lik kitosan jel karışımına eklenmiş ve 1 gece boyunca karıştırma işlemi devam

etmiştir. Oluşan homojen karışımdan, Bölüm 3.4.1.'de anlatılan yöntem kullanılarak PLGA yüklü kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir.

3.5.3.1. FTIR analizi

PLGA nanopartiküllerin kitosan doku iskelelerine yüklendiklerini göstermek amacıyla nanopartikül içeren ve içermeyen (boş) doku iskelelerinin 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında FTIR (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) ile spektrumları alınmış ve karşılaştırılmıştır.

3.5.3.2. Floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenen nanopartiküllerin görüntülenmesi

Doku iskelelerine yüklenmiş olan PLGA nanopartiküllerin görüntülenebilmesi için floresan bir boya olan FITC, PLGA üzerindeki terminal grupların, diyaliz tüp selüloz membran tekniği ile işaretlenmesi için kullanılmıştır. Etil asetat içerisindeki %2'lik polimer çözeltisinin (w/v) her bir mL'si için ortama dimetil sülfoksit (DMSO) içindeki %0.1'lik 1 mL FITC çözeltisinden (w/v) eklenmiş ve oluşan yeni çözelti oda sıcaklığında 3 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 3 saatin sonunda çözelti, içerisinde %1 (w/v) oranında çözünmüş DMAB bulunan sulu faza eklenmiş ve oluşan karışım yüksek hızlı homojenizatörde 15,000 rpm'de karıştırılmıştır. Karışıma sıcak su eklenerek içerisinde bulunan etil asetatın uçması için bir gece beklenmiş, süre sonunda karışım önceden şartlanmış olan selüloz membranlara aktarılarak 2 gün boyunca diyaliz edilmiştir. FITC işaretli 5-FU içeren PLGA nanopartiküller, hem üretim aşamasındaki kitosan jellere farklı oranlarda eklenmiş hem de üretilmiş olan kitosan doku iskelelerine emdirme yoluyla yerleştirilmiştir. Kitosan doku iskeleleri içerisindeki floresan işaretli PLGA nanopartiküller, floresan mikroskobu (Olympus, ABD) ile görüntülenmiştir.

3.5.3.3. SEM ile görüntüleme

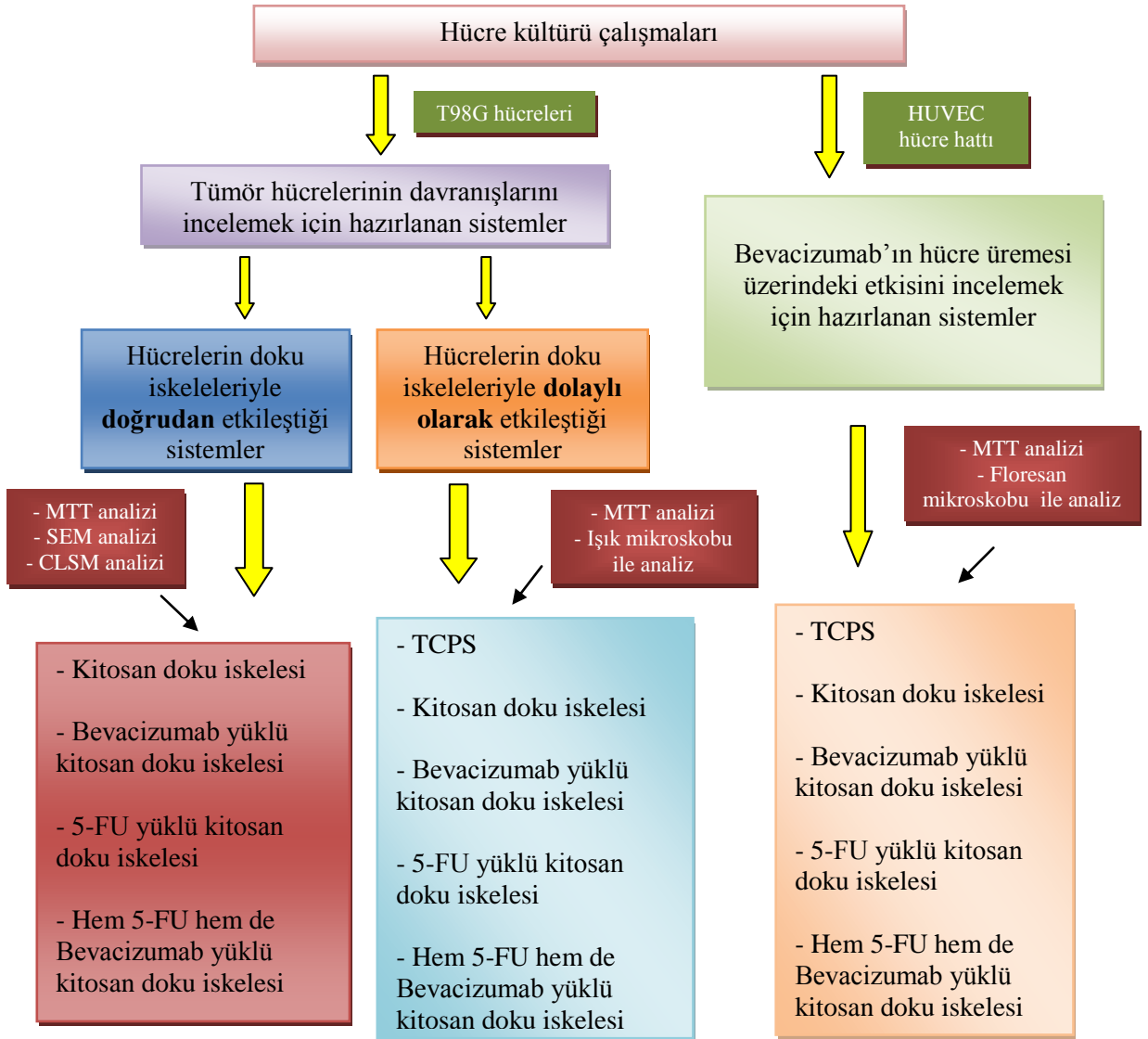
PLGA içeren kitosan doku iskelelerinden alınan kesitler altın-paladyum ile kaplanmış ve Zeiss (Evo-50, Almanya) taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir.

3.5.4. Kitosan doku iskelelerine Bevacizumab yüklenmesi

Doku iskelelerine yüklenmesi gereken optimum Bevacizumab miktarının ve yönteminin belirlenmesi için T98G hücreleri ve HUVEC'lerle çalışılmıştır. 0.25 mg/mL stok çözeltilerden alınan farklı miktarlardaki Bevacizumab çözeltileri, doku iskelelerine enjekte edilmek veya doğrudan besi ortamına eklenmek suretiyle hücrelerle etkileştirilmiş ve elde edilen sonuçlar çift etkili sistemler oluşturulurken kullanılmıştır.

3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez kapsamında yapılan hücre kültürü çalışmalarının aşamaları Şekil 3.4'te şematik olarak açıklanmıştır.



Şekil 3.4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan gruplar.

3.6.1. T98G hücrelerinin karakterizasyon çalışmaları

İstanbul Üniversitesi'nde Prof. Dr. Ayhan Bilir'in yönetimindeki histoloji ve embriyoloji laboratuvarından edinilen 6. pasajdaki T98G hücre hattı, %10 (v/v) fetal sığır serumu ve %1 antibiyotik içeren DMEM-F12 hücre ortamı kullanılarak, hücre kültür kaplarında çoğaltılmış ve 37°C'deki %5 CO₂ içeren etüvde (Heraeus Instruments, Almanya) kültüre edilmiştir. Tek tabaka halinde elde edilen hücreler yüzeyden %0.01 tripsin/10 mM EDTA ile kaldırılmış, santrifüjlenip hücre ekimi için tekrar süspansiyon edilmiştir. Tüm örnekler için, ortam, her üç günde bir veya pH'ın düşmesine bağlı olarak gerekli görüldüğü takdirde yarı yarıya taze besi ortamıyla değiştirilmiştir.

3.6.1.1. MTT analizi

MTT çalışmaları için, 24 gözlü kültür kaplarının her bir gözüne 1 mL, 3x10⁴ hücre/mL konsantrasyonunda hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. 1 haftalık kültürasyon boyunca hergün hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış, 24 gözlü kabın her bir gözüne 60 µL MTT (2.5 mg/mL, PBS içerisinde) ve 600 µL taze ortam eklenmiştir. Örnekler, 37°C'de 3 saat bekletildikten sonra, üzerlerinde bulunan MTT içeren ortam uzaklaştırılmış ve her göze 400 µL 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek oluşan mor formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözelti 96-gözlü ELISA pleytine aktarılmış (200 µL/göz) ve pleyt okuyucu kullanılarak 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.6.1.2. Hücre sayımı

Hücre sayım testleri 6 gözlü polistiren kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için, 6 gözlü kültür kabının her bir gözüne 3x10⁴ hücre/mL konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. 1 haftalık kültürasyon boyunca hergün 3 gözdeki hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler tripsinize edilmiştir. Hücreler tamamen kalktıktan sonra, elde edilen hücre süspansiyonu tripan mavisi ile boyanmış ve Neubauer lamı kullanılarak canlı hücrelerin hemositometrik sayımı yapılmıştır.

3.6.1.3. Floresan mikroskobu ile analiz

Petri kaplarındaki (3.5 cm çaplı) hücre iskeleti organizasyonu kültürün 2., 4. ve 6. günlerinde değerlendirilmiştir. Hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra PBS (pH 7.4) içerisinde hazırlanmış % 2.5 (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile 10 dakika muamele edilmiştir. Bu şekilde gerçekleştirilen fiksasyon işleminden sonra, % 0.1 Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 5 dakika boyunca muamele edilerek hücre membran geçirgenliği artırılmıştır. Hücrelerin filamentöz aktinleri (F-aktin), Bovine Serum Albumin (BSA)/PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmış % 2.5'lik (v/v) Alexa Fluor 488 phalloidin ile 20 dakika, hücre çekirdeği ise 10 µg/mL propidyum iyodür ile 5 dakika muamele edilerek boyanmıştır. Örnekler floresan mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir.

3.6.1.4. Kristal viyole ile boyama

Hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasına dair bilgiler elde etmek amacıyla kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde, hücreler kristal viyole ile boyanmıştır. Görüntüleme yapılacak günler 6 gözlü polistiren kültür kaplarının 3 gözüne ekilen hücrelerin üzerindeki kültür ortamları uzaklaştırılmış ve hücreler 2 defa PBS ile yıkanmıştır. 1 kısım PBS + 1.5 kısım metanol karışımı ile hücrelerin yıkama ve ön fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon için hücreler 10 dakika metanolla muamele edildikten sonra gözlere hücre yüzeyleri kaplanacak kadar kristal viyole boyası eklenerek 5 dakika bekletilmiştir. Akan suyun altında boya kalıntıları tamamen uzaklaşmaya kadar yıkama yapılmış ve hücreler invert mikroskop altında incelenmiştir.

3.6.2. T98G hücrelerinin ekileceği kitosan doku iskelesine yüklenecek Bevacizumab miktarının ve yükleme şeklinin belirlenmesi

3.6.2.1. MTT analizi

T98G hücrelerinin, 7 günlük kültürü süresince Bevacizumab'ın serbest halde ortama verildiği ya da doku iskelesine enjekte edildiği gözlerdeki üreme testleri 1., 3., 5., ve 7. günlerde kantitatif olarak, Bölüm 3.5.1.1'de ayrıntılı bir biçimde anlatılan yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.5.1.1'de yer alan yönteme ek olarak kitosan doku iskelelerindeki formazan kristallerinin daha kolay çözünmesi için gözlere %10 luk (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi

eklenmiştir. Bevacizumab içermeyen kitosan doku iskeleleri bulunan gözler kontrol olarak kullanılmış ve MTT bu örneklere de uygulanmıştır.

3.6.2.2. SEM analizi

Hücrelerin iskele içerisindeki morfolojileri kültürün 3. ve 5. günlerinde taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. İskeleler PBS ile yıkandıktan sonra hücreler PBS (pH 7.4) içerisinde hazırlanan % 2.5'lük (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile oda sıcaklığında, 10 dakika fikse edilmiştir. Sonrasında iskeleler etanol çözeltileri (% 30, % 50, % 70, % 90 ve % 96 (v/v)) içerisinde dehidre edilmiştir. Örnekler hekzametildisilazan ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılmıştır. İskeleler taramalı elektron mikroskobu ile incelenmeden önce altın-paladyumla kaplanmıştır.

3.6.3. T98G hücreleri ve çift etkili kitosan doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar

Hazırlanan çift etkili (hem 5-FU, hem de Bevacizumab içeren) sistemin T98G hücre hattı üzerindeki etkisinin gözlenebilmesi için hücreler doğrudan ve dolaylı olarak, partikül ve Bevacizumab içeren ve içermeyen doku iskeleleriyle 24 gözlü hücre kültür kaplarında etkileştirilmiştir.

3.6.3.1. Hücrelerin doku iskeleleriyle doğrudan etkileşimi

Parafilm ile kaplanmış 24 gözlü Petri kapları %96'lık alkolle muamele edildikten sonra UV ışık altında 30 dakika sterilizasyon için bekletilmiştir. 9 mm çapa, 2 mm kalınlığa sahip kitosan doku iskelelerinin otoklav ile 121°C'ta 15 dakikada veya etilen oksit fırını (Eto) ile sterilizasyonu gerçekleştirildikten sonra iskeleler, 24 saat steril Dulbecco's PBS içerisinde bekletilmiştir. Bir kez de serumsuz besi ortamı ile yıkanan doku iskelelerine, konsantrasyonu 2.8×10^4 hücre/mL olacak şekilde hücre ekilmiş ve 2 saat sonra üzerlerine 1'er mL besiyeri eklenmiştir.

3.6.3.2. Hücrelerin doku iskeleleriyle dolaylı etkileşimi

24 gözlü Petri kaplarına konsantrasyonu 2.8×10^4 hücre/mL olan hücreler ekilmiş ve yüzeye tutunmaları için 2 saat beklendikten sonra kapların her bir gözüne kitosan doku iskeleleri yerleştirilmiştir. Çalışmada kontrol olarak doku iskelesi içermeyen Petri kapları (TCPS) kullanılmıştır.

3.6.3.3. MTT analizi

Hücrelerin doku iskeleleri ile dolaylı olarak etkileştirildiği grup 10 gün, hücrelerin doğrudan doku iskelelerine ekildiği grup ise 21 gün süresince kültüre edilmiştir. Kültür sürelerince iskele ve Petri kaplarındaki hücrelerin üreme testleri 1., 3., 7., 10., 15. ve 21. günlerde kantitatif olarak, Bölüm 3.6.1.1'de ayrıntılı bir biçimde anlatılan yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.6.1.1'de yer alan yönteme ek olarak kitosan doku iskelelerindeki formazan kristallerinin daha kolay çözünebilmesi için gözlere %10 luk (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi eklenmiştir. Hücrelerin doku iskeleleriyle dolaylı etkileştiği denemelerde ise MTT analizi 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerde yapılmış, analiz esnasında hücrelerin üzerindeki besi ortamının tamamının uzaklaştırılmasının yanı sıra üzerlerinde bulunan doku iskeleleri de ortamdaki uzaklaştırılmış ve hücrelere Bölüm 3.6.1.1'de anlatılan yöntem uygulanmıştır. 5-FU ve Bevacizumab içermeyen doku iskelelerinin yer aldığı gözler kontrol olarak kullanılmış ve MTT bu örneklerle de uygulanmıştır.

3.6.3.4. SEM analizi

Doğrudan doku iskeleleri ile etkileştirilen hücrelerin kültürün 8. gününde iskele içerisindeki morfolojileri, Bölüm 3.6.2.2'de ayrıntılı bir biçimde anlatılan yöntem kullanılarak, taramalı elektron mikroskopisi ile incelenmiştir.

3.6.3.5. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) analizi

5-FU içeren/içermeyen ve Bevacizumab içeren/içermeyen kitosan doku iskelelerinden oluşan sistemlere ait 8. ve 15. gün örnekleri CLSM ile incelenmiştir. Örnekler, 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra PBS (pH 7.4) içerisinde hazırlanmış % 2.5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile 10 dakika fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra, % 0.1 Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 5 dakika boyunca muamele edilerek hücre membran geçirgenliği artırılmıştır. Hücrelerin filamentöz aktinleri (F-aktin), BSA/PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmış % 2.5'lik (v/v) Alexa Fluor 488 phalloidin ile 20 dakika, hücre çekirdeği ise 10 µg/mL propidyum iyodür (Sigma, ABD) ile 5 dakika muamele edilerek boyanmıştır. Örnekler Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan konfokal lazer taramalı mikroskopu (CLSM, Zeiss LSM 510, Germany) kullanılarak incelenmiştir.

3.6.3.6. Invert mikroskop ile analiz

Hücre kültür kabı yüzeyine ekilerek, kitosan doku iskeleleriyle dolaylı olarak etkileştirilen hücrelerin, 3. ve 5. günlerde optik mikroskop (Olympus, ABD) ile fotoğrafları çekilmiştir. Görüntü alınmadan önce 24 gözlü kültür kabında bulunan hücrelerin üzerlerindeki kitosan doku iskeleleri alınmış, bulanıklığa neden olan hücre ortamları gözlerden uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerlerine PBS eklenerek fotoğraf çekimi yapılmıştır.

3.6.4. HUVEC'lerin karakterizasyon çalışmaları

Human Umbilical Vein Endothelial Cell'ler (HUVEC), %10 fetal sığır serumu ve %1 antibiyotik içeren RPMI-1640 hücre ortamı kullanılarak, hücre kültür kaplarında çoğaltılmış ve 37°C'deki %5 CO₂ içeren etüvde kültüre edilmiştir. Tek tabaka halinde elde edilen hücreler yüzeyden % 0.005 tripsin/10 mM EDTA ile kaldırılmış, santrifüjlenip hücre ekimi için tekrar süspansiyon edilmiştir. Tüm örnekler için, ortam, her üç günde bir veya pH'ın düşmesine bağlı olarak gerekli görüldüğü takdirde yarı yarıya taze besi ortamıyla değiştirilmiştir.

3.6.4.1. MTT analizi

MTT çalışmaları için, 24 gözlü kültür kaplarının her bir gözüne 1 mL, 4x10⁴ hücre/mL konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. 1 haftalık kültürasyon boyunca hergün Bölüm 3.6.1.1'de ayrıntılı bir biçimde anlatılan MTT yöntemi kullanılarak hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri takip edilmiştir.

3.6.4.2. Hücre sayımı

Hücre sayım testleri 6 gözlü polistiren kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için, 6 gözlü kültür kabının her bir gözüne 4x10⁴ hücre/mL konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. 1 haftalık kültürasyon boyunca hergün Bölüm 3.6.1.2'de yer alan yöntem kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

3.6.4.3. Floresan mikroskopu ile analiz

Petri kaplarındaki (3.5 cm çaplı) hücre iskeleti organizasyonu, kültürün 2., 4. ve 6. günlerinde Bölüm 3.6.1.3.'te ayrıntılı bir biçimde anlatılan yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.6.4.4. Kristal viyole ile boyama

Hücrelerin çekirdek ve stoplazmasına dair bilgiler elde etmek amacıyla kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde, hücreler Bölüm 3.6.1.4'te yer alan yöntem kullanılarak invert mikroskop (Olympus, ABD) altında incelenmiştir.

3.6.5. HUVEC'lerin ekileceği kitosan doku iskelesine, yüklenecek Bevacizumab miktarının ve yükleme şeklinin belirlenmesi

3.6.5.1. MTT analizi

7 günlük kültür süresince Bevacizumab'ın serbest halde ortama verildiği ya da doku iskelesine enjekte edildiği gözlerdeki hücrelerin üreme testleri, 1., 3., 5., ve 7. günlerde Bölüm 3.6.1.1'de ayrıntılı olarak anlatılan yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bevacizumab içermeyen kitosan doku iskeleleri bulunan gözler kontrol olarak kullanılmış ve MTT bu örneklerle de uygulanmıştır.

3.6.5.2. Kristal viyole ile boyama

Hücreler çekirdek ve sitoplazmalarına dair bilgi elde etmek amacıyla kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde, Bölüm 3.6.1.4'te anlatılan yöntem uygulandıktan sonra invert mikroskop altında incelenmiştir.

3.6.6. Çift etkili kitosan doku iskelelerine ekilen HUVEC'lerle yapılan çalışmalar

Hazırlanan çift etkili (hem 5-FU, hem de Bevacizumab içeren) sistemin HUVEC'ler üzerindeki etkisinin gözlenebilmesi için 24 gözlü Petri kaplarının her bir gözüne ekilen 4×10^4 hücre/mL hücre, dolaylı olarak; partikül ve Bevacizumab içeren ve içermeyen doku iskeleleriyle etkileştirilmiştir.

3.6.6.1. MTT analizi

10 günlük kültür süresince Bevacizumab'ın serbest halde ortama verildiği ya da doku iskelesine enjekte edildiği gözlerdeki hücrelerin üreme testleri 1., 3., 5., 7. ve 10. günlerde, Bölüm 3.6.1.1'de ayrıntılı olarak anlatılan yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bevacizumab içermeyen kitosan doku iskeleleri bulunan gözler ile doğrudan Petri yüzeyine ekilen hücreler kontrol olarak kullanılmış ve MTT bu örneklerle de uygulanmıştır.

3.6.6.2. Kristal viyole ile boyama

Kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde 5 cm'lik Petri kaplarındaki hücrelerin hücre içi organizasyonları Bölüm 3.6.1.4'te yer alan yöntem kullanılarak incelenmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

Tüm deneysel veriler, üç paralel şekilde yürütülen üç benzer deneyin gösterimi olarak \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz, SPSS 11.5 versiyon yazılımında, kullanılan sistemleri ikili gruplar halinde birbirleriyle kıyaslamak için eşleştirilmiş iki grup t-testi ve tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) ile çoklu karşılaştırma için Tukey's post hoc testinin birlikte kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Çalışmanın bu bölümünde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerinde tartışmalar yapılmıştır. Öncelikle, PLGA nanopartiküllerin seçimi ve hazırlanmasına yer verilmiş, ardından 5-FU yüklü PLGA nanopartiküllerin ve PLGA nanaopartikül yüklü doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmalarının sonuçları tartışılmıştır. İlerleyen bölümlerde PLGA nanopartiküllerden ve doku iskelelerinden 5-FU salım kinetiği açıklanmıştır. Ardından çalışmada kullanılan HUVEC ve T98G hücreleri ile yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonuçları sunulmuştur. En son kısımda ise bu hücrelerin Bevacizumab ve/veya 5-FU içeren ve içermeyen doku iskeleleriyle farklı şekillerde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen bulgulara yer verilmiştir.

4.1. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartikül üretiminde hammadde olarak Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'nce (FDA) onaylanmış bir sentetik polimer olan PLGA kullanılmıştır. PLGA, oldukça yavaş bir biçimde bozunarak vücutta şeker metabolizmasının bir ara ürünü olan laktik asite dönüştüğü için normal hücre fonksiyonlarını etkilememektedir (Panyam and Labhasetwar, 2003). PLGA, farklı son ürünlerin sentezlenmesinde kullanılabilen, uygulamalarda esneklik sağlayabilen, farklı polimerlerle kompozit oluşturabilen, graft kopolimer olarak kullanılabilen ve birbiri ile bağlantılı gözenekler oluşturabilen bir kopolimerdir. En çok kullanılan bileşimi olan 50:50 (PLA/PGA) PLGA kopolimeri, 50-60 gün içerisinde bozunmaktadır. PLGA kopolimerinin diğer kombinasyonları ise (65:35, 75:25 ve 85:15) (PLA/PGA) daha uzun bozunma sürelerine sahiptirler (Mundargi et al., 2008). Sunulan tez çalışmasında sahip oldukları özellikler nedeniyle 3 farklı bileşimdeki (65:35, 75:25 ve 85:15) PLGA kopolimerleri kullanılmıştır.

Emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği nanopartikül üretiminde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, polimer bir organik çözücü içerisinde çözüldükten veya dağıtıldıktan sonra elde edilen çözelti başka bir yerde hazırlanan sulu çözelti ile karıştırılır (Soppimath et al., 2001; Perez et al., 2002). Ortamda bulunan organik çözelti buharlaştıktan sonra partiküller buldukları çözülden alınabilir. Karıştırma hızı, partikül büyüklüğünü kontrol etmek için kullanılan en önemli

parametredir. Söz konusu yöntem hem kolay olması, hem farklı birçok maddeye uygulanabilir olması, hem de yüksek verimli sonuçlar elde edilebilmesi nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (Silva et al., 2007). Bu nedenler göz önüne alınarak yapılan çalışmada da emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği ile PLGA nanopartikül üretimi gerçekleştirilmiştir.

Yüksek hızlı homojenizatör, sahip olduğu uca bağlı olarak dakikada çok yüksek dönüşlere (rpm) kadar çıkabilen ve bu nedenle de nanopartikül üretiminde tercih edilen bir ekipmandır. Zheng ve arkadaşları SiO₂ nanopartikül üretirken yüksek hızlı homojenizatör kullanmanın göreceli olarak daha küçük boy ve boy dağılımında partikül oluşumunu sağladığını belirtmişlerdir (Zheng et al., 2003). Literatürde homojenizatör hızının nanopartikül boyutunu doğrudan etkilediği belirtilmiştir. Homojenizatörün hızı arttırıldıkça birim zamanda daha çok kayma gerilimine maruz kalan partiküllerin boyutları küçülmekte, dolayısıyla oldukça küçük boyda nanopartiküller elde edilebilmektedir (Lee et al., 2004). Bu veriler ışığında, tez çalışmasında yüksek hızlı homojenizatör kullanılmış ve 15,000 rpm'de 5 dak. karıştırma yapılarak nanometre boyutunda partiküller üretilmiştir.

Nanopartikül üretiminde homojen partikül boyutu eldesi için genellikle poli (vinil alkol) (PVA) gibi stabilizatörler kullanılmaktadır ancak kullanılan stabilizatörlerin oluşan partikül yüzeyinden uzaklaştırılması oldukça zordur. Yüzeyden uzaklaştırılmayan stabilizatörün, biyolojik sistemlerde toksik etkiye neden olması ve polimerin bozunma rejimini etkilemesi nedeniyle stabilizatör veya yüzey aktif madde kullanılmaksızın nanopartikül üretimi tercih edilmektedir (Mundargi et al., 2008).

Didodesildimetilamonyumbromür (DMAB), katyonik dördüncül amonyum yüzey aktif maddeleri sınıfına ait çift zincirli bir yapıdır. PLGA nanopartikül üretilen bir çalışmada DMAB ve PVA'nın partikül büyüklüğüne etkisine bakılmış ve DMAB'nin bulunduğu çözeltilerdeki nanopartiküllerin daha küçük boyuta sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca DMAB konsantrasyonunun tek başına enkapsülasyon verimine ve partikül büyüklüğüne anlamlı bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Stabilizatör konsantrasyonundan çok tipinin, partikül büyüklüğü ve Zeta potansiyeline etki ettiği sonucuna varılmıştır (Hariharan et al., 2006).

Sunulan tez çalışması beyin tümörlerinin tedavisine yönelik olduğu için PLGA nanopartiküllerce enkapsüle edilip tümörlü doku bölgesine yerleştirilmek amacıyla hidrofilik ve antimetabolik bir terapötik olan 5-Florourasil (5-FU) tercih edilmiştir. Çünkü 5-FU, kan-beyin engelinden kolaylıkla ve yüksek bir oranda geçemeyen ve antikanser aktivitesi yönlendirilmiş uygulamalarla arttırılabilen, aynı zamanda da güçlü radyoaktif duyarlılığı olan bir ilaçtır (Menei et al., 1999).

Çalışmada kullanılan 5-FU'nun enkapsülasyon işlemi nanopartiküllerin hazırlanması sırasında yapılmıştır. İlgili literatür incelendiğinde, PLGA nanopartiküllerle peptid veya protein enkapsülasyonu için genellikle üç ana metod uygulandığı görülmektedir: su-yağ-su (w/o/w) emülsiyon tekniği, faz ayırma tekniği ve sprey kurutma tekniği (Freitas et al., 2005). Ayrıca peptid veya proteinlerin PLGA içeren bir organik çözeltide veya su-yağ (w/o) fazlı sulu emülsiyon çözeltisinde yer aldığı proseslerde yüksek hızlı homojenizatör veya ultrasound kullanılarak enkapsülasyon gerçekleştirilmektedir. Nanopartiküllere ilaç yüklemek için ise ilaçlar ya önceden hazırlanmış nanopartiküllerin buldukları çözeltilere ya da polimerizasyon esnasında doğrudan reaksiyon çözeltisine eklenir. İki metod da nanopartiküllere ilaçların farklı biçimlerde yüklenmesi ile sonlanır. Bunlar: 1) polimer içinde katı halde ilaç (Yalabık-Kaş et al., 1986; Kreuter, 1983), 2) katı kolloid nanopartiküllerin içinde disperse olmuş ilaç (Harmia et al., 1986), 3) partikül yüzeyine adsorbe olmuş ilaç (Berg et al., 1986), 4) polimere kimyasal bağlı ilaç (Kopf et al., 1977), 5) hiçbir bağın ya da birleşmenin olmadığı durumlar (Ringe et al., 2004) şeklinde sıralanabilir.

Literatürde, farklı PLA/PGA (85:15, 65:35 ve 50:50) bileşimlerine sahip PLGA kopolimerlerinden emülsiyon-çözücü-buharlaştırma yöntemiyle hazırlanan boş ve 5-FU içeren nanopartiküllerin üretiminde kullanılan DMAB'nin, partiküllerin boy dağılımlarını dar bir aralıkta tuttuğu, yüksek hızlı homojenizatörün ise partikül boyutlarının küçük olmasını sağladığı belirtilmiştir (Mittal ve ark., 2007).

Yapılan karakterizasyon çalışmalarında üretilen partiküllerin, hem kimyasal hem de fiziksel yapılarının literatürde yer alan sonuçlarla uyumlu olduğu saptanmıştır.

4.2. PLGA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.2.1. Boy ve boy dağılımı

Yukarıda açıklanan koşullarda üretilen boş ve 5-FU yüklü PLGA nanopartiküllerin boy ve boy dağılımları sırasıyla Çizelge 4.1 ve 4.2'de verilmiştir. Çizelgelerdeki verilerden anlaşılacağı üzere, üretilen nanopartiküllerin boyutlarının kullanılan PLGA kopolimerinin bileşimine bağlı olarak büyük farklılıklar göstermediği, ancak 50:50 PLA/PGA oranına sahip PLGA kopolimerinden üretilen nanopartiküllerin çoklu dağılım endekslerinin (PDI) daha düşük olduğu gözlenmiştir (PDI'nın korelasyonu 0'a göre yapılmıştır. Bu değer in sıfıra yakın olması partiküllerin eş boy dağılımını göstermektedir). Bu sonuçlar 50:50 PLA/PGA oranına sahip PLGA kopolimerinden üretilen partiküllerin boyutlarının oldukça dar bir aralıkta değiştiğini ifade etmektedir. Ayrıca Çizelge 4.1 ve 4.2 karşılaştırıldığında ilaç yüklenen partiküllerde gözlenen boyut artışının ihmal edilebilecek seviyede olduğu görülmektedir. Bu durum literatürdeki verilerle de uyum içerisindedir (Mittal et al., 2007).

Çizelge 4.1. Farklı bileşimlerdeki PLGA kopolimerlerinden üretilen boş (5-FU içermeyen) nanopartiküllerin boy ve boy dağılım değerleri.

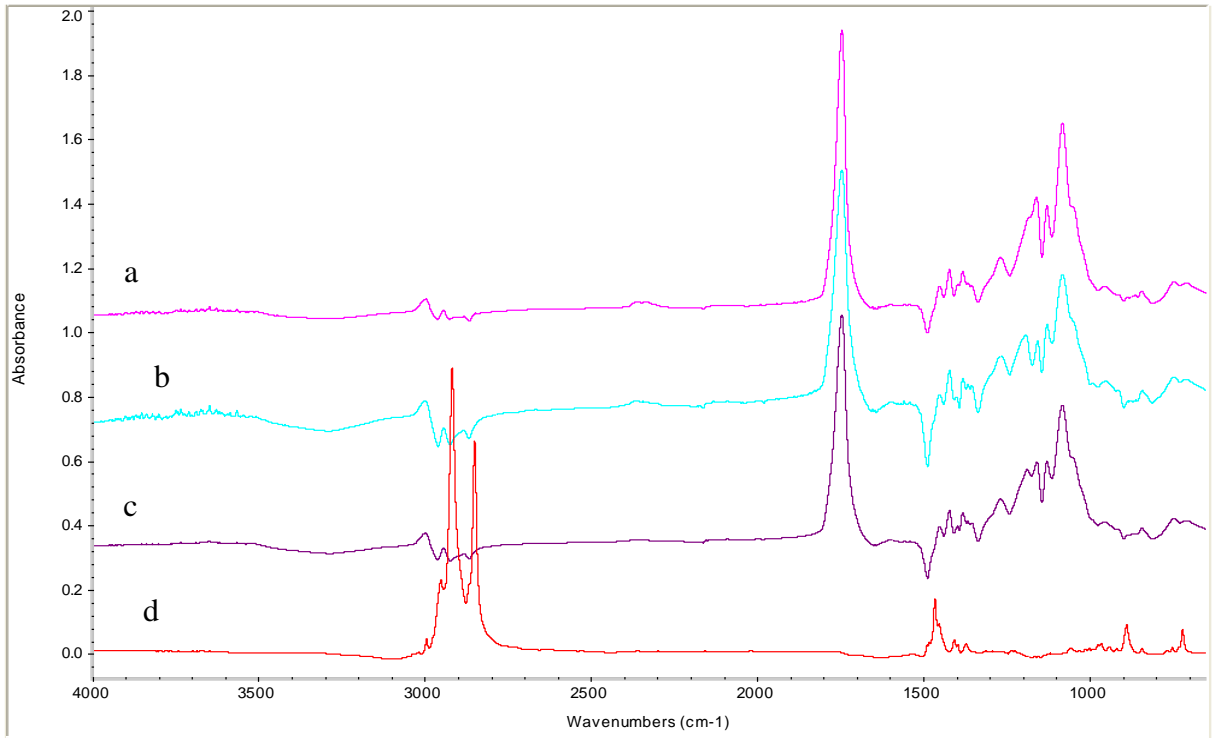
PLA/PGA	Ortalama çapı (nm)	Çoklu dağılım endeksleri (PDI)
50:50	196.5	0.0155
65:35	201.8	0.1655
85:15	238.9	0.0915

Çizelge 4.2. Farklı bileşimlerdeki PLGA kopolimerlerinden üretilen 5-FU içeren nanopartiküllerin boy ve boy dağılım değerleri.

PLA/PGA	Partikül Büyüklüğü (nm)	Çoklu Dağılım Endeksleri (PDI)
50:50	211.7	0.0775
65:35	214.5	0.1445
85:15	240.2	0.0875

4.2.2. FTIR analizi

Nanopartiküllerin hazırlanma aşamasında kullanılan DMAB stabilizatörünün üretim sonrası partiküllerden uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığını belirlemek için 50:50 bileşimindeki PLGA kopolimerinin, bu kopolimerlerle hazırlanmış 5-FU içeren PLGA nanopartiküllerin, boş PLGA nanopartiküllerin ve saf DMAB'nin Bölüm 3.3.2'de anlatılan yöntemle FTIR analizi yapılmıştır. Şekil 4.1'de yer alan spektrumlarda DMAB'ye ait alifatik C-H piklerinin ($2940-2835\text{ cm}^{-1}$) üretilen partiküllere ait spektrumlarda yer almadığı gözlenmiş ve böylece üretim sonrasında gerçekleştirilen yıkama ile DMAB'nin partiküllerden tamamen uzaklaştırıldığı kalitatif olarak kanıtlanmıştır (Testereci et al., 2004).



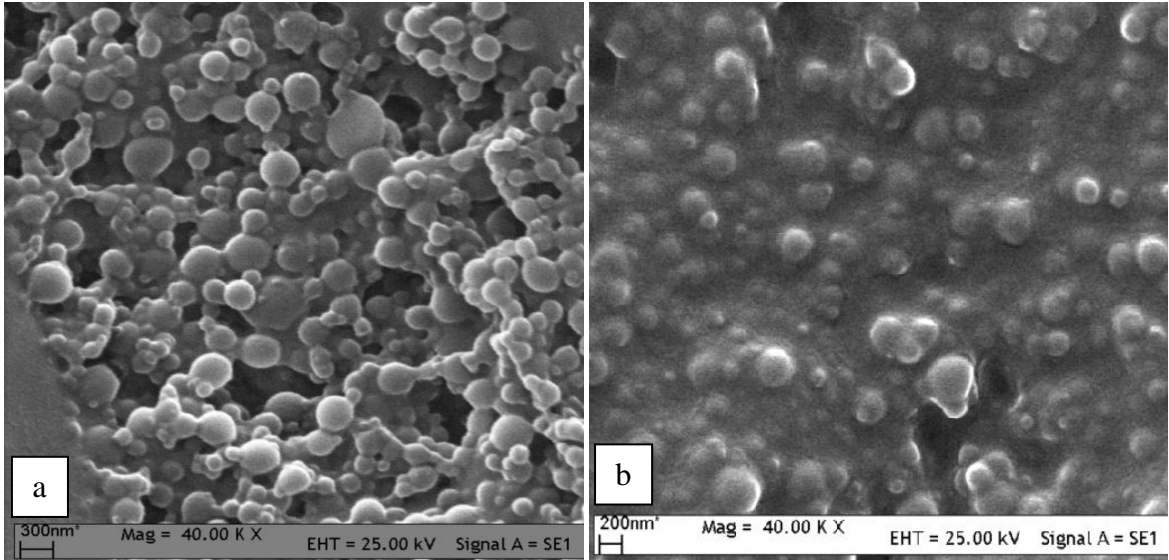
Şekil 4.1. Nanopartikül üretiminde kullanılan malzemelere ve nanopartiküllere ait FTIR spektrumları. 50:50 PLGA polimeri (a), 50:50 PLGA nanopartikül (b), 5-FU içeren 50:50 PLGA nanopartikül (c), DMAB (d).

4.2.3. SEM analizi

Nanopartiküllerin büyüklükleri, yoğunlukları ve yüzey morfolojileri SEM fotoğrafları ile incelenmiştir. Şekil 4.2'de yer alan SEM görüntüleri partikül boyutu açısından incelendiğinde, Çizelge 4.1 ve 4.2'deki sonuçları destekler niteliktedir. Elde edilen

görüntüler, üretilen nanopartiküllerin küresel bir morfolojiye sahip olduklarını ve yüzeylerinde herhangi bir pürüzün yer almadığını göstermektedir.

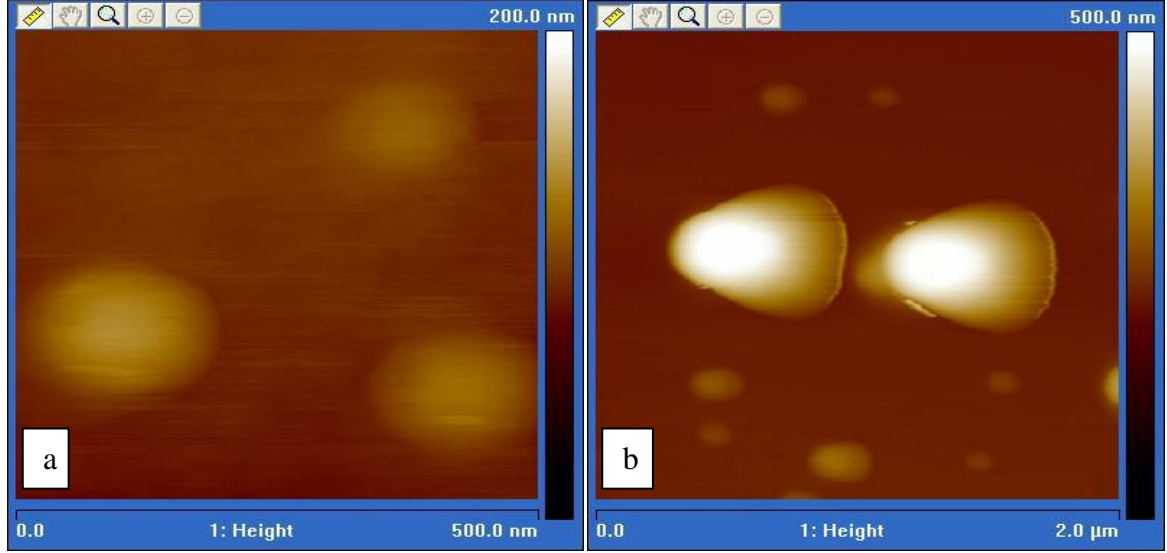
Şekil 4.2.a ile 4.2.b karşılaştırıldığında ise PLGA nanopartiküllerin, SEM analizi öncesi vakumla altın kaplama prosesi sırasında aglomere oldukları görülmektedir.



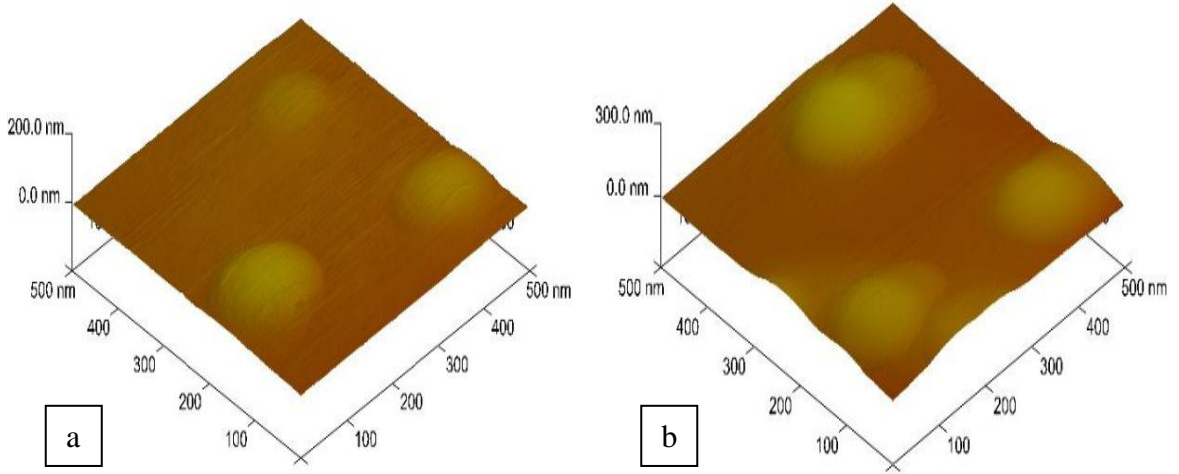
Şekil 4.2. 50:50 PLGA nanopartiküllerin SEM fotoğrafları (X40,000). (a) 5-FU içermeyen PLGA nanopartiküller; (b) 5-FU içeren PLGA nanopartiküller.

4.2.4. AFM analizi

Partikül yüzeyinin atomik boyutta bir iğne ucuyla taranarak görüntülerin elde edildiği atomik kuvvet mikroskobu (AFM) fotoğraflarında ise (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4), partiküllerin küresel formda olduğu tespit edilmiş hatta bu küreselliğin üçüncü boyutta neden olduğu yükseklik farkından dolayı özellikle 5-FU içeren partiküllerde iğnenin yer yer yan yüzeye temas edemediği gözlenmiştir. Bu nedenle 5-FU içeren PLGA nanopartiküllerin iki boyutlu (2D) AFM görüntülerinde partiküllerin sağında dağılan ışık, partikül şeklinin küresel formdan uzaklaştığı izlenimini yaratmıştır (Şekil 4.3b). Ancak partiküllere ait üç boyutlu (3D) AFM görüntüleri, partiküllerin küresel formda olduğu bilgisini doğrulamış ve Image Plus programı ile yapılan ölçümlerde boş partiküllerin büyüklüklerinin ~180 nm; 5-FU içeren partiküllerin büyüklüklerinin ise ~240 nm olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. PLGA nanopartiküllerin 2D AFM görüntüleri. (a) 5-FU içermeyen PLGA nanopartiküller; (b) 5-FU içeren PLGA nanopartiküller.



Şekil 4.4. PLGA nanopartiküllerin 3D AFM görüntüleri. (a) 5-FU içermeyen PLGA nanopartiküller; (b) 5-FU içeren PLGA nanopartiküller.

4.2.5. 5-FU enkapsülasyon veriminin hesaplanması

Tez çalışmasında kullanılan ve bir antikanser ajan olan 5-FU'nun PLGA nanopartiküllere enkapsülasyonu 2 farklı yöntemle incelenmiştir. Bölüm 3.4.1'de ayrıntılı bir biçimde anlatılan yöntemlerden ilkinde; partiküllere yüklenen 5-FU miktarı, işlemin başında partikül üretim ortamına konan ve partikül sentezi sonrası hala üretim ortamında kalan 5-FU miktarından yola çıkılarak hesaplanmıştır.

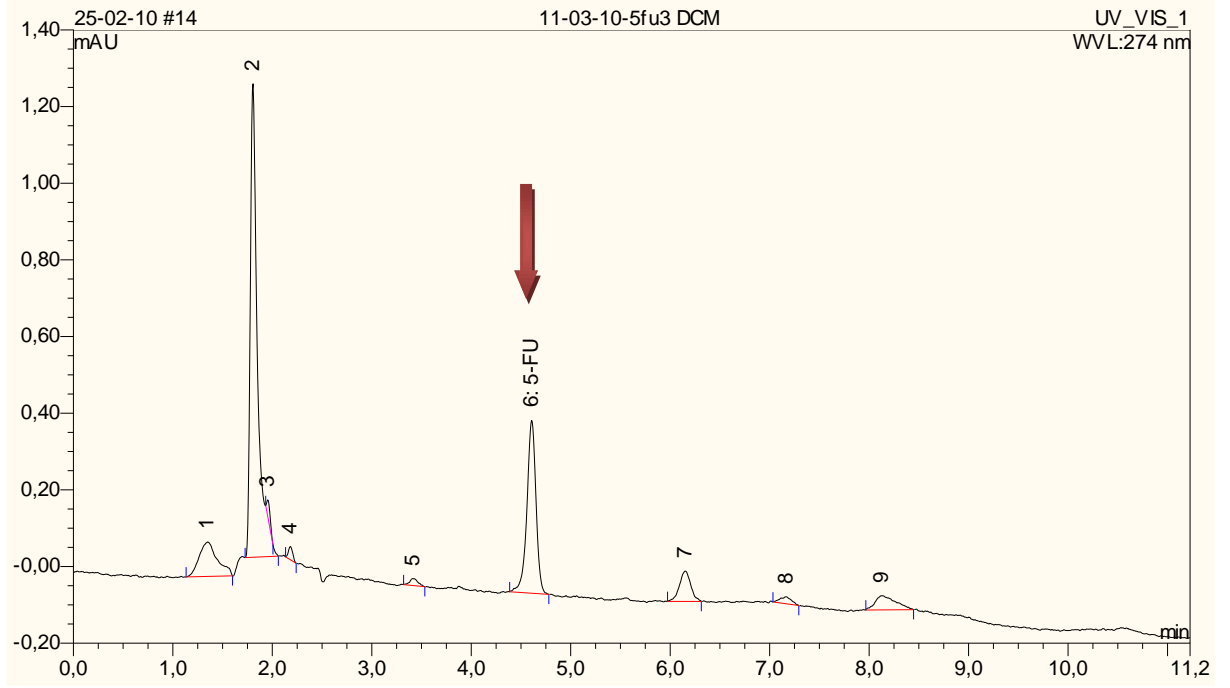
Çalışma sırasında PLGA nanopartiküllere %10 ve %20 (w/w), (ilaç/polimer) olmak üzere iki farklı konsantrasyonda ilaç yüklemesi yapılmıştır.

Eşitlik 3.1 kullanılarak yapılan hesaplamalara göre polimerin %10'u kadar ilaç bulunan çözeltide, PLGA nanopartiküllere ortamda bulunan 5-FU'nun %55.62'si yüklenebilmiş, polimerin %20 si kadar ilaç bulunan çözeltide ise PLGA nanopartiküllere ortamda bulunan 5-FU'nun %65.28'i yüklenebilmiştir. Bu sonuçlardan da anlaşılacağı üzere, ortamda bulunan ilacın miktarı ile partiküllerce enkapsüle edilen ilaç miktarı arasında bir doğru orantıdan bahsedilememektedir. Aynı zamanda ortamda bulunan ilaç miktarı ile ortama salınan ilaç miktarı arasında da doğrusal bir ilişki olmadığı Bölüm 4.5'te yer alan sonuçlardan anlaşılmaktadır. Bu nedenle çalışmanın ilerleyen aşamalarında PLGA nanopartiküllere yüklenen ilaç miktarının polimerin %10'u (ağırlıkça) kadar olmasına karar verilmiştir.

Enkapsülasyon verimi hesaplamasında kullanılan ikinci yöntem ise, nanopartiküllerin uygun çözücü içerisinde çözülerek kapsüle olan ilacın çözelti ortamına salınması ve bu ortamdaki ilaç konsantrasyonunun HPLC cihazında ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Nanopartiküllerin kullanıldığı sistemlerde daha hassas ve sağlıklı sayısal veriler elde edebilmek için HPLC analizine başvurulmaktadır. Yapılan tez çalışmasında Bölüm 3.4.1'de ifade edilen yöntem kullanılarak, üretilen PLGA nanopartiküllerce ortamda bulunan 5-FU'nun ne kadarının enkapsüle edildiği hesaplanmıştır. Şekil 4.5'te yer alan HPLC kromatogramı incelendiğinde 4.61inci dakikada C18 kolonundan 0.06 µg/mL 5-FU çıktığı görülmektedir. İlacın %100'nün enkapsüle edildiği varsayıldığında kolona beslenen 20 µL'lik çözelti içerisinde 112 µg 5-FU olması gerekmektedir. Ancak elde edilen 0.06 µg/mL'lik sonuç bize ilacın %53.48'nin partiküllerce enkapsüle edilebildiğini göstermektedir. UV spektrofotometre kullanılarak yapılan ölçümlerde de ilacın %55.62'sinin PLGA nanopartiküller tarafından enkapsüle edilebildiği hesaplanmıştır. Farklı yöntemler kullanılarak elde edilen sonuçlar arasındaki %2.14'lük fark, deneysel hata olarak

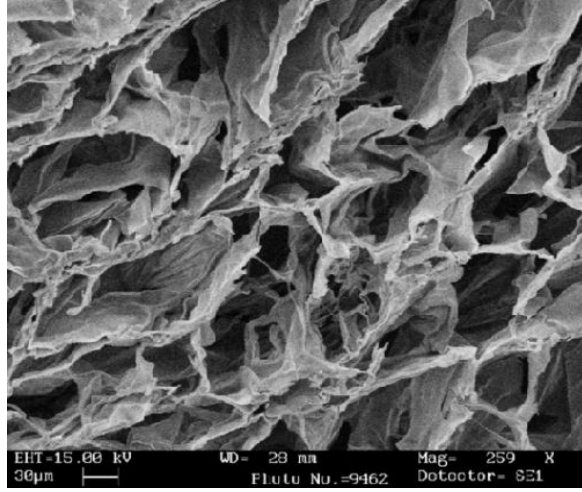
kabul edilebilir. Dolayısıyla her iki yöntemle de elde edilen enkapsülasyon verimleri uyum içerisindedir.



Şekil 4.5. PLGA nanopartiküllere yüklenen 5-FU'ya ait HPLC kromatogramı.

4.3. Gözenekli Kitosan Doku İskelelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Gözenekli doku iskeleleri >85% deasetilasyon derecesindeki (DD) kitosandan, “dondurarak-kurutma” yöntemiyle hazırlanmıştır. Bu yöntemde, jelleştikten sonra, donan kitosan çözeltilerinde oluşan buz kristalleri liyofilize edilmektedir. Bu sayede gözenekli ve içsel bağlantıları olan bir yapı elde edilmiştir (Şekil 4.6). Donmuş çözeltilerden elde edilen iskeleler herhangi bir çapraz bağlayıcıya maruz bırakılmadığı için üretilen iskelelerin, biyobozunurluk ve biyouyumlulukları önemli derecede artmıştır.



Şekil 4.6. Kitosan doku iskelesi SEM görüntüsü (250X).

Karakterizasyon çalışmaları daha önce grubumuz tarafından yapılan kitosan doku iskelelerinin, içsel bağlantılar içeren ve ~100 µm gözenek büyüklüğüne sahip yapılar oldukları belirlenmiştir (Tıǧlı ve ark., 2007). Tez çalışması sırasında kitosan doku iskelelerinin gözenekliliği Bölüm 3.5.2’de yer alan metot kullanılarak belirlenmiş ve iskelelerin %88 gözenekliliğe sahip oldukları sonucuna ulaşılmıştır. Bu yüksek gözeneklilik oranı ve birbiri ile bağlantılı gözenek oluşumu doku mühendisliği çalışmaları için istenen özelliklerdir. Çünkü böylelikle hücrelerin yayılması, besin maddelerinin taşınımı ve vasküler dokuların iskelenin içerisine doğru göç etmesi sağlanmaktadır (Freyman *et al.*, 2001; Arpornmaeklong *et al.*, 2007). Aynı zamanda ilaç içeren nanopartiküllerin doku iskelelerine yüklendiği durumlarda da; üretim sırasında gözeneklere yerleşen partiküllerden salınan ilacın travma bölgesine ulaşabilmesi için gözeneklerin birbiri ile bağlantılı olması gerekmektedir.

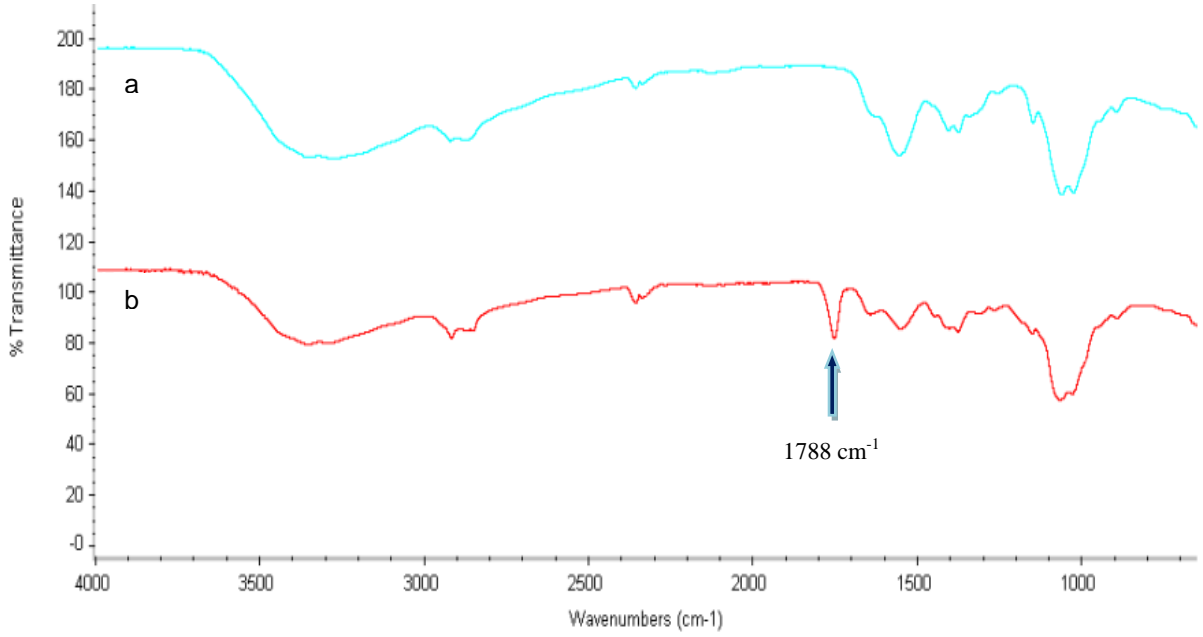
Konuya gözenek boyutu açısından bakıldığında, gözeneklerin çok küçük olması durumunda gözenekler hücreler tarafından tıkanacak; bu da hücre penetrasyonunu, ECM oluşumunu ve doku iskelesinin iç kısımlarının vaskülerize olmasını engelleyecektir (Salgado *et al.*, 2004).

4.4. PLGA Nanopartiküllerin Kitosan Doku İskelesine Yüklenmesi ve Karakterizasyonu

Üretilen PLGA nanopartiküllerin kitosan doku iskelelerine en uygun yüklenme metodunun ve oranının (PLGA/kitosan) belirlenebilmesi için çeşitli denemeler yapılmış ve bu denemelerden elde edilen sonuçlara göre hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak olan 5-FU içeren PLGA nanopartikül yüklü kitosan doku iskeleleri üretilmiştir. Üretim esnasında 5-FU'nun etki edeceği tümör dokusunun mm^2 'si için $1.5 \mu\text{g}$ 5-FU gerektiği bilgisi göz önünde bulundurularak, doku iskelelerine yüklenecek nanopartiküllerin, yeteri kadar 5-FU taşıma kapasitesi olmasına dikkat edilmiştir (Menei et al., 1999). Sulu çözelti içerisinde bulunan PLGA nanopartiküller sırasıyla, doku iskelesinin üretimi öncesinde kitosan çözeltisine partikül çözeltisi karıştırılarak eş zamanlı üretim-yükleme şeklinde veya hazırlanmış doku iskelelerine partikül çözeltisi enjekte edilmek suretiyle kitosan doku iskelelerine yüklenmeye çalışılmıştır.

4.4.1 FTIR analizi

Nanopartikül içeren doku iskeleleri hazırlandıktan sonra PLGA nanopartiküllerin kitosan doku iskelelerine yerleşip yerleşmediğini belirleyebilmek amacıyla FTIR spektrofotometresi ile Bölüm 3.5.3.1'de açıklanan yöntem kullanılarak kalitatif olarak inceleme yapılmıştır. Boş kitosan doku iskelesi ve PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelesine ait spektrumlar Şekil 4.7'de görülmektedir. Sunulan FTIR spektrumları incelendiğinde boş kitosan doku iskelesine ait spektrumda (a) gözlenmeyen 50:50 PLGA'ya ait karakteristik C=O gerinim piki, PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelesine ait spektrumda (b) gözlenmiştir (Çatıker et al., 2000). Böylece üretim esnasında PLGA nanopartiküllerin kitosan doku iskelelerine yerleştirilebildiği ve dondurarak kurutma ve stabilizasyon işlemleri esnasında da doku iskelesinden uzaklaşmadıkları kanıtlanmıştır.



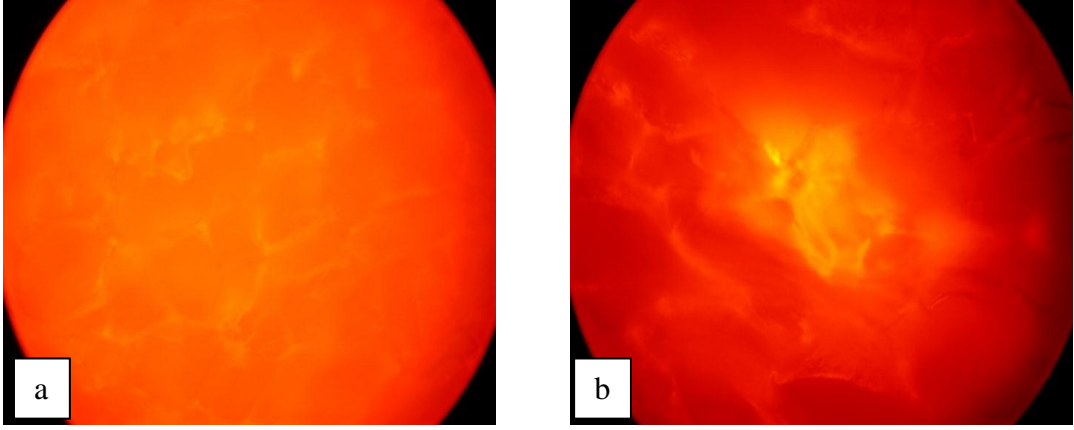
Şekil 4.7. Nanopartikül içeren ve içermeyen kitosan doku iskelelerine ait FTIR spektrumları. Boş kitosan doku iskelesi (a), 50:50 PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelesi (b).

4.4.2. Floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretleme

Kitosan doku iskelelerine yüklenen PLGA nanopartiküllerin, doku iskelelerinde nasıl yerleştiğini anlayabilmek için partiküller, terminal gruplarından floresan bir boya olan FITC ile işaretlenmiş ve floresan mikroskopta görüntülenmiştir (Kim ve ark., 2005). Elde edilen görüntüler aracılığıyla 9 mm çap ve 2 mm kalınlığa sahip bir doku iskelesine ne kadar partikül yüklenmesi gerektiğine karar verilmiş ve partiküllerin iskele içerisinde nasıl bir dağılım gösterdikleri tespit edilmiştir.

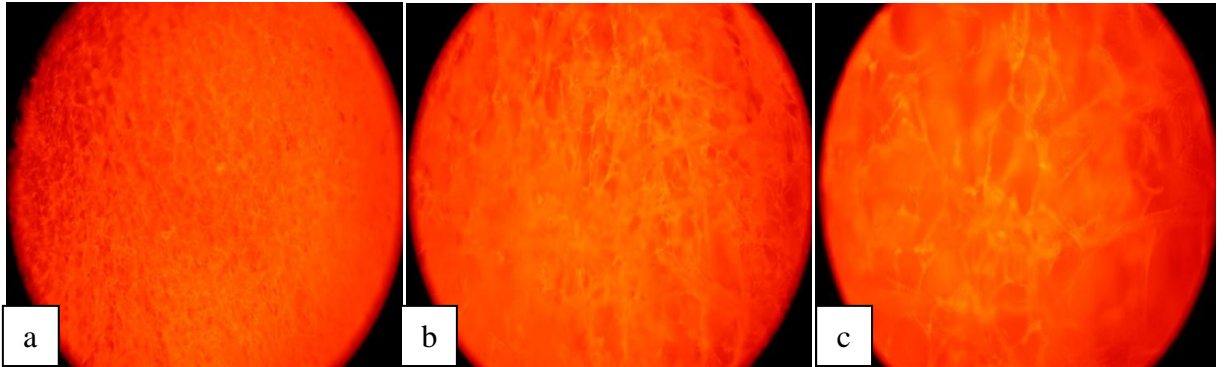
Zhang ve arkadaşlarının (2008) makalesinde yer alan 30:70 nanopartikül/kitosan (w/w) oranı dikkate alınarak doku iskelelerine, üretim esnasında, sulu ortamdaki FITC işaretli partiküller 25:75 ve 35:65 (PLGA nanopartikül/kitosan) oranında karıştırılmış ve Bölüm 3.5.1'de yer alan metot kullanılarak doku iskelesi üretimi gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.8'de görüldüğü gibi 25:75 PLGA nanopartikül/kitosan bileşimindeki doku iskelelerinde partiküller homojen bir şekilde iskeleye yayılmamış, aynı zamanda 20X'lik büyütmede çekilen fotoğrafa göre, iskeleye yüklenen partikül miktarının doku iskelesi için yetersiz olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.8. 25:75 PLGA/kitosan oranındaki FITC işaretli partiküllerin, doku iskelelerinde farklı büyütmelelerdeki floresan mikroskop görüntüleri a)20X; b)40X (Parlak kısımlar partikülleri göstermektedir.).

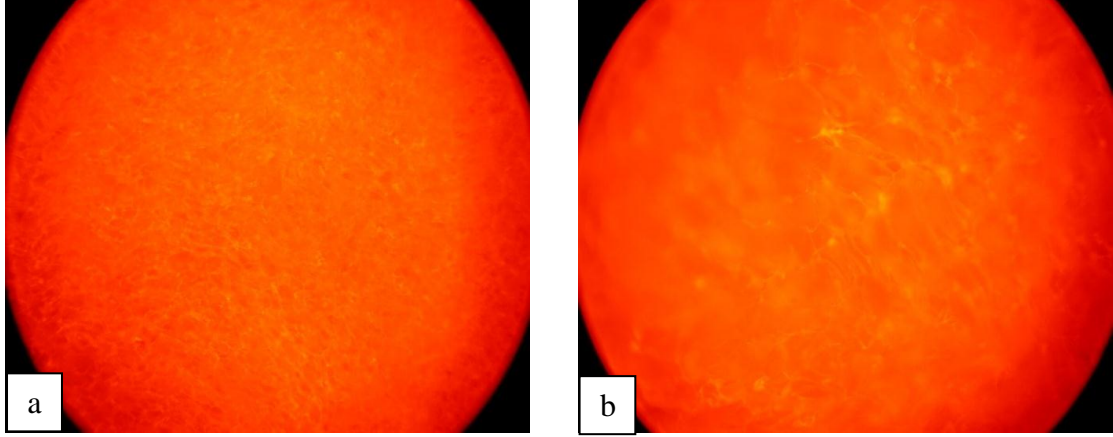
Şekil 4.9'a göre 35:65 PLGA nanopartikül/kitosan bileşimindeki doku iskelelerinde, partiküllerin nispeten homojen bir şekilde iskeleye yayıldığı gözlenmiş ve iskelenin içerisinde yeterli sayıda partikül olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. 35:65 PLGA/kitosan oranındaki FITC işaretli partiküllerin, doku iskelelerinde farklı büyütmelelerdeki floresan mikroskop görüntüleri a)4X; b)10X; c)20X.

Bir başka denemede Bölüm 3.5.1'de anlatılan şekilde üretilen doku iskelelerinden 9 mm çapında ve 2 mm kalınlığında alınan kesitlere, sulu ortamda bulunan FITC işaretli partiküller enjekte edilmek suretiyle yüklenmeye çalışılmıştır. Belirtilen büyüklüklerdeki doku iskelelerinin en fazla 2 mL sıvı emebildiği tespit edilmiş ve bu sıvı miktarının içerdiği partikül miktarından yola çıkarak bu denemedeki PLGA nanopartikül/kitosan oranının 17:83 olduğu hesaplanmıştır. Şekil 4.10'daki

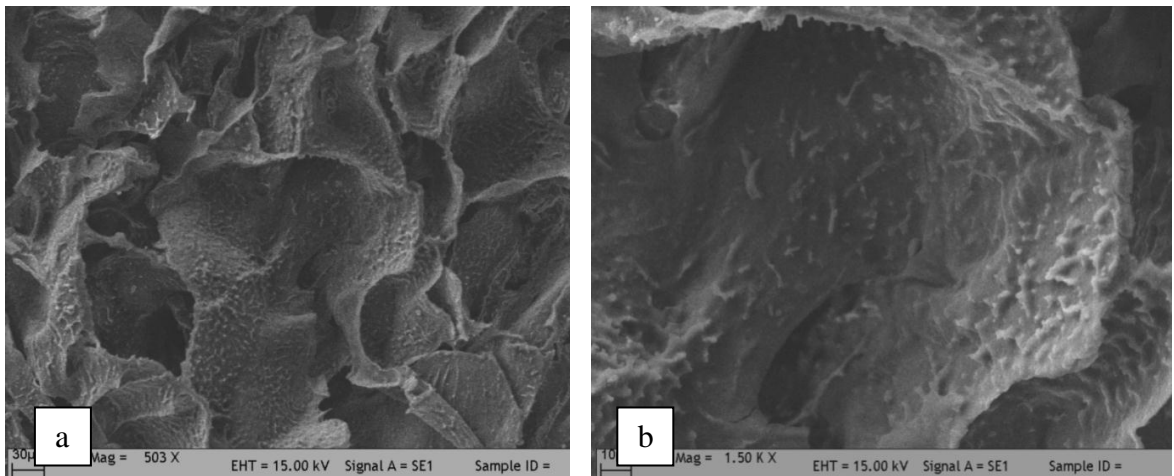
fotoğraflardan da anlaşılacağı gibi, bu partikül miktarının doku iskelesi için yetersiz olduğu ve bu yükleme yönteminin de verimsiz olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.10. 17:83 PLGA/kitosan oranındaki FITC işaretli partiküllerin doku iskelelerinde farklı büyütmelelerde floresan mikroskop görüntüleri a)4X; b)10X.

4.4.3. SEM ile analiz

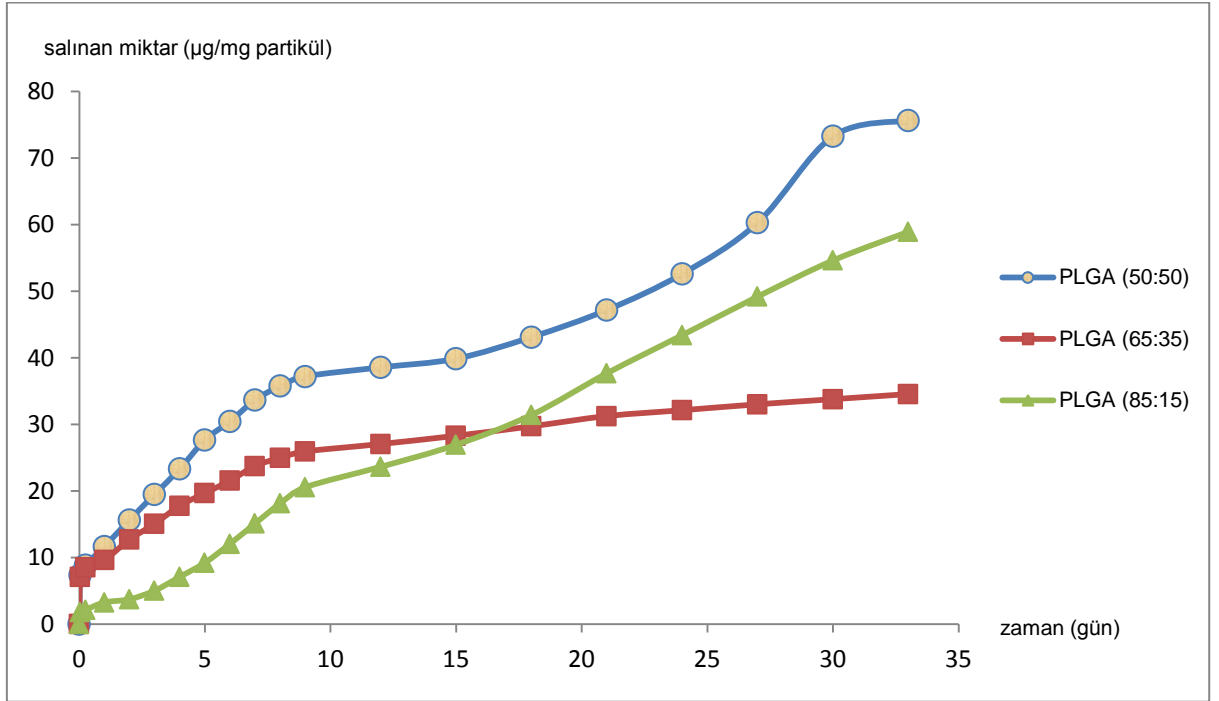
Kitosan doku iskelelerine yüklenen PLGA nanopartiküllerin, iskele içerisinde nasıl bir dağılım gösterdiklerini tespit edebilmenin bir diğer yolu da SEM analizidir. Şekil 4.11'de yer alan SEM fotoğraflarından >%85 DD'ne sahip kitosan iskelelerindeki PLGA nanopartiküllerin, iskele içerisinde homojen bir biçimde dağıldığı, partiküllerin kitosan jel içerisinde karışırken ve dondurarak kurutma işlemi esnasında bozulmadığı tespit edilmiş ancak bir miktar aglomere oldukları gözlenmiştir.



Şekil 4.11. PLGA (50:50) nanopartikül yüklü kitosan iskelelerin farklı büyütmelelerde çekilmiş kesit SEM görüntüleri (a)500X, b)1500X).

4.5. PLGA Nanopartiküllerden İlaç Salımı

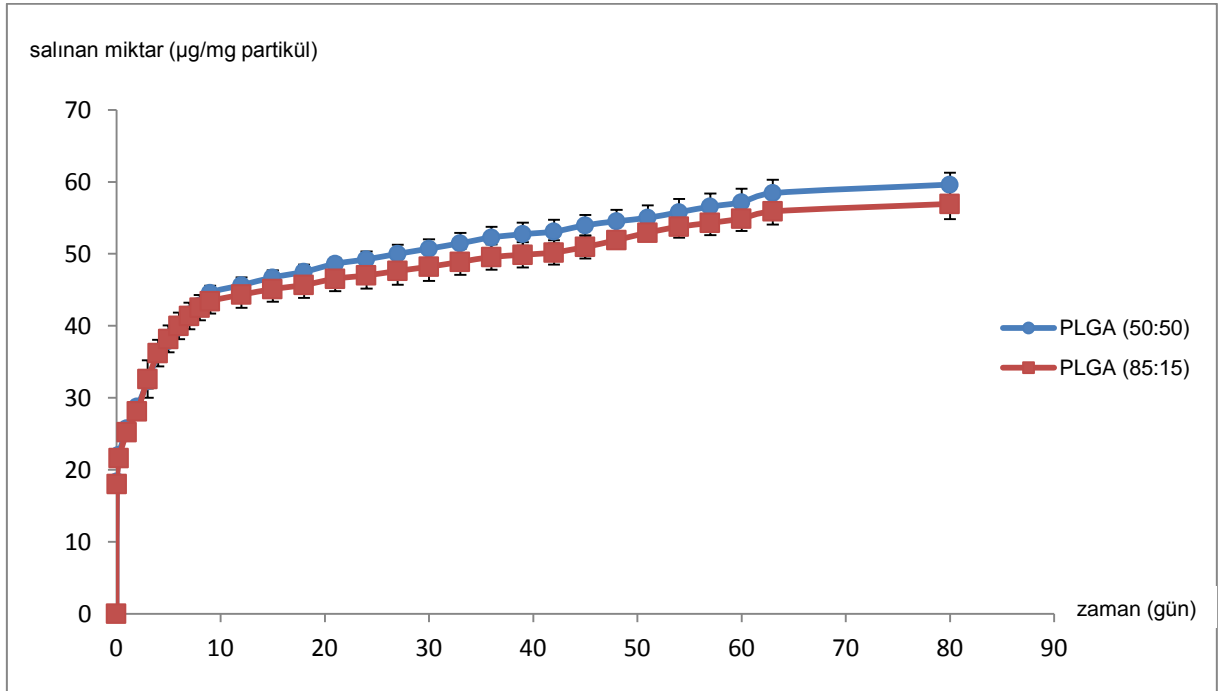
Selüloz membran içerisine yerleştirilen farklı PLA/PGA bileşimlerine sahip PLGA kopolimerlerinden üretilmiş nanopartiküllerden salınan 5-FU miktarının hesaplanabilmesi için, membranların yerleştirildiği rezarvuarlardan belirli aralıklarla örnekler alınmış, rezarvuarlardan eksilen hacim kadar ortama taze PBS eklenmiş ve alınan örneklerin 266 nm’de UV spektrofotometrede absorbans değerleri okunmuştur. Şekil 4.12’de yer alan grafikte 85:15 ve 50:50 PLA/PGA bileşime sahip PLGA kopolimerlerinden üretilen nanopartiküllerden gerçekleşen salımın, 65:35 PLA/PGA bileşime sahip PLGA kopolimerlerinden üretilen nanopartiküllere göre daha uzun süreli ve sürekli artan bir profile sahip oldukları görülmektedir.



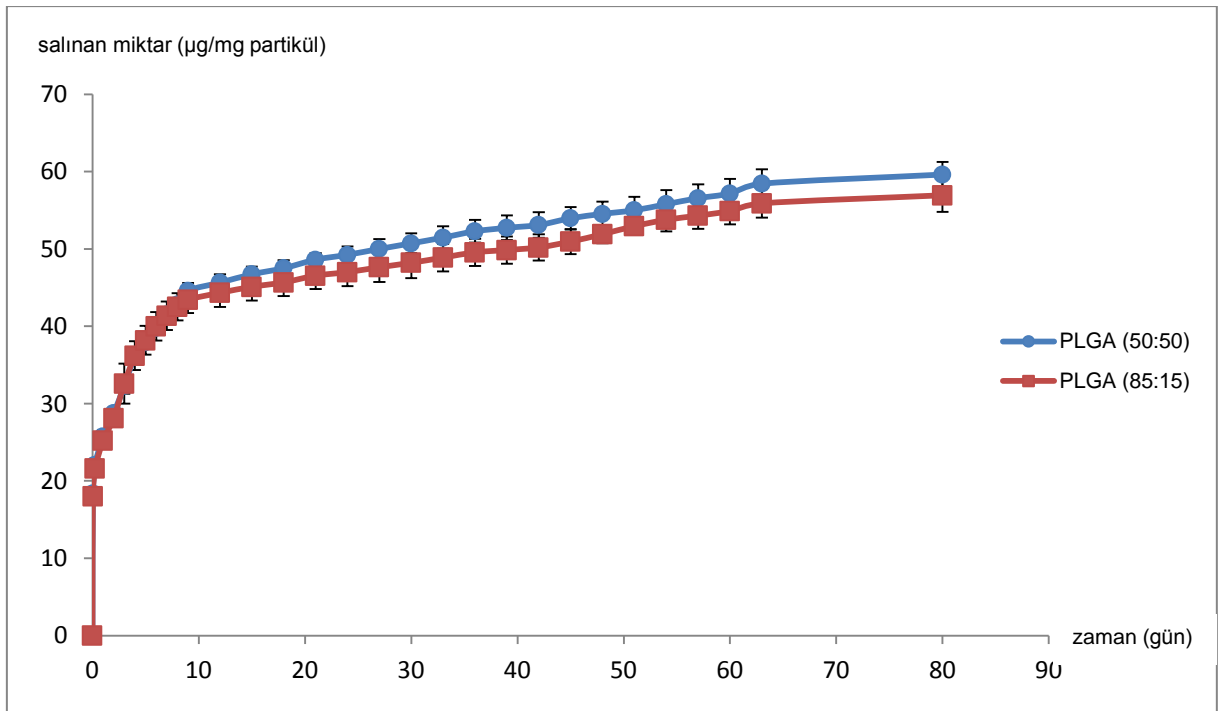
Şekil 4.12. %10 oranında ilaç yüklü nanopartiküllerden 5-FU'nun kümülatif salım değerleri.

PLA/PGA bileşimlerinin ilaç salımına etkisi incelendikten sonra, partiküllere yüklenen ilaç miktarının salım profilini nasıl etkileyeceğini belirlemek için; 50:50 ve 85:15 (PLA/PGA) PLGA nanopartiküllere hem polimer miktarının %10'u hem de %20'si (w/w) kadar 5-FU yüklenmiş ve ilaç salımı 80 gün boyunca takip edilmiştir. Şekil 4.13'ün, Şekil 4.14 ile karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan tabloya göre; partiküllere ortalama polimer miktarının %20'si kadar 5-FU yüklemenin kümülatif

salım miktarını kayda değer bir oranda arttırmadığı hatta 85:15 PLA/PGA oranına sahip PLGA nanopartiküllerde bu oranı azalttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. %10 oranında ilaç yüklü 85:15 ve 50:50 PLA/PGA oranındaki PLGA nanopartiküllerden 5-FU'nun kümülatif salım değerleri.



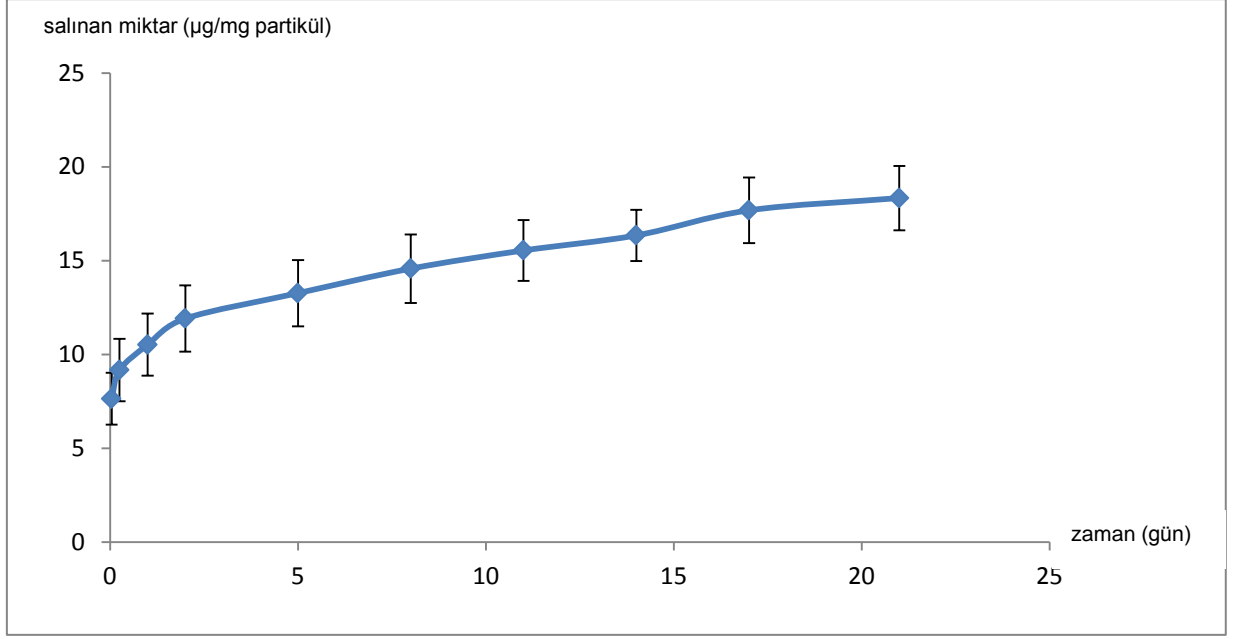
Şekil 4.14. %20 oranında ilaç yüklü 85:15 ve 50:50 PLA/PGA oranındaki PLGA nanopartiküllerden 5-FU'nun kümülatif salım değerleri.

Elde edilen salım grafiklerinde sistem kurulduktan sonraki ilk 24 saat içinde 50:50 bileşimindeki PLGA nanopartiküllerce enkapsüle edilen 5-FU'nun %44,71'inin; 85:15 bileşimdeki PLGA nanopartiküllerce enkapsüle edilen 5-FU'nun ise %42,92'sinin ortama salındığı görülmektedir. Roullin ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları çalışmada PLGA mikrokürelerden 5-FU salımının ilk 24 saatte %22 civarında olduğu tespit edilmiştir. Yapılan kıyaslamalar sonucu çalışmada elde edilen değerlerin literatürde yer alan değerlere oranla daha yüksek olduğu görülmüş ve kullanılan PLGA nanopartiküllerin yüksek bir patlama etkisine (burst effect) sahip oldukları sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda 8. günden itibaren doğrusal bir salım profili sergilemeye başlayan PLGA nanopartiküllerin 80 gün boyunca bu profili devam ettirmesi hazırlanan salım sisteminin kararlılığını ifade etmektedir.

4.6. PLGA Nanopartikül Yüklü Doku İskelelerinden İlaç Salımı

50:50 PLA/PGA bileşimindeki PLGA nanopartiküllere yüklenen %10 (w/w) oranındaki 5-FU'nun, partiküller kitosan doku iskelelerine yerleştirildikten sonra nasıl bir salım profiline sahip olduğunu belirlemek amacıyla da salım çalışmaları yapılmıştır. Bunun için partikül içeren doku iskelelerinden 9 mm çapında ve 2 mm kalınlığında kesilen örnekler selüloz membranlara, selüloz membranlar da 5 mL rezarvuvar hacmi olan salım ortamlarına yerleştirilmiştir. Bölüm 3.4.3'te anlatılan yöntemle alınan salım ölçümlerinin sonuçları Şekil 4.15'te gösterilmiştir.

Nanopartiküllerin kitosan doku iskelelerine yüklenmesiyle hem ilacın difüzyon mesafesinde bir artış meydana gelmiş hem de doku iskelesinin gözenekleri, ilacın partikülden çıkıp ortama salımı sırasında bariyer vazifesi görmüştür. Bu nedenle kitosan doku iskelelerine yüklenen PLGA nanopartiküllerden gerçekleşen 5-FU salımının, doğrudan partiküllerden gerçekleşen salıma oranla daha yavaş ve düşük seviyede olması beklenen bir durumdur. Şekil 4.13 ve 4.15'te yer alan salım grafikleri incelendiğinde 21 günün sonunda %10 5-FU (w/w) yüklü PLGA (50:50) nanopartiküllerden 46.04 µg 5-FU salınırken, nanopartikül yüklü kitosan doku iskelelerinden 18.33 µg 5-FU salındığı tespit edilmiştir. *In-vitro* çalışmalarda doku iskeleleri kullanıldığı için, hücrelerle etkileşime geçen ilaç miktarı hesaplanırken Şekil 4.15'teki salım değerleri göz önünde bulundurulmuştur.



Şekil 4.15. %10 5-FU içeren 50:50 PLGA nanopartiküller kitosan doku iskelesine yüklendiğinde elde edilen salım grafiği.

Zetapotansiyometre ölçüm sonuçları, SEM ve AFM analizlerinden elde edilen veriler ve Bölüm 4.5'te yer alan 5-FU salım sonuçları göz önünde bulundurularak 50:50 PLA/PGA bileşimine sahip PLGA kopolimerinin çalışmalar için uygun olacağına karar verilmiş ve projenin bundan sonraki aşamalarında yalnızca bu bileşimdeki PLGA kopolimeri kullanılmıştır.

4.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

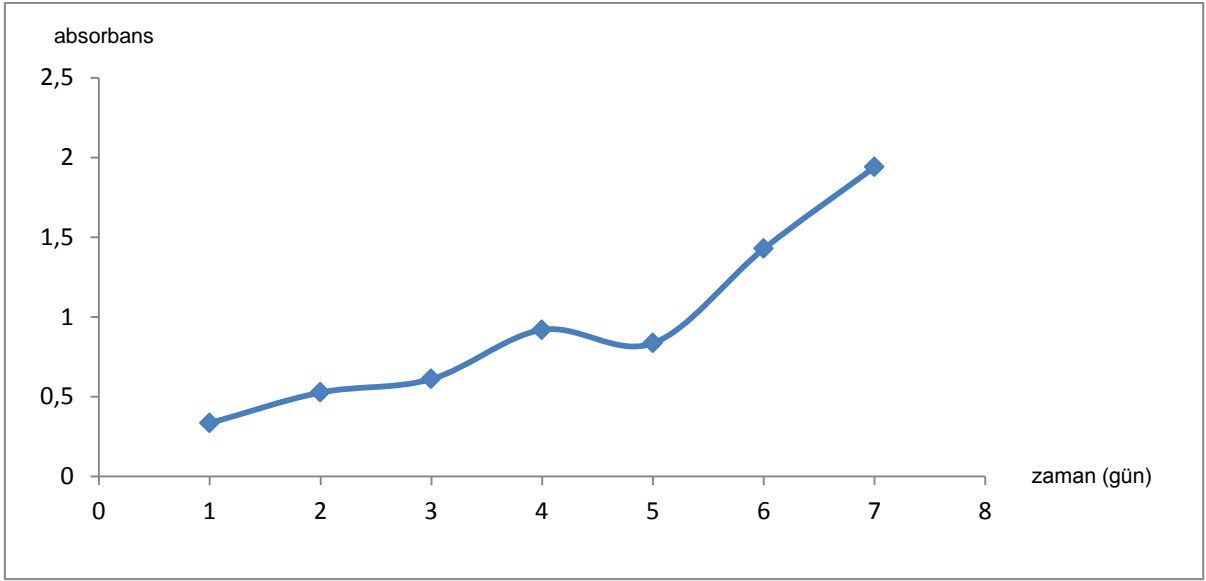
Tezin bu bölümünde deneylerde kullanılan HUVEC ve T98G hücrelerinin karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara yer verilmiştir. Ardından boş kitosan doku iskeleleri, 5-FU içeren PLGA nanopartikül yüklü kitosan doku iskeleleri, Bevacizumab içeren kitosan doku iskeleleri ve hem 5-FU hem de Bevacizumab içeren kitosan doku iskelelerinin yer aldığı kültür ortamlarında, HUVEC ve T98G hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma davranışlarına ilişkin sonuçlar tartışılmıştır.

4.7.1. T98G hücrelerinin karakterizasyon çalışmaları

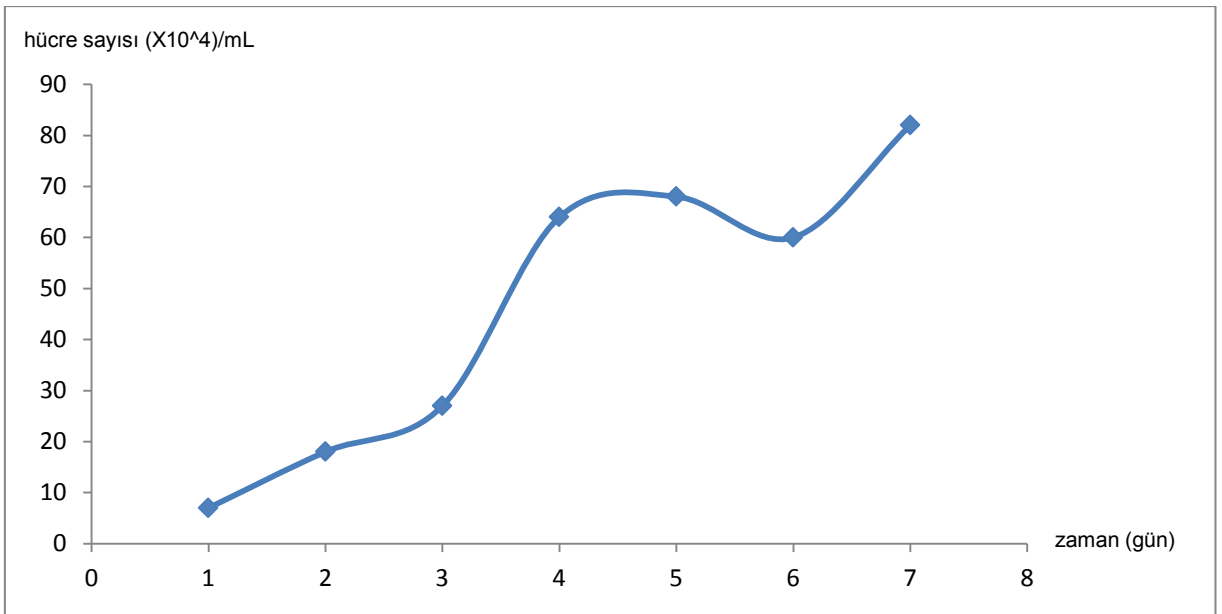
4.7.1.1. MTT analizi ve hücre sayım sonuçları

İnsan glioblastoma multiform tümörlerinden izole edilmiş T98G hücrelerinin üremeleri ve morfolojileri polistiren kültür kaplarında 7 gün boyunca izlenmiştir.

Hücrelerin 7 günlük inkübasyonu boyunca hücre sayımları yapılmış, 1:2 oranında seyreltilen ortamların MTT testleri sonucu elde edilen absorbans değerlerine karşılık zaman grafikleri (Şekil 4.16) çizilmiş, bu sayede hücre büyüme eğrisinin gecikme fazı (lag fazı), aktif üreme fazı (log fazı), durgun ve ölüm fazları gösterilmiştir (Şekil 4.17). Literatürden edinilen tümör hücrelerinin hızlı çoğaldığı bilgisinden yola çıkılarak başlangıç hücre konsantrasyonu 2.5×10^4 hücre/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.16. 1:2 oranında seyreltilen ortamların MTT testleri sonucu elde edilen T98G üreme grafiği.



Şekil 4.17. Hemositometrik hücre sayımı sonucu elde edilen T98G üreme grafiği.

Şekil 4.17’de yer alan üreme grafiğinde, hücrelerin 3. günde logaritmik faza girdiği görülmektedir. Hücre üremesi üstel üreme fazındaki hücre üreme hızı ve hücre ikilenme süresi ile karakterize edilmektedir. Üstel üreme fazındaki hücreler için üreme hızı Eşitlik 4.1 ile ifade edilmektedir. Üstel üreme fazında (logaritmik faz), hücrelerin ikilenme süresi Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$dx/dt = \mu x \quad (4.1.)$$

Burada x, hücre sayısını, μ , özgül üreme hızını ve t de zamanı göstermektedir. Bu eşitlik düzenlendiğinde;

$$\ln x = \mu t \quad (4.2.)$$

şekline dönüşmektedir. İkilenme süresinin (t_d) hesaplanması için ise Eşitlik 4.3 kullanılır.

$$t_d = \ln(2)/\mu \quad (4.3.)$$

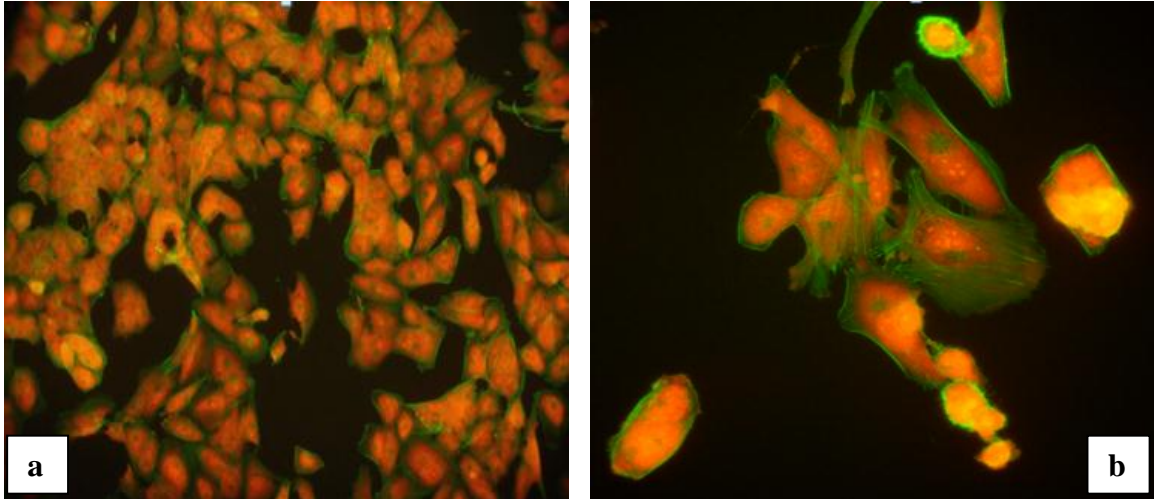
Eşitlikten de görülebileceği gibi $\ln x$ ’e larşı t’nin grafiği çizildiğinde, grafiğin eğimi özgül üreme hızını (μ) vermektedir. Çalışmamızda T98G hücreleri için özgül üreme hızı 0.0159 sa^{-1} , ikilenme süresi ise 43.39 sa olarak bulunmuştur.

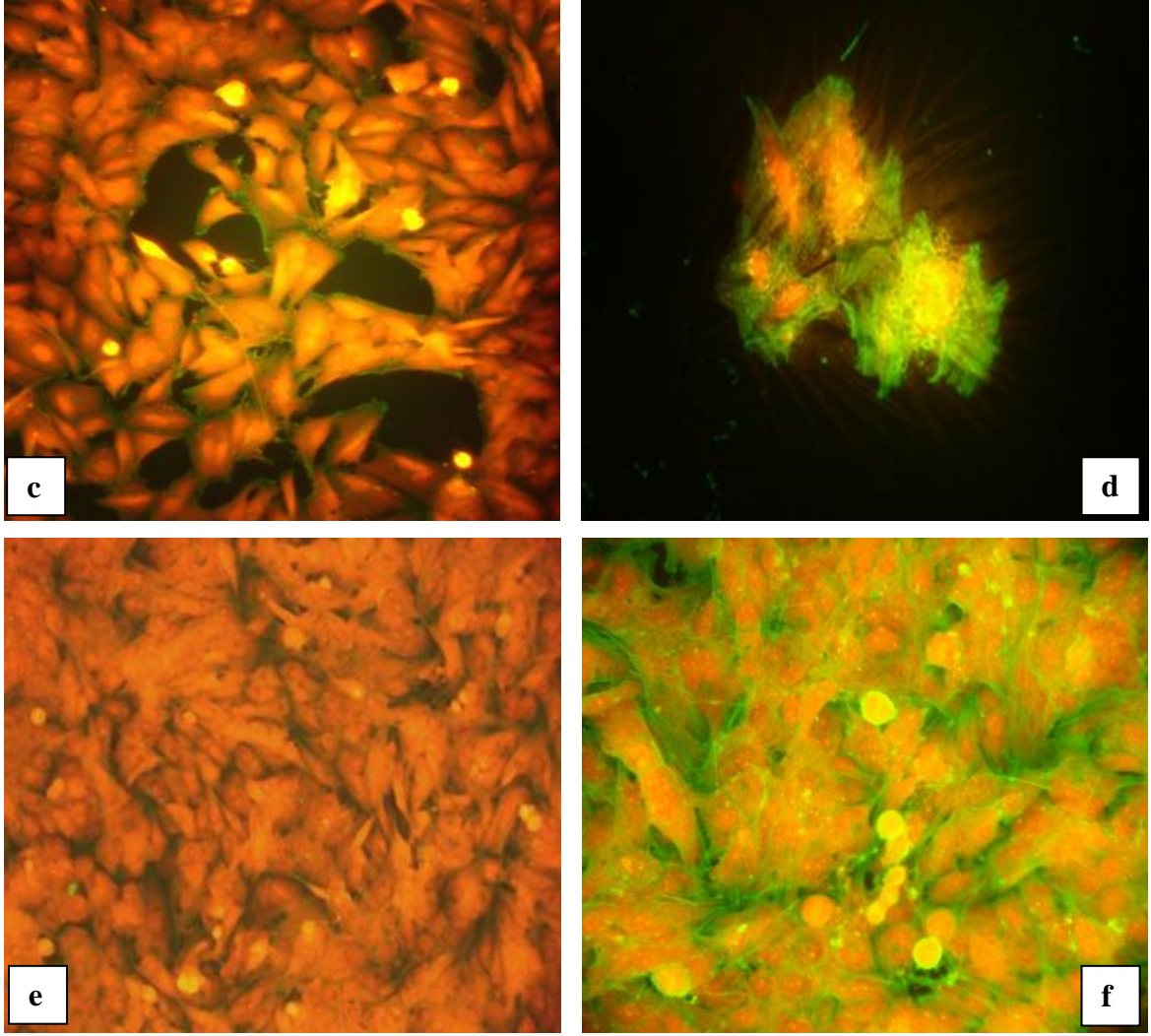
Şekil 4.16 ile 4.17 kıyaslandığında iki grafikte de hücrelerin üreme kinetiği profillerinin aynı olduğu gözlenmiştir. 7 günlük karakterizasyon çalışması sırasında Şekil 4.16’da 4. günden 5. güne geçerken; Şekil 4.17’de ise 5. günden 6. güne geçerken T98G hücrelerinin sayılarında bir azalma meydana geldiği ve takip eden günlerde hücre sayılarının tekrar arttığı görülmektedir. Ortaya çıkan bu dalgalı büyüme grafiği, glioblastoma hücre hatları için olağan bir büyüme grafiğidir. Perego ve arkadaşları çalışmaları esnasında kullandıkları glioblastoma hücre sayılarının, kültürün 4. gününden 5. gününe geçerken azaldığını; 5. günden 7. güne kadar kısa bir artış gösterdiğini ve 8. günden itibaren tekrar düşüşe geçtiğini görmüşlerdir (Perego et al., 1994). Yaptığımız karakterizasyon çalışmasında hücre sayılarının farklı günlerde azalması ve çoğalması MTT çalışmaları ile hemositometrik sayım çalışmalarında farklı çaplarda kültür kapları kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü hücre sayısı kültür ortamında belli bir konsantrasyonun üzerine çıktığı zaman koloni merkezlerindeki hücrelerin DNA

sentezi durmakta ve hücre konsantrasyonu belli bir seviyenin altına inince DNA sentezi tekrar başlamakta; buna bağlı olarak da hücre sayısı tekrar artmaktadır (Stein, 1979). Literatürde yer alan bu bilgi T98G hücrelerinin sahip olduğu bu düzensiz üreme profilini de açıklamaktadır.

4.7.1.2. Floresan mikroskopu ile analiz

Alexa Fluor 488 phalloidin ve propidyum iyodür ile yapılan 2'li boyama sonucunda çekilen floresan mikroskop fotoğraflarında çekirdek kırmızı, F-aktin ise yeşil olarak görülmektedir (Şekil 4.18). Tümör hücreleri çok çekirdekli bir yapıya sahip olduklarından ortamdaki hücre konsantrasyonu arttıkça çekirdek sayısı da artmakta ve dolayısıyla boyama sonrası görüntü alınırken çekirdeği boyayan propidyum iyodür sinyali güçlenmektedir. Bu duruma karşılık olarak kültür kabı yüzeyinde hücre yüzey şeklinin oluşumunda görev alan hücre iskeleti yapıları olan aktin filamentleri daha az görülebilmekte ve buna bağlı olarak kültür süresi uzadıkça Alexa Fluor sinyalinin azaldığı gözlenmektedir. Kültürün 2., 4. ve 6. günlerindeki fotoğraflar karşılaştırıldığında, kültür süresinin uzamasıyla beraber fotoğraflardaki kırmızı/turuncu tonun arttığı görülmektedir. Bu renk değişiminin nedeni, artan hücre sayısına bağlı olarak artan propidyum iyodür sinyalidir.

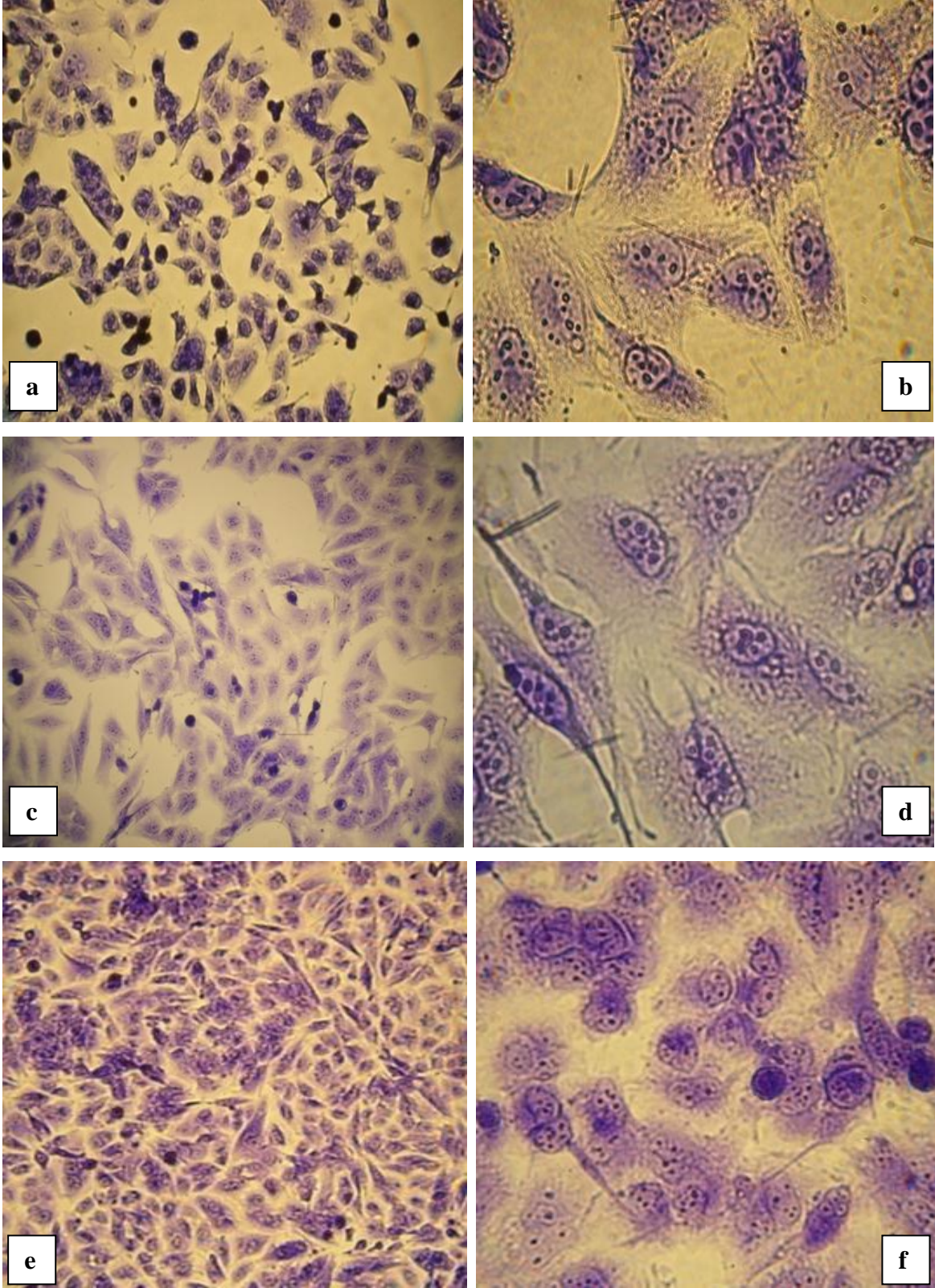




Şekil 4. 18. T98G hücrelerinin floresan boyanması: (a) 2. gün (10X), (b) 2. gün (20X), (c) 4. gün (10X), (d) 4. gün (20X), (e) 6. gün (10X), (f) 6. gün (20X). (Fotoğraflardaki kırmızı renk hücre çekirdeklerini, yeşil renk ise hücre iskeletlerini göstermektedir).

4.7.1.3. Optik mikroskop ile analiz

Karakterizasyon çalışmaları sırasında kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde kristal viyole ile boyanan T98G hücrelerine ait görüntüler Şekil 4.19'da verilmiştir. Elde edilen görüntülerde hücrelerin fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip oldukları ve hücre çekirdeklerinin, hücre sitoplazmasına göre daha koyu boyandığı görülmektedir. 7 günlük gözlem sonucunda, hücrelerin kısa sürede yüzeye tutunduğu ve çoğalmaya başladığı tespit edilmiş; aynı zamanda çok çekirdekli bir yapıya sahip oldukları ve yer yer uzantılarının olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4. 19. Kristal viyole ile boyanan T98G hücreleri (a) 1. gün (10X), (b) 1. gün (40X), (c) 3. gün (10X), (d) 3. gün (40X), (e) 5. gün (10X), (f) 5. gün (40X).

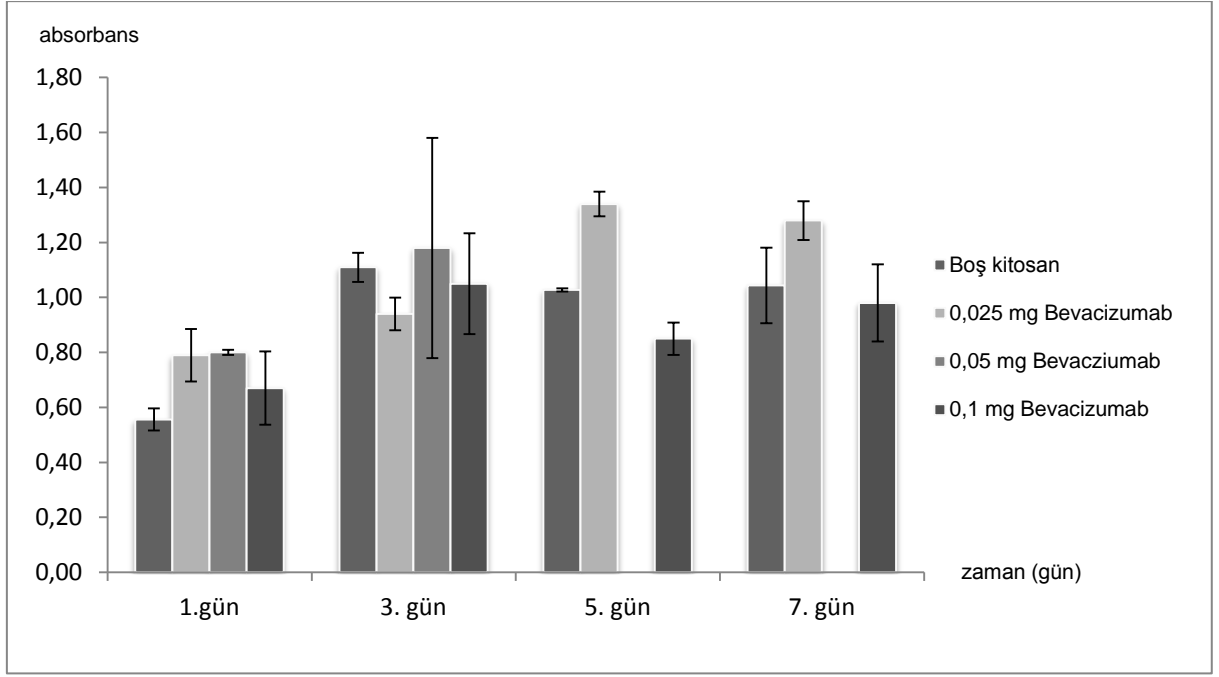
4.7.2. T98G hücrelerinin doku iskeleleriyle etkileştirilmeleri

Tezin bu kısmında yer alan çalışmalar Bölüm 4.7.1’de karakteristikleri tartışılan T98G beyin glioblastoma hücre hattı ile durgun kültür ortamında gerçekleştirilmiştir. Bölüm 4.7.2.1’de yer alan çalışmada boş ve Bevacizumab yüklü kitosan doku iskeleleri ile çalışılmıştır. Bölüm 4.7.2.2’de yer alan çalışmada boş, sadece Bevacizumab yüklü, sadece 5-FU yüklü ve hem Bevacizumab hem de 5-FU yüklü kitosan doku iskeleleri ile çalışılmıştır. Bölüm 4.7.2.3’te yer alan çalışmada ise boş, sadece Bevacizumab yüklü, sadece 5-FU yüklü ve hem Bevacizumab hem de 5-FU yüklü kitosan doku iskelelerinin yanı sıra TCPS ile de çalışılmıştır.

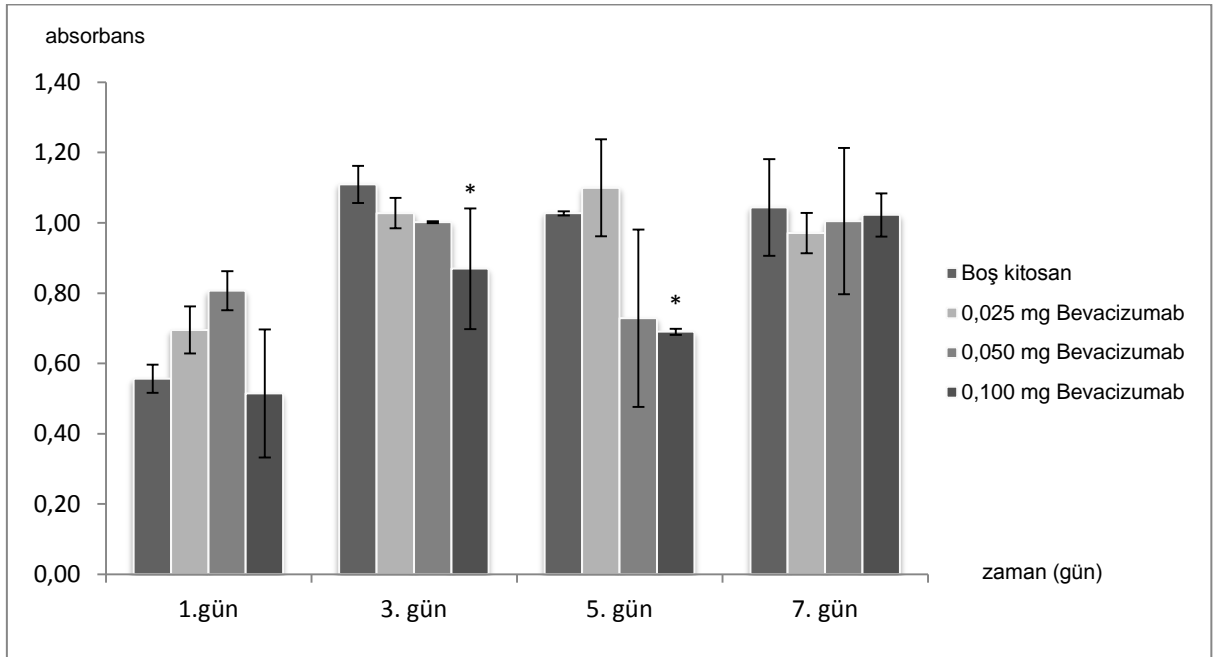
4.7.2.1. Doku iskelelerine yüklenen Bevacizumab miktarının belirlenmesi

Çalışmalarda kullanılacak Bevacizumab miktarının belirlenmesi amacıyla, 9 mm çapında 2 mm kalınlığındaki doku iskelelerine 3.1×10^4 hücre/mL derişiminde T98G hücreleri ekilmiştir. Bu hücreler üzerinde doku iskelesine enjekte edilen veya hücre ortamına serbest halde eklenen farklı miktarlardaki (0.025, 0.05 ve 0.1 mg/mL) Bevacizumab’ın etkisi incelenmiştir. Çalışma 7 gün devam ettirilmiş ve sadece hücre içeren boş kitosan doku iskeleleri, kontrol grubu olarak kullanılmıştır. İlacın hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi MTT test sonuçlarına göre belirlenmiştir.

Şekil 4.20 ile 4.21 karşılaştırıldığında; doku iskelesine enjekte edilen Bevacizumab’ın daha uzun süreli ve kontrollü salımı nedeniyle hücre üremesini, doğrudan hücre ortamına eklenen Bevacizumab’a göre daha fazla miktarda azalttığı görülmektedir. Çalışmanın amacı da kitosan doku iskelelerinde yer alan 5-FU ve Bevacizumab’ın istenilen hızda ve miktarda salınarak tümör hücrelerini yok etmesi ve salımın sürekliliği sayesinde yeni tümör hücresi oluşumunun engellenmesi olduğundan, Bevacizumab’ın doku iskelelerine enjeksiyon yoluyla yüklenmesine karar verilmiştir.



Şekil 4.20. Hücre ortamına serbest halde eklenen farklı miktarlardaki Bevacizumab'ın hücre üremesi üzerindeki etkileri.



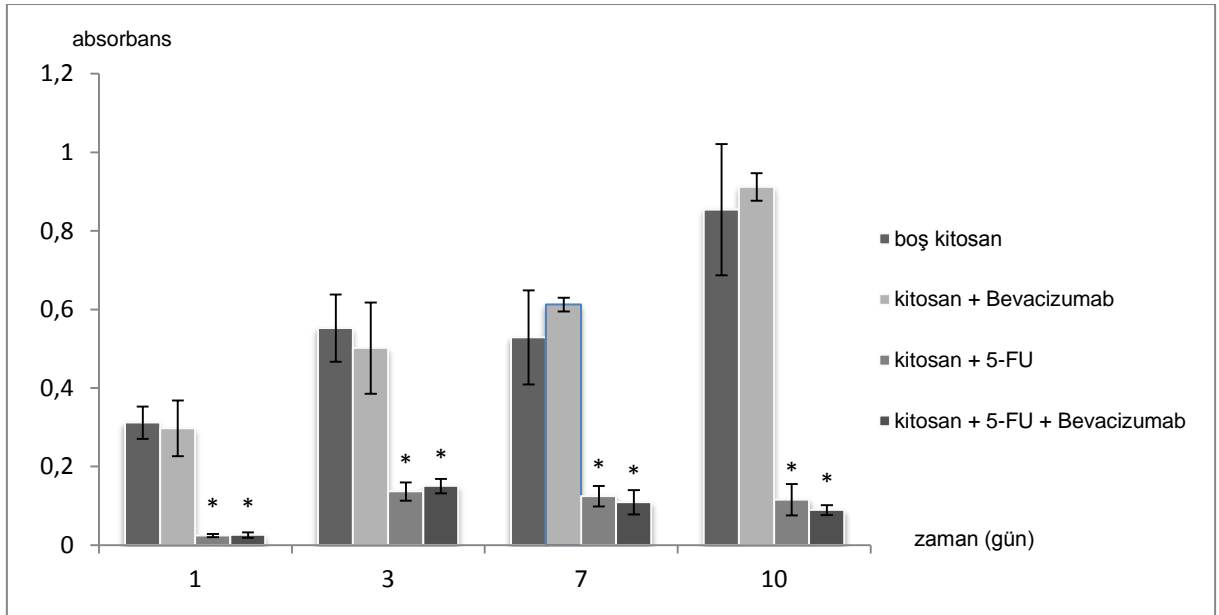
Şekil 4.21. Kitosan doku iskelelere enjekte edilen farklı miktarlardaki Bevacizumab'ın hücre üremesi üzerindeki etkileri.

Şekil 4.21'de görüldüğü üzere 0.1 mg Bevacizumab yüklü grupta hücre üremesi, ilk 5 günlük sürede, hem kontrol grubuna hem de diğer gruplara göre daha az olmuştur. 5. günden sonra bu grupta gerçekleşen hücre artışı, doku iskelesine

yüklenen Bevacizumab'ın hücreler tarafından kullanılması sonucu tükenmesinden yani ortamda Bevacizumab kalmamasından kaynaklanmaktadır. Çalışmada, 5 günden uzun süren kültürlerde, doku iskelelerine daha fazla Bevacizumab yüklenmesi gerekliliği ortaya konmuş ve bu bilgi ışığında bundan sonraki çalışmalarda doku iskelelerine 0.2 mg Bevacizumab yüklenmiştir.

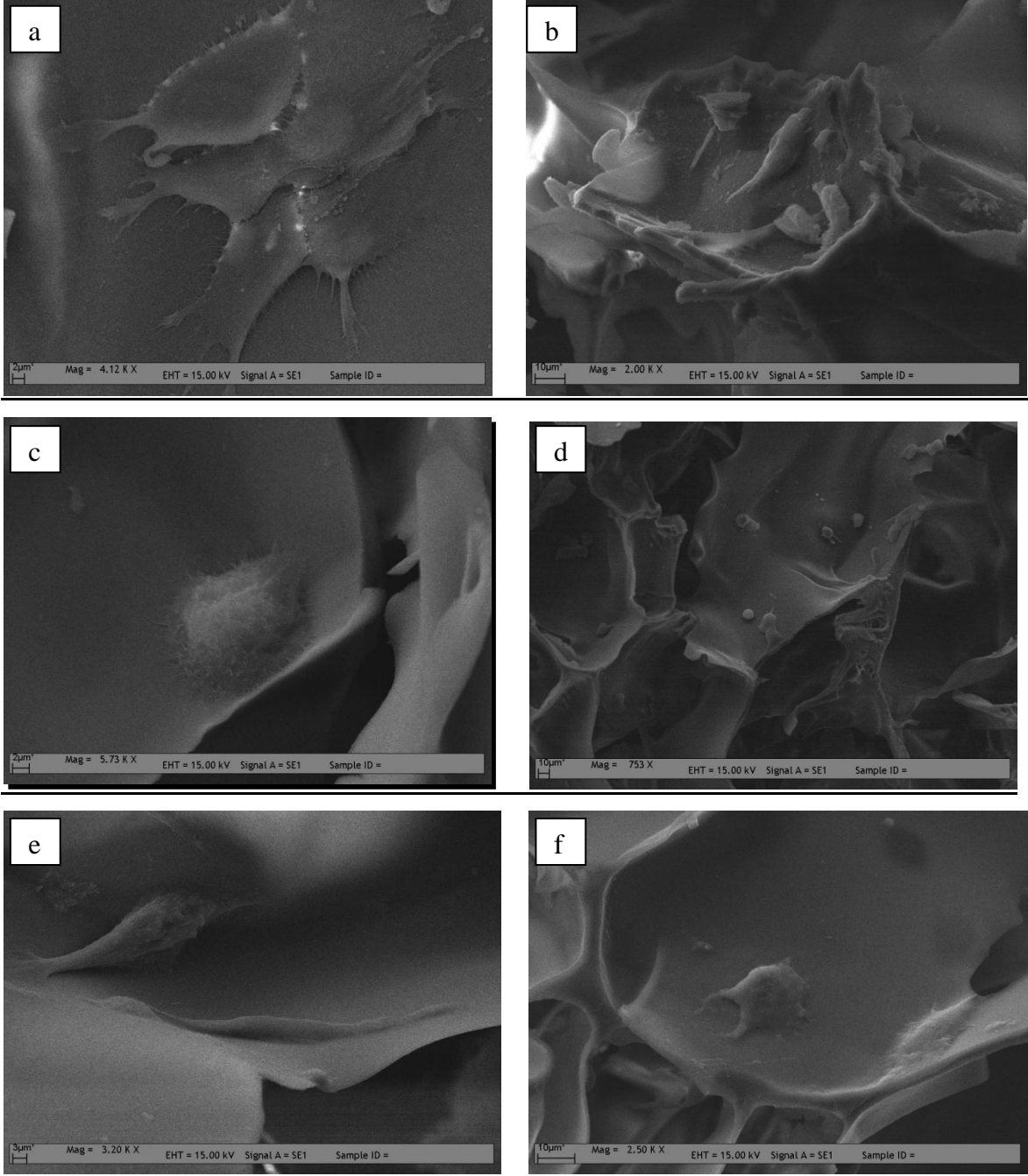
4.7.2.2. T98G hücrelerinin doku iskeleleriyle doğrudan etkileşimi

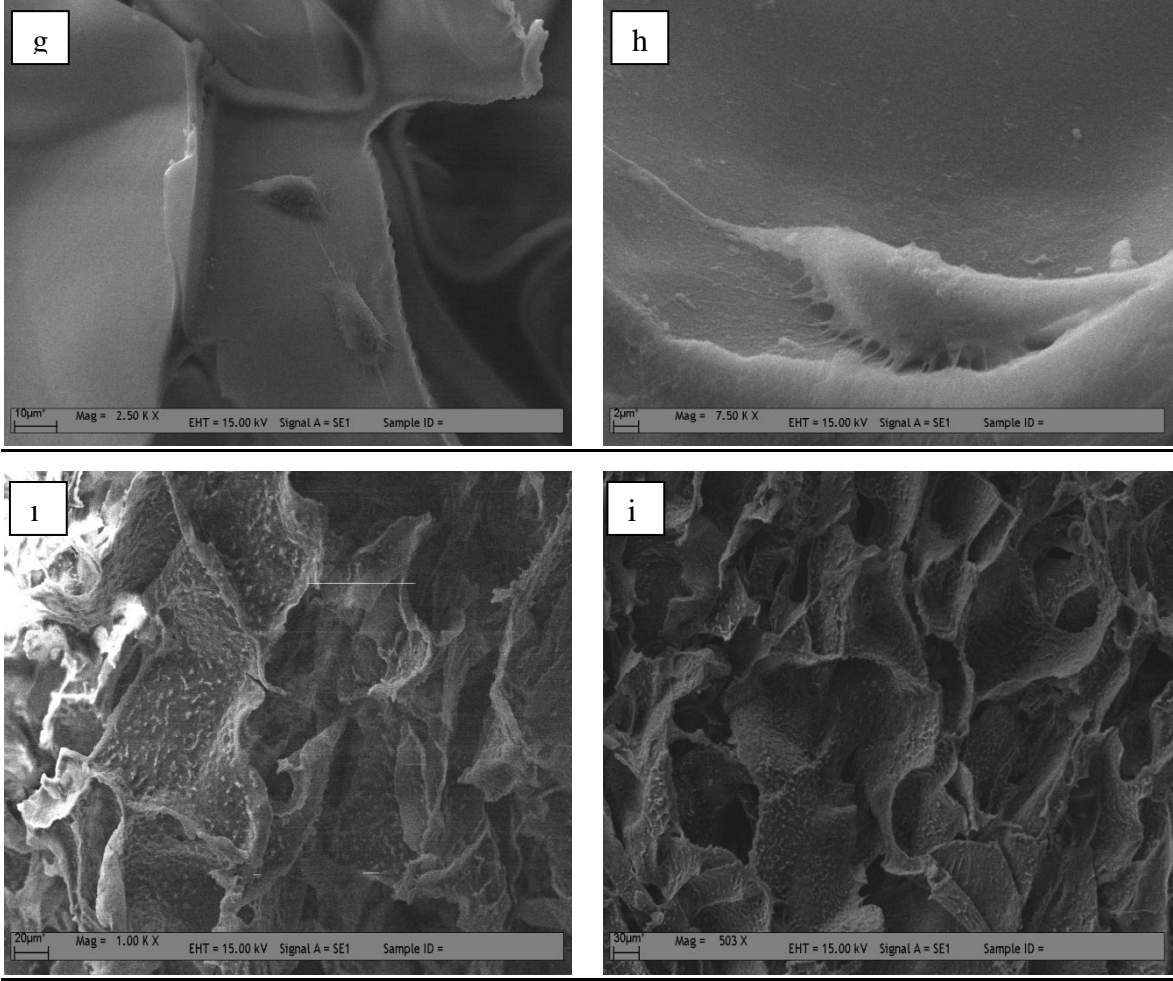
Çalışmanın bu aşamasında Bevacizumab, 5-FU ve kitosan doku iskeleleri kullanılarak oluşturulan farklı doku iskelesi-ilaç kombinasyonlarının (Bevacizumab içeren kitosan doku iskelesi, 5-FU içeren kitosan doku iskelesi ve hem Bevacizumab hem de 5-FU içeren kitosan doku iskelesi), T98G hücreleri üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarına göre; sadece 0.2 mg Bevacizumab içeren kitosan doku iskelelerindeki hücreler üzerinde ilacın ilk üç günden sonra herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı ($p>0.05$); 5-FU içeren ortamlarda hücre canlılığının ilk günden itibaren düşük olduğu ve ortama Bevacizumab'ın da katılmasıyla beraber hücre canlılığında kontrol grubuna göre anlamlı bir düşüş olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Boş kitosan, Bevacizumab, 5-FU yüklü ve 5-FU+Bevacizumab yüklü kitosan doku iskeleleriyle doğrudan etkileştirilen T98G hücrelerinin MTT sonuçları.

Şekil 4.23'te yer alan SEM görüntülerinde, kitosan doku iskelelerinin hücre büyümesini desteklediği bir kez daha teyit edilmiş (4.23-a,b); iskelelere enjekte edilen Bevacizumab'ın hücre üremesini engellemediği görülmüştür (4.23-c,d,e,f,g,h). Bevacizumab'ın yanısıra 5-FU içeren doku iskelelerinde hücre üremesinin MTT sonuçlarında da yer alan şekli ile minimum seviyede olduğu gözlenmiştir (4.23-ı,i).

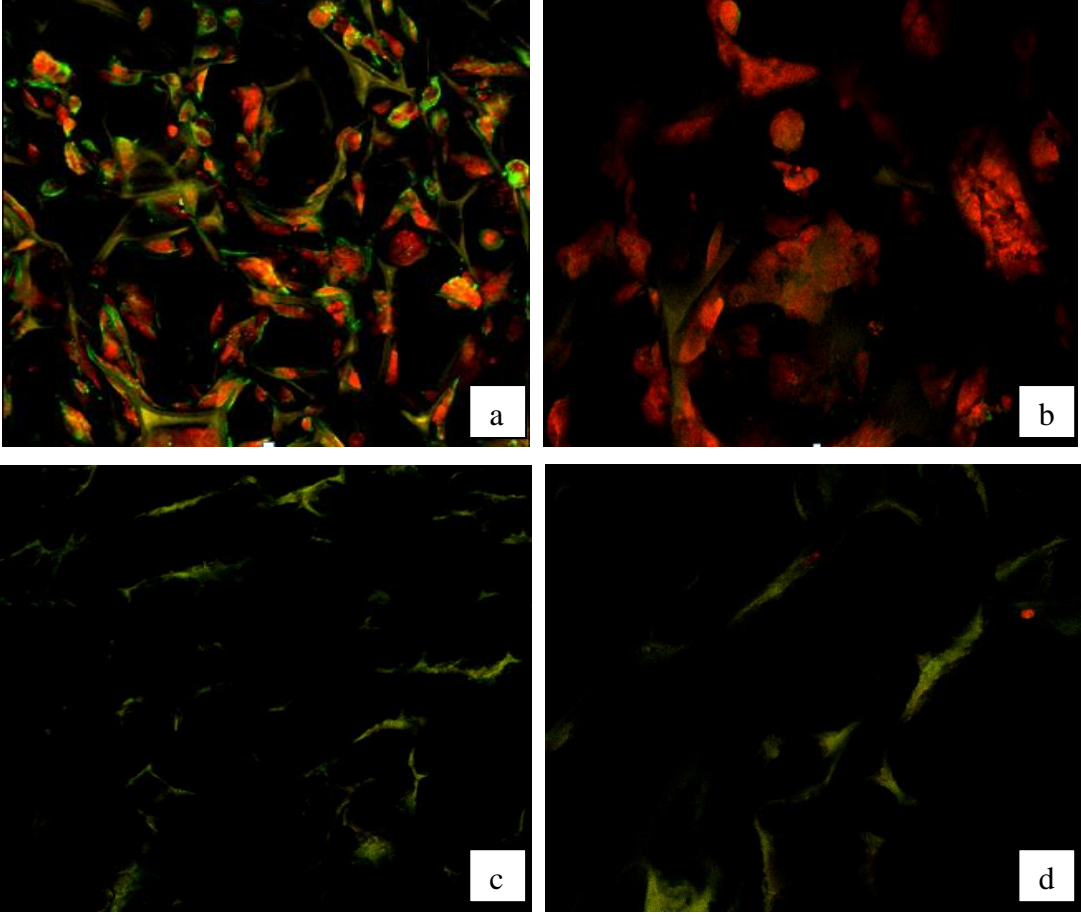


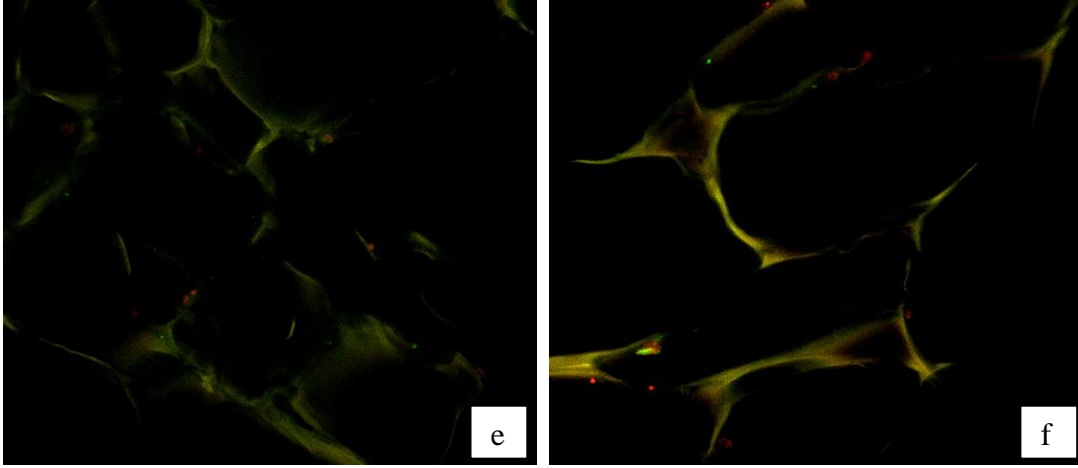


Şekil 4.23. Kitosan doku iskelelerindeki T98G hücrelerinin farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri: a) boş kitosan doku iskelesi 5. gün (x4000), b) boş kitosan iskele 8. gün (2000x), c)0.025 mg Bevacizumab yüklü iskele 3. gün (x5700), d) 0.025 mg Bevacizumab yüklü iskele 3. gün (x750), e) 0.05 mg Bevacizumab yüklü iskele 3. gün (x3200), f) 0.025 mg Bevacizumab yüklü iskele 5. gün (x2500), g) 0.025 mg Bevacizumab yüklü iskele 3. gün (x2500), h) 0.025 mg Bevacizumab yüklü iskele 5. gün (x7500), ı) 5-FU yüklü iskele 8. gün(x1000) , i) 5-FU+Bevacizumab yüklü iskele 8. gün (x500).

Hücrelerin iskelet organizasyonu ve doku iskelesi içerisindeki yayılımları konfokal mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. CLSM fotoğraflarının tümü 20X büyütmeye çekilmiştir. Kültürün 8. gününde T98G hücreleri kitosan doku iskelesinin iç kısımlarına doğru yayılarak çoğalmıştır (4.24.a). Sadece Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelelerinde hücreler, doku iskelesinin iç kısımlarına doğru ilerlemekte ve agregat oluşturmaktadır (4.24.b). 5-FU yüklü kitosan doku iskelelerinde ise ihmal edilebilir düzeyde canlı hücre bulunmaktadır (4.24.c ve

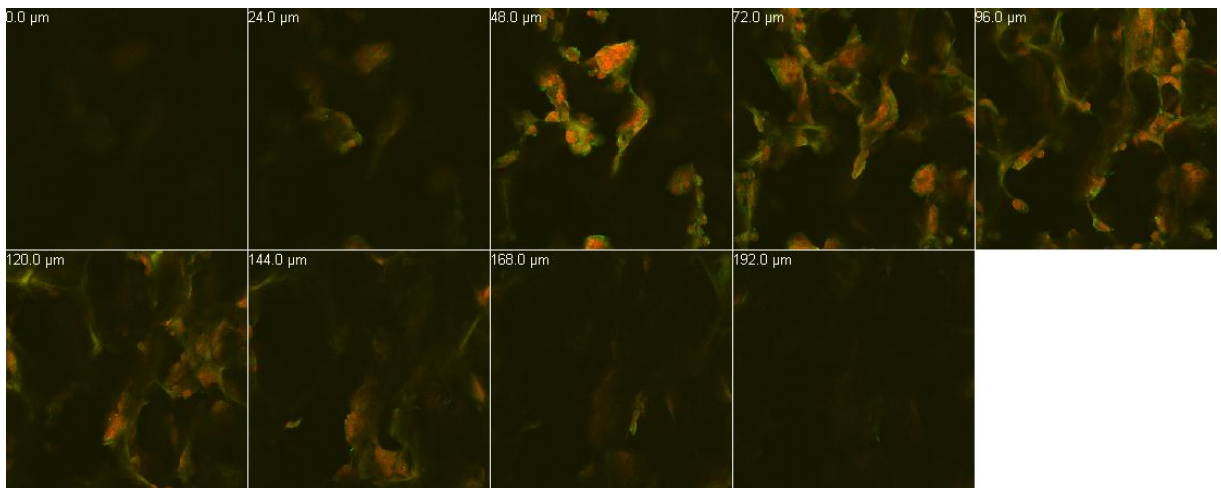
4.24.d). Ancak kültürün süresi uzadıkça hücre çoğalmasının azaldığı görülmüş, 15. güne gelindiğinde 5-FU içermeyen doku iskelelerinde bile çok az sayıda canlı hücre bulunduğu tespit edilmiştir (4.24.e ve 4.24.f).



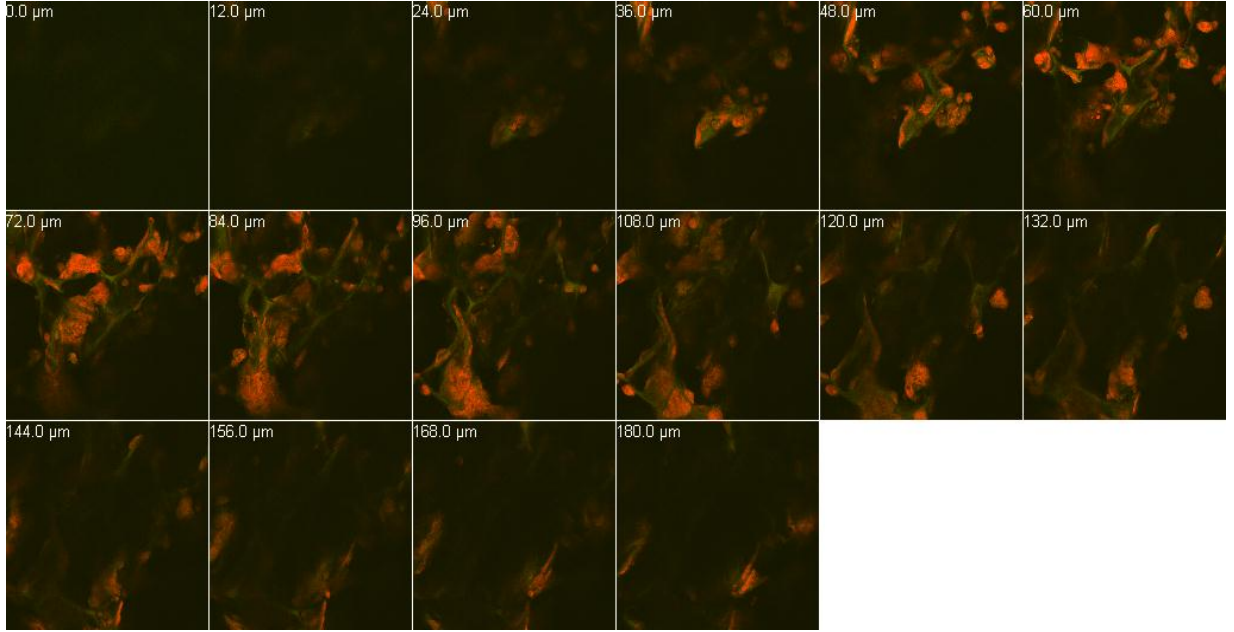


Şekil 4.24. Kitosan doku iskelelerindeki T98G hücrelerinin farklı koşul ve günlerdeki CLSM görüntüleri: (a) boş kitosan doku iskelesi (8. gün), (b) Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelesi (8. gün), (c) 5-FU yüklü kitosan doku iskelesi (8. gün), (d) 5-FU ve Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelesi (8. gün), (e) boş kitosan doku iskelesi (15. gün), (b) Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelesi (15. gün). (Fotoğraflardaki kırmızı renk hücre çekirdeklerini, yeşil renk ise hücre iskeletlerini göstermektedir).

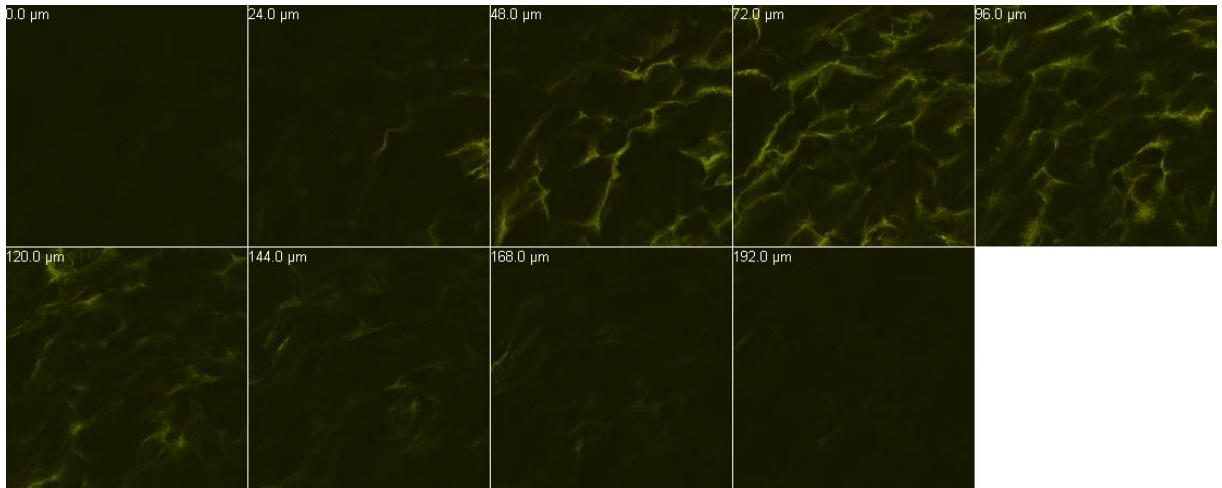
3 boyutlu kitosan doku iskelelerinin iç kısımlarına ilerleyen hücreleri görüntülemek amacıyla çekilen fotoğraflar Zeiss LSM Image Browser programı kullanılarak tabakalara ayrılmış ve hücrelerin çeşitli tabakalardaki konumları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.25, 4.26, 4.27 ve 4.28).



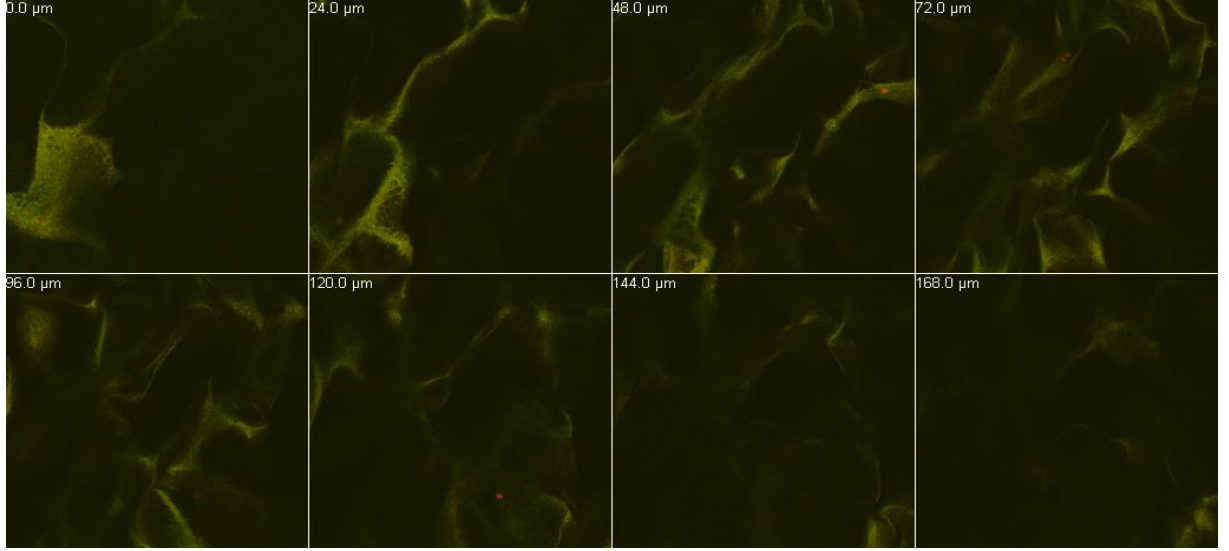
Şekil 4.25. Kültürün 8. gününde kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki T98G hücre yoğunluklarını gösteren CLSM fotoğrafları.



Şekil 4.26. Kültürün 8. gününde Bevacizumab içeren kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki T98G hücre yoğunluklarını gösteren CLSM fotoğrafları.



Şekil 4.27. Kültürün 8. gününde 5-FU içeren kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki T98G hücre yoğunluklarını gösteren CLSM fotoğrafları.

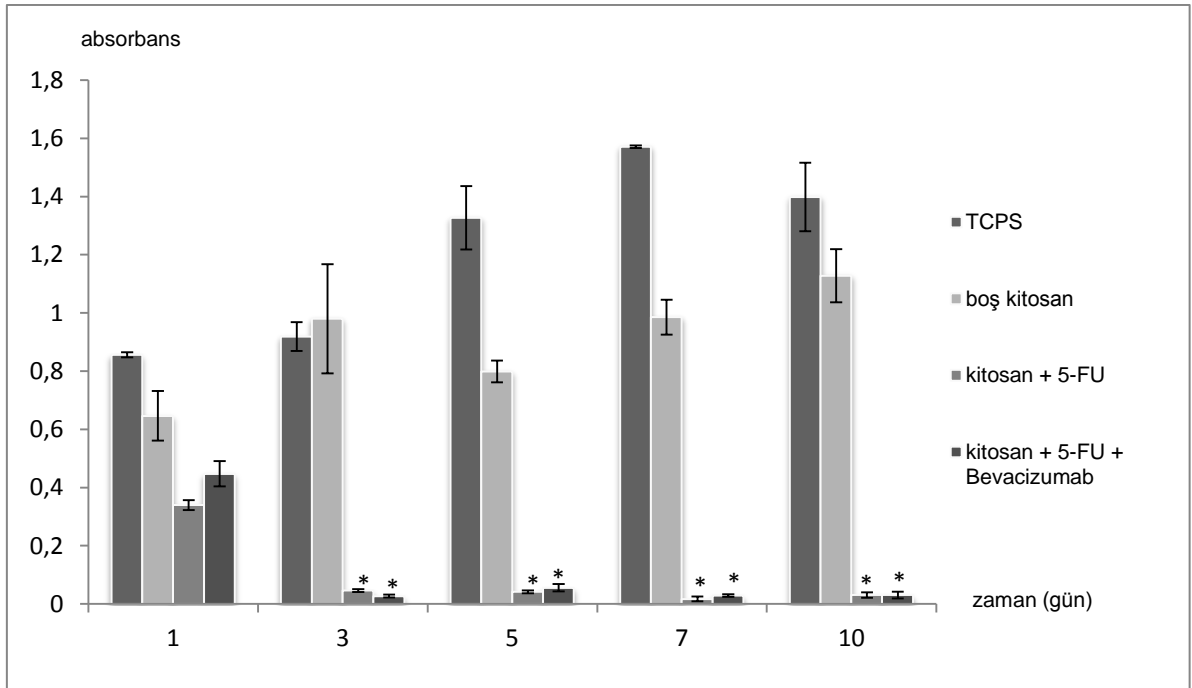


Şekil 4.28. Kültürün 8. gününde 5-FU ve Bevacizumab içeren kitosan iskelelerinde farklı derinliklerdeki T98G hücre yoğunluklarını gösteren CLSM yoğunlukları.

4.7.2.3. T98G hücrelerinin doku iskeleleriyle dolaylı etkileşimi

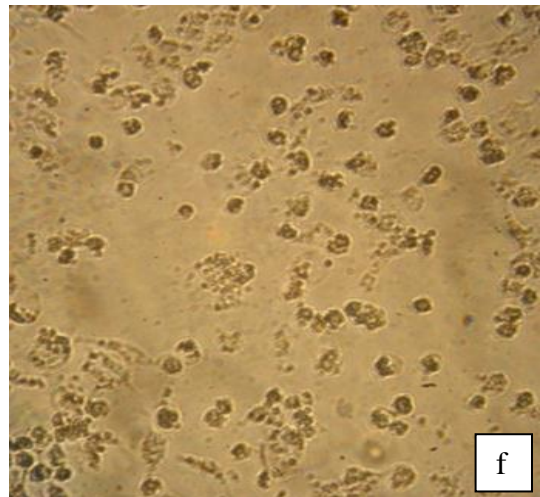
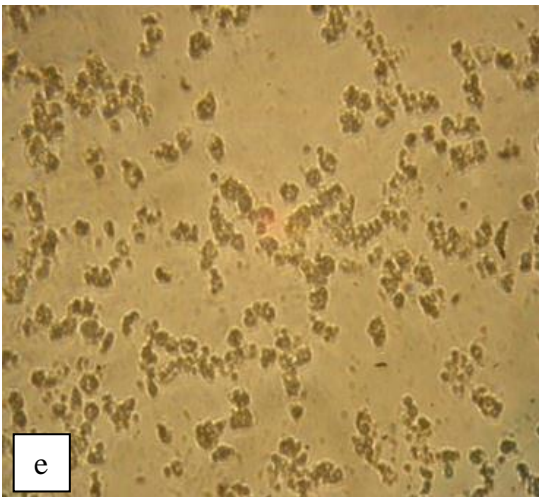
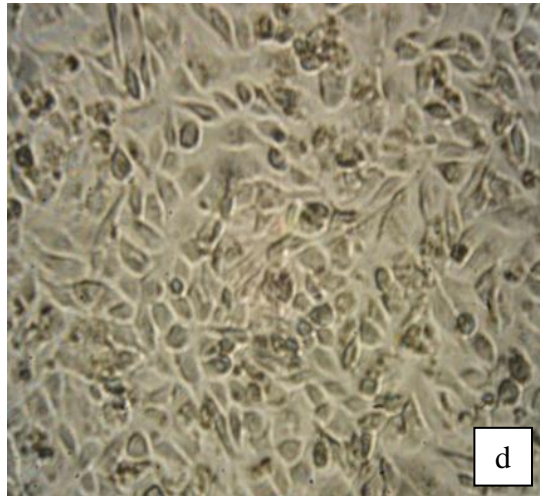
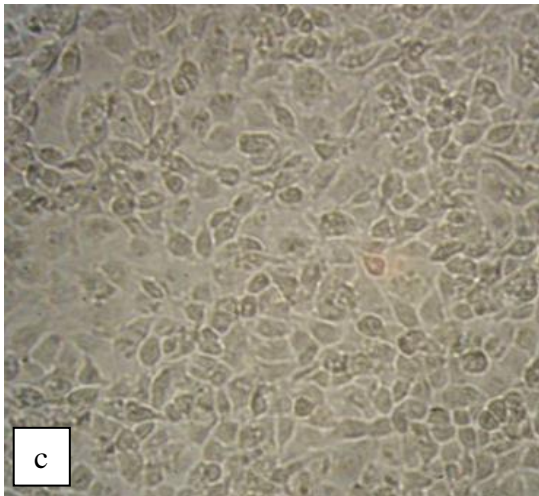
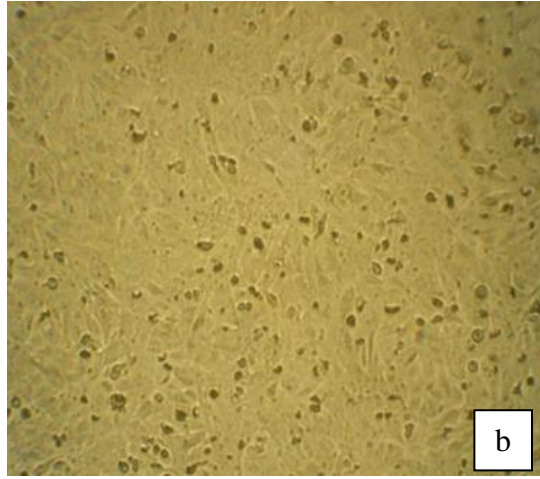
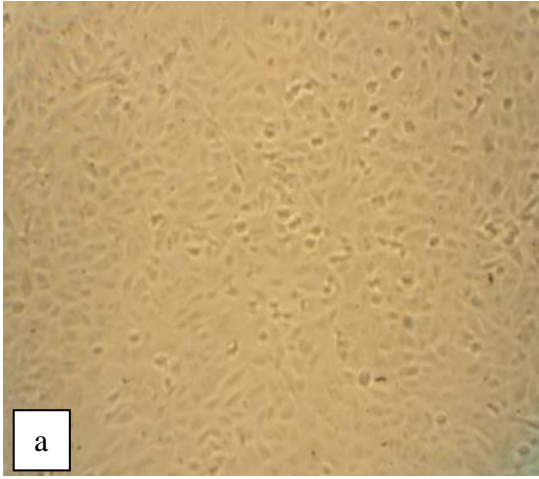
T98G hücrelerinin kitosan doku iskeleleriyle doğrudan etkileşimlerinin incelendiği çalışmada kitosan doku iskelelerine sadece Bevacizumab yüklenmesinin hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir azalmaya neden olmadığı tespit edildiğinden; bu çalışmada T98G hücreleri; hücre kültür kaplarına (TCPS) ekilmiş ve üzerlerine; boş, 5-FU yüklü ve hem 5-FU hem de Bevacizumab yüklü kitosan doku iskeleleri yerleştirilmiştir. Herhangibir kitosan doku iskelesi içermeyen TCPS yüzeye ekilen T98G hücreleri de kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışmanın bu aşamasında yukarıda açıklanan yöntemin tercih edilmesinin nedeni, *in-vivo* sistemlerde doku iskelesi-nanopartikül çift etkili sisteminin kullanım şeklidir. Bölüm 3.6.3.2’de de açıklandığı üzere, doku iskeleleri hücrelerle doğrudan etkileştirilmemiş, kültür kabına ekilen hücrelerin üzerlerine kitosan doku iskeleleri 2 saat sonra yerleştirilmiştir. 5-FU ve Bevacizumab’ın tümör hücreleri üzerindeki etkilerini analiz ederken de kontrol grubu olarak boş kitosan doku iskeleleri baz alınmıştır. Şekil 4.29’da yer alan sonuçlara göre 5-FU içeren doku iskelelerindeki hücre canlılığı ilk günden itibaren anlamlı bir biçimde azalmış ($p<0.05$) ve doku iskelelerinin hücrelerle doğrudan etkileştirildiği çalışmada da olduğu gibi; 5-FU içeren doku iskelelerine Bevacizumab eklenmesi hücre canlılığındaki azalmanın artmasına neden olmuştur.

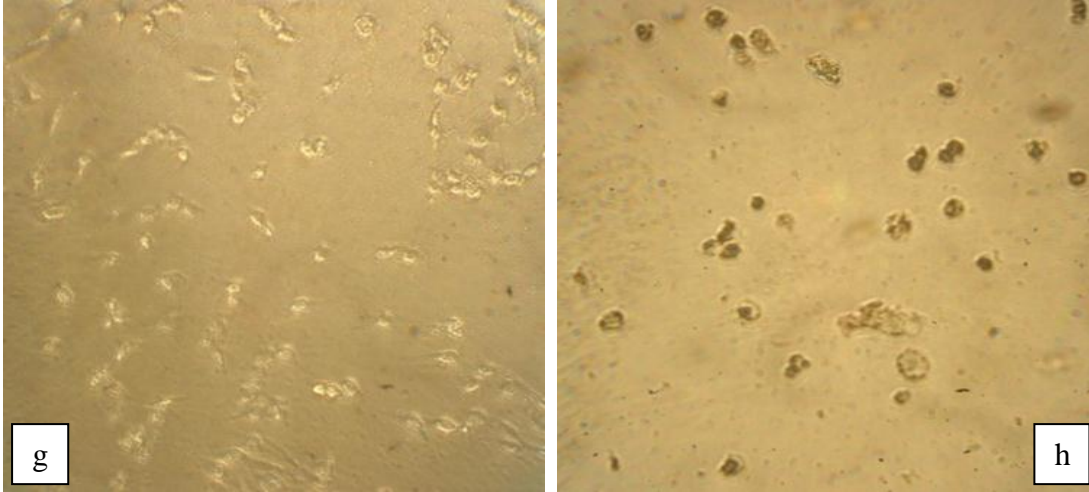
Ayrıca Şekil 4.29'daki MTT değerlerine göre, ilacın enkapsüle olduğu partiküllerden ortama salınarak hücrelerle etkileşmesinin, partikül içeren doku iskelelerine hücrelerin ekilmesi sonucu ilacın hücrelerle doğrudan etkileşmesinden daha etkili olduğu görülmektedir. Çünkü partiküllerden salınıp hücre ortamında dağılan 5-FU ve Bevacizumab, hücre kültür kabı yüzeyini kaplayan hücre yüzeylerinin tamamı ile temas etmektedir. Halbuki doğrudan doku iskelesine ekilen hücrelerin, büyük oranda, partiküllerle temas eden yüzeyleri ilaçlara maruz kalmaktadır. Bu durumda; 5-FU için hem PLGA nanopartiküllerin hem de kitosan doku iskelesinin bariyer vazifesi görmesi, difüzyon engelini arttırmaktadır. İlgili literatürde de belirtildiği gibi, ilaçların daha geniş yüzey alanı ile temas etmesinin hücre canlılığında önemli bir etken olduğu ortaya çıkmaktadır (Sheetz ve ark., 1976).



Şekil 4.29. TCPS'te boş kitosan, 5-FU yüklü ve 5-FU+Bevacizumab yüklü kitosan doku iskeleleriyle dolaylı etkileştirilen T98G hücrelerinin MTT sonuçları.

Çekilen optik mikroskop görüntüleri ile TCPS'te ve boş kitosan doku iskelesi içeren ortamda T98G hücrelerinin üremeleri gözlenmiş (4.30-a,b,c,d); 5-FU içeren doku iskelelerinden ortama salınan 5-FU'nun hücre üremesini 2. günden itibaren azalttığı ve ilerleyen günlerde tamamen engellediği görülmüştür (4.30-e,f,g,h).





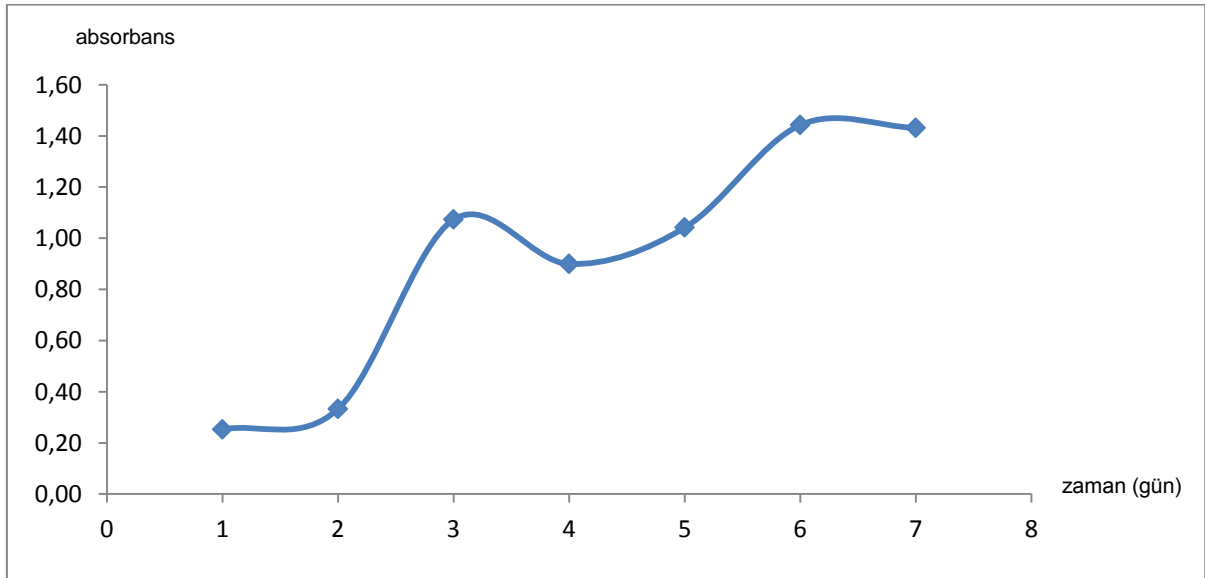
Şekil 4.30. Kültür kabına ekilen T98G hücrelerinin doku iskeleleriyle dolaylı etkileşimlerini gösteren optik mikroskop görüntüleri (x20); a) TCPS 3. gün, b) TCPS 5. gün, c) boş kitosan 3. gün, d) boş kitosan 5. gün, e) kitosan+5-FU 3. gün, f) kitosan +5-FU 5. gün, g) kitosan + 5-FU + Bevacizumab 3. gün, h) kitosan + 5-FU + Bevacizumab 5. gün.

T98G insan glioblastoma hücreleriyle yapılan tüm çalışmalar özetlenecek olursa; T98G hücrelerinin diğer tümör hücreleri gibi hızla çoğaldıkları ve fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip oldukları görülmüştür. Hücrelerin doğrudan kitosan doku iskelesine ekilmesiyle gerçekleşen denemelerde, Bevacizumabın, miktarından bağımsız olarak, T98G hücreleri üzerinde anlamlı bir olumsuz etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum Bevacizumab'ın hücreler üzerindeki etki mekanizmasından kaynaklanmaktadır. Yine etki mekanizmasına bağlı olarak 5-FU'nun T98G hücreleri üzerinde kültürün 1. gününden itibaren öldürücü bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Çekilen CLSM fotoğraflarında 5-FU içermeyen doku iskelelerinde T98G hücrelerinin, iskelenin derinliklerine kadar ilerledikleri ve hem iskele yüzeyine tutunmak hem de diğer hücrelerle ilişki kurabilmek için çeşitli uzantılar oluşturdukları gözlenmiştir. Hücrelerin dolaylı olarak kitosan doku iskeleleri ve ilaçlarla etkileştirildikleri çalışmalarda ise hücrelerin kültür ortamında ilaçlarla daha kolay temasa geçmelerine bağlı olarak, ilaçların hücreler üzerindeki olumsuz etkilerinin arttığı tespit edilmiştir.

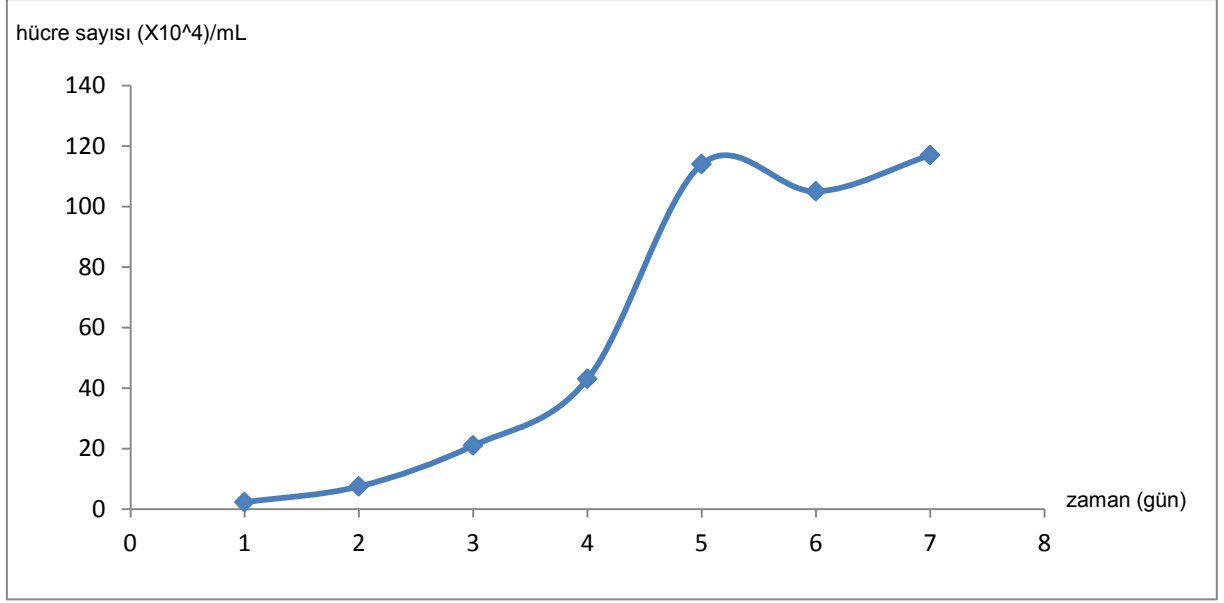
4.7.3. HUVEC'lerin karakterizasyon çalışmaları

4.7.3.1. MTT analizi ve hücre sayım sonuçları

İnsan damar endotelinden izole edilen Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC)'lerin üremesi ve morfolojileri polistiren kültür kaplarında 7 gün boyunca izlenmiştir. Hücrelerin 7 günlük inkübasyonu boyunca hücre sayımı sonucu hesaplanan hücre sayısı değerleri ile 1:2 oranında seyreltilen ortamların MTT testleri sonucu elde edilen absorbans değerlerine karşılık zaman grafikleri (Şekil 4.31) çizilmiştir, bu sayede hücre büyüme eğrisinin gecikme fazı (lag fazı), aktif üreme fazı (log fazı), durgun ve ölüm fazları gösterilmiştir (Şekil 4.32). Başlangıç hücre konsantrasyonu 4×10^4 hücre/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.31. 1:2 oranında seyreltilen ortamların MTT testleri sonucu elde edilen HUVEC üreme grafiği.



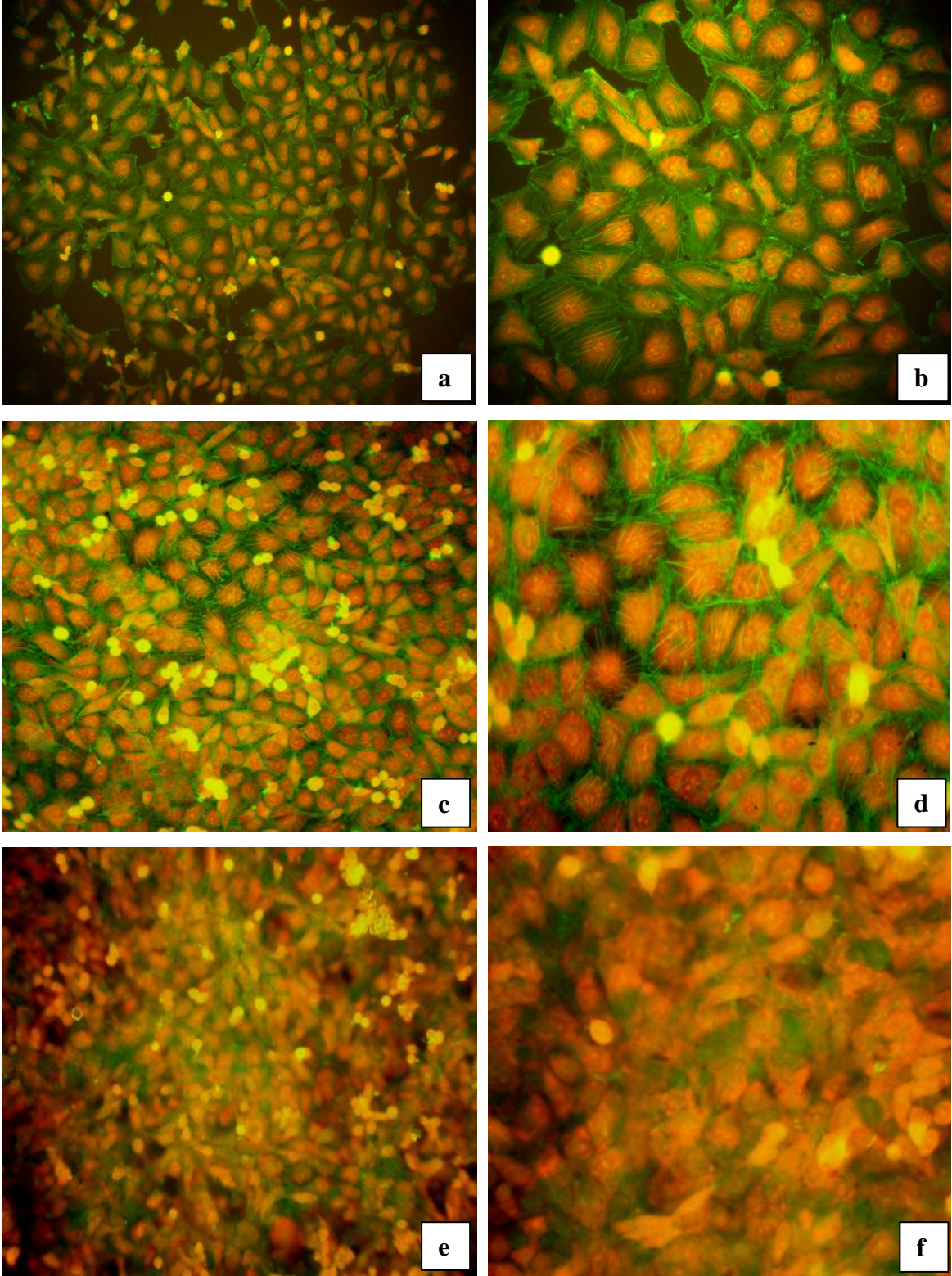
Şekil 4.32. Hemositometrik hücre sayımı sonucu elde edilen HUVEC üreme grafiği.

Şekil 4.32’de yer alan üreme grafiğinde, hücrelerin 3. günde logaritmik faza, 5. günden sonra durgun faza girdiği görülmektedir. Hücrelerin üreme hızı ve ikilenme süreleri Bölüm 4.7.1.1’de yer alan eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

Bölüm 4.7.1.1’de de belirtildiği gibi $\ln x$ ’e karşı t ’nin grafiği çizildiğinde, grafiğin eğimi özgül üreme hızını (μ) vermektedir. Çalışmamızda, HUVEClar için özgül üreme hızı 0.0279 sa^{-1} , ikilenme süresi ise $24,73 \text{ sa}$ olarak bulunmuştur. Elde edilen veriler literatürde yer alan bilgilerle uyum içerisindedir (Ne`gre-Aminou et al., 1997).

4.7.3.2. Floresan mikroskobu ile analiz

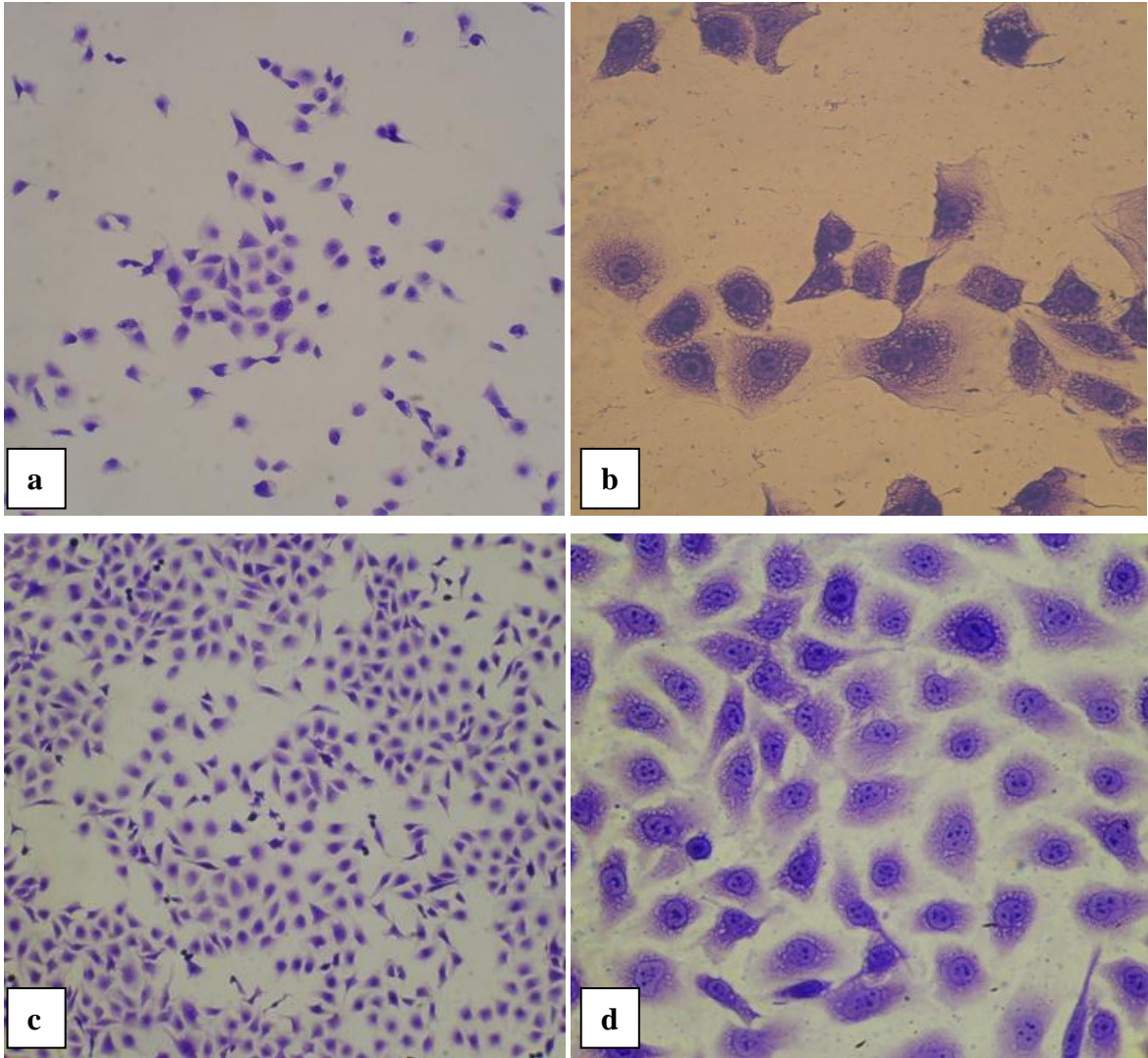
Alexa Fluor 488 phalloidin ve propidium iodide ile yapılan 2’li boyama sonucunda çekilen floresan mikroskop fotoğraflarında çekirdek kırmızı, F-aktin ise yeşil olarak görülmektedir (Şekil 4.33). Boyamaların ardından çekilen fotoğraflarda, endotel hücrelerin karakteristik özelliği olan tek katlı, yassı, poligonal hücre yapısı ve hücrelere yapısal destek sağlayan bol miktardaki ince filamentler net bir biçimde görülmektedir. 4. günden sonra hücreler aşırı çoğalarak hücre kültür kabına sığamaz hale gelmiş ve tek katlı yapı kaybolarak, hücre morfolojisi net bir biçimde ayırdedilemez olmuştur (Şekil 4.33-e,f).

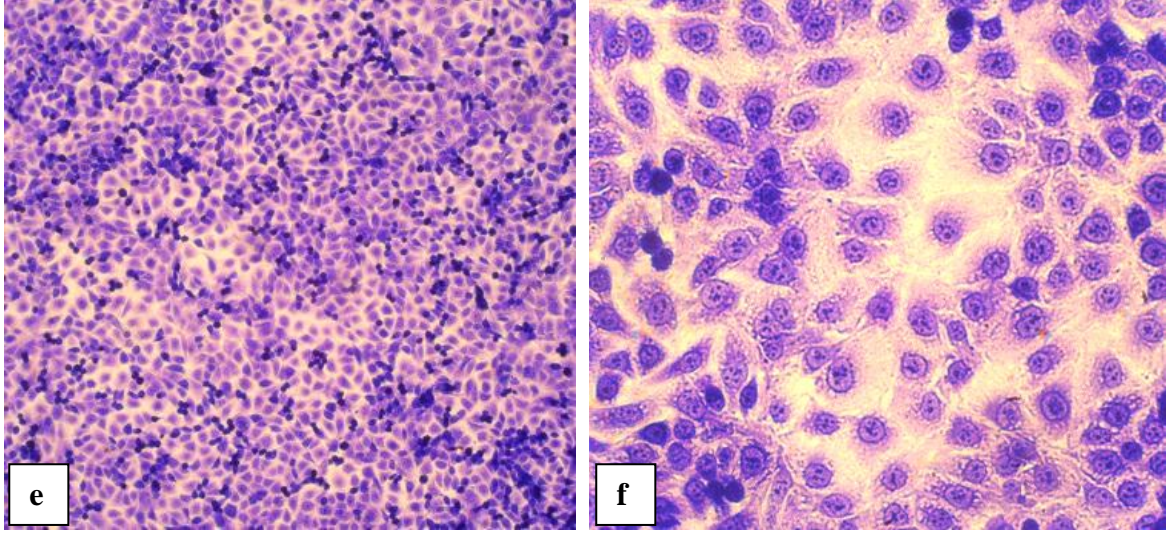


Şekil 4. 33. HUVEC'lerin floresan mikroskop görüntüleri (a) 2. gün (10X), (b) 2. gün (20X), (c) 4. gün (10X), (d) 4. gün (20X), (e) 6. gün (10X), (f) 6. gün (20X). (Fotoğraflardaki kırmızı renk hücre çekirdeklerini, yeşil renk ise hücre iskeletlerini göstermektedir).

4.7.3.3. Optik mikroskop ile analiz

Karakterizasyon çalışmaları sırasında kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde kristal viyole ile boyanan HUVEC hücrelerine ait görüntüler Şekil 4.34'te verilmiştir. Elde edilen görüntülerde hücre çekirdeklerinin, hücre sitoplazmasına göre daha koyu boyandığı görülmektedir. 7 günlük gözlem sonucunda, hücre çekirdeklerinin lümenine doğru kabarık, yassı ve oval oldukları gözlenmiş, hücrelerin poligonal ve uzunlamasına yapıda oldukları tespit edilmiştir.





Şekil 4. 34. Kristal viyole ile boyanan HUVEC'ler: (a) 1. gün (10X), (b) 1. gün (40X), (c) 3. gün (10X), (d) 3. gün (40X), (e) 5. gün (5X), (f) 5. gün (40X).

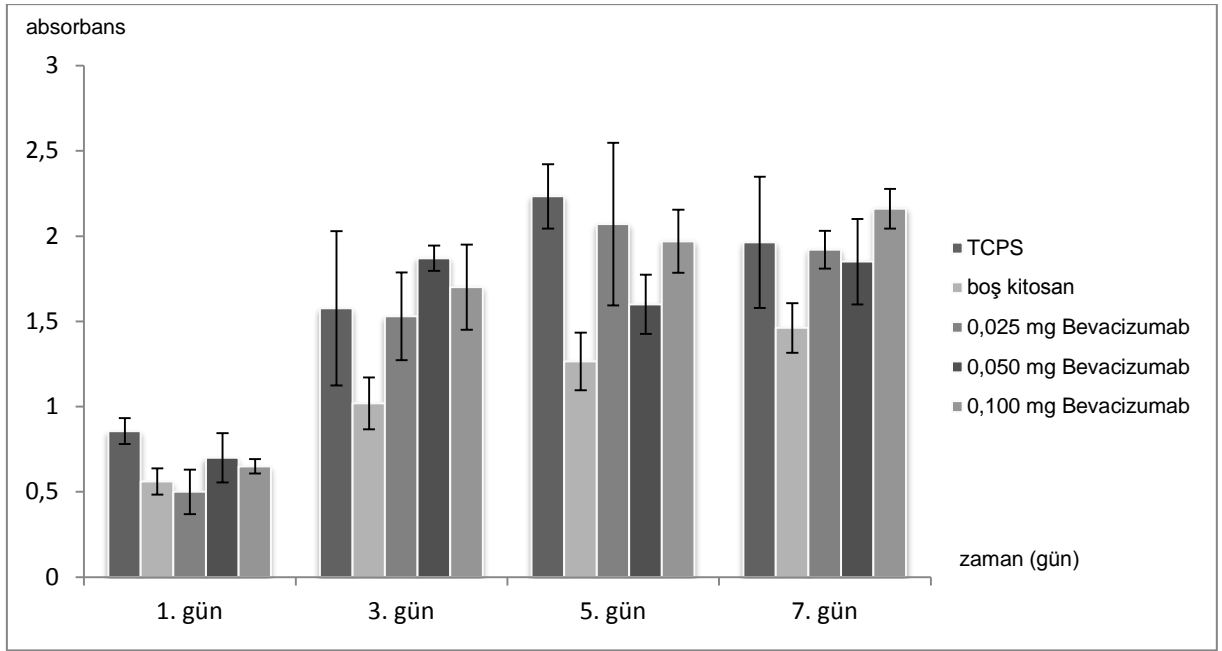
4.7.4. HUVEC'lerin doku iskeleleriyle etkileştirilmeleri

Tezin bu kısmında yer alan çalışmalar HUVEC hücre hattı ile durgun kültür ortamında gerçekleştirilmiştir. Bölüm 4.7.4.1'de yer alan çalışmada boş ve Bevacizumab yüklü kitosan doku iskeleleri ile çalışılmıştır. Bölüm 4.7.4.2'de yer alan çalışmada ise boş, sadece Bevacizumab yüklü, sadece 5-FU yüklü ve hem Bevacizumab hem de 5-FU yüklü kitosan doku iskelelerinin yanı sıra TCPS ile de çalışılmıştır.

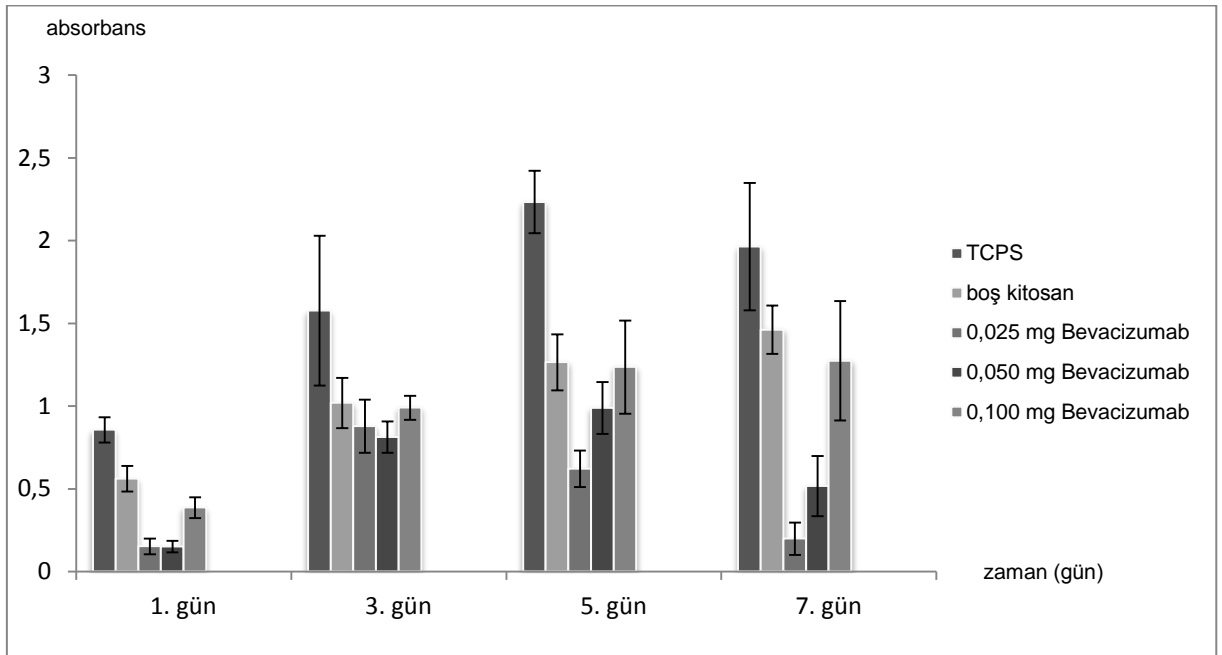
4.7.4.1. Doku iskelelerine yüklenen Bevacizumab miktarının belirlenmesi

HUVEC'lerde kullanılacak Bevacizumab miktarının belirlenirken Bölüm 4.7.2.1'de yer alan yöntem kullanılmıştır. Kitosan doku iskelelerine başlangıçta 4×10^4 hücre/mL hücre ekilmiş ve boş kitosan doku iskeleleri ile TCPS, kontrol grubu olarak kullanılmıştır. İlacın hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi MTT test sonuçlarına ve çekilen optik mikroskop fotoğraflarına göre belirlenmiştir.

Şekil 4.35 ile 4.36 karşılaştırıldığında doku iskelesine enjekte edilen Bevacizumab'ın hücre üremesini, hücre ortamına eklenen Bevacizumab'a göre daha fazla miktarda azalttığı görülmektedir. Bu nedenle söz konusu aşamadan sonraki tüm hücre kültürü çalışmalarında, Bevacizumab, doku iskelelerine enjekte edilmek suretiyle hücrelerle etkileştirilmiştir.



Şekil 4.35. Hücre kültür ortamına serbest halde eklenen farklı miktarlardaki Bevacizumab'ın HUVEC üremesi üzerindeki etkileri.



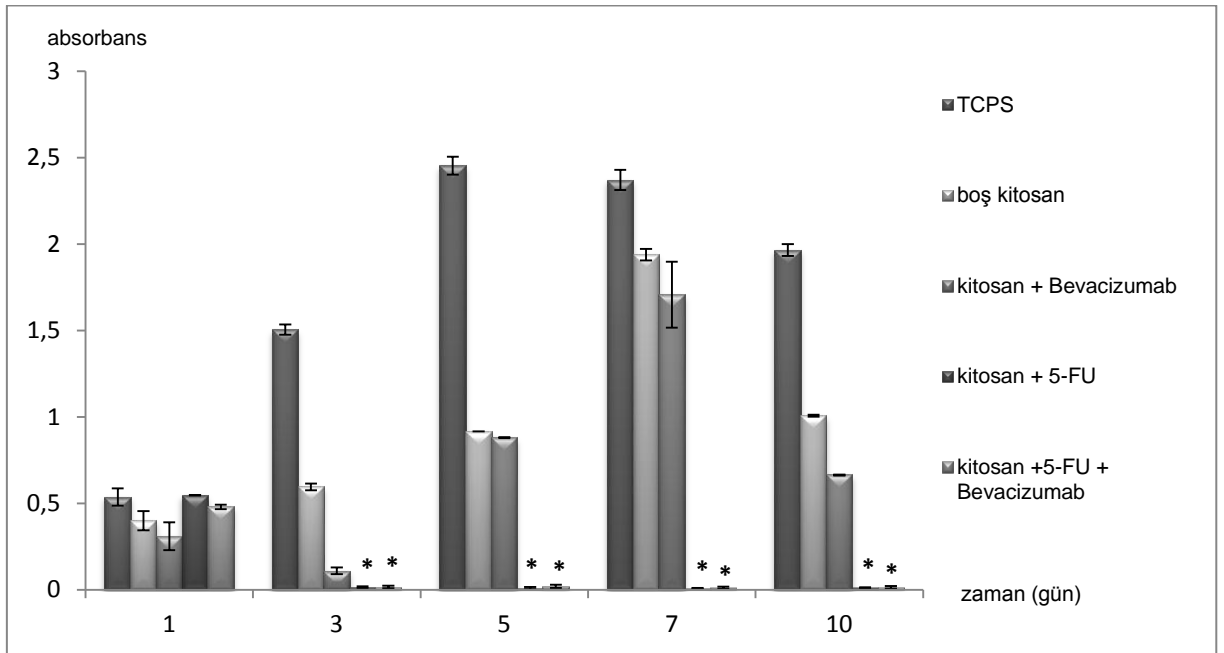
Şekil 4.36. Kitosan doku iskelelerine enjekte edilen farklı miktarlardaki Bevacizumab'ın HUVEC üremesi üzerindeki etkileri.

Şekil 4.36'da görüldüğü üzere 0.025 mg ve 0.05 mg Bevacizumab yüklü doku iskelelerinin olduğu gruplardaki hücreler, 7 günlük kültürasyon boyunca benzer üreme davranışları göstermişlerdir. Elde edilen MTT sonuçları, 0.025 mg

Bevacizumab'ın HUVEC'lerin üremeleri açısından en etkili doz olduğunu göstermektedir. Ancak SPSS 11.5 programı kullanılarak yapılan istatistiksel analizlerde, hücre üremesi üzerinde en olumsuz etkinin 0.05 mg Bevacizumab içeren grupta gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmanın ileriki aşamalarında kitosan doku iskelelerine 0.05 mg Bevacizumab enjekte edilerek, hücre üreme davranışı takip edilmiştir.

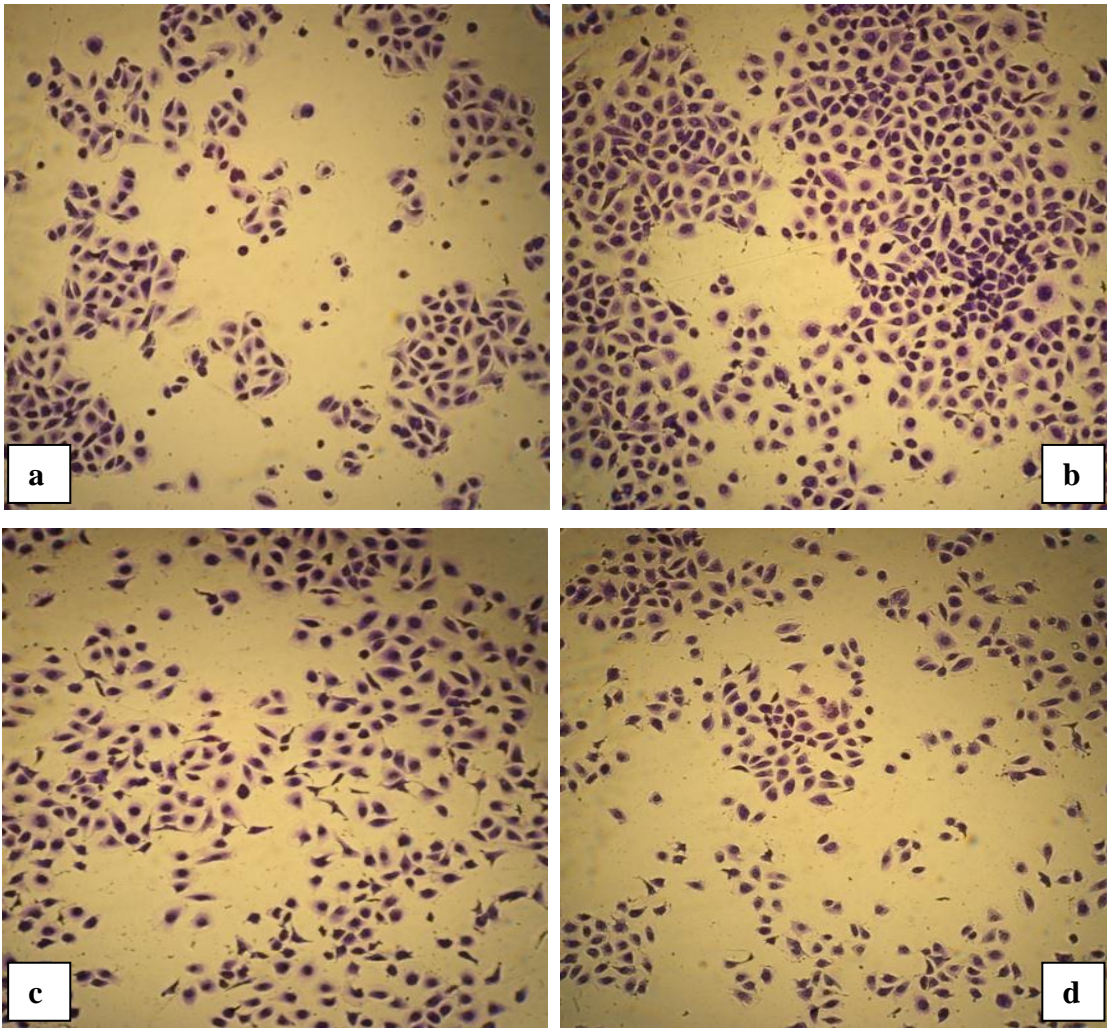
4.7.4.2. HUVEC'lerin doku iskeleleriyle dolaylı etkileşimi

HUVEC'lerin sadece Bevacizumab ve sadece 5-FU içeren doku iskeleleri ile hem Bevacizumab hem de 5-FU içeren doku iskeleleri ile etkileştirilmesi suretiyle, tez kapsamında kullanılan ilaçların, hücreler üzerindeki etkilerine bakılmıştır. Elde edilen MTT sonuçlarına göre; sadece 0.05 mg Bevacizumab içeren kitosan doku iskeleleri ile etkileştirilen hücreler üzerinde ilacın, olumsuz etkisinin olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). Aynı olumsuz etki sadece 5-FU içeren doku iskeleleri ile kültüre edilen HUVEC'lerde de kültürün 3. gününden itibaren gözlenmiştir ($p < 0.05$). 5-FU içeren doku iskelelerinin olduğu kültür kabına 0.05 mg Bevacizumab eklendiğinde ise, hücreler üzerindeki olumsuz etkinin bir miktar daha arttığı görülmüş ve 10 günlük kültür süresinin sonunda hücre canlılığının ihmal edilebilir seviyeye düştüğü tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 4.37).

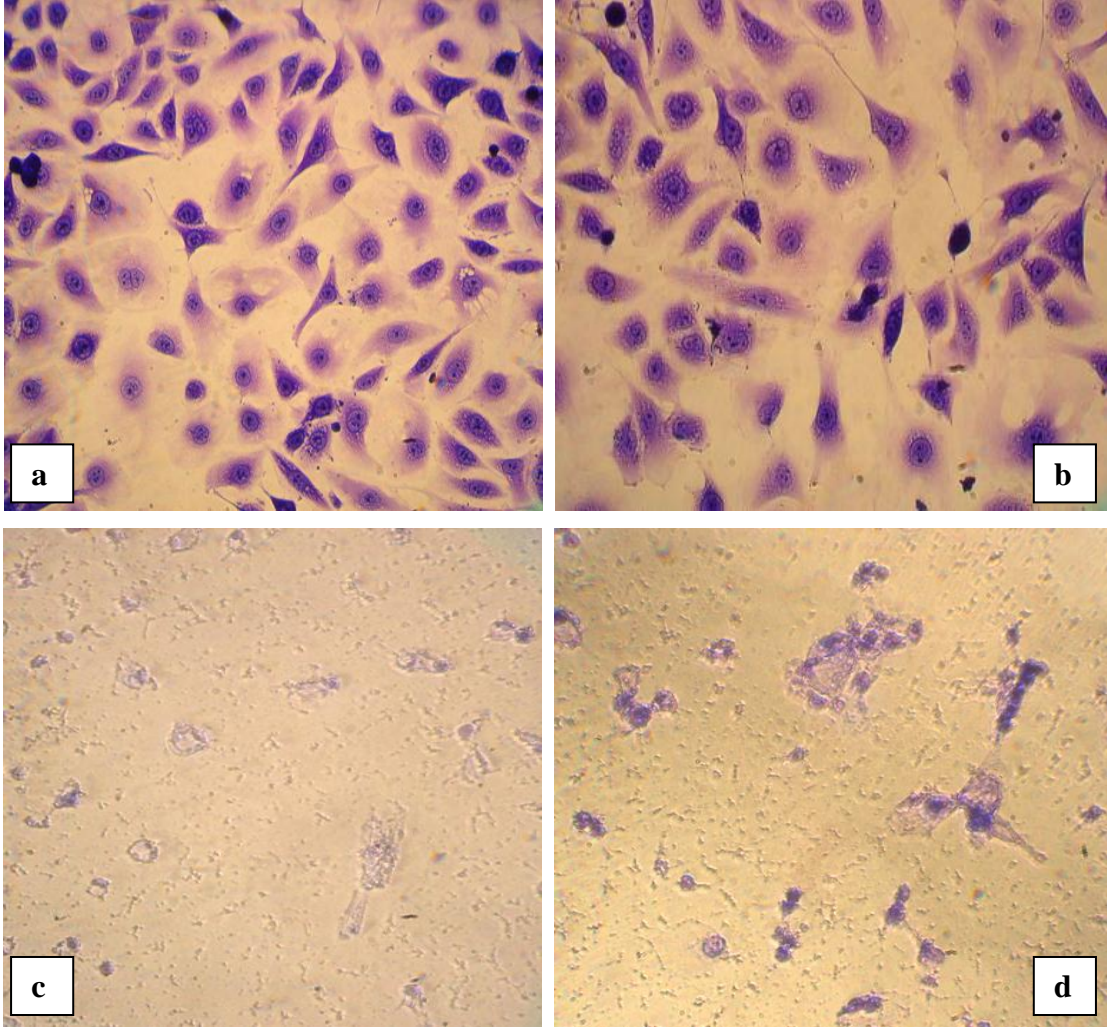


Şekil 4.37. Boş, Bevacizumab yüklü, 5-FU yüklü ve 5-FU+Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelelerinde HUVEC MTT sonuçları.

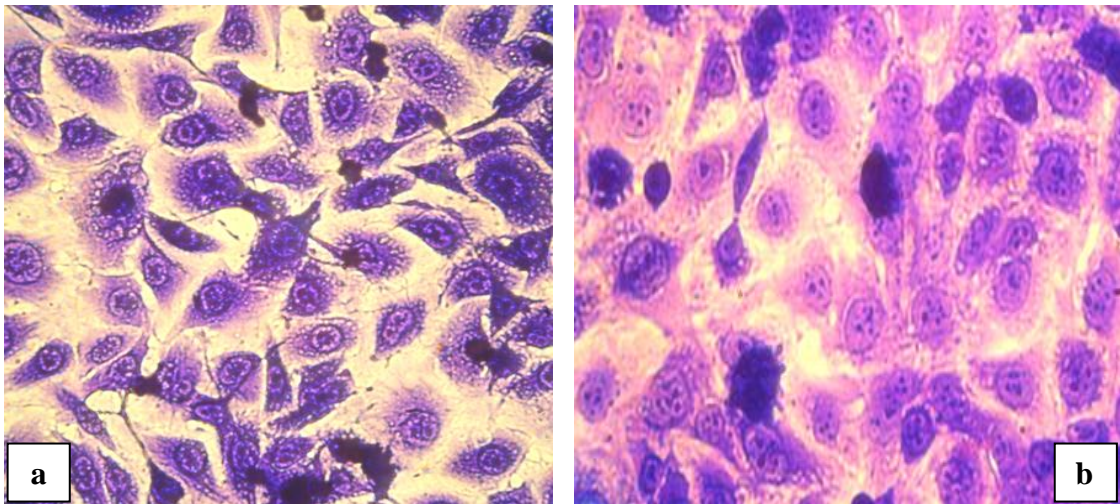
Çekilen optik mikroskop görüntülerinde, 5-FU içeren doku iskelelerinden ortama salınan 5-FU'nun 2. günden itibaren hücreleri öldürdüğü ve hücre üremesini engellediği görülmüştür (4.38.c,d). Benzer şekilde Bevacizumab içeren doku iskelelerinin olduğu ortamlarda da kültürün 2. gününden sonra, hücre sayısında meydana gelen azalma çekilen fotoğraflarla ifade edilmiştir (4.39.b, 4.40.b). Aynı zamanda MTT testleriyle de tespit edildiği gibi, Bevacizumab içeren ortamlarda hücre sayısındaki azalmanın; 5-FU içeren ortamlarda hücre sayısındaki azalmaya göre oldukça düşük olduğu elde edilen fotoğraflarla net bir biçimde gösterilmektedir (Şekil 4.39.b,c ve Şekil 4.40.b,c).

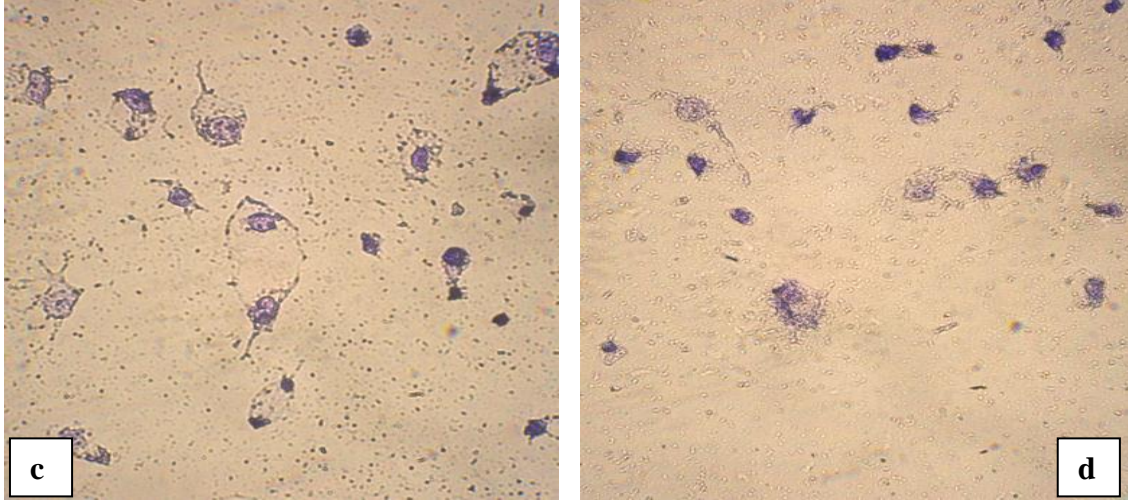


Şekil 4.38. Kültürün 1. gününde kristal viyole ile boyanan HUVEC'ler (10X): (a) boş kitosan, (b) Bevacizumab içeren kitosan doku iskelesi, (c) 5-FU içeren kitosan doku iskelesi, (d) hem Bevacizumab hem de 5-FU içeren kitosan doku iskelesi.



Şekil 4.39. Kültürün 3. gününde kristal viyole ile boyanan HUVEC'ler (20X): (a) boş kitosan, (b) Bevacizumab içeren kitosan doku iskelesi, (c) 5-FU içeren kitosan doku iskelesi, (d) hem Bevacizumab hem de 5-FU içeren kitosan doku iskelesi.





Şekil 4.40. Kültürün 5. gününde kristal viyole ile boyanan HUVEC'ler (40X): (a) boş kitosan, (b) Bevacizumab içeren kitosan doku iskelesi, (c) 5-FU içeren kitosan doku iskelesi, (d) hem Bevacizumab hem de 5-FU içeren kitosan doku iskelesi.

HUVEC'lerle yapılan tüm çalışmalar özetlenecek olursa, hücrelerin poligonol ve uzunlanmasına bir morfolojiye sahip oldukları ve 3. günde logaritmik faza girdikleri tespit edilmiştir. Hücrelerde en büyük tahribatın 0.05 mg Bevacizumab uygulaması ile yaratılabileceği görülmüş ve yapılan çalışmalarda kültürün 5. gününden sonra bir VEGF inhibitörü olan Bevacizumab'ın HUVEC'lerin çoğalmasını önemli ölçüde etkilediği gözlenmiştir. İlaç olarak sadece 5-FU'nun kullanıldığı denemelerde hücre çoğalmasının 2. günden itibaren; hem Bevacizumab hem de 5-FU'nun kullanıldığı denemelerde ise hücre çoğalmasının 3. günden itibaren durduğu tespit edilmiştir. 1. günden sonra çekilen optik mikroskop fotoğrafları da 5-FU içeren ortamlardaki hücrelerin tamamının ölü olduğunu ve kullanılan Bevacizumab'ın hücre çoğalmasını azalttığını göstermektedir.

İlgili literatürler incelendiğinde kitosan-PLGA kompozitinin, birçok çalışmada sahip oldukları özgül özellikleri nedeniyle, kitosan filme yüklenmiş PLGA mikropartikül (Perugini et al., 2003), nanopartikül (Taetz et al., 2009), matris (Moshfeghian et al., 2006), fiber (Shim et al., 2008), PLGA kaplı kitosan membran (Jung et al., 2007) gibi farklı formlarda bir araya getirildikleri görülmektedir. İşlenebilirlikleri, kolay modifiye edilebilmeleri ve birbirlerini dengeleyebilecek hızdaki bozunma süreleri sunulan tez çalışmasında kitosan ve PLGA kopolimerinin tercih edilmelerinin başlıca sebepleridir. Çalışma kapsamında üretilen PLGA nanopartikül yüklü

kitosan doku iskelelerinin; hem bozunma profilleri, hem homojen yapı oluşturabilmeleri, hem toksik olmayan özellikleri, hem de canlı sistemlerle uyum içindeki yapıları itibariyle ilaç salım sistemleri için başarılı kompozit sistemler oldukları görülmektedir.

Bir antikanser ilaç olan 5-FU ve damar oluşumunu engelleyici ajan olan Bevacizumab, klinikte kolon kanserinin (Hurwitz et al., 2004; Kabbinavar et al., 2005) yanısıra çeşitli tümör tedavilerinde de sıkça tercih edilen kemoterapötiklerdir. Ancak bu iki ajanın aynı sistem içerisinde bir arada bulunduğu ve kontrollü olarak ortama salındığı bilgisinin yer aldığı herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Sunulan tez çalışmasında bu iki kemoterapötik aynı sistemde buluşturulmuş ve birbirlerinin etki mekanizmalarını engellemeden, kontrollü bir biçimde hücrelerle etkileşmeleri sağlanmıştır.

Tümör tedavilerinde tümör hücrelerinin ölümü ve bir daha oluşmalarının engellenmesi hedefi dikkate alınarak tez çalışması için seçilen temsili hücre hatları, bir glioblastoma hücre hattı olan T98G ve bir endotel hücre hattı olan HUVEC'dir. Bu hücre hatlarının birlikte yer aldığı Zhang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, ortamdaki T98G hücrelerinin artışı ile HUVEC artışının birbiriyle doğru orantı içerisinde olduğu belirtilmiş; bu durumun iki hücre hattı tarafından da ortama salınan sinyal moleküllerinin hücre çoğalmasını indüklemesine bağlı olduğu ifade edilmiştir (Zhang et al., 2003). Yukarıda yer alan bilgilerin ışığında ortaya konan tez çalışmasında da, sentezlenen sistemde kullanılan ilaçlarla hem mevcut T98G ve HUVEC'lerin ölmesi istenmiş hem de hücre çoğalmasının önüne geçilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre de 5-FU içeren PLGA nanopartikül ve Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelelerinin kullanıldığı *in-vitro* ortam koşullarında hem T98G hücrelerinin hem de HUVEC'lerin çoğalmasının önüne geçildiği görülmüştür. Söz konusu tez çalışması, bu ve benzeri sistemlerin *in-vivo* koşullarda kullanımına giden yolda yararlanılabilecek bir kaynak niteliğindedir.

5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmasının amacı, antikanser ilaç yüklü PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelelerine bir antivaskülarizasyon ajanının enjekte edilmesi ve oluşturulan sistemin kanserli bölgeye implante edilmesine bağlı olarak etken maddelerin lokal olarak salımlarının gerçekleştirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda; öncelikle üç farklı bileşimde nanopartikül formunda polimerik ilaç taşıyıcı sistem sentezlenmiş; sonrasında ise bir antikanser ilaç olan 5-FU'nun bu sistemlerdeki salım profili incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre seçilen en uygun ilaç taşıyıcı sistem, gözenekli kitosan doku iskelelerine yüklenmiş ve aynı iskelelere enjekte edilen antivaskülarizasyon ajanı Bevacizumab ile çift etkili bir sistem oluşturulmuştur. Üretilen bu çift etkili sistemin, hem tümör hücreleri hem de endotel hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Poli-laktik-ko-glikolik asitin (PLGA) üç farklı bileşimindeki (50:50, 65:35, 85:15; PLA/PGA) kopolimerlerinden emülsiyon-çözücü-buharlaştırma yöntemiyle yaklaşık 200 nm çapında, küresel formda nanopartiküller üretilmiştir. Nanopartiküllerin karakterizasyonları AFM, SEM ve Zetasizer kullanılarak yapılmıştır. Bu partiküllere üretimleri esnasında polimer miktarının ağırlıkça %10'u ve %20'si oranında 5-FU yüklenmiş ve 5-FU'nun partiküllerden salımı 80 gün boyunca UV-spektrofotometre ile incelenmiştir. Yapılan analizlere göre en kararlı salım sisteminin, ağırlıkça %10 5-FU içeren 50:50 PLA/PGA oranına sahip PLGA kopolimerinden üretilen ilaç taşıyıcı sistemlerde olduğu tespit edilmiştir.
- PLGA nanopartiküllere yüklenen 5-FU miktarının tayini HPLC ve UV spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiş ve 5-FU enakpsülasyon verimi ~%55 olarak hesaplanmıştır.
- Deasetilasyon derecesi >% 85 olan kitosanın % 2'lik çözeltileri hazırlanarak dondurarak-kurutma yöntemiyle yaklaşık 100 µm gözenek boyutuna ve %88 gözenekliliğe sahip doku iskeleleri elde edilmiştir. Liyofilize doku iskeleleri, %96'lık etanolle 1 gece, %70 etanolle 2 saat muamele edilmek suretiyle stabilize edilmiştir.

- Kitosan doku iskelelerine yüklenecek PLGA nanopartiküllerin miktarının belirlenebilmesi amacıyla floresan izotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenen PLGA nanopartiküller, 35:65, 25:75 ve 17:83 PLGA/kitosan (w/w) oranını sağlayacak şekilde kitosan doku iskelelerine üretim esnasında yüklenmiş ve floresan mikroskop kullanılarak doku iskelelerinin farklı kesitlerinin fotoğrafları çekilmiştir. Elde edilen görüntülerde 35:65 PLGA/kitosan oranındaki sistemin uygun nanopartikül dağılımına sahip olduğu görülmüştür.
- 5-FU yüklü PLGA nanopartikül içeren kitosan doku iskelelerinden 2 mm kalınlığında ve 9 mm çapında kesitler alınarak, bu örneklerden gerçekleşen 5-FU salımı 21 gün boyunca takip edilmiştir. Buradan elde edilen salım sonuçları ve literatürden elde edilen tümör dokusunun mm^2 'si başına kullanılması gereken $1.5 \mu\text{g}$ 5-FU bilgisinden yola çıkılarak, hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak 5-FU miktarı $95.42 \mu\text{g}$ 5-FU/kitosan doku iskelesi olarak saptanmış ve bu miktarda ilacı içeren PLGA nanopartikül hacmi hesaplanarak doku iskelelerine yüklenmiştir.
- Üretilen çift etkili sistemin tümör tedavisinde kullanımının incelenmesi amacıyla hücre kültür testleri yapılmıştır. Bu amaçla T98G insan glioblastoma hücre hattı ve insan umbilikal damar endotel hücreleri (HUVEC) kullanılmıştır.
- Kullanılan hücrelerin karakterizasyon çalışmaları, MTT, hücre sayımı, kristal viyole boyaması ve floresan boyama yöntemlerinin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonunda T98G hücreleri için özgül üreme hızı, 0.016 sa^{-1} , ikilenme süresi 43.4 saat; HUVEC'ler için özgül üreme hızı, 0.028 sa^{-1} , ikilenme süresi 24.7 saat olarak bulunmuştur.
- Tümör dokusunu yok etmek için, o dokuyu besleyen damar oluşumunun engellenmesi gerektiği bilgisinden yola çıkılarak; çift etkili doku iskelelerine damar oluşumunda çok önemli bir rolü olan VEGF'in inhibitörü yüklenmiştir. Bevacizumab isimli bu inhibitörden kitosan doku iskelelerine ne kadar

yükleneceğine karar vermek amacıyla her iki hücre tipi için de ayrı ayrı çalışmalar yapılmış ve 0.05 mg Bevacizumab/doku iskelesi değerinin HUVEC'ler için en etkin doz olduğuna karar verilmiştir. Ancak damar oluşum mekanizmasında etkili olan bu ilacın T98G hücreleri üzerinde tek başına anlamlı bir etkiye sahip olmadığı ama 0.2 mg Bevacizumab/kitosan doku iskelesi değerinin 5-FU ile birlikte kullanıldığında T98G hücreleri üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

- T98G hücreleri ile yapılan ilk hücre kültürü çalışmasında, hücreler 5-FU içeren PLGA nanopartiküllerin yüklü olduğu kitosan doku iskelelerine, Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelelerine ve her iki ilacın da yüklendiği kitosan doku iskelelerine ekilmiş ve boş kitosan doku iskelelerine ekilen T98G hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışmada hücre üremesi MTT; hücre morfolojileri ve dağılımları SEM ve CSLM ile değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerden T98G hücrelerinin canlılığı üzerinde en etkili olan sistemin hem Bevacizumab hem de 5-FU içeren kitosan doku iskelesi sistemi olduğuna karar verilmiştir.
- T98G hücreleri ile yapılan ikinci hücre kültürü çalışmasında ise, üretilen çift etkili sistemin *in-vivo* çalışmalarda hücrelerle dolaylı olarak etkileşeceği düşünülmüş ve bu nedenle Petri kabında üretilen T98G hücreleri üzerine doku iskeleleri ilave edilmiştir. Bir önceki çalışmada doku iskelelerine yüklenen Bevacizumab'ın T98G hücreleri üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı göz önünde bulundurulmuş ve hücreler 5-FU içeren PLGA nanopartiküllerin yüklü olduğu kitosan doku iskeleleri ile her iki ilacın da yüklendiği kitosan doku iskelelerine ekilmiştir. Boş kitosan doku iskeleleri ile doğrudan TCPS'e ekilen T98G hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışmada hücre üremesi MTT; hücre morfolojileri ve dağılımları ise optik mikroskop ile değerlendirilmiştir. Bu deney setinde de hem 5-FU hem de Bevacizumab içeren kitosan doku iskelelerinin, T98G hücreleri üzerinde en az canlılığa neden olduğu tespit edilmiştir.
- HUVEC'lerle yapılan hücre kültürü çalışmasında, hücreler 5-FU içeren PLGA nanopartiküllerin yüklü olduğu kitosan doku iskelelerine,

Bevacizumab yüklü kitosan doku iskelelerine ve her iki ilacın da yüklendiği kitosan doku iskelelerine ekilmiş ve boş kitosan doku iskeleleri ve TCPS'e ekilen T98G hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışmada hücre üremesi MTT; hücre morfolojileri ve dağılımları optik ve floresan mikroskop ile değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerden HUVEC'lerin canlılığı üzerinde en etkili olan sistemin hem Bevacizumab hem de 5-FU içeren kitosan doku iskelesi sistemi olduğuna karar verilmiştir.

- Beyin tümör tedavisinde hem damar oluşumunun hem de kanser hücrelerinin çoğalmasının engellenmesi amacıyla; biri kontrollü salım sistemi diğeri difüzyonla ortama salınan 5-FU ve Bevacizumab gibi iki farklı ilacın, çift etkili bir sistemde birlikte yer alarak lokalize bir biçimde kullanılması, tezin literatürde yer alan diğeri çalışmalardan en önemli farkıdır.

Yapılan çalışmalarda, hem T98G hem de HUVEC'ler kullanılarak yapılan denemelerin ardından 95.42 µg 5-FU ve 0.05 mg Bevacizumab içeren 2 mm kalınlığında ve 9 mm çapında bir çift etkili kitosan doku iskelesi sisteminin, *in-vitro* koşullarda tümör oluşumunu engelleyebileceği sonucuna ulaşılmıştır. Elde edilen bilgiler, bu sistemin, beyin tümör tedavisi için klinikte kullanılacak bir ürüne dönüştürülebilme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Kaynaklar

- Acharya, G., Park, K., 2006, Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents, *Adv Drug Delivery Rev*, 58, 387–401.
- Ahmed, I., Kasraian, K., 2002, Pharmaceutical challenges in veterinary product development, *Adv Drug Delivery Rev*, 54, 871–882.
- Aiedeh K., Gianasi E., Orienti I., Zecchi V., 1997, Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin, *J Microencapsul*, 14, 567-76.
- Akca Can, C., Duran, D., 2009, Doku mühendisliği uygulamalarında tekstil materyal ve teknolojilerinin kullanımı, *Electronic Journal of Textile Technologies*, 3(1), 77-86.
- Alexis, F., Pridgen, E., Molnar, L.K., Farokhzad, O.C., 2008, Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles, *Mol Pharm*, 5(4), 505–515.
- Ang, T.H., Sultana, F.S.A., Hutmacher, D.W., Wong, Y.S., Fuh, J.Y.H., Mo, X.M., Loh, H.T., Burdet, E., Teoh, S.H., 2002, Fabrication of 3D chitosanhydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system, *Mater Sci Eng C*, 20(1), 35-42.
- Armelao, L., Bertocello, R., Cattaruzza E., Gialanella, S., Gross, S., Mattei, G., Mazzoldie, P., Tondello, E., 2002, Chemical and physical routes for composite materials synthesis: Ag and Ag₂S nanoparticles in silica glass by sol–gel and ion implantation techniques, *J Mater Chem*, 12, 2401–2407.
- Arpornmaeklong, P., Suwatwirote, N., Pripatnanont, P., Oungbho K., 2007, Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan-collagen sponges, *Int J Oral and Max Surg*, 36, 328-337.
- Bajpai, A.K., Shukla, S.K., Bhanu, S., Kankane, S., 2008, Responsive polymers in controlled drug delivery, *Prog Polym Sci*, 33, 1088–1118.
- Baldwin S.P., Saltzman, W.M., 1998, Materials for protein delivery in tissue engineering, *Adv Drug Delivery Rev*, 33, 71–86.
- Basu, H.S., Pellarin, M., Feuerstein, B.G., Shirahata, A., Samejima, K., Deen, D.F., Marton, L.F., 1993, Interaction of a polyamine analogue, 1,19-bis-(ethylamino)-5,10,15-triazanonadecane (BE-4-4-4-4), with DNA and effect on growth, survival, and polyamine levels in seven human brain tumor cell lines 1, *Cancer Res*, 53, 3948-3955.

- Baykal Y., Gök F., 2000, Anjiogenezis, Sendrom, 12(6), 30-40.
- Beck, P., Scherer, D., Kreuter, J., 1990, Separation of drug-loaded nanoparticles from free drug by gel filtration, *J Microencaps*, 7, 491-496.
- Berg, U.E., Kreuter, J., Speiser, P.P., Solvia, M., 1986, Herstellung und in-vitro-priifungyon polymeren adjuvantien fiir impfstoffe, *Pharm Ind*, 48, 75-79.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A., Gurny, R., 2004, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked hydrogels for biomedical applications, *European J Pharm and Biopharm*, 57, 19-25.
- Bhattarai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, F.A., Zhang, M., 2005, Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility, *Biomaterials*, 26, 6176-6184.
- Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P., 2002, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Adv Drug Deliv Rev*, 54(5), 631–651.
- Casciato, D.A., Lowitz, B.B., 2009, Principles, Definitions, and Statistics, *Manual of Clinical Oncology*, Lippincott Williams & Wilkins, USA. pp. 3-19.
- Chen, Y., Mohanraj, V.J., Parkin, J.E., 2003, Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an anti-angiogenesis peptide, *Lett Peptide Sci*, 10, 621-629.
- Chi, J.T., Chang, H.Y., Haraldsen, G., Jahnsen, F.L., Troyanskaya, O.G., Chang, D.S., Wang, Z., Rockson, S.G., van de Rijn, M., Botstein, D., Brown, P.O., 2003, Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling, *PNAS*, 100(19), 10623–10628.
- Chow, K.S., Khor, E., 2000, Novel fabrication of open-pore chitin matrixes, *Biomacromolecules*, 1, 61-67.
- Coombesa, A.G.A., Verderiob, E., Shawa, B., Lib, X., Griffinb, M., Downes, S., 2002, Biocomposites of non-crosslinked natural and synthetic polymers, *Biomaterials*, 23, 2113–2118.
- Couvreur, P., Puisieux, F., 1993, Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins, *Adv Drug Delivery Rev*, 10,141–162.
- Çakmak, S., Gümüşderelioğlu, M., Denizli, A., 2009, Biofunctionalization of magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres with protein A: Characterization and cellular interactions, *React Funct Polym*, 69(8), 586-593.

- Çatıker, E., Gümüşderelioğlu, M., Güner, A., 2000, Degradation of PLA, PLGA homo- and copolymers in the presence of serum albumin: a spectroscopic investigation, *Polym Int*, 49, 728-734.
- Demirkaya, M., Sevinir, B.B., 2005, Çocukluk çağı beyin tümörleri, *Güncel Pediatri*, 4, 118-121.
- Di Martino, D.A., Sittinger, M., Risbud, M.V., 2005, Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering, *Biomaterials*, 26, 5983–5990.
- Edelstein, A.S., Cammarata, R.C., 2001, *Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*, Institute of Physics Publishing, Bristol.
- El-Egakeya, A., Speiser P.P., 1982, Drug loading studies on ultrafine solid carriers by sorption procedures, *Pharm. Acta He*, 57, 236-240.
- Erguvan-Önal, R., Kırımlıoğlu, H., Önal, Ç., Erkal, H.Ş., Aydın, Ö.M., Aydın, N.E., 2008, Glial tümörlerde angiogenezis ve prognoz ilişkisi, *Sinir Sistemi Cerrahisi Derg*, 1(4), 229-242.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Novotny, W., 2005, Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy, *Biochem Bioph Res Co*, 333, 328–335.
- Fialho, S.L., Behar-Cohen, F., Silva-Cunha, A., 2007, Dexamethasone-loaded poly(ϵ -caprolactone) intravitreal implants: a pilot study, *Eur J Pharm Biopharm*, 68, 637–646.
- Forough, R., 2006, *New Frontiers in Angiogenesis*, Springer.
- Freitas, S., Merkle, H.P., Gander, B., 2005, Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology, *J Control Release*, 102, 313–332.
- Freyman, T.M., Yannas, I.V., Gibson, L.J., 2001, Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering, *Prog Mater Sci*, 46, 273-282.
- Gerçek-Beşkardeş, I., 2008, *Biyoseramik ve biyosinyal moleküllerle desteklenmiş poli(kaprolakton) doku iskeleleri: sentez, karakterizasyon ve kemik doku mühendisliği uygulamaları*, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 113s.

- Gifford, S.M., Grummer, M.A., Pierre, S.A., Austin, J.L., Zheng, J., Bird, I.M., 2004, Functional characterization of HUVEC-CS: Ca^{+2} signaling, ERK $\frac{1}{2}$ activation, mitogenesis and vasodilator production, *J Endocrinol*, 182, 485–499.
- Godbey, W.T., Atala, A., 2002, In vitro systems for tissue engineering, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 961, 10–26.
- Goldstein, A., 1997, *Handbook of Nanophase Materials*, Marcel Dekker Inc, New York.
- Gupte, A., Çiftçi, K., 2004, Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel + 5-FU microspheres, *Int J Pharm*, 276, 93–106.
- Gümüşderelioğlu M., 2002, *Biyomalzemeler, Bilim ve Teknik Dergisi Yeni Ufuklara Eki*.
- Gümüşderelioğlu, M., 2010, Doku mühendisliği ve ürünleri, *Bilim ve Teknik Dergisi*, 516, 70-75.
- Gümüşderelioğlu, M., Maviş, B., Karakeçili, A., Kahraman, A.S., Çakmak, S., Tıǧlı, S., Demirtaş, T.T., Aday, S., 2007, Doku mühendisliğinde nanoteknoloji, *Bilim ve Teknik Dergisi Yeni Ufuklara Eki*.
- Gürmen, S., Ebin B., 2008, Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri–1, *Metallurji*, 150, 31-38.
- Gürmen, S., Stopic, S., Friedrich, B., 2006, Synthesis of nanosized spherical cobalt powder by ultrasonic spray pyrolysis, *Mater Res Bull*, 41, 1882–1890.
- Gürsoy, A.Z. (ed), 2002, *Kontrollü Salım Sistemleri*, İstanbul, TR.
- Hakan, T., Berkman, M.Z., Aker, F.V., 2005, Glioblastoma located in the third ventricle: case report, *J Neurol Sci-Turk*, 22(1)14, 85-88.
- Han, X., Chen, S., Hu, X., 2009, Controlled-release fertilizer encapsulated by starch/polyvinyl alcohol coating, *Desalination*, 240, 21–26.
- Hariharan, S., Bhardwaj, V., Bala, I., Sitterberg, J., Bakowsky, U., Kumar, M.N.V.R., 2006, Design of estradiol loaded PLGA nanoparticulate formulations: a potential oral delivery system for hormone therapy, *Pharm Res*, 23, 184-195.
- Harmia, T., Speiser, P.P., Kreuter J., 1986, A solid colloidal drug delivery system for the eye. Encapsulation of pilocarpine in nanoparticles, *J Microencaps*, 3, 3-12.

- Hipp, J., Atala, A., 2004, Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy, *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*, 1(3), 1-10.
- Hla, T., Maciag, T., 1991, Cyclooxygenase gene expression is down-regulated by heparinbinding (acidic fibroblast) growth factor-1 in human endothelial cells, *Journal of Biological Chemistry*, 266(35), 24059-24063.
- Holland, S.J., Tighe, B.J., 1986, Polymers for biodegradable medical devices 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems, *J Control Release*, 4, 155-180.
- Hubbell, J.A., 1995, Biomaterials in tissue engineering, *Nat Biotechnol*, 13, 565-576.
- Hulteen, J.C., Martin, C.R., 1997, A general template-based method for the preparation of nanomaterials, *J Mater Chem*, 7(7), 1075-1087.
- Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., Kabbinavar, F., 2004, Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer, *N Engl J Med*, 350, 2335-2342.
- Jain, R.K., 2005, Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy, *Science*, 307, 58-62.
- Jang, H.D., Hwang, D.W., Kim, D.P., Kim, H.C., Lee, B.Y., Jeong, I.B., 2004, Preparation of cobalt nanoparticles by hydrogen reduction of cobalt chloride in the gas phase, *Mater Res Bull*, 39, 63-70.
- Jung, U.W., Song, K.Y., Kim, C.S., Lee, Y.K., Cho, K.S., Kim, C.K., Choi, S.H., 2007, Effects of a chitosan membrane coated with polylactic and polyglycolic acid on bone regeneration in a rat calvarial defect, *Biomed Mater*, 2 (3), 101-110.
- Kabbinavar, F.F., Hambleton, J., Mass, R.D., Hurwitz, H.I., Bergsland, E., Sarkar, S., 2005, Combined analysis of efficacy: The addition of Bevacizumab to Fluorouracil/Leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer, *J Clin Oncol*, 23(16), 3706-3712.

- Kahraman A.S., 2008, Non-manyetik ve manyetik lateks partiküllerin sentezi, karakterizasyonu ve doku mühendisliği uygulamaları. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 83s.
- Kamyshny, A., Magdassi, S., 2000, Fluorescence immunoassay based on fluorescer microparticles, *Colloid Surface B*, 18, 13-17.
- Karmakar, S., Banik, N.L., Patel, S.J., Ray, S.K., 2006, Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells, *Neurosci Lett*, 407, 53–58.
- Kim, S.H., Jeong, J.H., Chun, K.W., Park, T.G., 2005, Target-specific cellular uptake of PLGA nanoparticles coated with poly(L-lysine)-poly(ethylene glycol)-folate conjugate, *Langmuir*, 21, 8852-8857.
- Knudson, A.G., 1971, Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma, *Proc Natl Acad Sci USA*, 68, 820-823.
- Koo, Y.E.L., Reddy, G.R., Bhojani, M., Schneider, R., Philbert, M.A., Rehemtulla, A., Ross, B.D., Kopelman, R., 2006, Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatforms, *Adv Drug Delivery Rev*, 58, 1556–1577.
- Kopf, H., Joshi, R.K., Solvia, M., Speiser, P.P., 1977, Studium der mizellpolymerisation in gegenwart niedermolekularer arzneistoffe. 2. Bindungsartvon inkorporierten niedermolekularen modellarzneistoffen an nanopartikel auf polyavrylamid basis. Restmonomerenbestimmung, physikalisch-chemische daten, *Pharm. Ind.*, 39, 993-997.
- Krajewska, B., 2005, Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials, *Seperation and Purification Technology*, 41, 305-312.
- Kreuter, J., 1983, *Topics in Pharmaceutical Sciences*, Bremer, D.D., Speiser P.P. (eds.), Elsevier, Amsterdam. p.359.
- Kreuter, J., 1994, *Nanoparticles*, Swarbrick J., Boylan J.C. (eds.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 10 Marcel Dekker: New York. 165p.
- Kumar M.N.V.R., 2000, Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, *J Pharm Pharmaceut Sci*, 3(2), 234-258.
- Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., 2010, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloid Surface B*, 75, 1–18.
- Kuppen, J.K.P., Van Der Eb, M.M., Jonges, L.E., Hagenaars, M., Hokland, M.E., Nannmark, U., Goldfarb, R.H., Basse, P.H., Fleuren, G.J., Hoeben, R.C.,

- Van De Velde, C.J.H., 2001, Tumor structure and extracellular matrix as a possible barrier for therapeutic approaches using immune cells or adenoviruses in colorectal cancer, *Histochem Cell Biol*, 115, 67–72.
- Lee, E.S., Schwartz, F.W., 2007, Characteristics and applications of controlled–release KMnO_4 for groundwater remediation, *Chemosphere*, 66, 2058–2066.
- Lee, J.S., Im, S.S., Lee, C.W., Yu, J.H., Choa Y.H., Oh, S.T., 2004, Hollow nanoparticles of *b*-iron oxide synthesized by chemical vapor condensation, *J Nanopart Res*, 6, 627–631.
- Lee, J.S., Jeong, J.R., Shin, S.C., Kim, J.C., Chang, Y.H., Chang, Y.M., Kim, J.D., 2004, Nanoparticles of magnetic ferric oxides encapsulated with poly(D,L lactide-co-glycolide) and their applications to magnetic resonance imaging contrast agent, *J Magn and Magn Mater*, 272–276, 2432–2433.
- Lee, S.H., Shin H., 2007, Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering, *Adv Drug Delivery Rev*, 59, 339–359.
- Lee, T.T., Manzano, G.R., 1997, Third ventricular glioblastoma multiforme: case report, *Neurosurg Rev*, 20, 291-294.
- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A., Schlessinger, J., 1985, Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin, *Nature*, 313, 144-147.
- Lin, C.C., Metters, A.T., 2006, Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling, *Adv Drug Delivery Rev*, 58, 1379–1408.
- Liveri, V.T., 2006, *Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems*, Springer Science & Business Media, Inc., New York. p.165.
- Lu, G., Zhu, L., Kong, L., Zhang, L., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X., 2006, Porous chitosan microcarriers for large scale cultivation of cells for tissue engineering: fabrication and evaluation, *Tsinghua Science and Technology*, 11(4), 427-432.
- Ma, J., Wang, H., He, B., Chen, J., 2001, A Preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer

- material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts, *Biomaterials*, 22, 331-336.
- Menei, P., Venier, M.C., Gamelin, E., Saint-André, J.P., Hayek, G., Jadaud, E., Fournier, D., Mercier, P., Guy, G., Benoit, J.P., 1999, Local and sustained delivery of 5-Fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of glioblastoma, *Cancer*, 86(2), 325-330.
- Mi F.L., Shyu S.S., Wu Y.B., Lee S.T., Shyong J.Y., Huang R.N., 2001, Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing, *Biomaterials*, 22, 165-73.
- Mittal, G., Sahana, D.K., Bhardwaj, V., Kumar, M.N.V.R., 2007, Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo, *J Control Release*, 119, 77–85.
- Mooney, D.J., Mikos, A.G., 1999, Growing new organs., *Sci. Am.*, 280, 60–65.
- Moshfeghian, A., Tillman, J., Madhally, S.V., 2006, Characterization of emulsified chitosan–PLGA matrices formed using controlled-rate freezing and lyophilization technique, *J Biomed Mater Res A*, 79A(2), 418-430.
- Ne`gre-Aminou, P., Van Vliet, A.K., Van Erck, M., Van Thiel, G.C.F., Van Leeuwen, R.E.W., Cohen L.H., 1997, Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types, *Biochim et Biophys Acta*, 1345, 259–268.
- Nerem, R.M., 1992, Tissue engineering in the USA, *Med & Biol Eng.& Comput.*, 30, CE8-CE12.
- Nobsa, L., Buchegger, F., Gurnya, R., Allemann, E., 2004, Poly(lactic acid) nanoparticles labeled with biologically active Neutravidin for active targeting, *Eur J Pharm Biopharm*, 58, 483–490.
- Nomi, M., Atala, A., Coppi, P.D., Soker, S., 2002, Principles of neovascularization for tissue engineering, *Mol Aspects Med*, 23, 463–483.
- Orive G., Gasco´n A.R., Hern´andez R.M., Dom´ınguez-Gil A., Pedraz J.L., 2004, Techniques: new approaches to the delivery of biopharmaceuticals, *Trends Pharmacol Sci*, 25(7), 382-387.

- Ostraat, M.L., De Blauwe, J.W., Green, M.L., Bell, L.D., Atwater, H.A., Flagan, R.C., 2001, Ultraclean two-stage aerosol reactor for production of oxide-passivated silicon nanoparticles for novel memory devices, *J Electrochem Soc*, 148, G265–G270.
- Panyam, J., Labhasetwar, V., 2003, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Adv Drug Delivery Rev*, 55, 329–347.
- Panyam, J., Zhou, W.Z., Prabha, S., Sahoo, S.K., Labhasetwar, V., 2002, Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery, *FASEB J*, 16(10), 1217–1226.
- Paolo, A. N., David, A. B., Melody, A. S., Alan, J. G., Jain, R.K., 2000, Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors 1, *Cancer Res*, 60, 2497–2503.
- Perego, P., Boiardi, A., Carenini, N., De Cesare, M., Dolfini, E., Giardini, R., Magnani, I., Martignone, S., Silvani, A., Soranzo, C., Zunino, F., 1994, Characterization of an established human, malignant, glioblastoma cell line (GBM) and its response to conventional drugs, *J Cancer Res Clin Oncol*, 120, 585-592.
- Perez, C., De Jesus, P., Griebenow, K., 2002, Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method, *Int J Pharmaceut*, 248(1–2), 193–206.
- Perugini, P., Genta, I., Conti, B., Modena, T., Cocchi, D., Zaffe, D., Pavanetto, F., 2003, PLGA microspheres for oral osteopenia treatment: preliminary “in vitro”/“in vivo” evaluation, *Int J Pharmaceut*, 256(1-2), 153-160.
- Pillai, O., Panchagnula, R., 2001, Polymers in drug delivery, *Curr Opin Chem Biol*, 5, 447–451.
- Qiu, Y., Park, K., 2001, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv Drug Delivery Rev*, 53, 321–339.
- Raghavendra, C., Mundargi, V., Babu, R., Rangaswamy, V., Patel, P., Aminabhavi, T.M., 2008, Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives, *J Control Rel*, 125, 193–209.
- Rao, C.N.R., Müller, A., Cheetham, A.K., 2005. *The Chemistry of Nanomaterials Volume 1*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim.

- Ringe, K., Walz, C.M., Sabel, B.A., 2004, Nanoparticle drug delivery to the brain, in: H.S. Nalwa (ed.), *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, American Scientific Publishers, New York. pp. 91-104.
- Robinson, J.R., Lee, V.H.L., 1987, *Controlled Drug Delivery, Fundamentals and Applications*, Marcell Decker Inc., New York, USA.
- Roullin, V.G., Deverre, J.R., Lemaire, L., Hindre', F., Venier-Julienne, M.C., Vienet, R., Benoit, J.P., 2002, Anti-cancer drug diffusion within living rat brain tissue: an experimental study using [3H](6)-5-fluorouracil-loaded PLGA microspheres, *Eur J Pharm Biopharm*, 53, 293–299.
- Saçak, M., 2004, *Polimer Kimyası*, 2. Baskı, Gazi Kitapevi, Ankara, 514s.
- Salgado, A.J., Coutinho, O.P., Reis, R.L., 2004, Bone tissue engineering: state of art and future trends, *Macromol Biosci*, 4, 743-765.
- Sheetz, M.P., Painter, R.G., Singer, S.J., 1976, Biological membranes as bilayer couples, III. Compensatory shape changes induced in membranes, *J Cell Biol*, 70, 193-203.
- Shenoy, D.B., Amiji, M.M., 2005, Poly(ethylene oxide)-modified poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer, *Int J Pharm*, 293(1–2), 261–270.
- Shim, I.K., Lee, S.Y., Park, Y.J., Lee, M.C., Lee S.H., Lee, J.Y., Lee, S.J., 2008, Homogeneous chitosan-PLGA composite fibrous scaffolds for tissue regeneration, *J Biomed Mater Res A*, 84A(1), 247–255.
- Shinkai, M., 2002, Functional magnetic particles for medical application, *J Biosci Bioeng*, 94, 606–613.
- Silva, G.A., Ducheyne, P., Reis, R.L., 2007, Materials in particulate form for tissue engineering. 1. Basic concepts, *J Tissue Eng Regen M*, 1, 4-24.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., Dirks, P.B., 2003, Identification of a cancer stem cell in human brain tumors, *Cancer Res*, 63, 5821–5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B., 2004, Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature*, 432, 396-401.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E., 2001, Biodegradable polymeric nanoparticle as drug delivery devices, *J Control Release*, 70(1–2), 1–20.

- Suh, J.K.F., Matthew, H.W.T., 2000, Application of chitosan based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering:a review, *Biomaterials*, 21, 2589-2598.
- Suh, Y.J., Jang H.D., Chang, H., Kim, W.B., Kim, H.C., 2006, Size-controlled synthesis of Fe–Ni alloy nanoparticles by hydrogen reduction of metal chlorides, *Powder Technol*, 161, 196–201.
- Stein, G.H., 1979, T98G: An anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro, *J Cell Physiol*, 99, 43-54.
- Strakova, N., Ehrmann, J., Dzubak, P., Bouchal, J., Kolar, Z., 2004, The synthetic ligand of peroxisome proliferator-activated receptor- γ ciglitazone affects human glioblastoma cell lines, *J Pharmacol Exp Ther*, 309(3), 1239–1247.
- Swihart, M. T., 2003. Vapor-phase synthesis of nanoparticles, *Curr Opin Colloid In*, 8, 127-133.
- Şengel-Türk, C.T., Hasçıçek, C., Gönül, N., 2007, Nanoparticle drug delivery systems for targetting the drugs to the brain, *J Neurol Sci-Turk*, 24(3), 254-263.
- Taetz, S., Nafee, N., Beisner, J., Piotrowska, K., Baldes, C., Mürdter, T.E., Huwer, H., Schneider, M., Schaefer, U.F., Klotz, U., Lehr, C.M., 2009, The influence of chitosan content in cationic chitosan/PLGA nanoparticles on the delivery efficiency of antisense 2'-O-methyl-RNA directed against telomerase in lung cancer cells, *Eur J Pharm and Biopharm*, 72(2), 358-369.
- Takahashi, K., Sawasaki, Y., Hata, J.I., Ukai, K., Goto, T., 1990, Spontaneous transformation and immortalization of human endothelial cells, *In-vitro Cell Dev Biol*, 25, 265-274.
- Tao, S.L., Desai, T.A., 2003, Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores, *Adv Drug Delivery Rev*, 55, 315–328.
- Testereci, H.N., Akın- Öktem, G., Öktem, Z., 2004, Electrochemical polymerization of 4-allyl 1,2-dimethoxybenzene, *React Funct Polym*, 61, 183–189.
- Tıǧlı R.S., 2010, Kıkırdak doku rejenerasyonunda kitosan doku iskelesi destekli biyoreaktör performansının incelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 184s.

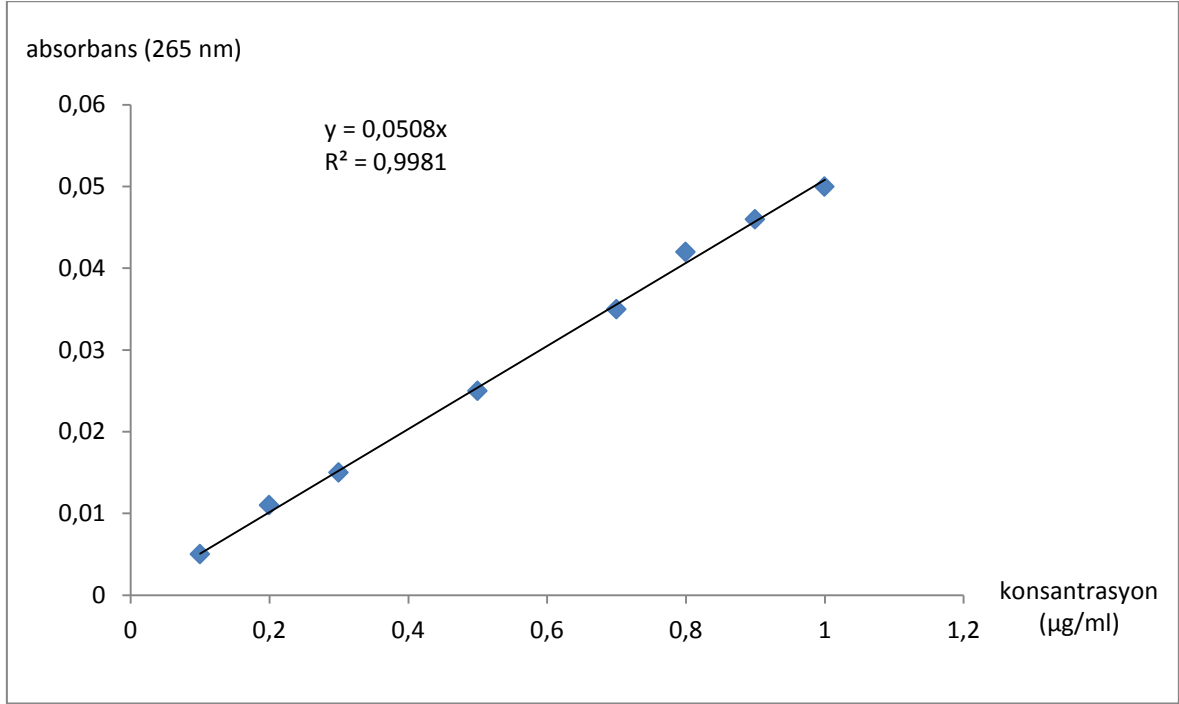
- Tıǒlı, R.S., Karakeçili, A., Gümüřderelioǒlu, M., 2007, In-vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *J Mater Sci- Mater M*, 18, 1665-1674.
- Tsai, S.C., Song, Y.L. Tsai, C.S., Yang, C.C., Chiu, W.Y., Lin, H.M., 2004. Ultrasonic spray pyrolysis for nanoparticles synthesis, *J Mater Sci*, 39, 3647-3657.
- Uhrich, K.E., Cannizzaro, S.M., Langer, R.S., Shakesheff, K.M., 1999, Polymeric systems for controlled drug release, *Chem Rev*, 99, 3181-3198.
- Urban, F.K., Hosseini-Tehrani, A., Griffiths, P., Khabari, A., Kim Y.W., Petrov, I., 2002, Nanophase films deposited from a highrate, nanoparticle beam, *J Vac Sci Technol B*, 20, 995–999.
- Vescovi, A.L., Galli, R., Reynolds, B.A., 2006, Brain tumour stem cells, *Nature Reviews, Cancer*, 6, 425-436.
- Vladimir, P., 2006, Torchilini multifunctional nanocarriers, *Adv Drug Deliver Rev*, 58, 1532–1555.
- Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Feng, Q.L., Cui, F.Z., Xu, Y.X., Song, X.H., Werf, M., 2003, Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers, *Biomaterials*, 24, 3213-20.
- Wang, Z.H., Choi, C.J., Kim, B.K., Kim, J.C., Zhang, Z.D., 2003, Microstructure and magnetic property of Fe–Co nanoparticles prepared by chemical vapor condensation process, *J Alloy Compd*, 351, 319–323.
- Wang, Z.H., Choi, C.J., Kim, J.C., Kim, B.K., Zhang, Z.D., 2003, Characterization of Fe–Co alloyed nanoparticles synthesized by chemical vapor condensation, *Mater Lett*, 57, 3560–3564.
- Wise, D.L., 2000, *Biomaterials and Bioengineering Handbook*, Marcel Dekker Inc, New York. pp. 366-368.
- Wu, P.K., Ringeisen, B.R., 2010, Development of human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) and human umbilical vein smooth muscle cell (HUVSMC) branch/stem structures on hydrogel layers via biological laser printing (BioLP), *Biofabrication*, 2, 141-152.
- Yalabik-Kas, H.S., Kreuter, J., Hincal, A.A., Speiser, P.P., 1986, *J Microencaps.*, 3, 71-76.

- Yamashita, T., Honda, M., Nio, K., Nakamoto, Y., Yamashita, T., Takamura, H., Tani, T., Zen Y., Kaneko S., 2010, Oncostatin M renders epithelial cell adhesion molecule–positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation, *Cancer Res*, 70(11), 4687–97.
- Yi, H., Wu, L.Q., Bentley, W.E., Ghodssi, R., Rubloff, G.W., Culver, J.N., Payne, G.F., 2005, Biofabrication with chitosan, *Biomacromolecules*, 6(6), 2881-2894.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L., Yu, J.S., 2004, Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme, *Oncogene*, 23, 9392–9400.
- Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., Vigneron, C., 1999, Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles, *J Control Release*, 60(2–3), 179–188.
- Zhang, W., DeMattia, J.A., Song, H., Couldwell, W.T., 2003, Communication between malignant glioma cells and vascular endothelial cells through gap junctions, *J Neurosurg*, 98(4), 846-853.
- Zhang, Y., Zhang, M., 2001, Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering, *J Biomed Mater Res*, 55(3), 304-312.
- Zheng Y., Zheng, Y., Ning, R., 2003, Effects of nanoparticles SiO₂ on the performance of nanocomposites, *Mater Lett*, 57, 2940–2944.
- Zmora, S., Glicklis, R., Cohen, S., 2002, Tailoring the pore architecture in 3-D alginate scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication, *Biomaterials*, 23, 4087–4094.

EKLER

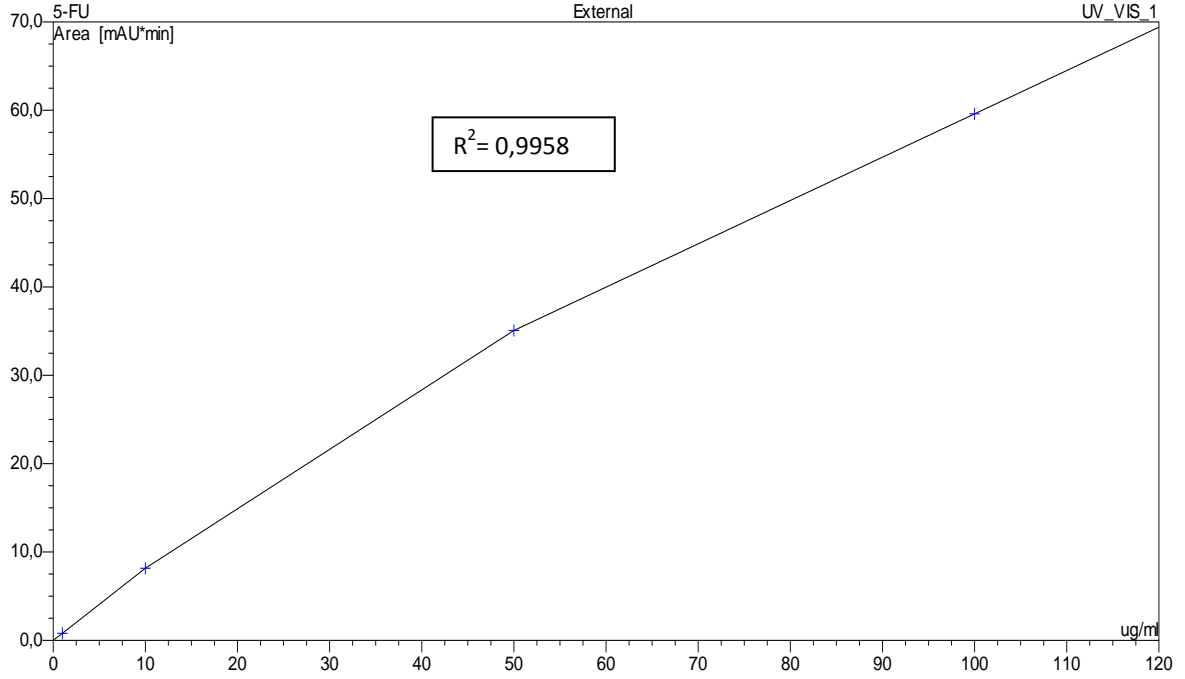
EK-1

UV SPEKTROFOTOMETREDE KULLANILAN 5-FU KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK-2

HPLC'DE KULLANILAN 5-FU KALİBRASYON GRAFİĞİ



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ceren KUTLU

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1986

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : Mersin Ticaret ve Sanayi Odası Anadolu Lisesi (2004).

Lisans : Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü (2008)

Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi:

2009- Araştırma Görevlisi, Fırat Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü,
Elazığ.