



T.C.

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**RNA VEYA İLAÇ TAŞIYICI OLARAK FOSFAZEN
NANOKOMPOZİTLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA ÖZSOY

Tez Danışmanı

Prof. Dr. ÖZGÜR ÖZAY

ÇANAKKALE – 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**RNA VEYA İLAÇ TAŞIYICI OLARAK FOSFAZEN
NANOKOMPOZİTLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA ÖZSOY

Tez Danışmanı

Prof. Dr. ÖZGÜR ÖZAY

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, 2210-C Öncelikli Alanlar) tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FHD-2022-4211

ÇANAKKALE – 2023



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Fatma ÖZSOY tarafından Prof. Dr. Özgür ÖZAY yönetiminde hazırlanan ve **08/06/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**RNA veya İlaç Taşıyıcı olarak Fosfazen Nanokompozitlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Biyomühendislik Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Özgür ÖZAY

(Danışman)

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Rıza KIVANÇ

Dr. Öğr. Üyesi Burçak DEMİRBAKAN

.....

.....

.....

Tez No :

Tez Savunma Tarihi : 08/06/2023

.....

İSİM SOYİSMİ

Enstitü Müdürü

.././20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Fatma ÖZSOY

13/06/2023

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve büyük sabır gösteren, sağladığı mükemmel çalışma ortamıyla araştırma şevkimi arttıran, saygı değer danışman hocam Prof.Dr. Özgür ÖZAY'a , paylaşmaktan büyük keyif aldığı engin bilgileriyle yolumu aydınlatan, güler yüzü ve hoşgörüsüyle Prof.Dr. Hava ÖZAY'a, çalışmalarımın her anında acemiliklerimi dizginleyen, bana yol gösteren, moral ve motivasyonlarıyla destek olan Doç.Dr. Pınar ILGIN ve Dr. Alper ÖNDER'e, antikanser hücre hattı çalışmalarımıdaki desteklerinden dolayı Dr.Öğr.Üyesi Ferah CÖMERT ÖNDER'e, müthiş enerjileri ve dostluklarıyla laboratuvar çalışma arkadaşlarıma, mükemmel ev arkadaşlığıyla beni asla yalnız bırakmayan, bana her konuda moral motivasyon sağlayan Safiye Nur YILDIZ'a hayatımın her evresinde bana destek olan, her konuda emeklerini esirgemeyen, maddi ve manevi her yönden bana güç veren başta babam Süleyman ÖZSOY ve bana hayat arkadaşlığı yapan annem Zeynep ÖZSOY olmak üzere değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmalarım boyunca maddi destek sağlayan 2210-C Öncelikli Alanlar, TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu)'a teşekkür ederim.

Fatma ÖZSOY
Çanakkale, Haziran 2023

ÖZET

RNA VEYA İLAÇ TAŞIYICI OLARAK FOSFAZEN NANOKOMPOZİTLERİNİN SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Fatma ÖZSOY

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Özgür ÖZAY

08/06/2023, 68

Biyomedikal alanındaki hızlı gelişmelerle birlikte mikro/nanopartiküller, polimerik sistemler, miseller ve hidrojel sistemleri gibi birçok ilaç dağıtım sistemi, özellikle kanser tedavisi ve doku mühendisliği olmak üzere birçok hastalığın klinik tedavisinde sayısız avantaj sunmaktadır. Günümüzde, ilaç dağıtım sistemleri, sistemik dağıtımdan organ ve hücresele hedeflemeye kadar sürekli ve kontrollü ilaç salımı için gelişmiş programlanabilir dağıtım sistemlerine geçiş yapmıştır.

Yapılan çalışmada halkalı yapıya sahip bir tür fosfazen kullanılarak nano ve mikro boyutlarda farklı kompozit partiküller sentezlendi. Sentezlenen partiküller bir ilaç/gen taşıyıcı olarak hedef ilaç ve hastalığa göre farklı yöntemler ile modifiye edildi. İlk aşamada tRNA taşınması amacıyla sentezlenen nanopartiküller altın nanopartiküller ile modifiye edilerek metal kompozitleri oluşturuldu. İkinci aşamada kanser tedavisi amacıyla yapısında bir tür aminoasit bulunduran mikropartiküller sentezlendi ve kuarternize edilerek elektrostatik etkileşimler yardımıyla ilaç tutma kapasiteleri artırıldı. Her iki sistemin de uygun tampon çözeltiler içerisinde *in vitro* ilaç salım davranışları araştırıldı. İlaç salım davranışlarını incelemek için partiküller farklı kinetik modeller kullanılarak matematiksel olarak modellendi. Mikro/nanopartiküller FT-IR, TEM, SEM-EDX, TGA, XRD, XPS gibi aletsel yöntemler kullanılarak ayrı ayrı karakterize edildi. Ayrıca partiküllerin antibakteriyel özellikleri, *Escherichia Coli*, ATCC 8739 (gram-negatif), *Staphylococcus Aureus*, ATCC 6538 (gram-pozitif), *Pseudomonas Aeruginosa*, ATCC 27853 (gram-negatif), bakteri türleri ve *Candida Albicans*, ATCC 90028 (bir tür mantar), gibi farklı bakteri türleri üzerinde

araştırıldı. Son olarak mikropartiküllerin antikanser özelliği *in vitro* HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerinde denendi.

Anahtar Kelimeler: İlaç/Gen Taşıyıcı, Nanopartikül, Mikropartikül, Polimerik Sistem, Antikanser, Antimikrobiyal



ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF PHOSPHAZENE NANOCOMPOSIDES AS RNA OR DRUG CARRIER

Fatma ÖZSOY

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Özgür ÖZAY

08/06/2023, 68

With the rapid developments in the field of biomedical, many drug delivery systems such as micro/nanoparticles, polymeric systems, micelles and hydrogel systems offer numerous advantages in the clinical treatment of many diseases, especially cancer therapy and tissue engineering. Today, drug delivery systems have transitioned to advanced programmable delivery systems for sustained and controlled drug release, from systemic delivery to organ and cellular targeting.

In the study, different composite particles in nano and micro sizes were synthesized by using a kind of phosphazene with a ring structure. The synthesized particles were modified with different methods according to the target drug and disease as a drug/gene carrier. In the first stage, the synthesized nanoparticles for tRNA transport were modified with gold nanoparticles and metal composites were formed. In the second stage, microparticles containing a kind of amino acid in their structure were synthesized for the purpose of cancer treatment and their drug holding capacity was increased by quaternization with the help of electrostatic interactions. *In vitro* drug release behavior of both systems in appropriate buffer solutions was investigated. Particles were mathematically modeled using different kinetic models to examine their drug release behavior. Micro/nanoparticles were individually characterized using instrumental methods such as FT-IR, TEM, SEM-EDX, TGA, XRD, XPS. In addition, the antibacterial properties of the particles were determined by *Escherichia*

Coli, ATCC 8739 (gram-negative), *Staphylococcus Aureus*, ATCC 6538 (gram-positive), *Pseudomonas Aeruginosa*, ATCC 27853 (gram-negative), bacterial species and *Candida Albicans*, ATCC 90028 (a type of fungus), were investigated on different bacterial species such as Finally, the anticancer properties of microparticles were tested on HT-29 colon cancer cells *in vitro*.

Keywords: Drug/Gene Carrier, Nanoparticle, Microparticle, Polymeric System, Anticancer, Antimicrobial



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1.1. Nano/mikro Temelli Kombinasyonel İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	1
1.1.1. Lipozomlar.....	2
1.1.2. Miseller.....	3
1.1.3. Polimer-İlaç Konjugatları.....	3
1.1.4. Nanopartiküller.....	4
1.1.5. Diğer Nanotaşıyıcılar.....	6
1.1.6. Mikropartiküller.....	6
1.1.7. Yığın Malzemelere Dayalı Taşıyıcı Sistemler.....	6
1.1.8. Hidrojeller.....	7
1.1.9. Nanolifli Matlar.....	7
1.1.10. Kompozit Malzemeler.....	8
1.2. Polimer Sistemler.....	8
1.2.1. Katyonik Polimerler.....	9
1.2.2. Anyonik Polimerler.....	10
1.2.3. Nötral Polimerler.....	10
1.2.4. Kopolimerler.....	11
1.3. Polimer Taşıyıcı Yapılar.....	11

1.3.1.	Polimerik Nanopartiküller.....	12
1.3.2.	Polimerik Nanopartiküllerin Bazı Üretim Yöntemleri.....	13
	Solvent Buharlaştırma Yöntemi.....	13
	Emülsifikasyon–Solvent Difüzyon Yöntemi.....	14
	Çözücü Yer Değiştirme Yöntemi.....	15
	Monomer Polimerizasyonu.....	16
1.4.	Halkalı ve Polifosfazener.....	16
1.4.1.	Sentez Yöntemleri.....	17
	Termal Halka Açma Polimerizasyonu.....	18
	Canlı Katyonik Polimerizasyon.....	19
1.4.2.	Biyomedikal Uygulamaları.....	20
1.5.	İlaç Salım Sistemleri için Kinetik Modeller.....	22

İKİNCİ BÖLÜM ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

25

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.	Materyal.....	28
3.2.	Yöntem.....	28
3.2.1	HCCP- AEP Nanokürelerin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	28
3.2.2	HCCP-AEP Nanokürelerin Au ile Fonksiyonelleştirilmesi.....	29
3.2.3	RNA ve İlaç Yükleme/Salımı Çalışmaları, İlaç Salımı için Kinetik Modelleme.....	30
3.2.4	Antibakteriyel ve Antifungal Davranışların İncelenmesi.....	31
3.2.5	HCCP-PP-LEE Mikrokompozit Kürelerin sentezi ve Kuarternizasyon Aşamaları.....	32
3.2.6	Mikrokompozit Kürelerin Karakterizasyonu.....	33
3.2.7	Mikrokompozit Kürelere İlaç Yükleme ve Salım Çalışmaları, İlaç Salım Kinetik Modelleri.....	33
3.2.8	Antibakteriyel ve Antifungal analizler.....	34
3.2.9	Sitotoksisite analizleri.....	35

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1.	HCCP-AEP Nanoküreler.....	36
4.1.1	Nanokürelerin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	36
4.1.2	Nanokürelere Gen/İlaç Yükleme ve Salım Çalışmaları.....	43
4.1.3	İlaç Salım Kinetikleri.....	44
4.1.4	Nanokürelerin Antibakteriyel ve Antifungal Etkilerinin İncelenmesi.....	45
4.2.	HCCP-PP-LEE Mikrokompozit Küreler.....	46
4.2.1	Mikrokompozit Kürelerin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	46
4.2.2	Mikrokompozit Kürelere İlaç yükleme ve Salım Çalışmaları.....	51
4.2.3	İlaç Salım Kinetikleri.....	52
4.2.4	Mikrokompozit Kürelerin Antibakteriyel ve Antifungal Etkilerinin İncelenmesi.....	54
4.2.5	Sitotoksisite Çalışmaları.....	55
		57

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ ve ÖNERİLER

KAYNAKÇA.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	I

SİMGELER VE KISALTMALAR

HCCP	Hekzaklorosiklotrifosfazen
AEP	1-(2-Aminoetil) Piperazin
PP	Fenolftalein
LEE	L-Lizin Etil Ester
ATA	4-Amino-4H-1,2,4 Triazol
TEA	Trietilamin
HCl	Hidroklorik Asit
TSB	Triptik Soya Suyu
TSA	Triptik Soya Agarı
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
NaDc	Diklofenak Sodyum
AuNp	Altın Nanopartikül
HCCP-AEP	Taşıyıcı polimerik nanopartikül
HCCP-AEP@Au	Altın kompozitleri oluşturulmuş taşıyıcı polimerik nanopartikül
HCCP-PP-LEE	Taşıyıcı polimerik mikopartikül
HCCP-PP-LEE-ATA-Q	Kuarternize edilmiş taşıyıcı polimerik mikopartikül
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
Uv-Vis	Ultraviyole-Görünür Spektroskopi
TGA	Termogravimetrik Analiz
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
SEM-EDX	Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi
XRD	X-ışını Difraktometresi
XPS	X-ışını Fotoelektron Spektroskopi
AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrometresi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DMEM	Hücre kültürü besi yeri
MTT	3-(4,5-dimetil-tiyazolil)-2,5-difeniltetrazolyum bromür testi
PS	Streptomisin

DL	İlaç yükleme yüzdesi
EE	İlaç tutma verimliliği
EPR	Arttırılmış geçirgenlik ve tutma
pH	Hidrojen potansiyeli
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
PEI	Polietilenimin
PLL	Poli-L Lizin
PAA	Poli-amidoamin
PAE	Poli-aminoester
PLGA	Polilaktik-ko-Glikolik Asit
PEG	Polietilen Glikol
PLA	Polilaktik Asit
PCL	Polikaprolakton
dk	Dakika
eV	Elektron volt
kHz	Kilohertz
rpm	Dakikadaki devir sayısı
cm	Santimetre
mm	Milimetre
μm	Mikrometre
nm	Nanometre
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
g	Gram
mg	Miligram
mg/L	Birim litreye karşılık gelen miligram
mg/g	Birim grama karşılık gelen miligram
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
Q_t	t anında çözünen ilaç miktarı
Q_0	Çözeltideki başlangıç ilaç miktarı

K_0	Sıfır dereceli kinetik sabiti
C	İlaç konsantrasyonu
C_0	İlacın başlangıç konsantrasyonu
K	Birinci dereceden hız zaman sabiti
K_H	Higuchi kinetik salım katsayısı
M_t/M_∞	t zamanında salınan ilacın fraksiyonu
a	Salım hız sabiti
n	Difüzyon üssü
k	Serbest salım kinetik sabiti
R^2	Regresyon sabiti



TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Güç yasasının n üssü ve farklı geometriye sahip polimerik kontrollü salım sistemlerinden ilaç salım mekanizması.	24
Tablo 2	HCCP-AEP ve HCCP-AEP@ Au nanoparçacıklarından ilaç ve gen salımının hız sabitleri ve korelasyon kat sayıları, aşağıdaki kinetik modeller kullanılarak hesaplanmıştır: Zero-order, First-order, basitleştirilmiş Higuchi, Korsmeyer–Peppas ve Hixson-Crowell kinetik model.	44
Tablo 3	HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelerin ilaç yükleme kapasiteleri.	51
Tablo 4	HCCP-PP-LEEMP's ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikropartiküllerinden ilaç salımının hız sabitleri ve korelasyon kat sayıları, aşağıdaki kinetik modeller kullanılarak hesaplanmıştır: Zero-order, First-order, basitleştirilmiş Higuchi, Korsmeyer–Peppas ve Hixson-Crowell kinetik model.	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Nano taşıyıcı sistemler.	2
Şekil 2	Polimer-ilaç konjugatları için örnek bir sentez mekanizması ve potansiyel uygulama alanları.	4
Şekil 3	Farklı şekil özelliklerine sahip nanopartiküller.	5
Şekil 4	Çeşitli polimer sistemlerinin moleküler mimarisi (zincir yapısı).	9
Şekil 5	Farklı kopolimer bağlantılarının bir özeti.	11
Şekil 6	Polimerik nanopartiküllerin fonksiyonel malzemeler ile yüzey işlevselleştirilmesi.	12
Şekil 7	Solvent buharlaştırma yöntemi.	14
Şekil 8	Emülsifikasyon–solvent difüzyon yöntemi.	15
Şekil 9	Çözücü yer değiştirme yöntemi.	15
Şekil 10	Hekzaklorosiklotrifosfazenin (HCCP) kimyasal yapısı.	16
Şekil 11	Halka açma polimerizasyonunun reaksiyon mekanizması.	19
Şekil 12	Canlı katyonik polimerizasyon mekanizması.	20
Şekil 13	HCCP-AEP nanokürelerin sentezi ve Au nanopartiküller ile kompozitlerinin oluşturulması.	29
Şekil 14	Nanokürelere ait RNA/ilaç yükleme mekanizması.	30
Şekil 15	Nanoküreler için RNA/ilaç salım gösterimi.	31
Şekil 16	HCCP-AEP nanokürelerinin sentezinin şematik gösterimi.	36
Şekil 17	HCCP-AEP nanokürelere ait FT-IR spektrumları.	37
Şekil 18	Nanokürelere ait TEM görüntüleri. (a) phz-AEP (1/3), skala: 100 nm b) phz-AEP (1/4), skala: 1 µm c) phz-AEP (1/6), skala: 2 µm d) Nanokürelerin parçacık boyut dağılımı analizi, TEM görüntüsü için skala: 100 nm. Analiz ImageJ programı kullanılarak yapıldı.	38
Şekil 19	(a) HCCP-AEP nanokürelerin yüzeylerinde altın nanopartiküllerin sentezi, (b ve c) HCCP-AEP nanokürelerinin SEM görüntüleri (d ve e) HCCP-AEP@Au nanokürelerinin SEM	39

	görüntüleri. (b ve d) için skala: 20 µm, (c ve e) için skala: 4 µm'dir.	
Şekil 20	HCCP-AEP@Au nanokürelerinin element haritalaması, (a) N, (b) P, (c) Cl, (d) Au, (e) EDX spektrumu.	40
Şekil 21	HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelere ait XRD spektrumları.	41
Şekil 22	HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelere ait TGA eğrileri.	42
Şekil 23	HCCP-AEP@Au nanokürelere ait XPS analizi (a) tam tarama spektrumu (b) dar tarama spektrumu.	42
Şekil 24	HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelerinden (a) RNA salımı, (b) NaDc salımı.	43
Şekil 25	HCCP-AEP için antimikrobiyal aktivite testlerinin görüntüleri (a) <i>E. Coli</i> (b) <i>S. Aureus</i> (c) <i>C. Albicans</i> . HCCP-AEP@Au (d) <i>E. Coli</i> (e) <i>S. Aureus</i> (f) <i>C. Albicans</i> .	46
Şekil 26	HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait sentez ve kuaternizasyon mekanizması.	47
Şekil 27	HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait FT-IR spektrumları.	48
Şekil 28	HCCP-PP-LEE-ATA-Q mikro kürelere ait TEM görüntüleri. (a) HCCP-PP, (b) HCCP-PP-LEE, (c) HCCP-PP-LEE-ATA, (d) HCCP-PP-LEE-ATA-Q. (a ve b) için sakala: 1 µm ve (c ve d) için skala: 500 nm'dir.	49
Şekil 29	Mikrokürelere ait SEM görüntüleri. (a) HCCP-PP-LEEMP, (b) HCCP-PP-LEE-ATAMP, (c) HCCP-PP-LEE-ATA-QMP. Tüm görüntüler için skala: 1 µm'dir.	50
Şekil 30	HCCP-PP-LEEMP, HCCP-PP-LEE-ATAMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait TGA eğrileri.	50
Şekil 31	HCCP-PP-LEEMP, HCCP-PP-LEE-ATAMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikro kürelere ait ilaç salım grafikleri. (a) Mikrokürelere cimetidine (%) salımı (b) NaDc (%) salımı, (c) HCCP-PP-LEE-ATA-QMP ve NaDc elektrokimyasal etkileşim mekanizması.	52
Şekil 32	HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait antimikrobiyal analiz sonuçları.	55
Şekil 33	HCCP-PP-LEEMP, HCCP-PP-LEE-ATA-QMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP@Cimetidine mikro kürelerinin HT-29	56

hücreleri üzerindeki hücre proliferasyonu etkileri. *P değeri < 0,05.



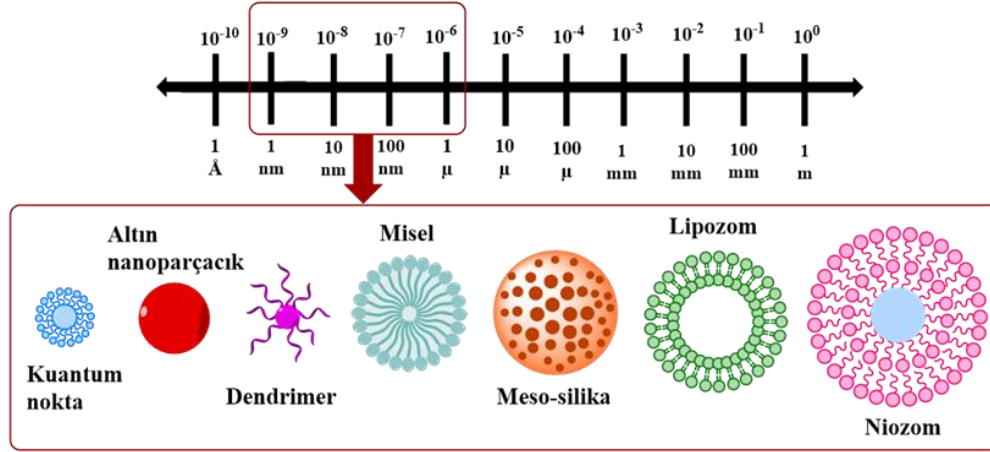
BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

İlaç taşıyıcı farmasötik sistemler sağlık ve tıp alanlarında büyük bir öneme sahiptir. Aynı zamanda ilaç taşıyıcı materyaller kullanılarak günümüze kadar farklı yöntemler ile geliştirilmiştir ve bulaşıcı veya bulaşıcı olmayan birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Bunun yanı sıra geliştirilmiş olan bu taşıyıcı sistemler hastalıkların önlenmesinde ve tedavi edilmesinde bazı yönlerden yetersiz kalabilmektedir. Hastalığın tedavisi sırasında hastalara uygulanan ilaçların dozajındaki olumsuz artışlar ve buna bağlı olarak hastada istenmeyen yan etkiler oluşması, canlı vücudunda sitotoksik etki açığa çıkması gibi bazı durumlar gözlemlenebilmektedir. İdeal bir ilaç taşıyıcı sistem inert, biyouyumlu, mekanik olarak güçlü, hasta için rahat, yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip, kontrollü ve güvenli ilaç salım davranışına sahip, uygulaması, imal etmesi ve sterilize etmesi kolay olmalıdır. Kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerin amacı genellikle ilacın uzun süre boyunca kan dolaşımında sirküle olabilecek bir uygulama profili elde etmektir. Geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlerde, kandaki ilaç seviyesi, ilacın her uygulamasından sonra seviyenin yükseldiği ve ardından bir sonraki uygulamaya kadar düştüğü gözlemlenir. İlaç uygulamalarında istenen aralık, ajanın kan seviyesinin, toksik bir seviyeyi temsil edebilecek bir maksimum değer ile ilacın artık etkili olmadığı minimum bir değer arasını temsil eder (Heng 2018; Hoffman 2008).

1.1. Nano/mikro Temelli Kombinasyonel İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nano/mikro ölçekteki ilaç taşıyıcı sistemler, aktif hedefleme ve pasif hedefleme yetenekleri sayesinde terapötik maddelerin biyolojik dağılımını iyileştirmek için farklı şekillerde tasarlanabilir. Literatürde kombinasyonel tedaviler için hedeflemenin avantajlarından yararlanarak tasarlanmış, lipozomlar, miseller, nanoparçacıklar, polimer-ilaç konjugatları gibi yerleşik nanotaşıyıcılar, dendrimerler, nanohücreler ve mikropartiküller mevcuttur (Şekil 1) (Zhang, Wang ve Yang 2011).



Şekil 1. Nano taşıyıcı sistemler.

1.1.1. Lipozomlar

Lipozomlar, önemli miktarda suyu içerisinde alabilen membranöz bir lipit çift tabakadan oluşan kapalı küresel veziküller olarak tanımlanabilir (Şekil 1). Lipozom çift tabakası esas olarak, geçirgenlik, yük yoğunluğu ve sterik engel dahil olmak üzere, ortaya çıkan lipozomların baskın fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkileyen doğal ve sentetik fosfolipidler ve kolesterol temelli yapılardır. Lipozomlar hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşikler için taşıyıcı olma yeteneğine sahiptir ve bunları sırasıyla ya iç sulu çekirdekte ya da lipit çift tabakasında kapsülleyerek taşıma işlemini gerçekleştirirler. Lipozomlar genellikle kanser tedavisi amacıyla klinik uygulamalar için tek bir terapötik ajanı taşıma amacıyla geliştirilmişlerdir (Bawarski vd., 2008).

Bazı uygulamalarda, tercih edilen ilaçların farklı özelliklerinden veya elde edilen formülasyonun kararsızlığından dolayı, farklı ilaçlar tek bir yükleme yöntemiyle tek bir lipozomal formülasyona dahil edilemez. Bu gibi durumlarda, bir kombinasyonel dağıtım sistemi oluşturmak amacıyla çeşitli yükleme teknolojileri tercih edilebilir.

Lipozomların dahili sulu çekirdeğinde iki farklı ilaç kapsüllenebilir. Buna ek olarak, farklı çözünürlüklere sahip (yağda çözünür ve suda çözünür) ilaçlar sırasıyla lipozomların lipit çift tabakasına ve sulu fazına dahil edilebilir (Rosenthal vd., 2002).

1.1.2. Miseller

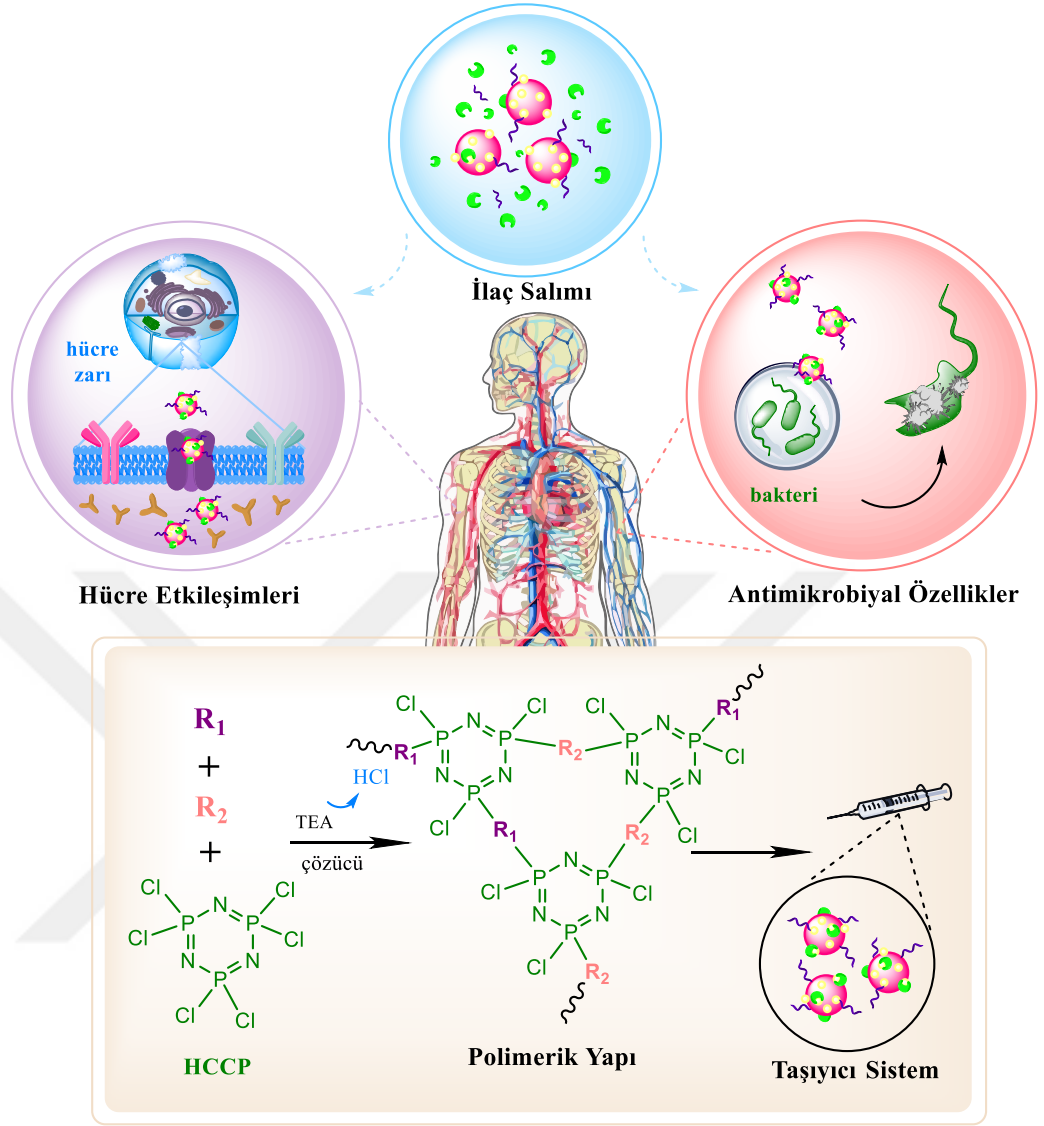
Miseller, konsantrasyonu kritik misel konsantrasyonunun üzerinde olduğunda amfifilik blok veya aşırı kopolimerinden kendiliğinden oluşan koloidal çekirdek-korona yapılarıdır (Şekil 1). Misellerin hidrofobik çekirdeği, suda az çözünen ilaçlar için bir depo görevi görürken, dış hidrofilik kabuk, kapsüllenmiş ilaçları koruyabilir ve kan dolaşım sürelerini uzatabilme avantajı sağlar. Bu sayede miseller ilaç dağıtımı için uygun birer taşıyıcı olma özelliği gösterirler (Suri, Fenniri ve Singh 2007).

Çeşitli terapötikleri misellere yüklemenin farklı yolları vardır. Bunlardan bir diğeri, ilaçları çekirdek fazında kapsüllemenin yanı sıra, kompleks oluşturma veya elektrostatik etkileşim yoluyla misel-terapötik konjugatları oluşturmaktır. Bu sayede, biyoaktif ajanlar ilaç yüklü miseller ile birleştirilebilir ve sinerjistik/kombine terapötik etkinlik elde etmek için hedef hücrelere birlikte iletilebilir. Son yıllarda, çok ajanlı dağıtım için anyonik gen, protein veya diğer ilaç türleri ile kompleksler oluşturmak üzere ilaç yüklü miselleri kullanan birkaç sistem geliştirilmiştir (Bae vd., 2007).

1.1.3. Polimer-İlaç Konjugatları

Son yıllarda, özellikle kanser tedavisi başta olmak üzere hastalık tedavileri için yeni "nanoilaçlar" olarak polimer-ilaç konjugatlarına olan ilgi giderek artmaktadır. Geleneksel düşük molekül ağırlıklı ilaçlar kullanılırken dolaşımdan hızlı bir şekilde temizlenmesi, patolojik bölgelerde zayıf birikme ve normal hücre/dokuya yönelik istenmeyen toksisite nedeniyle, bir 'polimerik ön ilaç' olarak polimer-ilaç konjugatları kavramı bu sorunların üstesinden gelme amacıyla geliştirilmiştir (Afsharzadeh, Hashemi, ve Mokhtarzadeh 2018; L. Zhang ve. 2020). Şekil 2'de örnek bir polimer-ilaç konjugatı için sentez mekanizması ve potansiyel uygulama alanları verilmiştir. Burada R1 ve R2 tercih edilen polimer ile anlamlı fonksiyonel gruplara sahip ilaç moleküllerini temsil etmektedir.

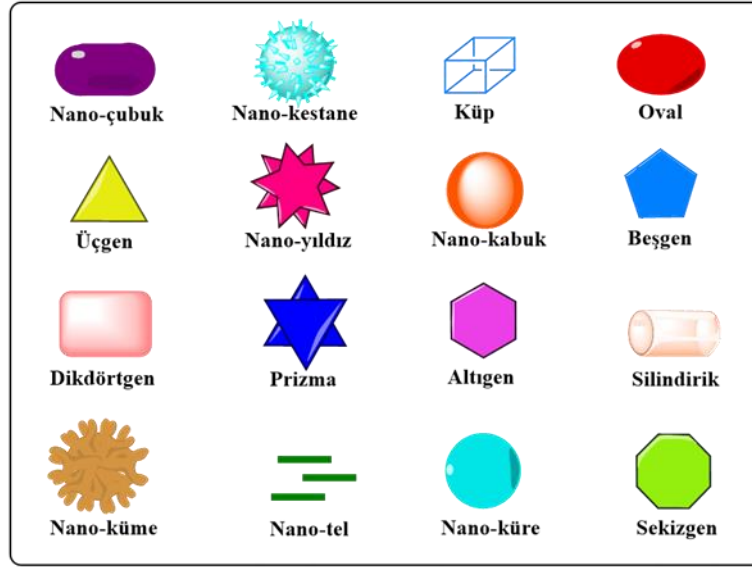
Bir polimer-ilaç konjugatı oluşturmak için, genellikle küçük bir moleküler ilaç bir lineer polimerin yan zincirine bir bağlayıcı aracılığıyla kovalent olarak bağlanır. Arttırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisiyle tümör seçiciliği, azalan toksisite, artan ilaç çözünürlüğü ve serbest ilaçlara kıyasla bazı ilaç direnci mekanizmalarının bertaraf edilmesi gibi avantajlar nedeniyle, yerleşik antikanser ajanlarla birçok polimer-ilaç konjugatı klinik olarak test edilmiştir (Greco ve Vicent 2009).



Şekil 2. Polimer-ilaç konjugatları için örnek bir sentez mekanizması ve potansiyel uygulama alanları.

1.1.4. Nanopartiküller

Boyutları $<1 \mu\text{m}$ olan nanopartiküller, bir tür koloidal katı parçacık olarak tanımlanabilirler. Esas olarak doğal veya sentetik polimerlerden ve bazı durumlarda polimer ve diğer malzeme türlerinin kombinasyonundan birçok farklı şekilde hazırlanabilir (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı şekil özelliklerine sahip nanopartiküller.

Hazırlama yöntemine bağlı olarak, terapötik maddeler nanoparçacık matrisinde tutulabilir, içinde çözülebilir veya ona eklenebilir. Hedef ilaçlar için taşıyıcı bir eleman olarak nanoparçacıklar, yalnızca farmakokinetiğini ve biyolojik dağılımını değiştirerek yüklü ilacın terapötik etkinliğini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda ilaçların aktif hedefleme veya uyarana duyarlı kontrollü salımı gibi belirli bir amacı gerçekleştirmek için daha fazla işlevselleştirmeye de izin verir (Singh ve Nalwa 2007).

Katı bir hidrofobik çekirdek ve bir lipit veya polimerlipid hibrit tek tabakasından oluşan lipit veya lipit bazlı nanopartiküller mevcuttur. Bunlar, terapötik peptitler, proteinler ve antijenler gibi biyoaktif maddeler için nanotaşıyıcı görevi görmektedir (Lombardo, Kiselev ve Caccamo 2019).

Kanser gibi riskli hastalıkların optimum tedavisi için, halihazırda var olan ilaç taşıyıcılarının özelliklerini iyileştirecek şekilde işlevlendirilmesi önemlidir. İlaç dağıtım sistemlerinde, bileşik etkilere sahip çok işlevli nanoparçacıklar, örneğin hedefleme özgüllüğü, teşhis ve görüntüleme yeteneği, optimize edilmiş farmakokinetik ve farmasötik ajanların kombine salımları bu sistemlerden beklenen özellikler arasındadır (Yang vd., 2007).

1.1.5. Diğer Nanotaşıyıcılar

Literatürde yer alan lipozom, misel gibi nano taşıyıcıların yanı sıra, kombinasyonel terapilerde çoklu terapötik ajanları birlikte salımlarını gerçekleştirmek için dendrimerler, polimerzomlar, mezogözenekli silika nanopartiküller, nanohücreler gibi nano boyutlarda diğer bazı araç türleri geliştirilmiştir (Z. Li vd., 2017). Dendrimerler, iç ara boşluk ve terminal fonksiyonel grupları içeren benzersiz yapı ve özellikler sayesinde, ilaç moleküllerinin iç kısımlarında tutulmasına ve hidrofobik/hidrojen bağı etkileşimleri veya elektrostatik etkileşimler yoluyla yüzeye bağlanmasına izin verir.

Polimerzom, bir iç sulu lümen ve kalın bir hidrofobik çevreye sahip olan polimer bazlı bir kabuk yapısına sahiptir. Bu yapı özellikleri sayesinde polimerzomlara hidrofilik ve hidrofobik ilaçların eşzamanlı yüklenmesiyle bir ortak dağıtım sistemi gerçekleştirilebilir (Hasannia vd., 2022).

1.1.6. Mikropartiküller

Taşıyıcı sistem olarak görev yapan mikropartiküllerin boyutları genellikle 1-1000 µm arasındadır. Nano taşıyıcılarla karşılaştırıldığında, daha büyük hacime sahip olan mikropartiküller, biyomakromoleküler ilaçları (örn. protein, nükleik asit ve antikor) veya daha küçük moleküler ilaçları kapsüllemeyi kolaylaştırabilir. Diğer yandan mikropartiküller uzun süreli bir ilaç salımına olanak sağlarlar. Mikropartiküller, emülsiyonun katılaştırılması, koaservasyon, solvent buharlaştırma ve solvent ekstraksiyonu gibi birçok yöntem ile üretilirler. Günümüzde birçok mikropartikül ilaç salım formülasyonu klinik deneylerden geçmiştir ve bazıları terapötik ajanların kombinasyon halinde verilmesi için üretilmiş ve laboratuvar çalışmaları gerçekleştirilmiştir (de Azevedo vd., 2018).

1.1.7. Yığın Malzemelere Dayalı Taşıyıcı Sistemler

İlaç salım sistemlerinde sıklıkla tercih edilen nanopartiküllerin yanı sıra hidrojeller, lifli matlar veya filmler ve farklı taşıyıcılardan elde edilen kompozit yapılar dahil olmak üzere yığın malzemeler, yerel ilaç dağıtımını için yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, nanotaşıyıcılar kullanılırken hücresel alım yoluyla hedef bölgelerde ilaç birikimi oluşturulabilir. Bu sayede yığın malzemeler, enjekte edilebilir veya tedavi edilen alanın yakınına implante edilebilir, bu da ilaçların yavaşça ayrıştırılabileceği bir depo özelliği

gösterir. Böylece, uzun süre boyunca patolojik bölgede yüksek bir lokal ilaç konsantrasyonu korunabilir (H. Zhang, Wang ve Yang 2011).

1.1.8. Hidrojeller

Hidrojeller çapraz bağlı hidrofilik polimerlerden üretilmiş hacimce şişme özelliğine sahip ağ yapılarıdır. Doku benzeri elastikiyetleri ve iyi biyouyumlulukları nedeniyle biyomedikal uygulamalarda sıklıkla tercih edilirler. Ayrıca hidrojeller, besinler ve suda çözünen maddeler (örneğin hidrofilik ilaçlar) için yüksek geçirgenliğe sahiptir, bu da onları ilaç salımı için potansiyel bir taşıyıcı sistem haline getirir (Rajan vd., 2022). Günümüze kadar kontrollü ilaç salım uygulamaları için, hidrojellerin geçirgenlik, uyarılara yanıt verme yeteneği, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve yüzey işlevselliği gibi özellikleri araştırmacılar tarafından tasarlanmış ve optimize edilmiştir. Günümüzde, birden fazla ilacın kontrollü salınımı için taşıyıcı olarak yeni hidrojeller tasarlamak ve üretmek bu alandaki en ilgi çeken konular arasındadır. İlaçların hidrojel matrisinden salınma davranışı, sadece ilaçların fizikokimyasal özelliklerine değil, aynı zamanda ilaçların nasıl yüklendiğine de bağlıdır. Bu konularda literatürde farklı yöntemler ile çalışılmış birçok araştırma mevcuttur (Ozsoy vd., 2022).

1.1.9. Nanolifli Matlar

Nanolifli matlar, ilaçlar için kapsülleme ve kontrollü salım kapasitesine sahip olan sistemlerdir (Okuda, Tominaga ve Kidoaki 2010). Bir tür ilaç taşıyıcı veya doku mühendisliği yapı iskelesi olarak kullanıma oldukça uygundur. Nanolifli keçeler, yaygın olarak koaksiyel elektroğirme ile ve son zamanlarda emülsiyon elektroğirme yoluyla elde edilen çekirdek-kabuk polimer liflerinden oluşur. Emülsiyon elektroğirmede, yaygın olarak kullanılan emülsiyon, hidrofobik ve hidrofilik ilaçların birden fazla tedavinin bir arada uygulanması amacıyla farklı fazlarda (yağlı faz ve sulu faz) ayrı ayrı çözülebildiği, elde edilen elyaf keçesini potansiyel bir taşıyıcı haline getiren, yağ içinde su emülsiyonudur (Abu Owida vd., 2022).

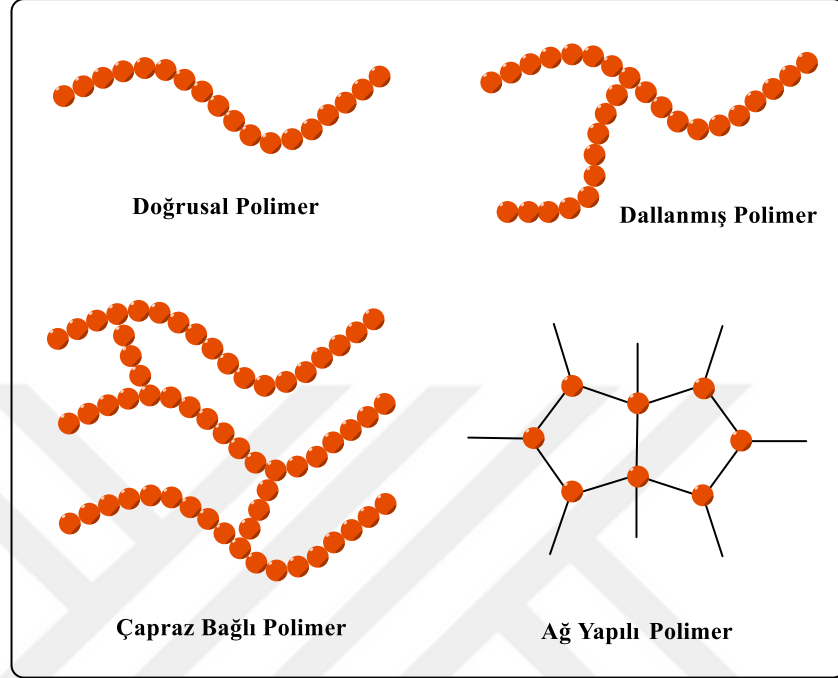
1.1.10. Kompozit Malzemeler

Farklı yapılara sahip malzemelerden oluşan kompozit malzeme, ilaç salım davranışları farklı yapılara sahip taşıyıcılardan ayrı olabileceğinden, kombinasyon tedavisinde çok ajanlı uygulama için umut verici araçlardan biridir. Günümüze kadar hidrojel/misel kompozitleri, polimer nanotabaka/misel kompozitleri, mezogözenekli cam/misel kompozitleri, hidrojel/mikropartikül kompozitleri ve aljinat boncuk gömülü ipek fibroin yapı iskeleleri gibi birkaç kompozit sistem kombinasyon sağlama amacı için tasarlanmış ve geliştirilmiştir (Wei vd., 2009; Kim vd., 2009).

1.2. Polimer Sistemler

Polimerler, oldukça çeşitli ve yaygın olarak kullanılan biyomalzeme sınıflarından biridir. Genellikle serbest radikal polimerizasyon veya yoğuşma polimerizasyon yöntemleri sonucunda kovalent bağlarla bağlanan monomer birimlerinden oluşurlar. Polimerler, çeşitli amaçlar için ayarlanabilen bir dizi fiziksel ve kimyasal özelliğe sahiptir ve düşük maliyetle kolayca üretilirler. Polimerler, sentezleri sırasında hassas bir şekilde kontrol edilmesi gereken yüksek moleküler ağırlığa sahip olma eğilimindedir. Bir yığın polimerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini üretmek veya tahmin etmek için polimer ağırlığının kontrol edilmesi gerekir. Genel olarak, tıbbi cihazlar ve nanoteknoloji gibi yapısal uygulamalar için 10.000 daltondan daha büyük moleküler ağırlıklara sahip tekli polimerler tercih edilir. Bununla birlikte, özel uygulamalarda daha düşük moleküler ağırlıklı polimerler veya "oligomerler" kullanılabilir; veya hem düşük moleküler ağırlıklı hem de daha yüksek moleküler ağırlıklı polimerler, her iki polimer türünün benzersiz özelliklerini vermek üzere karıştırılabilir. Bir polimerin fiziksel özelliklerini, tek tek moleküller arasındaki etkileşimlerden veya polimerin kendisinin ikincil yapısı belirler. Polimerler, doğrusal, dallanmış veya ağlar gibi çeşitli yapılar elde etmek için sentezlenebilir (Şekil 4). Böylece polimerler, özellikle ilaç taşıyıcı sistemlerde ilaç için çeşitli şekillerde modifiye edilebilen nanoparçacıklar ve hidrojeller gibi karmaşık veya basit yapılar oluşturmak üzere şekillendirilmeye uygun yapılar olarak tercih edilebilirler. Vücut veya hücre sistemi içindeki fiziksel özelliklerin değişimi, endozomlar veya lizozomlardaki pH değişimi ve oda sıcaklığından vücut sıcaklığına geçiş gibi polimer sistemlerin ilaç salım profilini manipüle etmek için kullanılabilir. Geçiş sıcaklığı ve viskozite gibi fiziksel özellikler ve polimerlerin yükü gibi kimyasal özellikler, polimer bazlı ilaç verme sistemlerinde büyük öneme sahiptir. Polimerlerin modifikasyonu, ısıya duyarlı veya pH'a

duyarlı davranış gibi istenen özelliklere sahip polimer ilaç verme sistemleri oluşturmak için yaygın olarak kullanılır (MacHtakova, Thérien-Aubin ve Landfester 2022; Abasian vd., 2020).



Şekil 4. Çeşitli polimer sistemlerinin moleküler mimarisini (zincir yapısı).

1.2.1. Katyonik Polimerler

Katyonik polimerler, pozitif yüke sahip benzersiz bir polimer sınıfıdır. Çoğu katyonik polimer, protonlanabilen amin fonksiyonel gruplarına sahiptir, ancak bunlar polimerik yapı bakımından (yani doğrusal, dallı veya ağ bağlantılı) büyük ölçüde farklılık gösterir. Katyonik polimerler, yüksek hücre alım ve transfeksiyon verimlilikleri ile gen iletiminde viral olmayan vektörler olarak büyük potansiyel göstermiştir. Bunun nedeni, pozitif yüklü polimerler ile negatif yüklü genetik materyal (örneğin, DNA ve RNA) arasındaki kararlı etkileşimlerdir. Katyonik polimerlerin pozitif özellikleri, onları negatif yüke sahip hücre zarlarına yaklaştırır ve endositoz yoluyla etkili hücre alımına izin verir. Katyonik polimerler düşük maliyetle üretilebilir ve çeşitli amaçlar için kolayca modifiye edilebilir. Ayrıca anyonik polimerlerle birleştirilerek elektrokimyasal olarak aktif polimer sistemlerinin geliştirilmesine de olanak sağlarlar. Tıbbi uygulamalarda kullanımına ek olarak, katyonik polimerler biyomalzemelerin geliştirilmesi için yararlı bir araç haline

gelmiştir. Jelatin, kitosan, katyonik siklodekstrin, katyonik dekstran, katyonik selüloz, polietilenimin (PEI), poli(L-lizin) (PLL), poliamidoamin (PAA), poliaminoester (PAE) gibi polimerler katyonik polimerlere örnek olarak gösterilebilir (Chen vd., 2023; Smedt, Demeester ve Hennink 2000).

1.2.2. Anyonik Polimerler

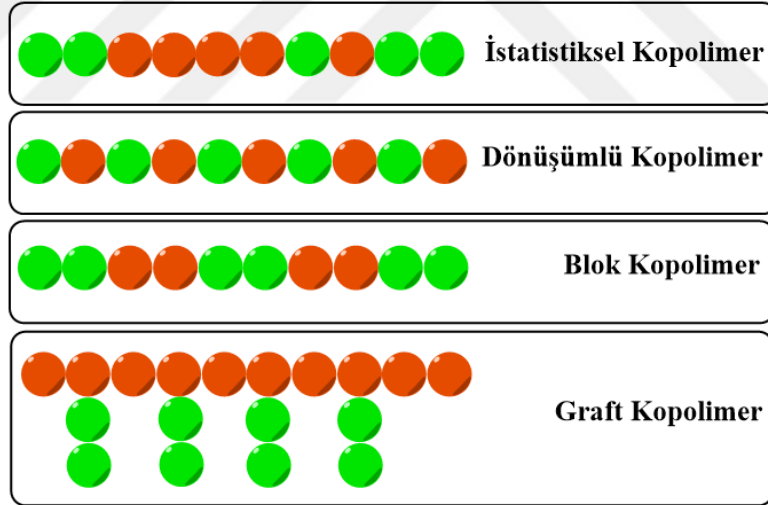
Anyonik polimerler, fizyolojik koşullarda negatif yüke sahip olan polimer türleridir. Anyonik polimerlerin çoğu, omurgalarında veya yan zincirlerinde genellikle hidroksil grupları veya karboksilik asitler bulundurlar. Bu özellikleri sayesinde anyonik polimerler biyomedikal ve biyomalzeme uygulamalarında sıklıkla tercih edilmiştir. Katyonik polimerlere benzer şekilde, anyonik polimerler de çeşitli yapılara uyum sağlayabilir ve biyotıpta arzu edilen uygulamalara sahip olan blok kopolimerlerde kolayca birleştirilebilir. Aljinat, hiyalüronik asit, silikon, poli-l glutamat, poliester ve polieterler doğal ve sentetik olan anyonik polimerlere örnektir (Dar vd., 2017).

1.2.3. Nötral Polimerler

Nötr polimerler herhangi bir fizikokimyasal yüke sahip değildir ve yapılarına bir pozitif veya negatif küçük molekül eklenerek katyonik veya anyonik olacak şekilde modifiye edilebilir. Bitkilerde birincil bileşenler olan selüloz ve amiloz gibi nötr polisakkaritler, ilaç dağıtım sistemleri de dahil olmak üzere birçok uygulamada tercih edilmektedir. Selüloz, yeryüzünde en çok bulunan polimerlerden biridir. Aynı zamanda nanolifler ve mikroküreler gibi çeşitli morfolojik selülozlar, potansiyel ilaç taşıma sistemleri olarak kullanılmaktadır (Zhao vd., 2015). Diğer iyi bilinen polimerlere benzer şekilde PLGA, 3 ila 5 nm genişliğinde ve 0,05 ila 0,5 mm uzunluğundaki nanokristal selüloz ile modifiye edilebilir, kontrollü ilaç salımı ve terapötik müdahaleler için kopolimer sistemlere dahil edilebilirler. Ek olarak nötr PEG, uzun sirkülasyon, sulu ortamda yüksek çözünürlük, toksik olmama, immünojenik olmama ve biyouyumluluk avantajlarına sahip olduğu için ilaç dağıtımında yaygın olarak kullanılmaktadır. PEGilasyon, kanser tedavisi için uygun farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri kopolimer sistemlerine dahil etmek için popüler bir stratejiydi (Tian vd., 2017).

1.2.4. Kopolimerler

Hibrit polimerler genellikle, bireysel özellikleri birleştirmek için polimerizasyon yoluyla tekrarlanan birimlerde kovalent olarak bağlanan iki veya daha fazla polimerden elde edilirler. Kopolimer monomer birimleri, istatistiksel veya rastgele, dönüşümlü, blok ve graft kopolimerler olarak farklı şekillerde oluşmuş kovalent bağ yapılarına göre adlandırılabilirler (Şekil 5). Örneğin, iki bloklu kopolimerler iki ayrı homopolimer bloğa sahiptir; triblok kopolimerler üç ayrı homopolimer bloğa sahiptir. Blok polimer sistemleri, literatürde ağırlıklı olarak iki blok, üç blok veya çoklu blok şeklinde yer almaktadır. Blok kopolimerler, tek tek polimerlerin istenen ve uygun özelliklere sahip polimerizasyonundan sonra elde edilirler. Blok kopolimer, nanopartiküller oluşturmak veya tümör hedefleme özelliklerine sahip olmak gibi yeni işlevler veya özellikler eklemek amacıyla modifiye edilebilirler. Orijinal polimer özelliklerini taklit etme yeteneklerinden dolayı, blok kopolimerler genellikle amfifiliktir ve hidrofilik ve hidrofobik bölümleri arasında büyük çözünürlük farklılıkları vardır (Opanasopit vd., 2004).



Şekil 5. Farklı kopolimer bağlantılarının bir özeti.

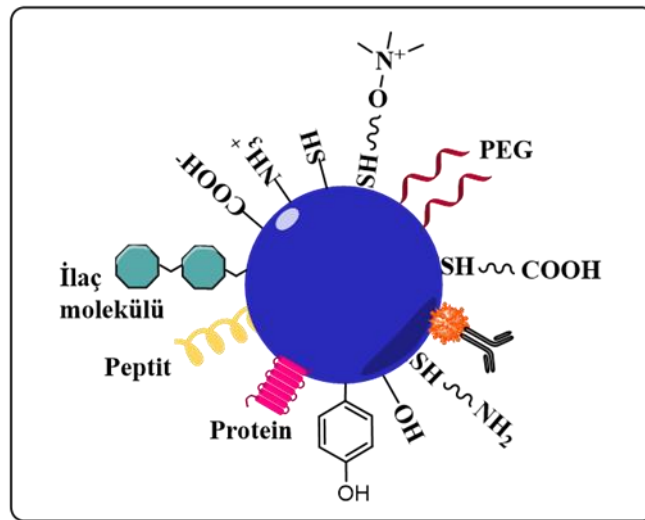
1.3. Polimer Taşıyıcı Yapılar

İlaç dağıtım sistemlerinde kullanılan potansiyel kemoterapötik ajanlar, hem normal hem de tümör hücrelerinde spesifik olmayan bir şekilde dağılmaya meyillidir. Geleneksel kemoterapinin yan etkileri, genellikle kemoterapötiklerin normal hücrelerde ve dokularda

istenmeyen birikimlerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, tümöre özgü hedefleme, yan etkileri önlemek ve kemoterapötik ilaçların genel terapötik indeksini iyileştirmek için kritik öneme sahiptir. Polimer temelli terapötikler tarafından daha derinlemesine hedeflenen tümör hücresi organelini hedefleyen tümör dokusu, normal hücrelerde ve dokularda istenmeyen birikim ve tümör bölgelerinde düşük alım etkinliği açısından geleneksel kemoterapötik ajanların üstesinden gelmek için umut verici bir yöntemdir (Rajan vd., 2022).

1.3.1. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, genellikle 100-500 nm aralığında üretilmesine rağmen, yaklaşık 5-10 nm ile 1000 nm üst boyut sınırı arasında olan koloidal sistemler olarak tanımlanabilir. "Polimerik nanopartiküller" terimi, her tür polimer temelli nano-boyutlu partikül için kullanılan, ancak özellikle polimer nanoküreler ve nanokapsüller için kullanılan genel bir terimdir. Polimerik nanoküreler matrisel parçacıklardır, yani kütlesi tamamen katı olan parçacıklardır (Abasian vd., 2020). Ayrıca küre yüzeyinde adsorbe edilebilen veya partiküllerin içerisine kapsüllenebilen diğer biyolojik olarak aktif moleküller için taşıyıcı görevi görebilirler. Burada biyolojik olarak aktif malzemeler arasında ilaçlar, genler, nükleik asitler, flüoresan ve diğer fonksiyonel malzemeler bulunur (Şekil 6). Polimer nanokürelerin aksine, polimer nanokapsüller, biyoaktif maddelerin sulu bir çekirdeğe hapsedildiği ve etraflarındaki polimerik kabukla çevrelendiği veziküler sistemlerdir (Sahu vd., 2021; Prasanna vd., 2021).



Şekil 6. Polimerik nanopartiküllerin fonksiyonel malzemeler ile yüzey işlevselleştirilmesi.

Aktif taşıyıcı sistemler olarak polimerik nanopartiküller, yüksek ilaç kapsülleme verimliliği, diğer partikül ilaç salım sistemlerinden daha yüksek hücre içi alım, kapsülleyici aktif maddelerin daha yüksek stabilitesi ve biyoyumlu veya biyolojik olarak parçalanabilen biyopolimerlerden hazırlandığında doku ve hücrelerle biyoyumluluğu içermesi gibi avantajlara sahiptirler. Ayrıca, polimerik nanopartiküller, ilacı hedef bölgeye etkili bir şekilde iletmek ve böylece yan etkileri en aza indirerek terapötik sonuçları artırmak için tasarlanabilir. Olağanüstü bir ilaç dağıtım sistemi olarak, polimerik nanopartiküller oldukça çeşitli yapılarda üretilebilirler (Castro, Costa ve Campos 2022).

Polimerik nanopartiküllerin dezavantajları arasında olası biyolojik olarak parçalanamama, kırılabilirlik, daha yüksek üretim maliyetleri yer alabilir. Tanı, terapötik tedavi veya farklı klinik uygulamalarda görüntüleme ve tedavinin bir kombinasyonu için polimerik nanopartiküllerin tasarlanması ve uygulanmasıyla ilgili temel ilkelerin daha iyi anlaşılması gereklidir. Biyoyumluluk, farmakokinetik, *in vivo* hedefleme etkinliği ve maliyet etkinliği gibi birçok faktörün, ilaç salımının moleküler görüntülemesi için gelişmiş polimerik nanopartikülleri tasarlamak üzere optimize edilmesi gerekir. Her şeyden önce, polimer nanopartiküllerin potansiyel toksisitesini en aza indirmek kritik derecede önemlidir. Polimerik nanopartiküller ile terapötik ilaç taşıyıcı potansiyelini doğrulamak için, polimer nanopartiküllerden kaynaklanan *in vitro* sitotoksikite dikkatle incelenmelidir (Sultana vd., 2022).

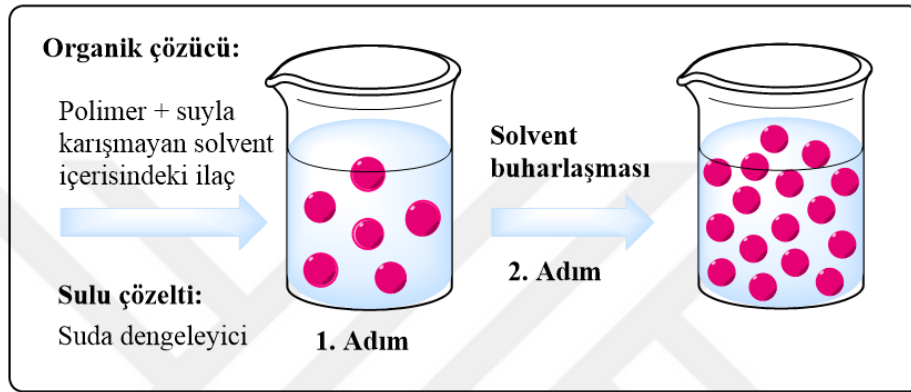
Polimer nanopartiküller, önceden oluşturulmuş polimerlerin dispersiyonundan veya klasik polimerizasyon kullanılarak monomerlerin doğrudan polimerizasyonundan uygun şekilde hazırlanabilir. Benzer şekilde literatürde polimerik nanopartiküllerin birçok üretim yöntemi mevcuttur. Bunlardan birkaçı aşağıda verilmiştir (Lu vd., 2011).

1.3.2. Polimerik Nanopartiküllerin Bazı Üretim Yöntemleri

Solvent Buharlaştırma Yöntemi

Polimer önce diklorometan, kloroform veya etil asetat gibi bir organik çözücü içinde çözülerek bir çözelti haline getirilirken, ilaç bu önceden oluşturulmuş polimer çözeltisi içinde çözülür veya dağıtılır. İki faz, dioktil sodyum sülfosüksinat, polisorb-80, poloksamer-188, vb. gibi sürfaktan/emülsifiye edici maddeler kullanılarak su içinde yağ (Y)

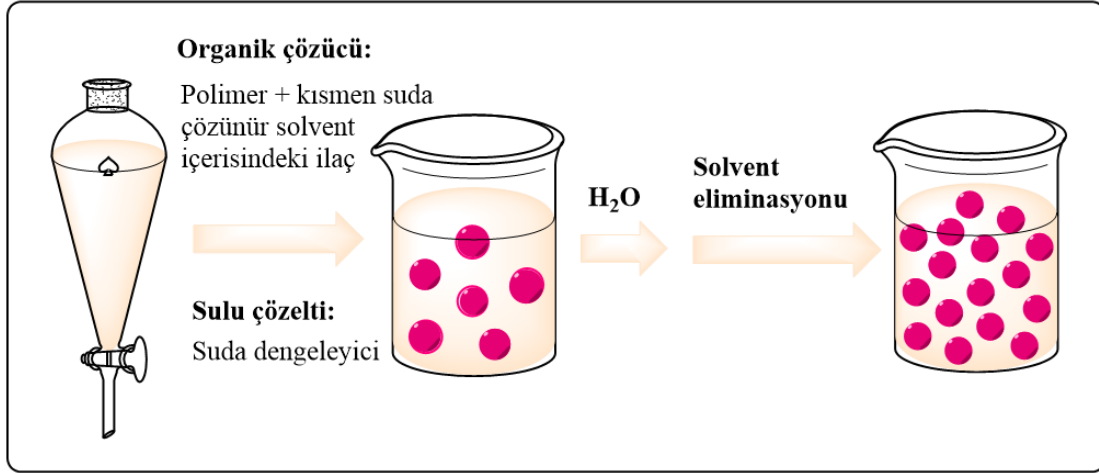
(S) emülsiyonu yapmak için emülsifiye edilir. Belirli bir süre sürekli karıştırarak, kararlı emülsiyon oluşur ve artık organik çözücü, sistem sıcaklığının artırılmasıyla/basınç altında veya bir süre sürekli karıştırılarak buharlaştırılabilir (Şekil 7). Daha sonra katılan polimerik nanoparçacıklar, ultrasantrifüjleme ile toplanabilir ve yüzey aktif maddeler veya artık katkı maddeleri gibi safsızlıkları gidermek için damıtılmış su ile yıkanabilir. Son olarak, ürün liyofilize edilir ve kullanımdan önce saklanır (Quintanar-guerrero vd., 2008).



Şekil 7. Solvent buharlaştırma yöntemi.

Emülsifikasyon–Solvent Difüzyon Yöntemi

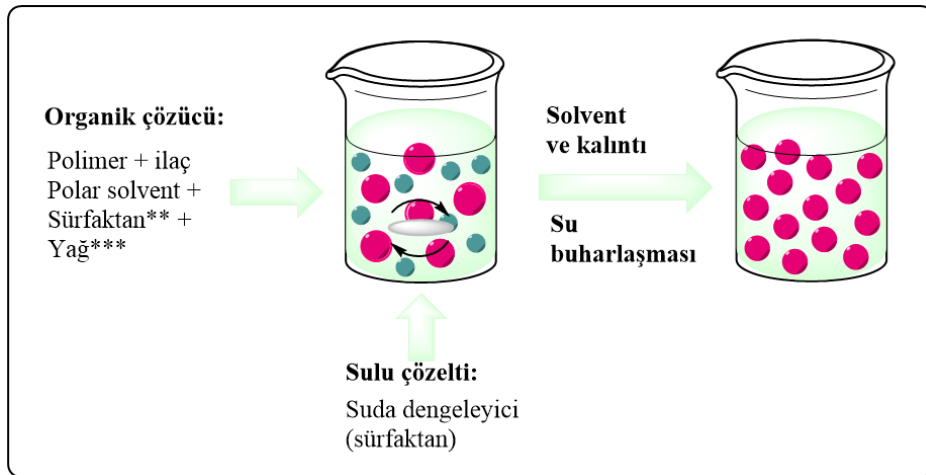
Emülsifikasyon-solvent difüzyon tekniği (Şekil 8), polimerik nanoparçacık üretmek için geliştirilmiş bir diğer yöntemdir. Kapsülleyici polimer önce suyla doymuş propilen karbonat gibi kısmen suda çözünür bir çözücü içinde çözülür. Polimer çökmesini ve ortaya çıkan nanopartikülleri üretmek için, dağılmış fazın çözücüsü, fazla suyla veya başka bir organik çözücüyle seyreltilir. Daha sonra, polimer-su-doymuş çözücü fazı, bir stabilizatör içeren sulu bir çözelti içinde emülsifiye edilir, bu da çözücünün dış faza difüzyonuna ve nanokürelerin veya nanokapsüllerin oluşumuna yol açar. Çözücü buharlaştırma ile elimine edilir. Bu teknik, lipofilik ilaçlar için yüksek kapsülleme etkinlikleri, tekrar üretilebilirlik, kolay ölçeklendirme, basitlik ve dar boyut dağılımı dahil olmak üzere çeşitli avantajlara sahiptir. Dezavantajları, süspansiyondan uzaklaştırılacak büyük miktarda su ve emülsifikasyon sırasında suda çözünen ilacın doymuş-sulu dış faza sızması ve kapsülleme verimliliğinin azalmasıdır (Reis ve Neufeld 2006).



Şekil 8. Emülsifikasyon–solvent difüzyon yöntemi.

Çözücü Yer Değiştirme Yöntemi

Çözücü yer değiştirme yönteminin temel prensibi, bir polimerin organik bir çözücü veya tuzlar tarafından ara yüzeyde biriktirilmesine dayanır. Çözücünün çözücü olmayan bir faza hızlı difüzyonu, yüzey alanını artırabilen ve nano boyutlu parçacıkların oluşumuna yol açabilen iki faz arasındaki arayüz geriliminin azalmasına neden olur (Şekil 9). Bu yöntem, PLA, PLGA, PCL ve benzeri gibi polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.



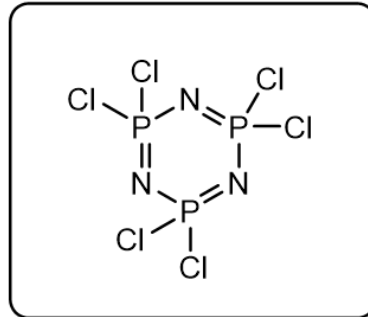
Şekil 9. Çözücü yer değiştirme yöntemi.

Monomer Polimerizasyonu

Monomer polimerizasyonu, su, suda düşük çözünürlüğe sahip bir monomer, suda çözünür başlatıcı ve bir yüzey aktif madde bileşenlerini kullanır. Polimerizasyona devam etmek için belirli bir sıcaklıkta uzun süre karıştırılırlar. Reaksiyonun sonunda, tipik olarak 10-150 nm boyutunda polimerik nanopartiküller elde edilir ve uzun alifatik zincirleri ya polimer ağına dolandıkça ya da yan reaksiyonlarla polimere aşılandıklarından, genellikle polimer parçacıkları içinde radikallerle bir miktar sürfaktan hapsolarak oluşturulur. Bu nedenle yüzeyleri stabilize edilirler. Yüzey aktif maddelerin uzaklaştırılması, üretim maliyetini artıran zor ve zaman alan bir işlemdir. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için de kullanılan ara yüzey polimerizasyonu, sırasıyla iki fazda (yani, sürekli ve dağılmış faz) çözünen iki reaktif monomerin veya maddenin işlem polimerizasyonunu içerir. Reaksiyon iki sıvının arayüzünde gerçekleşir. Saflaştırma işlemine gerek yoktur ve bu yöntem sayesinde yüksek ilaç kapsülleme verimliliğine ulaşılabilir. Organik çözücü, toksisiteye sahip olabilecek bir dış fazdır. İnsülin, kalsitonin, oktreotid, darodipin, indometasin ve ışıkla aktive olabilen sitotoksik bileşikler içeren ilaçlar, bu polimerizasyon işlemiyle oluşturulan bu nanopartiküllerde verimli bir şekilde kapsüllenebilir (F. Zhang, Fan ve Wang 2020; Khanna ve Speiser 1969).

1.4. Halkalı ve Polifosfazenler

Fosfazenler, yapılarında binlerce -P=N- parçası içeren polimerlere kadar üç veya dört birimli düşük moleküler ağırlıklı halkalı yapılara yol açan -P=N- tekrar eden birimlerin varlığıyla karakterize edilen çok yönlü kimyasal substratlardır. Yapılarındaki P atomu iki klor atomu taşır. Halkalı yapıdaki heksaklorosiklotrifosfazenin kimyasal yapısı Şekil 10'daki gibidir (Ozsoy ve Ozay 2023).



Şekil 10. Hekzaklorosiklotrifosfazenin (HCCP) kimyasal yapısı.

Endüstriyel uygulamalar açısından fosfazenlerin kimyası ve özellikleri, Allcock ve arkadaşları tarafından 1964–1965'te literatüre sunulan bir dizi kitap ve makalelerde gözden geçirilmiştir. İlk olarak HCCP'nin termal kaynaklı halka açılması yoluyla doğrusal poli(organo)fosfazenlerin sentezini ve ardından çok çeşitli yeni türevler elde etmek için klor atomlarının uygun fonksiyonel gruplarla ikame reaksiyonu sonucunda elde edildiği bildirildi (Ahmad vd., 2022).

Fosfazenlere yönelik bilimsel ve uygulamalı ilgi, klor atomlarının çok çeşitli sübstitüentlerle nispeten kolay bir şekilde ikame edilmesinden kaynaklanmaktadır. Bu sayede özellikleri prensip olarak maddenin doğasına dayalı olarak tasarlanabilen son derece geniş sayıda yeni malzemelerin ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır.

Azotun sinerjistik etkisi ile organik maddeler yanıcı özellik gösterir. Bu nedenle, -P=N- omurgası yanıcı olmamakla birlikte, aynı zamanda muhtemelen hem serbest radikal işlemlerinin kesintiye uğraması hem de oksijen girişine şişen bir bariyer oluşması nedeniyle, onunla temas halinde olan diğer bileşiklerin yanmasını da engeller. Ayrıca, fosfazenler P-N bağının doğası gereği, omurganın son derece düşük bir burulma bariyerine sahip olmasına neden olur. Böylece bazı polifosfazenlerin -100 °C bölgesindeki camsı geçiş sıcaklıklarını gösterir (Casella vd., 2022).

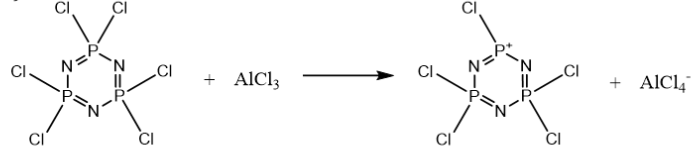
1.4.1. Sentez Yöntemleri

Polifosfazenler normalde iki ana hammaddeden sentezlenir. Bunlar termal halka açma polimerizasyonunda kullanılan heksaklorosiklotrifosfazen ($N_3P_3Cl_6$) ve canlı katyonik polimerizasyonda kullanılan fosforanimindir ($Cl_3P=NSiMe_3$). Hangi başlangıç materyali kullanılırsa kullanılsın bu iki işlemle hazırlanan tüm polifosfazenlerin ara aşamasında polidiklorofosfazen meydana gelir. Çapraz bağlı olmayan polidiklorofosfazenin sentezi, polifosfazenlerin verimli bir şekilde hazırlanması için önemli bir noktadır. Polidiklorofosfazenin nem veya havanın (çoğunlukla su buharı) varlığı nedeniyle çapraz bağlanması, herhangi bir çözücünde şişmeye ve çözünürlük sorunlarına neden olabilir (Ullah vd., 2017).

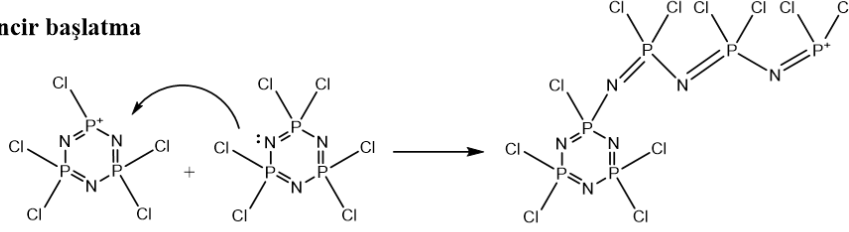
Termal Halka Açma Polimerizasyonu

Polifosfazenleri sentezlemek için en yaygın kullanılan yol, polidiklorofosfazen'i sentezlemek için heksaklorosiklotrifosfazenin (HCCP) halka açma işlemi için yaygın olarak kullanılan termal halka açma polimerizasyonudur (Şekil 11). Stokes, 1897'de bu yöntemi kullanmanın öncüsüydü, ancak sentezlediği polidiklorofosfazen çapraz bağlıydı ve herhangi bir çözücü içinde çözülemezdi. Bu süreç, 1965'te Allcock ve arkadaşlarının çeşitli organik çözücülerde iyi çözünürlük gösteren çapraz bağlanmamış polidiklorofosfazen'i başarıyla sentezlemesiyle dikkat çekti. Bu proses, doğrusal zincirli polidiklorofosfazen üretmek için HCCP'nin vakum altında ve uygun bir katalizör varlığında yüksek sıcaklıkta ısıtılmasını içerir. Her fosforda bulunan iki klor atomu oldukça reaktiftir ve çeşitli polifosfazenleri sentezlemek için uygun nükleofilik gruplarla kolayca değiştirilebilir. Isıtma sıcaklığı 300 °C'ye yükseltirse, polidiklorofosfazen daha fazla kullanılmayan çapraz bağlı inorganik "kauçuğa" dönüştürülür. Bu işlem, yüksek moleküler ağırlıklı polifosfazenler verebilir, ancak monomerin saflığının yanı sıra nem ve havaya karşı oldukça hassastır. Böylece reaksiyon yüksek vakum altında ilerler ve HCCP kullanımdan önce yeniden kristalleştirilir ve süblimleştirilir (Rotheund ve Teasdale 2016).

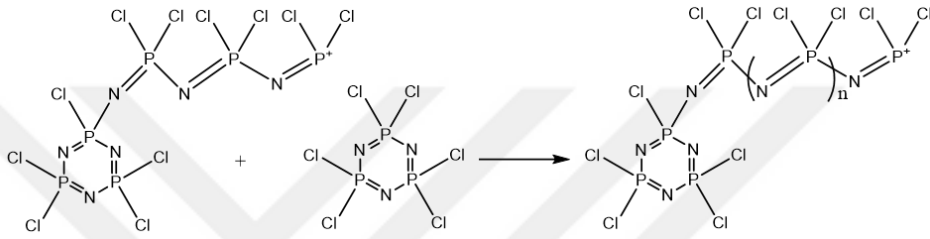
1) Başlatıcı oluşumu



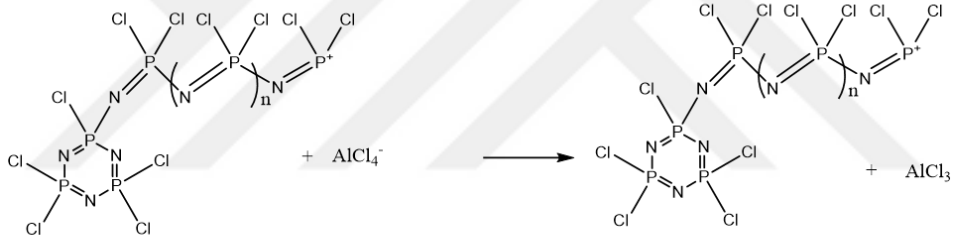
2) Zincir başlatma



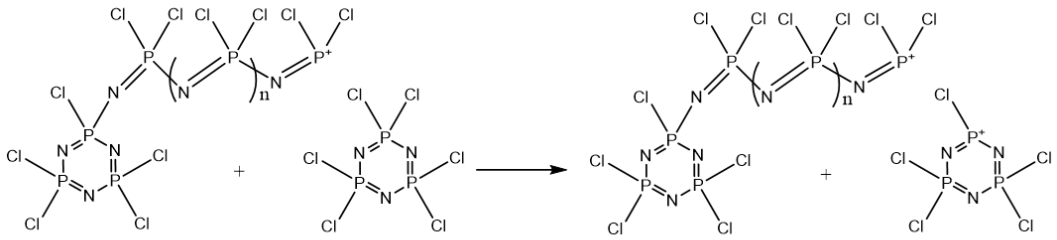
3) Yayılma



4) Zincir sonlandırma



4.1) Katalizör ile sonlandırma



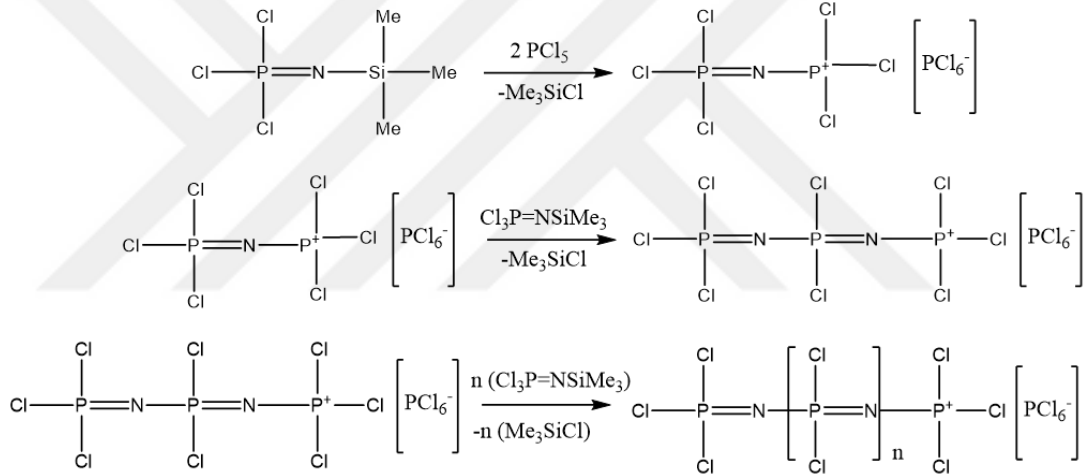
4.2) Monomer ile sonlandırma

Şekil 11. Halka açma polimerizasyonunun reaksiyon mekanizması.

Canlı Katyonik Polimerizasyon

Polifosfazenler, yüksek sıcaklık, yani canlı katyonik polimerizasyon kullanımını içermeyen alternatif bir yöntemle sentezlenebilir (Şekil 12). Allcock ve arkadaşları 1995 yılında PCl_5 'i başlatıcı olarak kullanarak başka bir monomer olan trikloro-(trimetilsilil)-

fosfoarnimin'den ($\text{Cl}_3\text{P}=\text{NSiMe}_3$) polifosfazen sentezlemeyi başardılar. Bu işlem çoğunlukla, polifosfazen blok kopolimerleri dahil olmak üzere çok çeşitli polimerlerin sentezi için uygundur. Bu tür polimerlerin örnekleri arasında polifosfazen-blok-polifosfazen kopolimerleri, poli(etilen oksit)-blok-polifosfazen kopolimerleri ve polistiren-blok-polifosfazen kopolimerleri yer alır. Benzer şekilde, ortam sıcaklığı koşulları kullanılarak üç bloklu kopolimerler ve üç kollu, yıldız şekilli ve telekolik polifosfazenler gibi başka yapılar da tasarlanmıştır. Halka açma polimerizasyonuna benzer şekilde, sentezlenen polimerlerin özellikleri moleküler ağırlığa ve yan grupların doğasına bağlıdır. Bu yöntemin bir diğer önemli avantajı, moleküler ağırlık kontrolü ve dar polidispersitedir (Y. Zhang, Huynh ve Reed 2008).



Şekil 12. Canlı katyonik polimerizasyon mekanizması.

1.4.2. Biyomedikal Uygulamaları

Son yıllarda, farklı uygulamalar göz önünde bulundurularak biyomalzemeler olarak trimerik veya polimerik çok çeşitli yeni fosfazen sistemleri geliştirilmiştir (Ogueri vd., 2021). Biyomedikal uygulamalarda kullanılacak malzemelerin, bozunma ürünlerinin yanı sıra biyouyumlu yani toksik olmaması gerekir. Ayrıca hem malzemeler hem de bunların bozunma ürünleri ayrıca bir enflamatuar, kanserojen, pirojenik veya alerjik tepkiye neden olmamalıdır. Birçok polifosfazenin bozunma ürünleri bir tamponlama sistemi (amonyum fosfat) oluşturur ve bozunma yoluyla nötr bir pH sağlar. Polifosfazenlerin diğer polimerlere göre en önemli avantajı, özel uygulamalar için biyomateryaller tasarlamak amacıyla belirli

kimyasal-fiziksel ve biyolojik davranışa sahip yan grupları tanıtmaya olasıdır. Florlu zincirler, yüzey modifikasyonları için uygun materyallerin ortaya çıkmasına neden olarak hidrofobikliği artırır ve antimikrobiyal özellikleri ve biyolojik inertlikleri nedeniyle dış astar materyalleri olarak onaylanmıştır. Amino asit esterlerinin eklenmesi, polimerlerin bozunmasını iyileştirir: omurga bozunması toksik olmayan ürünlere (fosfat ve amonyak) yol açar ve zincir boyunca kalıntı klor atomlarının ve hidroksil gruplarının varlığından önemli ölçüde etkilenebilir. Hidrolitik olarak kararsız yan gruplar: sterik engellemelerinin hidroliz oranını değiştirebildiği gözlemlenerek, yine kombinasyon halinde bir dizi amino asit esteri dahil edilmiştir. Materyaller ilaç verme, doku mühendisliği veya kardiyovasküler veya safra kanalı stentleri için şekil hafızalı polimerler için kullanılabilir.

N atomu veya O atomu üzerinden bağlı yan gruplara sahip polimerlerde bozunma hızlarının farklı olduğu gözlenmiştir. Polimer omurgasına ya amino ya da fenolik parça ile bağlanabilen tirozin durumunda, yalnızca polifosfazen taşıyan N-tirozin yan grupları biyolojik olarak parçalanabilirken, fenolik grup polimerleri parçalanamaz ancak pH'a duyarlı hale getirir. Bazı suda çözünür polifosfazenlerin (amino asit ester birimleri veya pirrolidinil veya karboksilatofenoksi parçaları taşıyan) bozunma hızı, pH'ın bir fonksiyonu olarak incelenmiş ve daha düşük pH değerlerinde önemli ölçüde daha hızlı bozunma gözlenmiştir. Hidrolitik stabilite, amino asit aralayıcının dikkatli seçimi ile uyarlanabilir ve polimerik omurganın sterik korunması ile artırılabilir (Amin vd., 2017).

İşlevselliklerin fosfazen asılı gruplara dahil edilmesi, istenen türler için afiniteyi artırabilen spesifik moleküllerin sisteme bağlanmasına izin verir. Bir örnek aminoetoksietanol olabilir: Oksijen atomu P'ye bağlanabilir ve amino birimi örneğin galaktoz veya polietilen glikol kısımlarını bağlamak için kullanılabilir, bu da DNA ile etkileşime girebilen materyallere yol açar. Doku mühendisliği uygulamalarına gelince, diğer özellikler araştırılmalıdır:

(i) Fizyolojik sıcaklık ile karşılaştırıldığında cam geçiş sıcaklığı: kemik dokusu mühendisliğinde olduğu gibi, *in vivo* ortamda yapısal bütünlüğü korumak için fizyolojik sıcaklıktan daha yüksek bir cam geçiş sıcaklığı gereklidir (Subash, Basanth ve Kandasubramanian 2022);

(ii) Mekanik özellikler: sübstitüentler, poliorganofosfazenlerin mekanik özelliklerini (basınç ve gerilme mukavemetleri) ve doğal dokularinkileri eşleştirmek için seçilmelidir;

(iii) Biyomalzemelerin gözenekliliği ve gözenekli birbirine bağlanabilirliği, kontrollü parçalanabilirlikleri nedeniyle ilaç salım uygulamalarında veya hücre çoğalması için malzeme iskeleleri olarak eskiyen doku mühendisliğinde önemli bir rol oynar (Chernysheva vd., 2023);

(iv) Uyarılara duyarlı alan davranışı: sıcaklık, ultrason, ışık, pH, iyonik güç, oksidatif koşullar ve enzim varlığı, biyomedikal uygulamalar için önemli uyarılardır. Farklı yan grupların kombinasyonlarından özellikleri ayarlama olasılığı nedeniyle, doku mühendisliği ve ilaç dağıtımı için çeşitli uyarılara yanıt veren materyaller hazırlanmıştır (Xu vd., 2020).

Oldukça yakın tarihli bir incelemede, poliorganofosfazenerde inorganik bir omurganın ve çok çeşitli organik (veya organometalik) yan grupların faydalarını birleştirme fırsatı, parçacıkları kapsüllemek için siklomatriks polifosfazenerin kullanımı gibi gelecekteki biyouygulamalar için değerlendirilmiştir (Ahmad vd., 2022).

1.5. İlaç Salım Sistemleri için Kinetik Modeller

İlaç taşıyıcı sistemlerden ilacın salınması, özellikle modifiye salım söz konusu olduğunda ve doğrudan salımlı dozaj formlarında önemli rol oynar. İlaçların fizikokimyasal özellikleri, eksipiyenler (yardımcı maddeler), dozaj formu tasarımı, üretim süreci değişkenleri ve tasarım, ilacın dozaj formundan salımını etkiler. Dozaj formunun etkinliğini yönettiği için ilacın dozaj formundan salım modelini incelemek gerekir (Ozsoy ve Ozay 2023). İlaç salım modelinin anlaşılmasını kolaylaştırarak etkili bir formülasyon tasarlamayı mümkün kılan kinetik modellerden birkaçı aşağıda verilmiştir.

İlk olarak Zero-order model salım matrisinde ortama salınan ilaç konsantrasyonu ilacın çözünürlüğünden bağımsızdır (1.1).

$$Q_t = Q_0 + K_0t \quad (1.1)$$

burada Q_t , t zamanında çözünen ilaç miktarı, Q_0 , çözeltideki başlangıç ilaç miktarını ve K_0 , kinetik sabitini ifade etmektedir.

First-order model, salım sistemi için konsantrasyona bağlı ilaç salım profilleri için tercih edilmektedir (1.2).

$$\log C = \log C_0 + (K/2.203t) \quad (1.2)$$

burada C, C₀, K sırasıyla ilaç konsantrasyonunu, ilacın başlangıç konsantrasyonunu ve birinci dereceden hız zaman sabitini ifade etmektedir.

Higuchi modeli, genellikle polimerik matrislerin ilaç salım davranışlarını ifade etmek için kullanılır (1.3).

$$f_t = K_H t^{1/2} \quad (1.3)$$

burada K_H, Higuchi kinetik salım katsayısıdır.

Kormeyer-Peppas modeli, polimerik bir matristen ilaç salım profilini araştırmak için tercih edilmektedir (H. Ozay, Ilgin, et vd., 2020) (1.4).

$$M_t/M_\infty = at^n \quad (1.4)$$

burada M_t/M_∞, t zamanında salınan ilacın fraksiyonu, a salım hız sabiti ve n salım üs ifadesidir.

Hixson-Crowell modeli, bazı ilaç salım çalışmalarında sisteme bağlı olarak ilaç salım matrisinin çapı ve yüzey alanı zamana bağlı olarak değişebilir. Bu durumlarda Hixson-Crowell modeli kullanıma uygundur (1.5).

$$Q_t^{1/3} = Q_0^{1/3} + kt \quad (1.5)$$

burada k serbest salım kinetik sabitidir (Blagoeva ve Nedev 2006; England vd., 2015).

Ek olarak ilaç salım sisteminin n üssü referans alınarak geometrik yapısı ve ilaç salım mekanizması hakkında yorum yapılabilir. Bunun için gerekli aralık değerleri Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Güç yasasının n üssü ve farklı geometriye sahip polimerik kontrollü salım sistemlerinden ilaç salım mekanizması.

n Değeri	Silindir	Küre	İlaç Salım Mekanizması
0,5	0,45	0,43	Fickian difüzyonu
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Anormal taşıma
1,0	0,89	0,85	Vaka-II taşıma

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Teşhis ve tedavi amacıyla geliştirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler oldukça büyük bir öneme sahiptir. Hastalar üzerinde istenmeyen yan etkilerin ortadan kaldırılması, hedef bölgeye istenilen zaman ölçeğinde ilaç salımının gerçekleştirilmesi, geliştirilen sistemin biyouyumlu ve biyobozunur özelliklere sahip olması ilaç taşıyıcı sistemlerden beklenen başlıca özellikler arasındadır. Bu doğrultuda günümüze kadar literatüre sunulmuş birçok ilaç taşıyıcı sistem mevcuttur. Ek olarak taşıyıcı sistemden beklenen özellikleri karşılamak amacıyla bunlar arasında polifosfazen ve türevlerini içeren ilaç taşıyıcı sistemler de oldukça ilgi görmüştür.

Hou ve arkadaşları bir yoğunlaştırma polimerizasyon yöntemi ile antikanser özelliğe sahip fosfazen nanopartiküller sentezlemişlerdir. Burada bir tür antikanser ilacı olan doxorubicin partiküllerin yapısına dahil edilip tümöre duyarlı bir molekülün kendi kendine çerçevesine dayanan, yüksek ilaç verme etkinliğine sahip yeni bir çift yanıtı ilaç kendi kendine çerçevesi bir ilaç salım sistemi geliştirilmiştir. Arica polifosfazenlerin benzersiz yapısal özelliği sayesinde, geliştirilen ilaç salım sistemi pH'a duyarlı özellikler göstermiştir. Ek olarak ilaç taşıyıcı sistemin yapısında bulunan sistein türevi ve sisteinin yapısında bulunan disülfid bağları etkisiyle geliştirilen nanopartiküller glutatyon yanıtı vermiştir ve bu sayede biyobozunur özellik kazandırılmıştır (Hou vd., 2019).

Başka bir çalışmada Zhou ve arkadaşları yapısında heksaklorotripolifosfonitrid (HCCP) ile 4-hidroksi-benzoik asit (4-hidroksibenziliden)-hidrazid ve antikanser ilacı doksorubisin bulunan aside duyarlı ve parçalanabilir polifosfazen nanoparçacıkları sentezlemişlerdir. Deneysel sonuçlar, polifosfazen nanopartiküllerin vücudun normal sıvılarında (pH ~ 7,4) stabil kaldığını, kanserde tümörler (pH ~ 6,8) ve lizozom ve endozom (~5,0) gibi asidik bir ortamda doksorubisin'in degrade ve kontrol edilebilir bir şekilde salındığını göstermiştir. Ek olarak geliştirilen polifosfazen nanoilaçları, gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi ve pH'a duyarlı bozunma özellikleri nedeniyle tümör hücrelerine karşı mükemmel toksisite gösterdi ve hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak normal hücrelere olan yan etkiyi azaltmıştır (Zhou vd., 2020).

Kanser tedavisinin etkinliğini artırma amacıyla yapılan bir çalışmada Jing ve arkadaşları bir tür antikanser ilacı olan kurkumin, bir fotodinamik ajan olarak Ce6 ve tümör

ortamına duyarlı molekülleri çapraz bağlı polifosfazene doğrudan birleştirmek ve ayrı nanopartiküller oluşturmak için süperparamanyetik Fe₃O₄ nanokümelerinin üzerinde kaplayarak manyetik bir ilaç taşıyıcı nanopartikül sistemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen taşıyıcı sistem yüksek fizyolojik stabilite ve iyi biyouyumluluk göstermiştir. Aynı zamanda Fe₃O₄ çekirdekleri ve flüoresan görüntüleme nedeniyle çift modaliteli manyetik rezonans görüntüleme için etkili bir performans sergilemiştir. Daha da önemlisi, tümör dokusundaki süpernormal glutasyon seviyeleri ve asidik mikro ortam koşulları altında, kurkumin ve Ce6, sentezlenen nanopartiküllerin bozunmasıyla etkili bir şekilde salınmıştır (Jing vd., 2019).

Khan ve arkadaşları, yan grupların farklı mol oranlarında üç farklı indirgeyici/asidik çift duyarlı polimer, poli[(mPEG-SS-amino) (N,N-diizopropiletilendiamino)fosfazenler] sentezlemişlerdir. Hidrofilik özelliğe sahip doksorubisin hidroklorür ve hidrofobik ilaç doksorubisinin sentezlenen polimerzomlara yükleme çalışmaları yapılmıştır. Fosfazen esaslı polimerzomlar, antikanser ilaçların indirgeyici/asidik uyarılara duyarlı salınımını göstermiştir. Ayrıca, bu polimerzomlar aynı zamanda uygun hidrodinamik çaplar da sergilemiştir, bu da artan geçirgenlik ve tutma etkisi nedeniyle renal klerensi ve vasküler bölümlerdeki tümör hücreleriyle yakın teması önleyerek kan dolaşımında uzun süreli dolaşımı kolaylaştırması beklenmiştir (Khan vd., 2020).

Yapılan bir çalışmada Mehmood ve arkadaşları heksaklorosiklotrifosfazen ile hesperetin reaksiyonu sonucu çapraz bağlı poli(siklotrifosfazen-ko-hesperetin) mikroküreleri sentezlemişlerdir. Sentezlenen mikrokürelere, 5-florourasil yüklenerek ilaç taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Mikrokürelere ilaç salınımını incelemek için iki farklı pH değerinde *in vitro* salım davranışı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, hem bazik hem de asidik ortamlarda ilaç salımına olanak sağlayan mikrokürelerinin kanser tedavisinde ilaç taşıyıcıları olarak kullanılabilirliğini göstermiştir (Mehmood vd., 2022).

Chernysheva ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada heksafenoksisiklotrifosfazen ve okta(tetrametilamonyum)silikat arasındaki polikondensasyon reaksiyonu yoluyla yeni gözenekli hidrolitik olarak bozunabilen çapraz bağlı polimer elde edilmiştir. Bu polimer taşıyıcı sisteme model ilaç olarak Rhodamine-6G yükleme denemesi yapılmıştır. Çalışma sonucunda hidrolitik olarak kararsız P-O-Si parçalarının varlığından dolayı, elde edilen gözenekli polimerin Rhodamine-6G'yi yükleyebildiği ve ortamın pH değerine bağlı olarak çeşitli oranlarda saldığı gösterilmiştir (Chernysheva vd., 2023).

Yapılan bir çalışmada Abid ve arkadaşları moleküler ağırlığı kontrollü 2-(2-metoksietoksi) etanol ile kloro gruplarının yer değiştirmesi ile parçalanabilir bir polifosfazen sentezlemişlerdir. Poli[bis((metoksietoksi)etoksi)fosfazen] sentezi iki adımda gerçekleştirilmiştir. Sentezin ilk adımı, halka açma polimerizasyonu ile katalizör olarak $AlCl_3$ kullanılarak heksaklorosiklotrifosfazenden polidiklorofosfazenlerin sentezini içermektedir. İkinci adımda, polidiklorofosfazen klorinleri 2(2-metoksietoksietoksi) kısmı ile ikame edilmiştir. Ek olarak sentezlenen polifosfazenin antibakteriyel aktivitesi, metisiline dirençli *Staphylococcus Aureus*'a karşı değerlendirilmiştir (Abid vd., 2021).

Khan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada heksaklorosiklotrifosfazen kullanılarak yan grupların farklı mol oranlarında üç farklı biyolojik olarak parçalanabilen polimer, poli[(etil aminobezoat) (etil glisinato) fosfazenler] sentezlenmiştir. Daha sonra sentezlenen polimerik taşıyıcılara kamptotesin, bir hidrofobik antikanser ilacı yüklenmiştir. Bu ilaç yüklü nanoparçacıklar, normal fizyolojik koşullar (pH 7,4 ve sıcaklık 37 °C) altında ilaç salım davranışları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar sentezlenen nanopartiküllerin, kanser tedavisi için etkili ilaç taşıyıcıları olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Khan, Yu, Wang, Teng, vd., 2020).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Hekzaklorosiklotrifosfazen (HCCP, %99), 1-(2-Aminoetil) piperazin (AEP), Fenolftalein (PP), 4-Amino-4H-1,2,4 triazol (ATA), Hidroklorik asit (HCl, %37) trietilamin (TEA, %99), asetonitril (%99,8), etanol (%99), aseton (%99), Torula maya tip VI ribonükleik asit (RNA), potasyum altın (III) klorür (%99,9), L-Askorbik asit, diyaliz membran Sigma-Aldrich' ten temin edildi. L-Lizin etil ester (LEE, %99) abcr Gute Chemie şirketinden temin edildi. Cimetidine, Cayman Kimyasal Şirketi'nden satın alındı. Triptik soya suyu (TSB) ve Triptik soya agarı (TSA) Merck' ten temin edildi. Model ilaç olarak Diklofenak sodyum (NaDc, %98) Acros'tan temin edilmiştir.

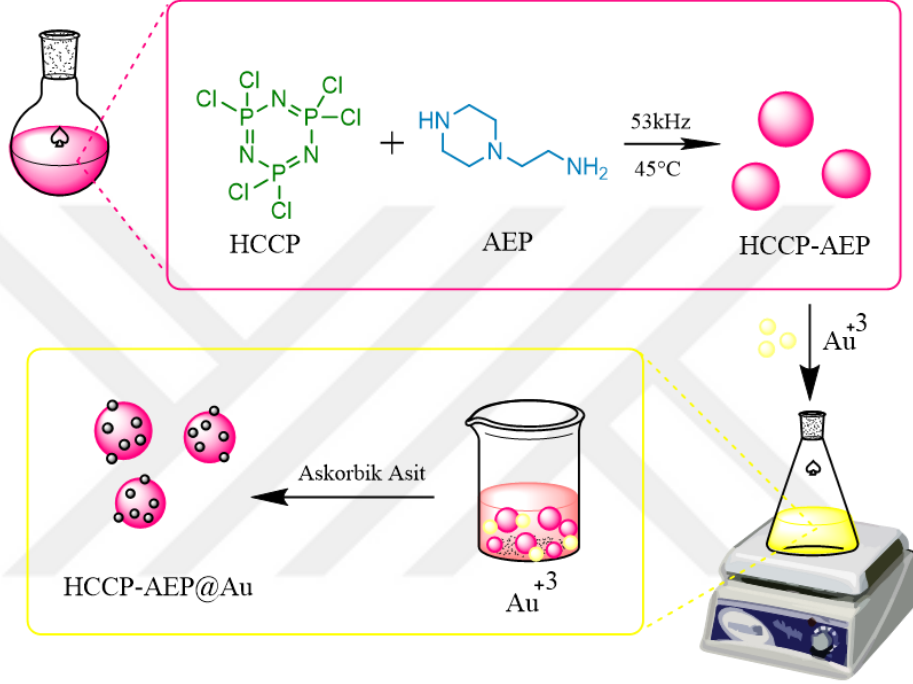
Salım çalışmaları için fosfat tampon çözeltisi (PBS) pH 7,2 olarak belirlenmiştir. PBS çözeltisi 100 mL deiyonize su içerisinde 0,806 g NaCl, 0,027 g KH₂PO₄, 0,178 g Na₂HPO₄ ve 0,020 g KCl ile hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. HCCP- AEP Nanokürelerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Nanokompozit kürelerin sentezi daha önceki çalışmalarımıza benzer şekilde gerçekleştirildi (Onder ve Ozay 2021). Hekzaklorosiklotrifosfazen (HCCP) ve 1-(2-Aminoetil) piperazin'e (AEP) göre belirlenen 3 farklı mol oranında (HCCP/ AEP; 1/3, 1/4, 1/6) 30 mL asetonitril içerisinde toplam konsantrasyon 30 mM olacak şekilde ultrasonik banyo ile çözüldü. Daha sonra çözelti içerisine 500 µL trietilamin (TEA) eklenerek 3 saat ultrasonik banyo cihazında 53 kHz ve 45 °C şartlarında nano kürelerin sentezi gerçekleştirildi. Süre sonunda bulanık ve beyaz renkte bir karışım elde edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı 6000 rpm karıştırma hızında (30 dk) santrifüj ile çöktürüldü. Oluşan çökelti 1 kez deiyonize su ile 1 kez de asetonitril ile yıkandı. Santrifüjlenen son ürün 30 °C vakumlu etüv cihazında 5 saat kurutuldu. Sentez sonucunda beyaz toz tanecikler elde edildi.

Sentezlenen nanopartiküllerin kimyasal, termal özellikleri ve morfolojileri için FT-IR (Perkin Elmer 100) ATR aparatlı spektrometre, TGA (Perkin Elmer TGA 8000) ve TEM (JEOL JEM-1400-EDX), XRD (PANalytical Empyrean, COBILTUM) cihazları kullanıldı. XPS (Thermo Scientific K-Alpha, EGE-Matal), SEM (FEI-QUANTA FEG 250, NABİLTEM) cihazları hizmet alımı olarak kullanıldı.



Şekil 13. HCCP-AEP nanokürelerin sentezi ve Au nanopartiküller ile kompozitlerinin oluşturulması.

3.2.2. HCCP-AEP Nanokürelerin Au ile Fonksiyonelleştirilmesi

Sentez sonucunda elde edilen HCCP-AEP nanokompozit küreler altın nanoparçacıklar ile fonksiyonelleştirildi. Bunun için 30 mg HCCP-AEP 100 mg/L (20 mL) Au³⁺ çözeltisi içerisinde ilave edildi. 15 dk süresince nanokürelerin altın adsorbsiyonu için beklendi. Daha sonra nanoküreler santrifüj ile çöktürüldü. Elde edilen çökeltiliye 200 mg/L (20 mL) askorbik asit çözeltisi eklendi ve 1 saat süresince Au³⁺ iyonlarının indirgenmesi için beklendi. Süre sonunda oluşan siyah-mor karışım santrifüjlendi ve ardından bir kez deiyonize su ile yıkandı. Daha sonra partiküller tamamen kuruyana kadar vakum etüvünde bekletildi.

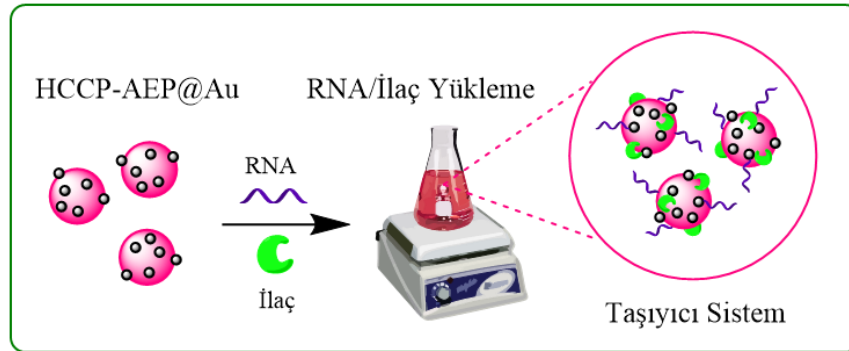
3.2.3. RNA ve İlaç Yükleme/Salımı Çalışmaları, İlaç Salımı için Kinetik Modelleme

Sentez ve fonksiyonelleştirme adımlarından sonra elde edilen HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokompozit kürelere bir tRNA çeşidi olarak torula mayası tip VI ve non-steroidal antiinflamatuvar bir ilaç olan NaDc yüklendi. İlk olarak 25 mg kuru HCCP-AEP veya HCCP-AEP@Au nanoküresi alındı. 250 mg/L (20 mL) gen (RNA) veya ilaç (NaDc) çözeltisi içerisine atıldı. Manyetik karıştırıcı ile 500 rpm (2 saat) karıştırılarak partiküllere ayrı ayrı RNA ve NaDc yüklendi. Yükleme sonrasında karışım çöktürüldü. Salım çalışması için tanecikler kurutuldu.

Sonuçta RNA-ilaç yükleme yüzdesi (DL) ve RNA-ilaç tutma verimliliği (EE) değerleri aşağıda verilen eşitlikler (Eşitlik 3.1 ve 3.2) kullanılarak hesaplandı (Ozay vd., 2020).

$$DL (\%) = (\text{Nanoküreler içindeki ilaç miktarı}) / (\text{Nanoküre miktarı}) \times 100 \quad (3.1)$$

$$EE (\%) = (\text{Toplam ilaç} - \text{Rezidual ilaç}) / \text{Toplam ilaç} \times 100 \quad (3.2)$$



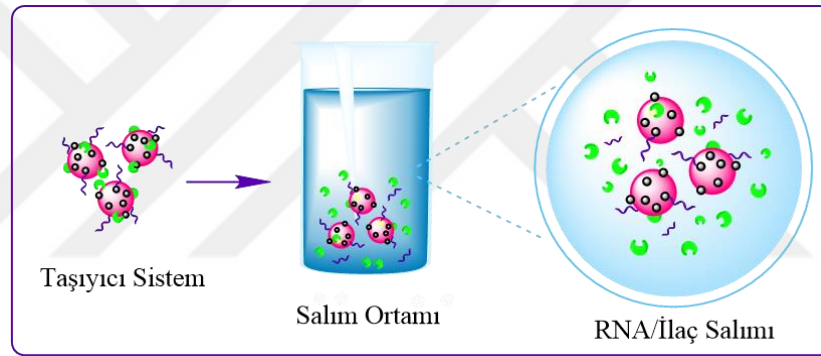
Şekil 14. Nanokürelere ait RNA/ilaç yükleme mekanizması.

Salım çalışmaları için 6 cm uzunluğunda diyaliz membran kullanıldı. 20 mg partikül 1 mL PBS ile süspansiyon halinde membran içerisine eklendi ve membranın her iki ucuda kapatıldı. Membran daha sonra 19 mL PBS içeren salım ortamına atıldı ve karıştırılmaya başlandı. Belirlenen zaman aralıklarında UV-Vis Spektrofotometre cihazı kullanılarak

numunelerin konsantrasyon ölçümleri RNA için 258 nm ve NaDc için 276 nm’de alındı. Gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümlerin ardından aşağıda verilen eşitlik kullanılarak RNA ve NaDc için salım yüzdeleri (3.3) belirlendi (İlgin, Ozay, ve Ozay 2020). Hesaplanan salım değerleri (mg/g) cinsinden ifade edildi.

$$DR (\%) = \text{Kürelerden salınan ilaç} / \text{Kürelerdeki toplam ilaç} \times 100 \quad (3.3)$$

Ölçümler boyunca salım ortamı her 12 saatte bir değiştirildi. Salım çalışmaları hem RNA hem de ilaç salımı için HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanopartiküllerde 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 15. Nanoküreler için RNA/ilaç salım gösterimi.

HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanopartiküllerin ilaç ve gen salım mekanizmalarını incelemek için *in vitro* salım modelleri beş farklı matematiksel model kullanılarak analiz edildi: Bunlar Zero-order modeli, First-order modeli, Higuchi modeli, Korsmeyer-Peppas modeli ve Hixson-Crowell.

3.2.4. Antibakteriyel ve Antifungal Davranışların İncelenmesi

Daha önceki çalışmalarımıza benzer şekilde antibakteriyel analizler kısaca şu şekilde gerçekleştirildi (Ozay, İlgin, ve Ozay 2021). İlk olarak analiz için *Escherichia Coli*, ATCC 8739 (gram-negatif) ve *Staphylococcus Aureus*, ATCC 6538 (gram-pozitif) bakteri türleri ve *Candida Albicans*, ATCC 90028 bir çeşit mantar olarak tercih edildi. Tercih edilen bakteriler

37 °C’de gece boyunca inkübe edildi. Ardından hazırlanan agar plakalar üzerine bakteri ve mantar kültürlerinin ekimleri yapıldı. Daha sonra hazırlanmış olan HCCP-AEP, HCCP-AEP@Au, HCCP-AEP@Au@RNA, HCCP-AEP@Au@NaDc boş ve yüklü küreler ilk olarak UV ortamında sterilize edildi. Bu işlemin ardından partiküller dairesel formda petri kaplarına aktarılıp bir gece inkübatör cihazında 37 °C’de bekletildi.

3.2.5. HCCP-PP-LEE Mikrokompozit Kürelerin sentezi ve Kuarternizasyon Aşamaları

Fosfazen esaslı mikrokompozit kürelerin sentezi daha önceki çalışmalarımıza benzer şekilde gerçekleştirildi (Ozsoy ve Ozay 2023). Buna göre ilk olarak HCCP (5 mM, 10 mL), PP (7,5 mM, 10 mL) ve LEE (7,5 mM, 10 mL), HCCP/PP/LEE mol oranları sırasıyla 1/1,5/1,5 olacak şekilde her bir reaktif 10 mL asetonitril içerisinde ayrı ayrı çözüldü. Daha sonra HCCP ve PP çözeltileri bir reaksiyon balonuna ilave edilerek reaksiyonu başlatıldı. Bu sırada polimerizasyon reaksiyonu sırasında açığa çıkacak olan HCl tuzlarını nötralize etmek için ortama 500 µL TEA ilave edildi ve reaksiyon karışımı 1 saat boyunca ultrasonik banyoda bekletildi. Süre sonunda 10 mL (7,5 mM) LEE çözeltisi reaksiyona eklendi. Reaksiyon 53 kHz ve 45 °C’de 5 saat devam ettirildi. Sentez işleminin sonunda elde edilen mikroküreler santrifüj ile 6000 rpm hızda (30 dk) çöktürüldü. Çöktürme işleminden sonra elde edilen tanecik formdaki çökelek sırasıyla aseton (1 x 10 mL), saf su (1 x 10 mL) ve aseton (1 x 10 mL) olmak üzere 3 kez yıkandı. Daha sonra yıkanan mikroküreler 30 °C’de vakum etüvünde kurutuldu. Mikroküreler kuarternizasyon ve karakterizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere desikatörde saklandı.

Sentez adımlarının ardından mikrokürelerin modifikasyonu için 50 mg ATA 30 mL asetonitril içerisinde çözüldü. Çözeltiye 50 mg HCCP-PP-LEEMP mikroküreleri ve 40 mM (30 mL) konsantrasyon oluşturacak miktarda 167 µL TEA ilave edildi. Reaksiyon karışımı ultrasonik banyoda 3 saat karıştırıldı. Sürenin sonunda çöktürülen mikroküreler 30 mL 0,2 M HCl çözeltisi ile 1 saat boyunca quarternize edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra partiküller santrifüjlenip etanol (1 x 10 mL) ve deiyonize saf su ile (1 x 10 mL) yıkanıp kurutuldu. Son aşamada mikrokürelerin yüzeylerinde kuarternier amonyum gruplarının oluştuğu öngörüldü.

3.2.6. Mikrokompozit Kürelerin Karakterizasyonu

Sentezlenen HCCP-PP-LEEMP ve kuarternize edilmiş HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokompozit kürelerin polimerizasyon reaksiyonu sonucu oluşan kimyasal bağları incelemek için Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FT-IR) (Perkin Elmer 100) ATR aparatlı spektrometre kullanıldı. Numunelere ait FT-IR spektrumları 4000-650 cm⁻¹ aralığında kaydedildi. Mikrokürelerin yüzey yapılarını ve morfolojilerini analiz etmek için Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, JEOL JSM-7100-F) kullanıldı. Bu amaçla karbon bant üzerine yapıştırılan mikroküreler altın ile kaplandıktan sonra SEM görüntüleri kaydedildi. Mikropartiküller ayrıca Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM, JEOL JEM-1400-EDX) kullanılarak da incelendi. Bu amaçla mikrokürelerin asetonitrildeki süspansiyonundan birkaç mikrolitre, karbon bant kaplı bakır grid üzerine damlatıldı. Asetonitrilin grid üzerinden buharlaşması sonrası TEM analizleri gerçekleştirildi. Ayrıca mikrokürelerin yüzey yüklerini ölçmek için, Zeta (ζ) Potentials Malvern Zetasizer Nano ZSP marka cihaz kullanıldı. Mikrokürelerin ısıl davranışları Termogravimetrik Analiz (TGA, Perkin Elmer TGA 8000) yöntemi kullanılarak analiz edildi. İlaç salım çalışmaları için Ultraviolet-Visible (UV-Vis) spektrofotometrisi (T80 + UV/Vis Spectrometer, PG Ins. Ltd.) kullanıldı.

3.2.7. Mikrokompozit Kürelere İlaç Yükleme ve Salım Çalışmaları, İlaç Salım Kinetik Modelleri

Sentezlenen HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere non-steroidal anti-inflamatuar ilaç olan NaDc ve bir tür antikanser ilacı olan Cimetidine yüklemesi daha önceki çalışmalarımıza benzer kısaca şu şekilde gerçekleştirildi (Ozay ve Ozay 2014). Her bir ilaç uygun çözücü olan deiyonize su içerisinde 100 mg/L konsantrasyona sahip olacak şekilde çözdürüldü. Daha sonra UV/Vis cihazı kullanılarak ilaç çözeltilerinin kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. NaDc ve Cimetidine ilaç çözeltilerinin kalibrasyon eğrilerini oluşturmak için sırasıyla $\lambda_{\max} = 276$ nm ve $\lambda_{\max} = 216$ nm dalga boyundaki karakteristik absorbans değerleri referans alındı. Kuru haldeki (20 mg) mikroküreler 20 mL ilaç çözeltisi içerisinde 24 saat manyetik karıştırıcıda (250 rpm) karıştırıldı. Ardından mikroküreler 15 dakika santrifüj ile çöktürüldü. Elde edilen

süpernatantlar stok ilaç çözeltileri ile aynı şartlarda UV/Vis cihazı ile absorbanans değerleri ölçüldü.

Mikrokürelerin *in vitro* fizikokimyasal ilaç salımlarını araştırmak için ilaç yüklü mikroküreler (20 mg) diyaliz membrane içerisine konuldu. Daha sonra pH 7,2 salım ortamı (20mL) içerisine atıldı. 37 °C’de belirlenen zaman aralıklarında UV/Vis cihazı kullanılarak ölçümler alındı.

HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-QMP mikrokürelerin *in vitro* ilaç salım davranışlarını analiz etmek için kinetik modeller kullanıldı. Bunun için mikrokürelerden salınan NaDc ve Cimetidine Zero-order, the First-order, the Higuchi, the Korsmeyer-Peppas ve the Hixson-Crowell ilaç salım kinetikleri kullanılarak modellendi (Ozay vd., 2020).

3.2.8. Antibakteriyel ve Antifungal analizler

Mikrokompozit kürelerin yeni tür bir ilaç taşıyıcı sistem olarak *in vitro* antibakteriyel analizleri yapıldı. Antibakteriyel analizler için kuyucuk metodu kullanılarak kısaca řu şekilde yapıldı (Balouiri, Sadiki, ve Ibsouda 2016). İlk olarak analiz için *Pseudomonas Aeruginosa*, ATCC 27853 (gram-negatif), *Staphylococcus Aureus*, ATCC 6538 (gram-pozitif) ve *Candida Albicans* ATCC 90028 (bir tür mantar) bakteri türleri tercih edildi. Tercih edilen bakteriler 15 mL TSB içerisinde 37 °C şartlarında bir gece inkübe edildi. Ardından uygun konsantrasyon ve hacimlerde hazırlanan TSA petriler üzerine hazırlanan bakteri kültürlerinin ekimi gerçekleştirildi. Daha sonra agar plakalar üzerinde 0,8 cm çapında kuyucuklar açıldı. Açılan kuyucuklar içerisine 100 µL DMSO içerisinde süspanse edilen 10 mg mikroküreler yerleştirildi. Petri kapları gece boyunca inkübatör cihazında 37 °C’de bekletildi. 18 saat sonunda oluşan inhibisyon bölgeleri fotoğraflandı ve etki bölgelerinin çapları ölçüldü.

3.2.9. Sitotoksosite analizleri

Mikrokompozit kürelerin hücre canlılığı üzerindeki değişen hacimlerdeki sitotoksitesini anlamak için MTT analizi yapıldı. Analiz için HT-29 kolon kanseri hücreleri tercih edildi. Hücreler, FBS %10 ve 100 U/mL penisilin ve streptomisin (PS) (Sigma) ile takviye edilmiş Dulbecco Modifiye Eagle's Medium (DMEM)/F12 (Gibco) içinde 37°C' de %5 CO₂ altında nemlendirilmiş bir inkübatörde kültürlendi (Cömert Önder vd., 2016). HCCP-PP-LEEMP, HCCP-PP-LEE-QMP ve HCCP-PP-LEE-QMP@Cimetidine mikrokompozit küreleri ile doz ve zamana karşı yapılan çalışmalarda hücreler tedavi edildi. 72 saat sonunda absorbans değerleri microplate reader tarafından 570 nm'de okundu (Thermo Scientific Multiskan GO). Hücre canlılığı grafiklerinin yüzdesi, GraphPad Prism ile elde edildi.

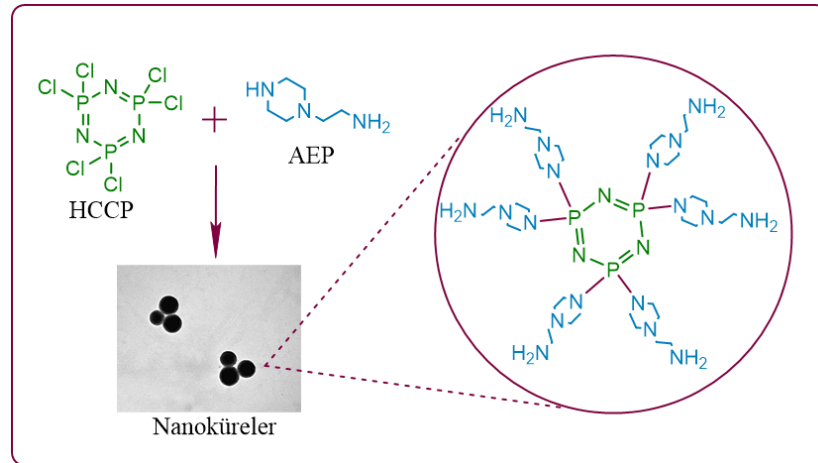
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. HCCP-AEP Nanoküreler

4.1.1. Nanokürelerin Sentezi ve Karakterizasyonu

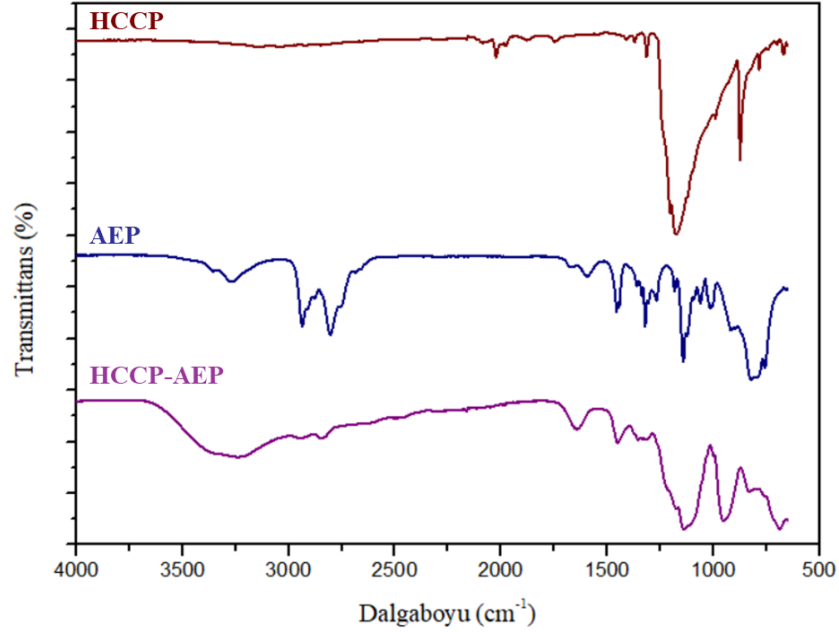
Gen ve ilaç salımında kargo materyal olarak kullanılması planlanan nanoküreler AEP ve HCCP kullanılarak polikondenzasyon yöntemi ile yaklaşık olarak 100 nm boyutunda ve küresel formda sentezlendi (Şekil 16). Nanokürelerin sentezinde HCCP ve AEP'nin farklı mol oranları (1/3), (1/4), (1/6) kullanılarak sentezlendi. Her bir mol oranında sentezlenmiş nanoküreler TEM analizi ile boyut ve şekilsel olarak incelendi. Daha düşük boyutlu olan ve küresel formda olan HCCP:AEP (1/3) oranlarında sentezlenmiş nanoküreler gen ve ilaç salımı amacıyla seçildi. Sentez esnasında açığa çıkan HCl tuzları TEA kullanılarak nötralize edilerek yıkama ile ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra seçilen mol oranındaki (1/3) nanoküreler Au ile modifiye edilerek HCCP@Au kompozit nanoküreler elde edildi. Sentezlenen HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au partiküller ilk olarak vakum etüvünde tamamen kurutulduktan sonra FT-IR, TEM, SEM-EDX, XRD, TGA ve XPS yöntemleri kullanılarak analiz edildi.



Şekil 16. HCCP-AEP nanokürelerinin sentezinin şematik gösterimi.

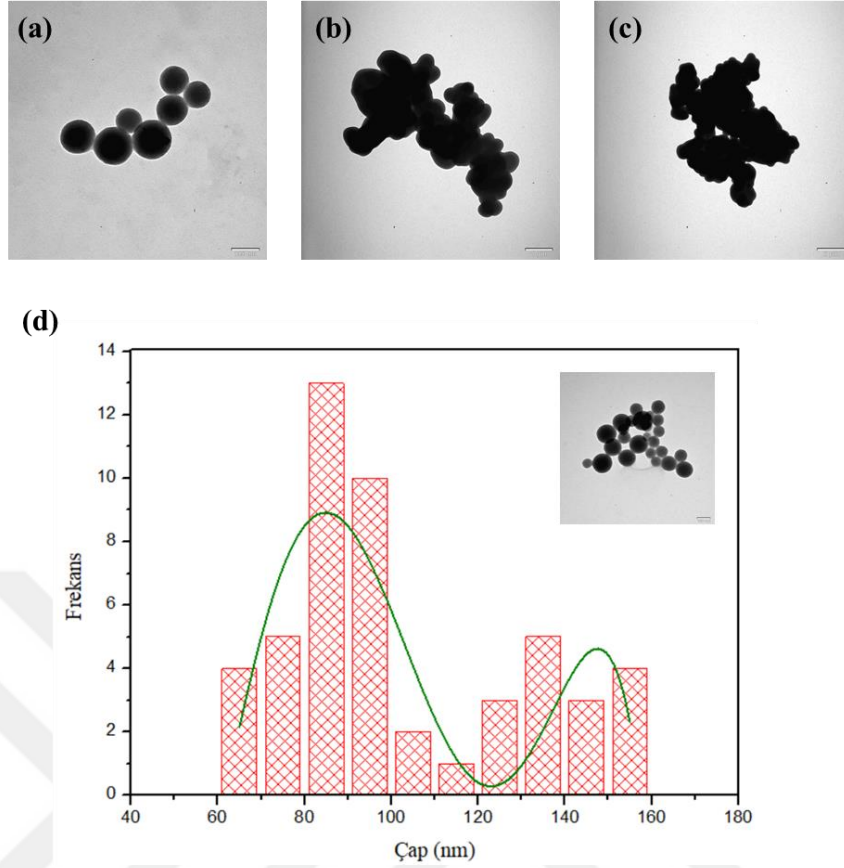
HCCP-AEP nanokürelerin FT-IR spektrumları Şekil 17'deki gibidir. Şekilde görülüğü üzere HCCP-AEP nanokürelerin AEP temelli NH gerilme $3233,20\text{ cm}^{-1}$ ve NH

eğilme bantları $1645,84 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi (H. Ozay, Ilgin ve Ozay 2021). Ek olarak PN bandı $1139,15 \text{ cm}^{-1}$ ve P-Cl bandı $873,86 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlendi (H. Ozay, Ilgin vd., 2020). Bu veriler nanokürelerin yapısında hem fosfazene hemde aminin katıldığını doğrulamaktadır.



Şekil 17. HCCP-AEP nanokürelere ait FT-IR spektrumları.

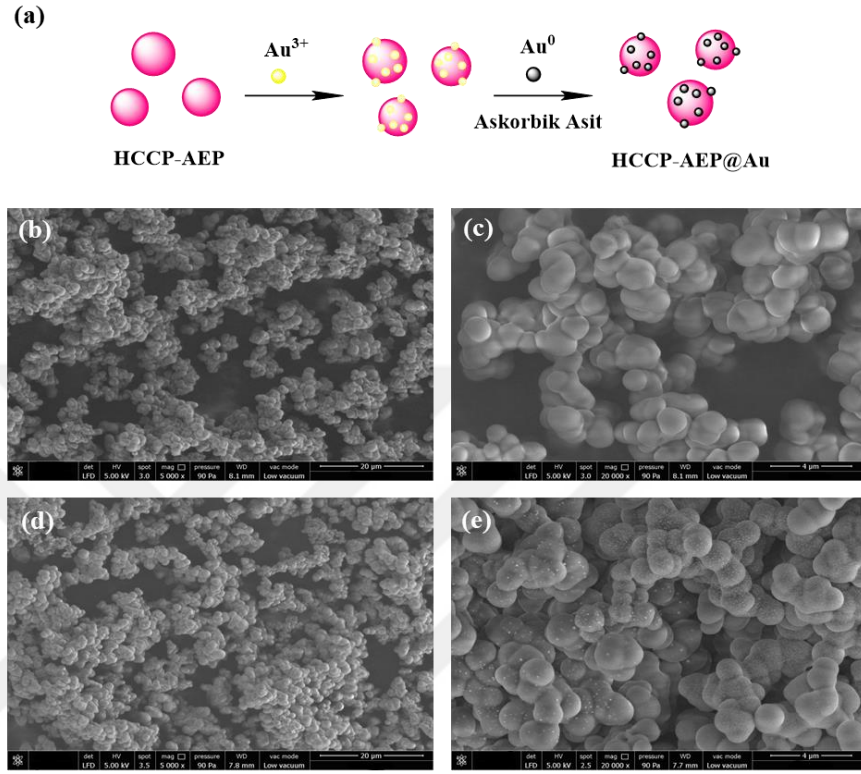
Molce farklı oranlarda sentezlenen HCCP-AEP nanokürelerin TEM görüntüleri Şekil 18'de verilmiştir. Şekil 18 (a) molce (1/3) oranında HCCP-AEP kürelerini göstermektedir. TEM mikrogramına göre nanoküreler monodispers yapıda, küresel formda ve ImageJ programı kullanılarak yapılan partikül boyut dağılımına göre yaklaşık olarak 100 nm boyutlarındadır. Nanokürelerin sentezinde kullanılan diğer mol oranlarına ((1/4), (1/6) ait TEM görüntüleri Şekil 18 (b) ve (c)'de verilmiştir. Buna göre polimerizasyon reaksiyonunun gerçekleştiği ancak küresel nanopartikül yapısının oluşmadığı söylenebilir. Bunun nedeni polimerizasyon ortamında bulunan HCCP yapısında bulunan Cl atomları sayısının yine ortamdaki AEP yapısında bulunan NH₂ fonksiyonel grup sayısında az olmasıdır. TEM görüntüleri incelenmesi, nanopartiküllerin boyut ve küresel şekil kazanımlarından dolayı çalışmanın sonraki aşamalarında (1/3) mol oranındaki küreler tercih edilmiştir.



Şekil 18. Nanokürelere ait TEM görüntüleri. (a) phz-AEP (1/3), skala: 100 nm b) phz-AEP (1/4), skala: 1 μ m c) phz-AEP (1/6), skala: 2 μ m d) Nanokürelere ait parçacık boyut dağılımı analizi, TEM görüntüsü için skala: 100 nm. Analiz ImageJ programı kullanılarak yapıldı.

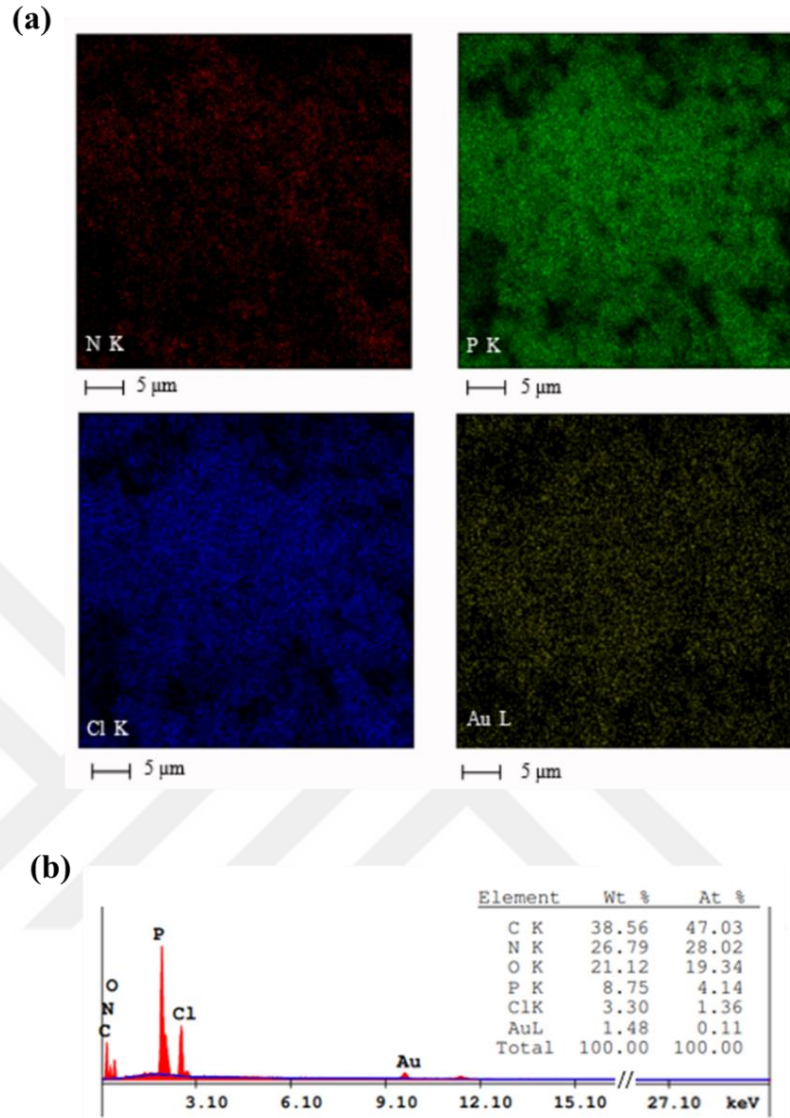
HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokompozit partiküller yüzey morfolojisi yönünden incelendi. Bunun için SEM analizi gerçekleştirildi. Şekil 19 (a) ve (b) altın ile modifiye edilmemiş HCCP-AEP nanokürelerine ait Şekil 19 (c) ve (d) ise altın ile modifiye edilmiş HCCP-AEP@Au nanokürelerine ait SEM görüntüleri verilmiştir. Altın ile modifiye edilmemiş HCCP-AEP nanokürelerinin küresel yapıları ve yüzey morfolojileri açıkça görülmektedir. Farklı büyütme oranlarında verilmiş Şekil 19 (c) ve (d) ise HCCP-AEP@Au nanokompozit kürelerin yüzeylerinde tutunmuş olan küresel Au nanopartikülleri görülmektedir. Yüzeyde tutunmuş olan Au nanopartiküller taşıyıcı materyale biyoyumluluk, biyobozunurluk ve aktif yüzey özellikleri kazandıracaktır. Bununla birlikte altın ile modifikasyonun nanokürelerin küresel şekillerinde herhangi bir değişikliğe sebep

olmadığı söylenebilir. Ek olarak AAS kullanılarak yapılan analiz sonucunda HCCP-AEP@Au nanokompozit partiküller için Au miktarının 10,11 mg/g olduğu belirlenmiştir.



Şekil 19. (a) HCCP-AEP nanokürelerin yüzeylerinde altın nanopartiküllerin sentezi, (b ve c) HCCP-AEP nanokürelerin SEM görüntüleri (d ve e) HCCP-AEP@Au nanokürelerin SEM görüntüleri. (b ve d) için skala: 20 μm, (c ve e) için skala: 4 μm'dir.

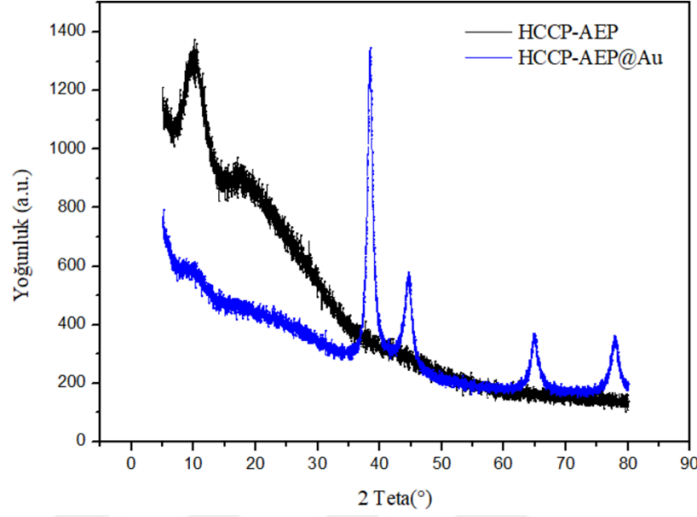
SEM analizinin ardından nanokürelerin yüzeyinde bulunan elementlerin kütle oranlarının belirlenmesi için EDX ve elementel haritalama yöntemi kullanılmıştır. Buna göre Şekil 20 (a)'da verilmiş azot atomları haritası amin kaynaklı ve Şekil 20 (b)'de verilmiş fosfor atomları fosfazen kaynaklıdır. Dolayısıyla polimerizasyon reaksiyonunda homojen küre oluşumu sağlanmıştır. Bununla birlikte nanokürelerin yüzeyinde Şekil 20 (c)'de verildiği gibi halen -Cl atomu bulunmaktadır. Yine Şekil 20 (d) incelendiğinde altın nanopartikülleri ile modifikasyonun kürelerin yüzeylerinde homojen olarak gerçekleştiği söylenebilir. Şekil 20'de ise nanokürelerin yüzeyinde bulunan seçilmiş bazı elementlere ait kütlece C, N, O, P, Cl ve Au element miktarları % olarak verilmiştir.



Şekil 20. HCCP-AEP@Au nanokürelerinin element haritalaması, (a) N, (b) P, (c) Cl, (d) Au, (e) EDX spektrumu.

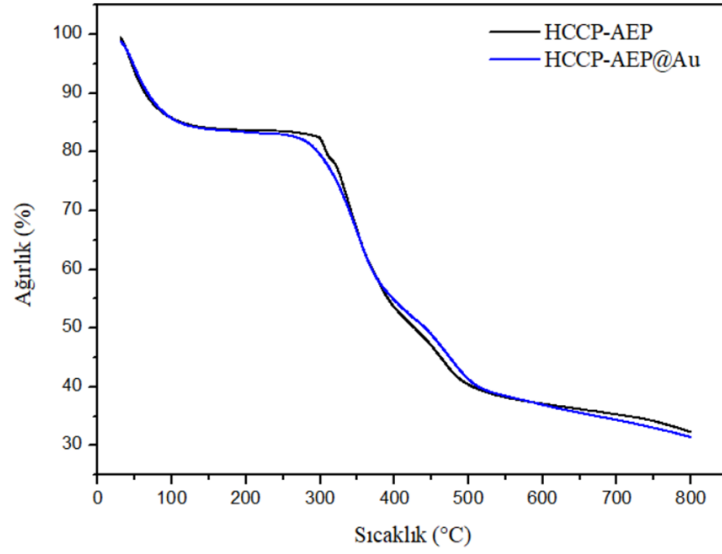
Yukarıda verilmiş karakterizasyon yöntemlerine ek olarak HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokompozit küreler amorf ve kristalin yapı özelliklerini tayin etmek için X-ışını kırınım modeli ile karakterize edildi. Şekil 21’de verilmiş XRD analiz sonucu incelendiğinde HCCP-AEP karakteristik dalgasından polimerik özellik etkisiyle amorf yapıya sahip olduğu anlaşılmaktadır. Polimerik yapı yüzeyinde sentezlenmiş Au nanopartiküllerinin polimere katılmasıyla elde edilmiş olan HCCP-AEP@Au nanokompozit küreler kristalin özellik göstermiştir. Buna göre $2\theta = 38^\circ\text{-}43^\circ$ civarında görülen genliği yüksek pik yapının Au etkisiyle kristal özelliğe sahip olduğunu gösterir. Bu durum nanokürelerin yüzeyinde

tutunmuş Au^{3+} iyonlarının askorbik asit ile indirgenmesi sonucu elde edilen Au^0 nanopartiküllerinin kristal yapıda oluştuğunun kanıtıdır.



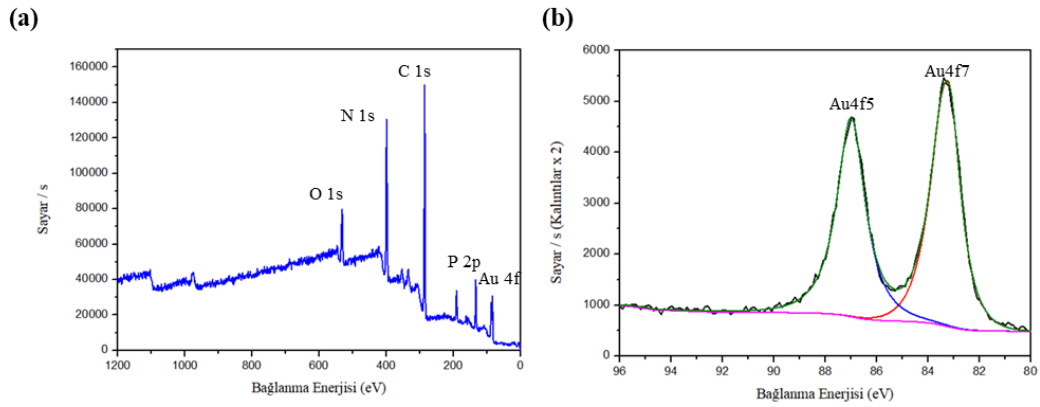
Şekil 21. HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelere ait XRD spektrumları.

Polimerik fosfazen yapıların ısı dayanımlarının yüksek olduğu bilinmektedir. Şekil 22’de HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokompozit kürelerin termal analizleri görülmektedir. Grafik incelendiğinde nanokürelerin 3 farklı bozunma sıcaklığına sahip oldukları görülmektedir. Buna göre oda sıcaklığında 100 °C ye kadar gerçekleşen kütle kaybının nem etkisi ile olduğu söylenebilir. 100-300 °C arası sıvı etkisiyle herhangi bir bozunmaya uğramayan HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanoküreleri 300-800 °C aralığında kütlelerinin %52’sini ısı etkisi ile kaybetmiştir.



Şekil 22. HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelere ait TGA eğrileri.

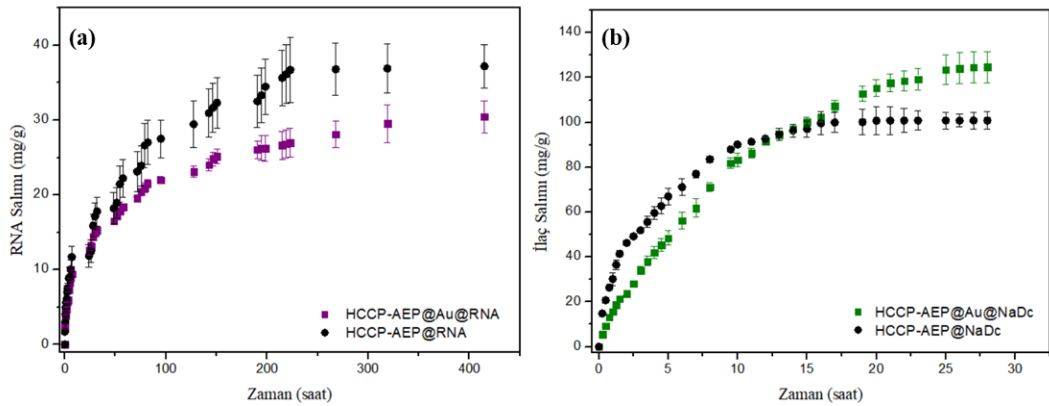
Şekil 23 (a)'da verilen X- ışını fotoelektron spektrometresi full scan spectrumunda O 1s, N 1s, C 1s, P 2p ve Au 4f ile ilgili pikler sırasıyla (531,31), (398,79), (285,3), (132,9) ve (83,47) eV'de gözlemlendi. Ek olarak Şekil 23 (b)'de görüldüğü gibi Au4f7 ve Au4f5 bağlanma enerjileri sırasıyla (83,22) ve (86,99) eV'dir (Ozay, Tarimeri, vd., 2020).



Şekil 23. HCCP-AEP@Au nanokürelere ait XPS analizi (a) tam tarama spektrumu (b) dar tarama spektrumu.

4.1.2. Nanokürelere Gen/İlaç Yükleme ve Salım Çalışmaları

RNA ve NaDc salımı çalışmaları molce (1/3) oranında sentezlenmiş HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelere kullanıldı. Salım davranışlarının araştırılması için gen salımı için bir tür maya RNA'sı ve model ilaç olarak NaDc salımı araştırılmıştır. RNA ve NaDc salımı için kuru halde HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelere her birinden de 25 mg kullanıldı. Salım ortamı olarak pH: 7,2 (PBS) tercih edildi. İlk olarak RNA salımı için HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelere gen tutma kapasitesi sırasıyla 175,521 mg/g ve 114,033 mg/g'dır. Şekil 24 (a)'da verilen salım grafiği incelendiğinde HCCP-AEP kürelerden 37,2 mg/g RNA salımı ve HCCP-AEP@Au nanokürelere 30,4 mg/g RNA salımı gerçekleştiği ve salımın yaklaşık 415 saatte dengeye geldiği görülmektedir. Ek olarak NaDc salımı için HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelere ilaç tutma kapasitesi sırasıyla 194,7751 mg/g ve 196,004 mg/g'dır. Şekil 24 (b) verilmiş salım grafiği incelendiğinde ise HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelere sırasıyla 100,9 mg/g ve 124,7 mg/g ilaç salındığı ve sistemin yaklaşık 28 saatte dengeye geldiği görülmektedir. Bu sonuçlar incelendiğinde HCCP-AEP@Au nanokürelere kontrollü ve uzun sürelerde gen ve ilaç salımı özelliğine sahip olduğu görülmektedir. HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelere gen/ilaç tutma kapasiteleri ve salım özellikleri kıyaslandığında her iki matristen de aynı kütlede tartılmış olduğu göz önüne alındığında HCCP-AEP@Au nanokürelere ilaç ve tutma kapasitesinin altınsız olanlara göre daha az olduğu görülmektedir. Bunun sebebi HCCP-AEP kürelere yüzeylerinin altın ile kaplanması ve bunun sonucunda yüzey doluluk oranının artmasıdır.



Şekil 24. HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelere (a) RNA salımı, (b) NaDc salımı.

4.1.3. İlaç Salım Kinetikleri

Yapılan ilaç salım çalışmalarında HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanotaşıyıcıların salım kinetiklerini araştırmak için farklı matematiksel modeller kullanıldı. Matematiksel olarak modellemek için sırasıyla Zero-order, First-order, Higuchi, Korsmeyer-Peppas ve Hixson-Crowell modelleri kullanılmıştır. Her bir matematik model için salım kinetikleri analizi yapıldı (İlgin, Ozay, ve Ozay 2019). Salım kinetiği ve parametreler doğrusal regrasyon kullanılarak elde edildi. Tablo 2’de görüldüğü gibi parametreleri doğrulamak için korelasyon katsayıları (R^2) kullanılmıştır. Kors-Peppas modeli, polimerik matrislerden ilaç salım çalışmaları için uygundur. Çalışmamızda HCCP ile çapraz bağlanmış polimerik nanopartiküller sentezlendiği için bu modele uygundur. Buna ek olarak partiküllerin salımları diyaliz membran kullanılarak yapılmıştır ve bu durum da ilave olarak polimerik bir matris gibi davranabilmektedir. HCCP-AEP@Au partiküllerinden RNA salımlarında $R^2 > 0,99$ ve NaDc salımlarında $R^2 > 0,99$ oluşu bu sonucu doğrulamaktadır. Kors-Peppas modeline göre difüzyon üssü (n) değerleri küresel matrisler için 0,43 ile 0,85 arasında olmalıdır (Blagoeva ve Nedev 2006). Salım çalışmaları sonucunda elde edilen n değerleri (Tablo 1.) bu aralıktadır ve ilaç salım mekanizmasına göre anomalous transport olarak nitelendirilmektedirler. Son olarak Higuchi modeli sistemden salınan ilacın çözündüğü durumlarda tercih edilmektedir. Çalışmada kullanılan NaDc salım ortamında çözünmektedir. Bu sebeple Higuchi modeline oldukça uygundur. Ayrıca HCCP-AEP@Au partiküllerinden NaDc ilaç salımında $R^2 > 0,98$ oluşu bu sonucu doğrulamaktadır. Aynı modelin RNA salımları için daha düşük R^2 değeri göstermesi tercih edilen RNA türünün sulu ortamda geç çözünmesi ile ilişkilendirilebilir. Sonuç olarak kullanılan beş farklı kinetik model arasından Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modelleri bizim çalışmamıza uygundur.

Tablo 2. HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanoparçacıklarından ilaç ve gen salımının hız sabitleri ve korelasyon kat sayıları, aşağıdaki kinetik modeller kullanılarak hesaplanmıştır: Zero-order, First-order, basitleştirilmiş Higuchi, Korsmeyer–Peppas ve Hixson-Crowell kinetik model.

Kinetik Model	Parametre	Yüklenen İlaç/Gen	
		RNA	NaDc

		HCCP-AEP	HCCP- AEP@Au	HCCP-AEP	HCCP- AEP@Au
Zero-order	R^2	0,7565	0,7531	0,8356	0,9081
	K_0	0,0598	0,0683	2,037	2,3228
Firts-order	R^2	0,7772	0,782	0,8893	0,9593
	K	0,0003	0,0004	0,0135	0,0169
Higuchi	R^2	0,9489	0,9503	0,9663	0,9814
	K_H	0,8133	0,6871	0,0855	0,0696
Korsmeyer- Peppas	R^2	0,9739	0,9924	0,9979	0,9979
	n	0,4354	0,3690	0,4753	0,7165
Hixson- Crowell	R^2	0,7704	0,7725	0,8729	0,9445
	k	0,001	0,0012	0,0417	0,0502

K_0 salınım kinetik sabitidir.

K salım kinetik sabitidir.

K_H , Higuchi'nin salınım kinetik sabitidir.

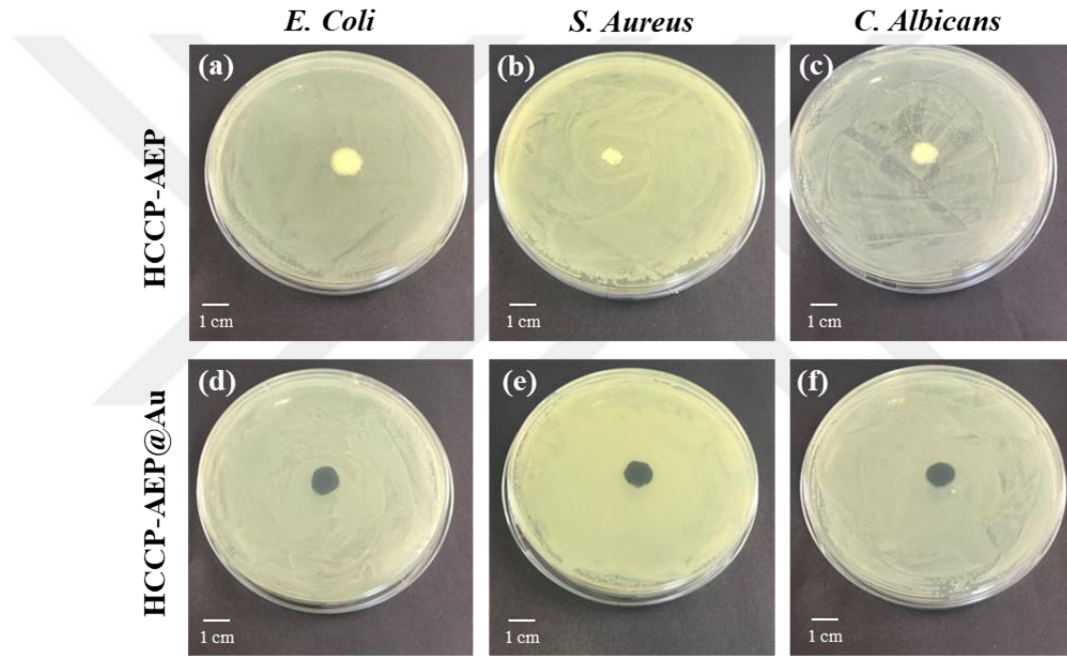
n , yayın üssüdür.

k , salınım kinetik sabitidir.

4.1.4. Nanokürelerin Antibakteriyel ve Antifungal Etkilerinin İncelenmesi

Altın nanoparçacıklar çeşitli biyolojik işlevlere sahiptirler. Bu işlevlerden biri de AuNp'lerin bilinen antibakteriyel özellikleridir. AuNp'ler bakterilerin hücre zarına tutunarak peptidoglikan yapının penetrasyonuna yol açarlar ve bu sayede bakterinin ölümüne neden olurlar. Ancak AuNP'ler bu antibakteriyel özelliği genellikle gram- negatif bakteriler üzerinde etkilidir (Alfei ve Schito 2020; Li vd. 2018). Bu çalışmada disk difüzyon metodu kullanılarak HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanokürelerin antibakteriyel davranışları araştırılmıştır. Antibakteriyel analiz sonuçları Şekil 25'te görülmektedir. Burada altınlı ve altınsız kompozit nanokürelerin etkileri *E. Coli* gram-negatif, *S. Aureus* gram-pozitif ve *C. Albicans* mantar olmak üzere üç farklı tür üzerinde incelenmiştir. İlk olarak altınsız HCCP-AEP nanokürelerin bakteriler üzerinde bir etkisi olmadığı görülmektedir. Altınlı kompozit HCCP-AEP@Au partiküllerin gram-negatif bakteri ve mantar üzerinde etkili olup

beklendiği üzere gram-pozitif bakteri üzerinde etki etmediği sonucuna varılmıştır. Şekil 25 (d) ve (f)'de sırasıyla gram-negatif bakteri için 1 mm inhibisyon çapı ve mantar için 1,3 mm inhibisyon çapı gözlenmiştir. Zone çaplarının küçük oluşu kompozit nanokürelerin içerdiği Au miktarının 1g HCCP-AEP@Au partikül için 10,11 mg gibi az bir miktarda olmasıyla ilişkilendirilebilir. Elde edilen sonuçlar dahilinde sentezlenmiş olan nanokompozit taşıyıcı kürelerin artırılabilir özellikte antibakteriyel aktivite gösterdiği görülmektedir. Bu doğrultuda ilaç ve gen taşıyıcı aynı zamanda antimikrobiyal özellik gösteren taşıyıcı bir sistemin sentezi başarıyla gerçekleştirildiği sonucuna varılmıştır.



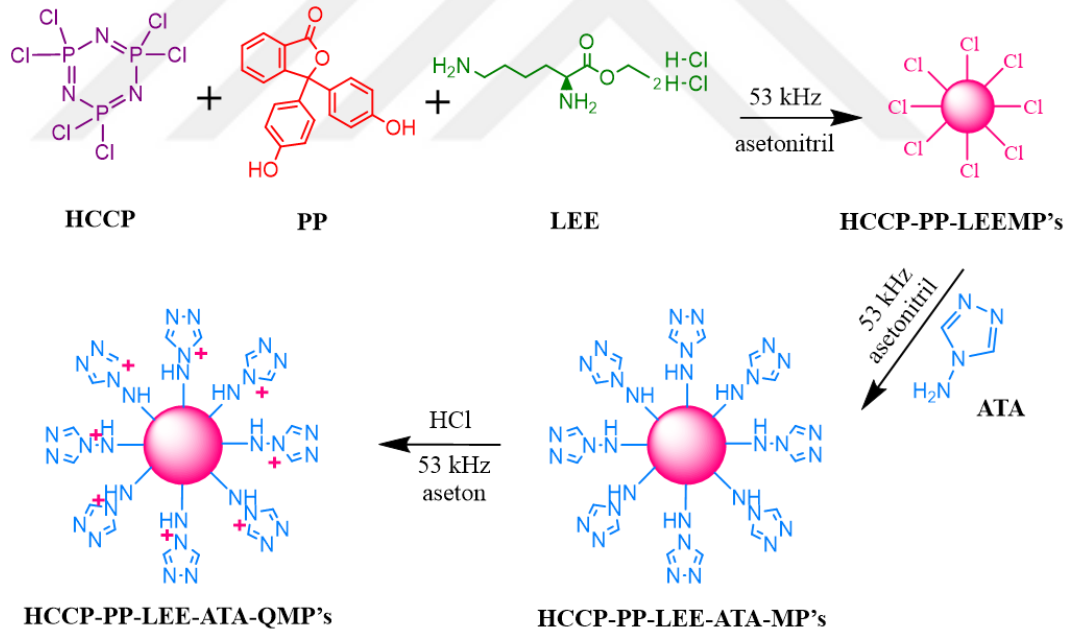
Şekil 25. HCCP-AEP için antimikrobiyal aktivite testlerinin görüntüleri (a) *E. Coli* (b) *S. Aureus* (c) *C. Albicans*. HCCP-AEP@Au (d) *E. Coli* (e) *S. Aureus* (f) *C. Albicans*.

4.2. HCCP-PP-LEE Mikrokompozit Küreler

4.2.1. Mikrokompozit Kürelerin Sentezi ve Karakterizasyonu

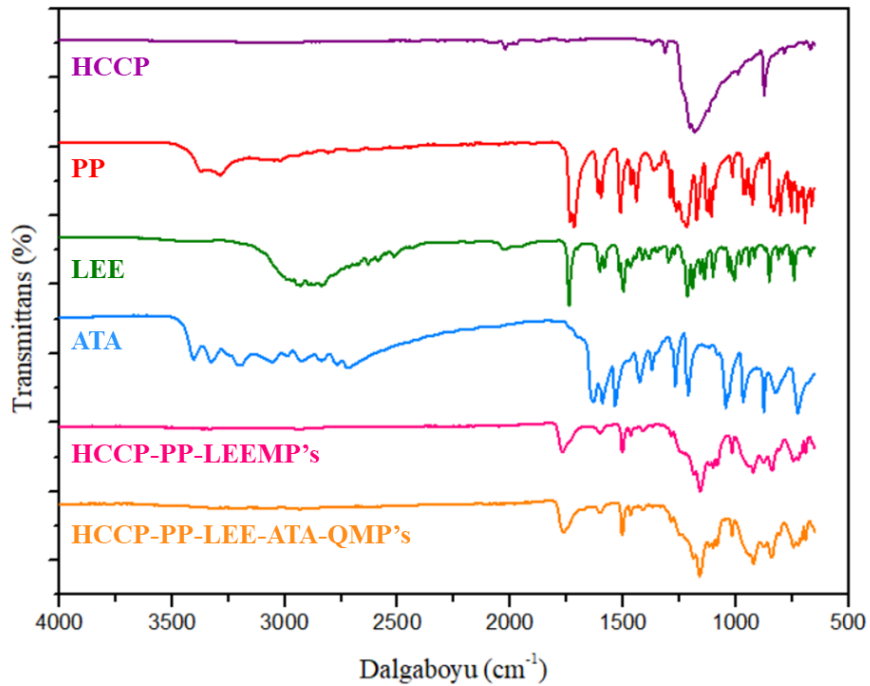
HCCP-PP-LEEMP mikroküreler mol oranları (HCCP/PP/LEE; 1/1,5/1,5) olacak şekilde polimerizasyon reaksiyonu sonucunda sentezlendi. Sentez için monomerlerin reaksiyona dahil edilme süreleri arasında farklı denemeler yapıldı. İlk olarak HCCP ve LEE'nin eş zamanlı reaksiyonu ultrasonik banyo cihazı kullanılarak (53 kHz) başlatıldı.

Reaksiyon ortamına 1 saat sonra PP eklendi ve 5 saat devam ettirildi. Sonuçta reaksiyon ortamında herhangi bir bulanıklık gözlemlenmedi. Bunun sebebi sentez denemesinde partikül oluşmadığı şeklinde açıklanabilir. İkinci bir denemede bütün monomerler eş zamanlı olarak reaksiyon ortamına katıldı. Reaksiyon 6 saat devam ettirildi ve elde edilen reaksiyon ürününde küresel yapıların oluşmadığı gözlemlendi. Son olarak HCCP ve PP'nin eş zamanlı olarak reaksiyonu başlatıldı. Reaksiyon ortamına 1 saat sonra LEE eklendi ve reaksiyon 5 saat devam ettirildi. Bu sentez denemesinin sonucunda katı toz taneciklerin oluştuğu görüldü. Bu tanecikler santrifüjlenip yıkama işlemleri yapılarak reaksiyon artıkları ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra vakumlu etüv cihazında 40 °C'de kurutuldu ve çalışmalara bu tanecikler ile devam edildi (Şekil 26). Sentezlenen HCCP-PP-LEEMP mikroküreler kuarternizasyon için ATA çözeltisi içerisine atılarak 3 saat sonike edildi. Sonra mikroküreler 1 saat HCl ile modifiye edildi. Yıkama ve kurutma işlemlerinin ardından Şekil 26'da verilen HCCP-PP-LEE-ATA-QMP kuarternize edilmiş mikroküreler elde edildi.

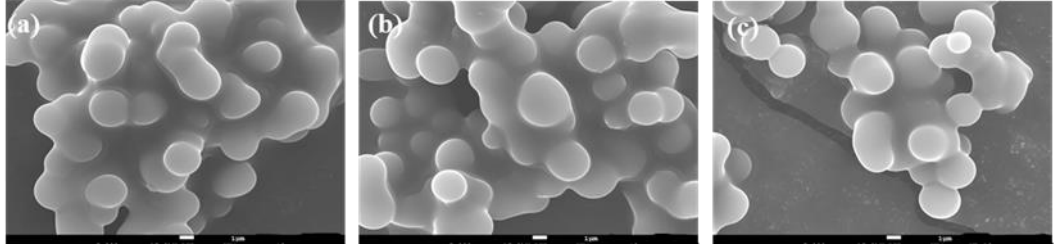


Şekil 26. HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait sentez ve kuarternizasyon mekanizması.

Sentezlenen/modifiye edilen HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait FT-IR spektroskopisi kullanılarak analiz edildi (Şekil 27). Şekil 27'deki HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait spektrumlar incelendiğinde her iki mikroküre için de sırasıyla $724,03 \text{ cm}^{-1}$ ve $1498,74 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyundaki N-H bantları PP ve LEE'den kaynaklanmaktadır (González-García vd., 2018; Han vd., 2009). Mikrokürelere katılan HCCP'ye ait P=N bandı $1157,66 \text{ cm}^{-1}$ 'de görülmektedir (O. Ozay ve Ozay 2019). PP ve LEE'nin halkalı yapısında bulunan C=O ve C=C karakteristik pikleri sırasıyla $1763,14 \text{ cm}^{-1}$ ve $1600,71 \text{ cm}^{-1}$ dalga boylarına karşılık gelmektedir (H. Ozay, Ilgin, vd., 2020; H. Ozay vd., 2016; Acik, Acik, ve Erdemi 2021). HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait spektrumda HCCP-PP-LEEMP mikrokürelere farklı olarak $1211,42 \text{ cm}^{-1}$ ve $1047,23 \text{ cm}^{-1}$ dalga boylarında C=N gerilmelerine ait absorpsiyon piklerinin kuarternizasyondan dolayı oluştuğu düşünülmektedir (H. Ozay ve Ozay 2014; Frey ve Corn 1996).

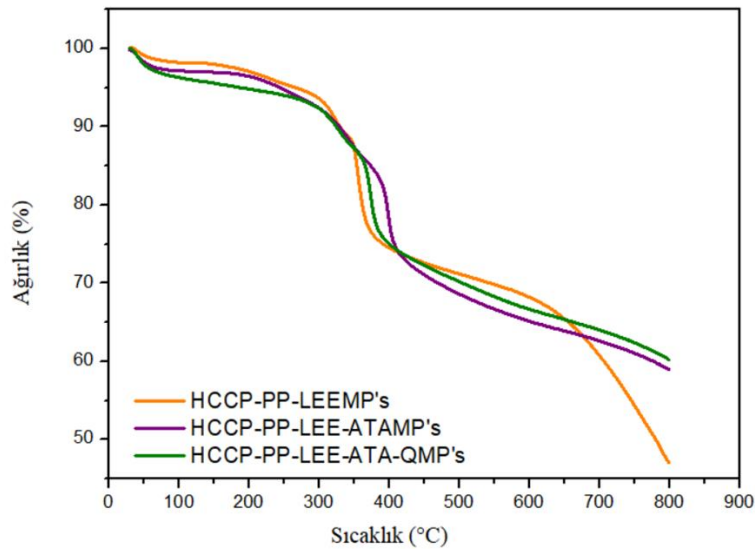


Şekil 27. HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait FT-IR spektrumları.



Şekil 29. Mikrokürelere ait SEM görüntüleri. (a) HCCP-PP-LEEMP, (b) HCCP-PP-LEE-ATAMP, (c) HCCP-PP-LEE-ATA-QMP. Tüm görüntüler için skala: 1 µm'dir.

Mikrokürelerin termal özelliklerini incelemek için TGA analizi yapılmıştır (Şekil 30). HCCP-PP-LEE, HCCP-PP-LEE-ATA, HCCP-PP-LEE-ATA-Q mikroküreler için TGA eğrileri Şekil 30'da verilmiştir. TGA eğrisinde ilk 30 °C ve 67 °C aralığından mikrokürelerin ısı etkisiyle nem kaybettiği düşünülmektedir. Daha sonra 325 °C'de mikroküreler için sıcaklık etkisiyle yapısal bozunma gerçekleşmiştir. 347 °C'de HCCP-PP-LEE mikroküreler için diğer kürelerden farklı bir ısıl bozunma eğrisi gözlemlendi. 414 °C'de her mikroküre için %26,04 bir bozunma meydana gelmiştir. Yapılan analiz sonucunda HCCP-PP-LEE, HCCP-PP-LEE-ATA, HCCP-PP-LEE-ATA-Q mikroküreler için total termal bozunma sırasıyla %39,77, %41,17, %53,07'dir. Bozunma yüzdeleri kıyaslandığında kuarternizasyon sonrasında mikrokürelerin termal dayanımının arttığı görülmektedir.



Şekil 30. HCCP-PP-LEEMP, HCCP-PP-LEE-ATAMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait TGA eğrileri.

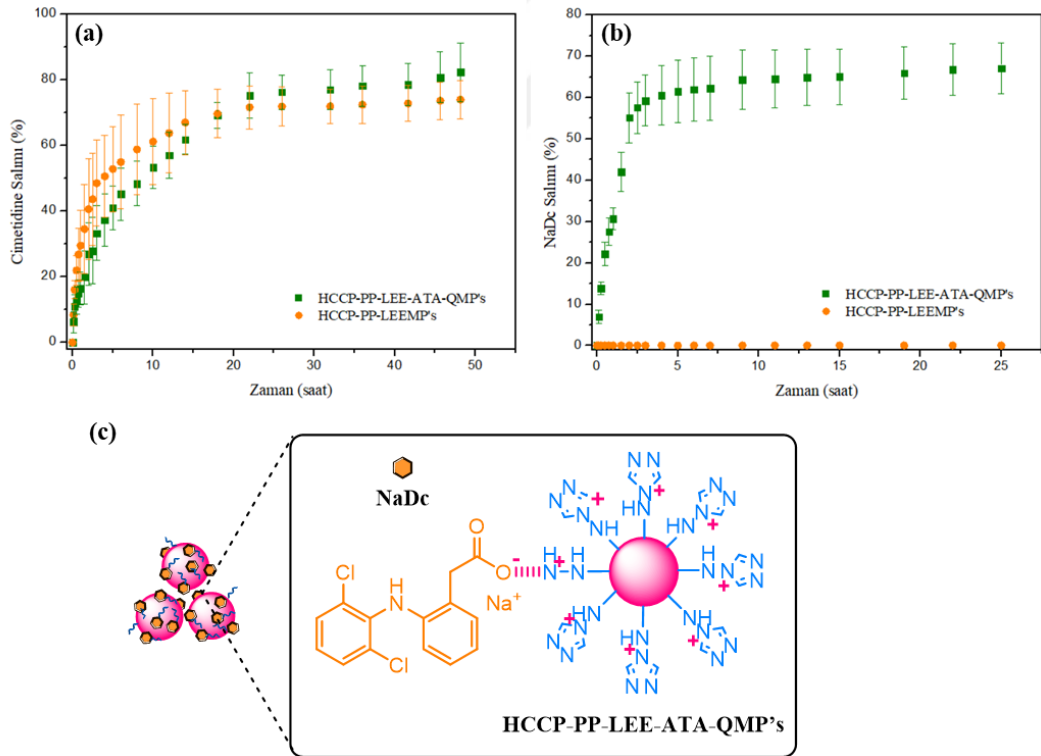
4.2.2. Mikrokompozit Kürelere İlaç Yükleme ve Salım Çalışmaları

Genellikle ilaç taşıyıcı sistemlerin hedef bölgeye uygun miktarda ilacı taşıyabilmesi için ilaç yükleme kapasitelerinin yüksek olması beklenir. Bu amaçla sentezlenen HCCP-PP-LEEMP mikrokürelere yüzeylerindeki elektrostatik etkileşimleri artırarak ilaç tutma kapasitesini geliştirmek amacıyla kuarternize edilmiştir. Daha sonra mikrokürelere bir tür kanser ilacı olan Cimetidine ve ek olarak bir tür non-steroidal antiinflamatuvar bir ilaç olan aynı zamanda aktif (-) fonksiyonel grup bulduran NaDc yüklenmiştir. HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ilaç tutma kapasiteleri Tablo 3'te verilmiştir. Mikrokürelere Cimetidine yükleme kapasiteleri HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP için sırasıyla 7,4735 ve 7,9264 mg/g'dır. Cimetidine yüksüz bir moleküler yapıya sahip olduğu için kuarternize edilen ve edilmeyen mikrokürelere için ilaç yükleme kapasitesi olarak büyük bir farklılık oluşturmamaktadır. Ancak taşıyıcı sistemin bir kanser ilacı taşıma özelliğine sahip olduğunu göstermektedir. Ek olarak NaDc için kuarternize edilmiş HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere için ilaç tutma kapasitesi 99,6677 mg/g'dır. Kuarternizasyon öncesinde mikrokürelere HCCP-PP-LEEMP yüzey yapıları nedeniyle elektrostatik olarak NaDc ilaç molekülüyle herhangi bir elektrostatik etkileşim oluşturmadığı için ilaç yükleme denemesi başarısız olmuştur. Ancak kuarternizasyon sonrasında yüzeyi (+) yük kazanan HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere elektrostatik etkileşimler sayesinde onlarca kat daha fazla ilaç tutma özelliği kazanmıştır (Şekil 31 (c)).

Tablo 3. HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ilaç yükleme kapasiteleri.

İlaç Yükleme (mg/g)	HCCP-PP-LEEMP	HCCP-PP-LEE-ATA-QMP
Cimetidine	7,4735	7,9264
NaDc	-	99,6677

HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelerin *in vitro* ilaç salım davranışlarını araştırmak için PBS (pH 7,2) salım ortamı tercih edildi. İlaç yüklü olan mikroküreler diyaliz membran kullanılarak 37 °C’de salım ortamı içerisine atıldı. Belirlenen zaman aralıklarında salım ortamından UV/Vis cihazı kullanılarak ölçümler alındı ve PBS ortamına salınan ilaç konsantrasyonları belirlendi. Yapılan fizikokimyasal ölçümler sonucunda mikrokürelerin *in vitro* ilaç salım grafikleri Şekil 31’de verilmiştir. Şekil 31 (a)’daki ilaç salım grafiğinde HCCP-PP-LEEMP mikroküreler için Cimetidine salımı 48 saat için %73,86 ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikroküreler için aynı şartlar altında Cimetidine salımı %82,17’dir. Şekil 31 (b)’deki ilaç salım grafiğinde HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait NaDc salımı 24 saat için %66,80 olarak hesaplandı. Ek olarak Şekil 31 (c)’de HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikroküreler ve NaDc ilaç molekülüne ait elektrostatik etkileşim mekanizması verilmiştir.



Şekil 31. HCCP-PP-LEEMP, HCCP-PP-LEE-ATAMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikro kürelere ait ilaç salım grafikleri. (a) Mikrokürelerden cimetidine (%) salımı (b) NaDc (%) salımı, (c) HCCP-PP-LEE-ATA-QMP ve NaDc elektrokimyasal etkileşim mekanizması.

4.2.3. İlaç Salım Kinetikleri

Mikrokürelerin *in vitro* ilaç salım davranışları kinetik modeller kullanılarak karakterize edildi. İlaç salım özelliklerini yorumlamak için Zero-order, First-order, Higuchi, Korsmeyer–Peppas and Hixson-Crowell kinetik modelleri tercih edildi. Uygulanan kinetik modeller için hesaplanan korelasyon değerleri ve hız sabitleri Tablo 4’te verilmiştir. Tablo 4’te verilen parametreler incelendiğinde Cimetidine salımı için HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait Higuchi kinetik modeli korelasyon değerleri sırasıyla $R^2 = 0,9914$ ve $R^2 = 0,9904$ olarak hesaplanmıştır. Korelasyon değerleri kıyaslandığında her iki mikroküre için Cimetidine salımının Higuchi kinetik modeline uygun olduğu görülmektedir. NaDc salımı için Higuchi korelasyon değeri $R^2 = 0,9831$ ’ dir. Higuchi kinetik modeli genellikle polimerik matristen ilaç salımını ifade etmek için tercih edilir. Bu da mikrokompozit kürelerin polimerik yapıda olmasıyla açıklanabilir. Polimerik sistemlerden ilaç salım davranışlarını analiz etmek için kullanılan bir diğer model Korsmeyer-Peppas kinetik modelidir (Paarakh vd., 2018). Tablo 4’te Cimetidine salımı için mikrokürelere ait Korsmeyer-Peppas korelasyon değerleri HCCP-PP-LEEMP’s için $R^2 = 0,9737$, HCCP-PP-LEE-ATA-QMP için $R^2 = 0,9589$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca NaDc salımı için HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait korelasyon değeri $R^2 = 0,9854$ ’ tür. Korsmeyer-Peppas kinetik modeline ait korelasyon değerleri mikrokürelerin ilaç salım davranışlarının bu modele uygun olduğu anlamına gelmektedir. Ayrıca Korsmeyer-Peppas modeline n değeri ilaç salım siteminin difüzyon prensibi ve matris erozyonu hakkında da bilgi verir. Küresel yapıya sahip polimerik sistemler için $0,43 < n < 0,85$ aralığı Non -Fickian transportu ifade eder (Blagoeva ve Nedev 2006). Tabloda verilen n değerleri belirtilen aralıktadır ve ilaç salım davranışları Korsmeyer-Peppas kinetik modeline göre Non -Fickian transport olarak tanımlanmaktadır.

Tablo 4. HCCP-PP-LEEMP’s ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikropartiküllerinden ilaç salımının hız sabitleri ve korelasyon kat sayıları, aşağıdaki kinetik modeller kullanılarak hesaplanmıştır: Zero-order, First-order, basitleştirilmiş Higuchi, Korsmeyer–Peppas ve Hixson-Crowell kinetik model.

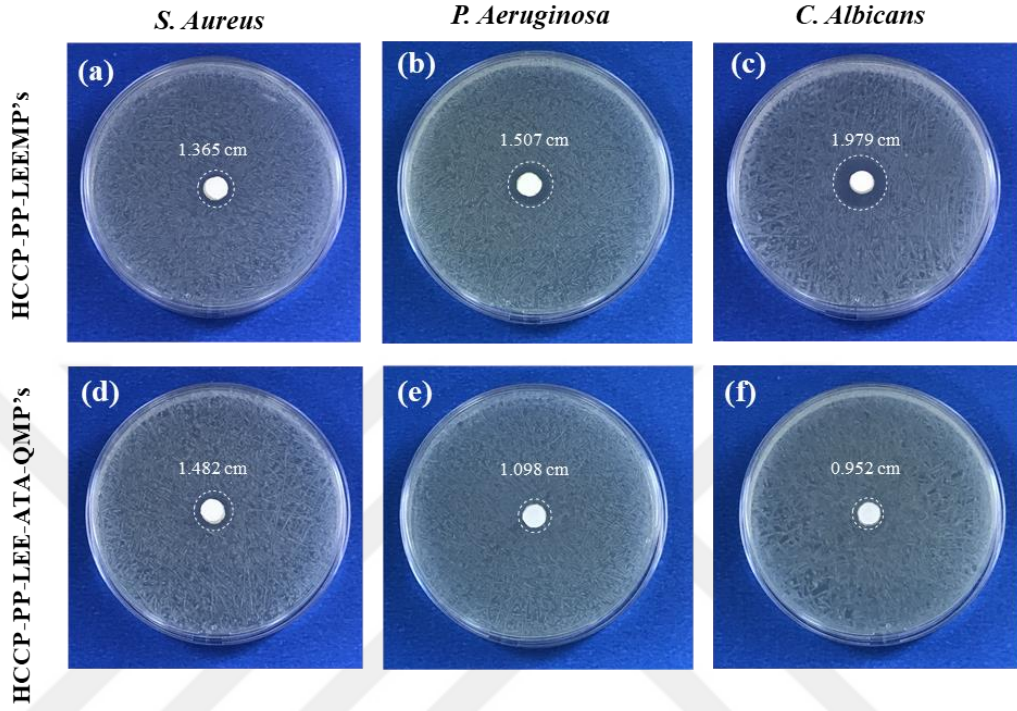
Kinetik Model	Parametre	Yüklenen İlaç	
		Cimetidine	NaDc

		HCCP-PP- LEEMP	HCCP-PP- LEE-ATA- QMP	HCCP- PP- LEEMP	HCCP-PP- LEE-ATA- QMP
Zero-order	R^2	0,8789	0,9051	-	0,9403
	K_0	15,587	5,8403	-	30,267
First-order	R^2	0,9286	0,9479	-	0,9603
	K	0,0918	0,0357	-	0,1591
Higuchi	R^2	0,9914	0,9904	-	0,9831
	K_H	28,057	17,933	-	32,614
Korsmeyer- Peppas	R^2	0,9737	0,9589	-	0,9854
	n	0,5147	0,4534	-	0,6886
Hixson-Crowell	R^2	0,9132	0,9350	-	0,9539
	k	0,2948	0,1131	-	0,5315

4.2.4. Mikrokompozit Kürelerin Antibakteriyel ve Antifungal Etkilerinin İncelenmesi

Mikrokürelerin *in vitro* antibakteriyel özelliklerini incelemek için agar kuyucuk difüzyon metodu kullanıldı (Balouiri, Sadiki, ve Ibsouda 2016; Urnukhsaikhan vd., 2021). HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelerin her biri için *S. Aureus*, *P. Aeruginosa* ve *C. Albicans* olmak üzere üç farklı bakteri türü üzerinde analizler yapıldı. Şekil 32'de mikrokürelere ait inhibisyon çapları görülmektedir. HCCP-PP-LEEMP mikrokürelerin farklı bakteri türleri üzerinde etki ettikleri bölgelerin çapları sırasıyla 1,365 cm, 1,507 cm, 1,979 cm'dir. HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikroküreler için ise 1,482 cm, 1,098 cm ve 0,952 cm'dir. İnhibisyon çapları incelendiğinde HCCP-PP-LEEMP mikroküreler gram pozitif ve gram negatif bakteri türlerinde etki etmiştir. Ek olarak 1,979 cm inhibisyon bölgesiyle en büyük etki *C. Albicans* mantar türü üzerinde görüldü. HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikroküreler de benzer şekilde her bir bakteri türü için inhibisyon bölgeleri oluşturdu ve en belirgin etki 1,482 cm inhibisyon çapıyla *S. Aureus* bakteri türünde gözlemlendi. Yapılan antibakteriyel testler sonucunda kuarternize edilmiş ve edilmemiş kürelerin her ikisinin de antibakteriyel özelliğe sahip olduğu görüldü. Mikrokürelerin sahip

olduğu bu özelliğin sebebinin mikrokürelerin yapısında bulunan LEE'den kaynaklandığı düşünüldü (Mills, Richardson, ve Jasensky 1980).



Şekil 32. HCCP-PP-LEEMP ve HCCP-PP-LEE-ATA-QMP mikrokürelere ait antimikrobiyal analiz sonuçları.

4.2.5. Sitotoksikite Çalışmaları

HCCP-PP-LEEMP, HCCP-PP-LEE-ATA-QMP ve ilaç yüklü HCCP-PP-LEE-ATA-QMP@Cimetidine mikrokürelerin HT-29 kolon kanseri hücreleri üzerinde sitotoksikite etkisini belirlemek için MTT testi yapıldı. Elde edilen bulgulara göre her bir mikroküre kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermiştir. Ancak Cimetidine yüklü olan mikrokürelerde hücre canlılığındaki azalma daha belirgin şekilde görülmektedir (Şekil 33). HCCP-PP-LEE-ATA-QMP@Cimetidine mikroküreler hücre canlılığını 40 µL'de net bir şekilde azaltmaya başladı. 100 µL'de hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı görüldü. Cimetidine yüklü mikroküreler için 40 ve 100 µL için Cimetidine konsantrasyonu sırasıyla 1,02 µM ve 2,54 µM olarak belirlendi. Burada in vitro analiz için mikrokürelerden DMEM ortamına 48 saat süreyle salınan salma ortamı kullanıldı. Sonuç olarak mikrokürelerin hücre

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasının ilk aşamasında halkalı yapıda bir tür fosfazen olan HCCP ve AEP kullanılarak küresel formda nanopartiküller sentezlendi. Ardından Au kullanılarak literatürde ilk kez HCCP-AEP@Au nanokompozit küreleri sentezlendi. Sentezlenen HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au nanopartikülleri FT-IR, TEM, SEM-EDX, TGA, XRD ve XPS analizleri ile karakterize edildi. Au nanopartikülleri sayesinde yüzeyleri daha biyouyumlu ve biyobozunur, ilaç ve gen taşıyıcı materyal elde edildi. Aynı zamanda Au yüzey etken partiküller antibakteriyel özellik gösterdi. Buna ek olarak ilaç ve gen yükleme ve salım çalışmaları HCCP-AEP ve HCCP-AEP@Au partikülleri için ayrı ayrı yapıldı. Bu amaçla partiküllere model ilaç olarak Diklofenak Sodyum ve gen olarak bir çeşit maya RNA'sı yüklenmiştir. Salım çalışmaları aynı zamanda matematiksel kinetik modeller ile araştırıldı. Çalışmaların sonucunda altınlı kompozit partiküllerin daha kontrollü ve uzun sürede ilaç ve gen salımı özelliğine sahip olduğu görüldü. Aynı zamanda bakteri ve mantarlar üzerinde etkiye sahip antimikrobiyal özellikler gösterdiği belirlendi. Elde edilen sonuçlar dahilinde potansiyel aşı uygulamaları ve ilaç taşıyıcı sistemlere ek olarak bir tür yeni ilaç ve gen taşıyıcı materyal sentezi ve karakterizasyon çalışmaları başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının ilerleyen aşamalarında HCCP, PP ve LEE kullanılarak polimerik ilaç taşıyıcı mikroküreler sentezlendi. Daha sonra sentezlenen mikroküreler HCl varlığında kuarternize edilerek yüzeyleri modifiye edildi. Bu sayede mikrokürelerin yüzeyleri anyonik özellik taşıırken kuarternizasyon sonucunda yüzeyde (N⁺) atomları oluşturuldu ve mikroküreler katyonik özellik kazandı. Bu doğrultuda geliştirilen sistem yüzey modifikasyonları sayesinde ilaç tutma kapasiteleri elektrostatik etkileşimler varlığında artırılmış oldu. Yapılarında bir tür aminoasit türevi bulunduran ve geliştirilmiş ilaç tutma kapasitesine sahip olan mikro taşıyıcı sisteme NaDc ve Cimetidine ilaçlarının yükleme ve salım çalışmaları *in vitro* olarak gerçekleştirildi. Mikroküreler kontrollü bir ilaç salım özelliği gösterdi ve salım davranışları kinetik modeller kullanılarak analiz edildi. Ayrıca mikrokürelerin antibakteriyel özellikleri üç farklı bakteri türü üzerinde denendi. Mikroküreler kuarternizasyon öncesinde ve sonrasında antibakteriyel özellik gösterdi. Ek olarak mikrokürelerin ikincil anti kanser özellikleri HT-29 kolon kanseri hücreler üzerinde

denendi. Cimetidine yüklü olmayan ve Cimetidine yüklenmiş mikroküreler antikanser özellik gösterdi. Bunun sebebinin mikrokürelerin yapısında bulunan LEE'den dolayı olduğu tahmin edilmektedir. Ancak literatürde bununla ilgili kesin bir çalışmaya rastlanmadı. Bu sayede literatüre geliştirilmiş ilaç tutma özelliği gösteren, yapısında bulunan bir tür aminoasit ile kendiliğinden anitbakteriyel ve antikanser özelliğe sahip bir tür mikrokompozit taşıyıcı sistem kazandırılmış oldu.

Yapılan çalışmalar sonucunda geliştirilmiş ilaç/gen taşıyıcı sistemler birçok hastalığın teşhii ve tedavisinde potansiyel kargo elemanlar olarak kullanılabilir özelliklere sahiptir. Bu amaçla yapılan çalışmalar *in vitro* ve *in vivo* analizlerin daha kapsamlı uygulanmasıyla desteklenebilir. Bu sayede geliştirilen terapötik sistemlerin canlı vücudundaki etkileri daha iyi analiz edilebilir. Analiz sonucunda elde edilen veriler ile potansiyel ilaç taşıyıcı veya aşı sistemlerine bir katkı sağlayabilir, gelecek çalışmalar için modifiye edilebilir ve geliştirilebilir bir temel sunabilir.

KAYNAKÇA

- Abasian, P., Ghanavati, S., Rahebi, S., Nouri Khorasani, S., & Khalili, S. (2020). Polymeric nanocarriers in targeted drug delivery systems: A review. *Polymers for Advanced Technologies*, 31(12), 2939–2954. <https://doi.org/10.1002/pat.5031>
- Abid, M. A., Hussain, S., Intisar, A., Rizwan, M., Ain, Q., Mutahir, Z., Yar, M., Aamir, A., Qureshi, A. K., & Jamil, M. (2021). Synthesis, characterization, hydrolytic degradation, mathematical modeling and antibacterial activity of poly[bis((methoxyethoxy)ethoxy)phosphazene] (MEEP). *Polymer Bulletin*, 78(10), 6059–6072. <https://doi.org/10.1007/s00289-021-03625-w>
- Abu Owida, H., Al-Nabulsi, J. I., Alnaimat, F., Al Sharah, A., Al-Ayyad, M., Turab, N. M., & Abdullah, M. (2022). Advancement of Nanofibrous Mats and Common Useful Drug Delivery Applications. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/9073837>
- Acik, B., Acik, G., & Erdemi, H. (2021). Synthesis and characterization of bile acid, poly(ϵ -caprolactone) and L-lysine diisocyanate ethyl ester based polyurethanes and investigation of their biodegradability properties. *European Polymer Journal*, 146(November 2020), 110247. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110247>
- Afsharzadeh, M., Hashemi, M., & Mokhtarzadeh, A. (2018). Recent advances in co-delivery systems based on polymeric nanoparticle for cancer treatment. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(6), 1095–1110. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1376675>
- Ahmad, M., Nawaz, T., Hussain, I., Chen, X., Imran, M., Hussain, R., Assiri, M. A., Ali, S., & Wu, Z. (2022). Phosphazene Cyclomatrix Network-Based Polymer: Chemistry, Synthesis, and Applications. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01573>
- Alfei, S., & Schito, A. M. (2020). Positively charged polymers as promising devices against multidrug resistant gram-negative bacteria: A Review. *Polymers*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/POLYM12051195>
- Amin, A. M., Shahid, S. A., Li, W., Haojie, Y., Ali, Z., Rehman, H., & Sarfraz, A. G. M. (2017). An Efficient Synthesis, Structural Characterization and Hydrolytic Degradation

- Studies of Poly [bis (3-phenyl-1- propoxide amino benzoic acid diethylamino) phosphazene] as Potential Materials for Biomedical Applications. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 27(4), 1117–1121. <https://doi.org/10.1007/s10904-017-0533-9>
- Bae, Y., Diezi, T. A., Zhao, A., & Kwon, G. S. (2007). Mixed polymeric micelles for combination cancer chemotherapy through the concurrent delivery of multiple chemotherapeutic agents. *Journal of Controlled Release*, 122(3), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.05.038>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bawarski, W. E., Pharm, D., Chidlow, E., Pharm, D., Bharali, D. J., & Mousa, S. A. (2008). Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2008.06.002>
- Blagoeva, R., & Nedev, A. (2006). Monolithic Controlled Delivery Systems: Part II. Basic Mathematical Models. *Bioautomation*, 5(December 2006), 106–117.
- Casella, G., Carlotto, S., Lanero, F., Mozzon, M., Sgarbossa, P., & Bertani, R. (2022). Cyclo- and Polyphosphazenes for Biomedical Applications. *Molecules*, 27(23). <https://doi.org/10.3390/molecules27238117>
- Castro, K. C. de, Costa, J. M., & Campos, M. G. N. (2022). Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 71(1), 1–13. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1798436>
- Chen, D., Liu, X., Lu, X., & Tian, J. (2023). Nanoparticle drug delivery systems for synergistic delivery of tumor therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 14(February), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1111991>
- Chernysheva, A. I., Karpova, E. A., Terentyeva, D. A., Tsivkovsky, N. S., Selivantev, Y. M., Raitman, O. A., Gorlov, M. V., & Soldatov, M. A. (2023). Degradable covalently-linked siloxane-phosphazene polymer for drug loading and releasing. *Reactive and Functional Polymers*, 182(December 2022), 105491. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105491>

- Cömert Önder, F., Ay, M., Aydoğan Türkoğlu, S., Tura Köçkar, F., & Çelik, A. (2016). Antiproliferative activity of *Humulus lupulus* extracts on human hepatoma (Hep3B), colon (HT-29) cancer cells and proteases, tyrosinase, β -lactamase enzyme inhibition studies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(1), 90–98. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1004060>
- Dar, M. J., Ali, H., Khan, A., & Khan, G. M. (2017). Polymer-based drug delivery : the quest for local targeting of inflamed intestinal mucosa. 2330. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1298601>
- de Azevedo, M. de B. M., de Melo, V. H. S., Soares, C. R. J., Miyamoto, D. M., Katayama, R. A., Squair, P. L., Barros, C. H. N., & Tasic, L. (2018). Development and characterisation of polymeric microparticle of poly(D,L-lactic acid) loaded with holmium acetylacetonate. *Journal of Microencapsulation*, 35(3), 281–291. <https://doi.org/10.1080/02652048.2018.1477843>
- England, C. G., Miller, M. C., Kuttan, A., Trent, J. O., & Frieboes, H. B. (2015). Release kinetics of paclitaxel and cisplatin from two and three layered gold nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 92, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.02.017>
- Frey, B. L., & Corn, R. M. (1996). Covalent Attachment and Derivatization of Poly(L-lysine) Monolayers on Gold Surfaces As Characterized by Polarization-Modulation FT-IR Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 68(18), 3187–3193. <https://doi.org/10.1021/ac9605861>
- González-García, D. M., Marcos-Fernández, Á., Rodríguez-Lorenzo, L. M., Jiménez-Gallegos, R., Vargas-Becerril, N., & Téllez-Jurado, L. (2018). Synthesis and in vitro cytocompatibility of segmented poly(ester-urethane)s and poly(ester-urea-urethane)s for bone tissue engineering. *Polymers*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/polym10090991>
- Greco, F., & Vicent, M. J. (2009). Combination therapy: Opportunities and challenges for polymer-drug conjugates as anticancer nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(13), 1203–1213. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.05.006>
- Han, J., Chen, B., Ye, L., Zhang, A. Y., Zhang, J., & Feng, Z. G. (2009). Synthesis and characterization of biodegradable polyurethane based on poly(ϵ -caprolactone) and L-

- lysine ethyl ester diisocyanate. *Frontiers of Materials Science in China*, 3(1), 25–32.
<https://doi.org/10.1007/s11706-009-0013-4>
- Hasannia, M., Aliabadi, A., Abnous, K., Taghdisi, S. M., Ramezani, M., & Alibolandi, M. (2022). Synthesis of block copolymers used in polymersome fabrication: Application in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 341(November 2021), 95–117.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.11.010>
- Heng, P. W. S. (2018). Controlled release drug delivery systems. *Pharmaceutical Development and Technology*, 23(9), 833–833.
<https://doi.org/10.1080/10837450.2018.1534376>
- Hoffman, A. S. (2008). The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 132(3), 153–163.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.08.012>
- Hou, S. L., Chen, S. S., Huang, Z. J., & Lu, Q. H. (2019). Dual-responsive polyphosphazene as a common platform for highly efficient drug self-delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(27), 4319–4327. <https://doi.org/10.1039/c9tb00801b>
- Ilgin, P., Ozay, H., & Ozay, O. (2019). A new dual stimuli responsive hydrogel: Modeling approaches for the prediction of drug loading and release profile. *European Polymer Journal*, 113(November 2018), 244–253.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.02.003>
- Ilgin, P., Ozay, H., & Ozay, O. (2020). Synthesis and characterization of pH responsive alginate based-hydrogels as oral drug delivery carrier. *Journal of Polymer Research*, 27(9). <https://doi.org/10.1007/s10965-020-02231-0>
- Jing, X., Zhi, Z., Jin, L., Wang, F., Wu, Y., Wang, D., Yan, K., Shao, Y., & Meng, L. (2019). pH/redox dual-stimuli-responsive cross-linked polyphosphazene nanoparticles for multimodal imaging-guided chemo-photodynamic therapy. 9457–9467.
<https://doi.org/10.1039/c9nr01194c>
- Khan, R. U., Yu, H., Wang, L., Teng, L., Zain-ul-Abdin, Nazir, A., Fahad, S., Elshaarani, T., Haq, F., & Shen, D. (2020). Synthesis of amino-cosubstituted polyorganophosphazenes and fabrication of their nanoparticles for anticancer drug delivery. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(46), 1–13.

<https://doi.org/10.1002/app.49424>

- Khan, R. U., Yu, H., Wang, L., Zhang, Q., & Xiong, W. (2020). I F E S sciences for life Synthesis of polyorganophosphazenes and preparation of their polymersomes for reductive / acidic dual- responsive anticancer drugs release. *Journal of Materials Science*, 55(19), 8264–8284. <https://doi.org/10.1007/s10853-020-04595-6>
- Khanna, S. C., & Speiser, P. (1969). Epoxy Resin Beads as a Pharmaceutical Dosage Form I: Method of Preparation. *Journal of Polymer Science*, 1273(13), 1114–1117.
- Kim, B., Smith, C., Poon, Z., & Hammond, P. T. (2009). MAD (Multiagent Delivery) Nanolayer : Delivering Multiple Therapeutics from Hierarchically Assembled Surface Coatings †. *Journal of Materials Chemistry*, 25(4), 14086–14092. <https://doi.org/10.1021/la9017618>
- Li, S., Dong, S., Xu, W., Tu, S., Yan, L., Zhao, C., Ding, J., & Chen, X. (2018). Antibacterial Hydrogels. *Advanced Science*, 5(5). <https://doi.org/10.1002/advs.201700527>
- Li, Z., Tan, S., Li, S., Shen, Q., & Wang, K. (2017). Cancer drug delivery in the nano era : An overview and perspectives (Review). *Journal of Materials Chemistry*, 611–624. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5718>
- Lombardo, D., Kiselev, M. A., & Caccamo, M. T. (2019). Review Article Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. 2019.
- Lu, X. Y., Wu, D. C., Li, Z. J., & Chen, G. Q. (2011). Polymer nanoparticles. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1st ed., Vol. 104). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3>
- MacHtakova, M., Thérien-Aubin, H., & Landfester, K. (2022). Polymer nano-systems for the encapsulation and delivery of active biomacromolecular therapeutic agents. *Chemical Society Reviews*, 51(1), 128–152. <https://doi.org/10.1039/d1cs00686j>
- Mehmood, S., Uddin, M. A., Yu, H., Wang, L., Amin, B. U., Haq, F., Fahad, S., & Haroon, M. (2022). One-Pot Synthesis of Size-Controlled Poly(cyclotriphosphazene-co-hesperetin) Microspheres and Their Properties as Drug Delivery Carriers. *ChemistrySelect*, 7(28). <https://doi.org/10.1002/slct.202200273>
- Mills, C. J., Richardson, T., & Jasensky, R. D. (1980). Antimicrobial Effects of N-Palmitoyl-

- L-lysyl-L-lysine Ethyl Ester Dihydrochloride and Its Use To Extend the Shelf Life of Creamed Cottage Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(4), 812–817. <https://doi.org/10.1021/jf60230a035>
- Ogueri, K. S., Ogueri, K. S., Ude, C. C., Allcock, H. R., & Cato, T. (2021). Biomedical applications of polyphosphazenes. 3(6). <https://doi.org/10.1002/mds3.10113.Biomedical>
- Okuda, T., Tominaga, K., & Kidoaki, S. (2010). Time-programmed dual release formulation by multilayered drug-loaded nano fiber meshes. *Journal of Controlled Release*, 143(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.12.029>
- Onder, A., & Ozay, H. (2021). Synthesis and characterization of biodegradable and antioxidant phosphazene-tannic acid nanospheres and their utilization as drug carrier material. *Materials Science and Engineering C*, 120(November 2020), 111723. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111723>
- Opanasopit, P., Yokoyama, M., Watanabe, M., Kawano, K., Maitani, Y., & Okano, T. (2004). Block Copolymer Design for Camptothecin Incorporation into Polymeric Micelles for Passive Tumor Targeting. 21(11).
- Ozay, H., Ilgin, P., & Ozay, O. (2021). Novel hydrogels based on crosslinked chitosan with formyl-phosphazene using Schiff-base reaction. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 70(4), 246–255. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1706514>
- Ozay, H., Ilgin, P., Ozyurt, C., & Ozay, O. (2020). The single-step synthesis of thiol-functionalized phosphazene-based polymeric microspheres as drug carrier. *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 59(17), 1944–1955. <https://doi.org/10.1080/25740881.2020.1784212>
- Ozay, H., & Ozay, O. (2014). Synthesis and characterization of drug microspheres containing phosphazene for biomedical applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 450(1), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.03.022>
- Ozay, H., Sahin, O., Koc, O. K., & Ozay, O. (2016). The preparation and applications of novel phosphazene crosslinked thermo and pH responsive hydrogels. *Journal of*

- Ozay, H., Tarimeri, N., Gungor, Z., Demirbakan, B., Özcan, B., Sezgintürk, M. K., & Ozay, O. (2020). A New Approach to Synthesis of Highly Dispersed Gold Nanoparticles via Glucose Oxidase-Immobilized Hydrogel and Usage in The Reduction of 4-Nitrophenol. *ChemistrySelect*, 5(29), 9143–9152. <https://doi.org/10.1002/slct.202002327>
- Ozay, O., & Ozay, H. (2019). Novel hexacentered phosphazene compound as selective Fe³⁺ ions sensor with high quantum yield: Synthesis and application. *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, 194(3), 221–228. <https://doi.org/10.1080/10426507.2018.1539491>
- Ozsoy, F., & Ozay, O. (2023). Phosphazene-based nanostructures modified with gold nanoparticles as drug and gene carrier materials with antibacterial and antifungal properties. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 0(0), 1–12. <https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2163642>
- Ozsoy, F., Ozdilek, B., Onder, A., Ilgin, P., Ozay, H., & Ozay, O. (2022). Graphene nanoplate incorporated Gelatin/poly(2-(Acryloyloxy)ethyl trimethylammonium chloride) composites hydrogel for highly effective removal of Alizarin Red S from aqueous solution. *Journal of Polymer Research*, 29(11), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10965-022-03327-5>
- Paarakh, M. P., Jose, P. A. N. I., Setty, C. M., & Peter, G. V. (2018). RELEASE KINETICS – CONCEPTS AND APPLICATIONS. 12–20.
- Prasanna, P., Kumar, P., Kumar, S., Rajana, V. K., Kant, V., Prasad, S. R., Mohan, U., Ravichandiran, V., & Mandal, D. (2021). Current status of nanoscale drug delivery and the future of nano-vaccine development for leishmaniasis – A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 141, 111920. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111920>
- Quintanar-guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., Doelker, E., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (2008). Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers Preparation Techniques and Mechanisms of Formation of Biodegradable Nanoparticles from Preformed Polymers. 9045. <https://doi.org/10.3109/03639049809108571>

- Rajan, R., Pal, K., Jayadev, D., Jayan, J. S., Aathira, U., Appukuttan, S., de Souza, F. G., Joseph, K., & Kumar, S. S. (2022). Polymeric Nanoparticles in Hybrid Catalytic Processing and Drug Delivery System. *Topics in Catalysis*, 65(19–20), 1860–1884. <https://doi.org/10.1007/s11244-022-01697-0>
- Reis, C. P., & Neufeld, R. J. (2006). Nanoencapsulation I . Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. 2, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>
- Rosenthal, E., Poizot-Martin, I., Saint-Marc, T., Spano, J. P., Cacoub, P., Carbon, Benselama, Cassuto, Coulaud, Bouchaud, Dupont, Frottier, Meynard, Gastaut, Imbert, Picard, Kazatchkine, Piketty, Gilquin, ... Escaut. (2002). Phase IV study of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in AIDS-related Kaposi sarcoma. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*, 25(1), 57–59. <https://doi.org/10.1097/00000421-200202000-00012>
- Rothmund, S., & Teasdale, I. (2016). *Chem Soc Rev* Preparation of polyphosphazenes : a. 5200–5215. <https://doi.org/10.1039/c6cs00340k>
- Sahu, T., Ratre, Y. K., Chauhan, S., Bhaskar, L. V. K. S., Nair, M. P., & Verma, H. K. (2021). Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63(January), 102487. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102487>
- Singh, S., & Nalwa, H. S. (2007). Nanotechnology and health safety - Toxicity and risk assessments of nanostructured materials on human health *Nanotechnology and Health Safety – Toxicity and Risk Assessments of Nanostructured Materials on Human Health*. June 2015. <https://doi.org/10.1166/jnn.2007.922>
- Smedt, S. C. De, Demeester, J., & Hennink, W. E. (2000). Cationic Polymer Based Gene Delivery Systems. 17(2).
- Subash, A., Basanth, A., & Kandasubramanian, B. (2022). Biodegradable polyphosphazene–hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 0(0), 1–19. <https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2082426>
- Sultana, A., Zare, M., Thomas, V., Kumar, T. S. S., & Ramakrishna, S. (2022). Nano-based drug delivery systems: Conventional drug delivery routes, recent developments and

- future prospects. *Medicine in Drug Discovery*, 15(February), 100134. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100134>
- Suri, S. S., Fenniri, H., & Singh, B. (2007). Journal of Occupational Medicine Nanotechnology-based drug delivery systems. 6, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-2-16>
- Tian, J., Min, Y., Rodgers, Z., Au, M., Iv, C. T. H., Zhang, M., Roche, K., Yang, F., Wagner, K., & Wang, A. Z. (2017). Co-delivery of paclitaxel and cisplatin with biocompatible PLGA – PEG nanoparticles enhances models †. 6049–6057. <https://doi.org/10.1039/c7tb01370a>
- Ullah, R. S., Wang, L., Yu, H., Abbasi, N. M., Akram, M., Ul-Abdin, Z., Saleem, M., Haroon, M., & Khan, R. U. (2017). Synthesis of polyphosphazenes with different side groups and various tactics for drug delivery. *RSC Advances*, 7(38), 23363–23391. <https://doi.org/10.1039/c6ra27103k>
- Urnuksaikhan, E., Bold, B. E., Gunbileg, A., Sukhbaatar, N., & Mishig-Ochir, T. (2021). Antibacterial activity and characteristics of silver nanoparticles biosynthesized from *Carduus crispus*. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00520-2>
- Wei, L., Cai, C., Lin, J., & Chen, T. (2009). Biomaterials Dual-drug delivery system based on hydrogel / micelle composites. *Biomaterials*, 30(13), 2606–2613. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.006>
- Xu, L. C., Chen, C., Zhu, J., Tang, M., Chen, A., Allcock, H. R., & Siedlecki, C. A. (2020). New cross-linkable poly[bis(octafluoropentoxy) phosphazene] biomaterials: Synthesis, surface characterization, bacterial adhesion, and plasma coagulation responses. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 108(8), 3250–3260. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34662>
- Yang, J., Lee, C. H., Ko, H. J., Suh, J. S., Yoon, H. G., Lee, K., Huh, Y. M., & Haam, S. (2007). Multifunctional magneto-polymeric nanohybrids for targeted detection and synergistic therapeutic effects on breast cancer. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(46), 8836–8839. <https://doi.org/10.1002/anie.200703554>
- Zhang, F., Fan, J. bing, & Wang, S. (2020). Interfacial Polymerization: From Chemistry to

- Functional Materials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 59(49), 21840–21856. <https://doi.org/10.1002/anie.201916473>
- Zhang, H., Wang, G., & Yang, H. (2011). Drug delivery systems for differential release in combination therapy. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(2), 171–190. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.547470>
- Zhang, L., Beatty, A., Lu, L., Abdalrahman, A., Makris, T. M., Wang, G., & Wang, Q. (2020). Materials Science & Engineering C Microfluidic-assisted polymer-protein assembly to fabricate homogeneous functionalnanoparticles. *Materials Science & Engineering C*, 111(September 2019), 110768. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110768>
- Zhang, Y., Huynh, K., & Reed, C. A. (2008). Ambient temperature ring-opening polymerisation (ROP) of cyclic chlorophosphazene trimer [N₃P₃Cl₆] catalyzed by silylium ions. 9, 494–496. <https://doi.org/10.1039/b713933k>
- Zhao, J., Lu, C., He, X., Zhang, X., Zhang, W., & Zhang, X. (2015). Polyethylenimine-Grafted Cellulose Nano fi bril Aerogels as Versatile Vehicles for Drug Delivery. <https://doi.org/10.1021/am507601m>
- Zhou, N., Zhi, Z., Liu, D., Wang, D., Shao, Y., Yan, K., Meng, L., & Yu, D. (2020). Acid-Responsive and Biologically Degradable Polyphosphazene Nanodrugs for E ffi cient Drug Delivery. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00378>