

**İLAC TAŞIYICI SİSTEM OLARAK KULLANILMAK ÜZERE
KİL-PROTEİN KOMPOZİT NANOPARTİKÜLLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CLAY-
PROTEIN COMPOSITE NANOPARTICLES USING AS
DRUG DELIVERY SYSTEM**

ÖZNUR AKBAL

PROF. DR. HANDAN YAVUZ ALAGÖZ

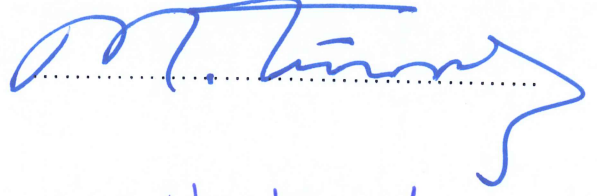
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2018

ÖZNUR AKBAL'ın hazırladığı “İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Kullanılmak Üzere Kil- Protein Kompozit Nanopartiküllerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP ANABİLİM DALI**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa TÜRK
Başkan



Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ
Danışman



Doç. Dr. Lokman UZUN
Üye



Doç. Dr. Nilay BERELİ
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Feray BAKAN
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- ☐ Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- ☐ Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- ☒ Tezimin/Raporumun 22.05.2021 tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

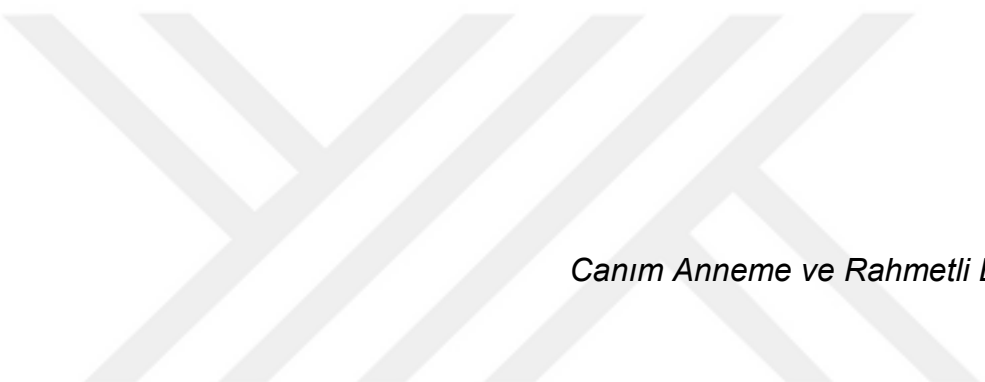
- ☐ Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

06 / 06 / 2018

A.Ö.
(İmza)

Öğrencinin Adı Soyadı

Öznur AKBAL



Canım Anneme ve Rahmetli Babama...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

22/05/2018

ÖZNUR AKBAL

ÖZET

İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM OLARAK KULLANILMAK ÜZERE KİL- PROTEİN KOMPOZİT NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

ÖZNUR AKBAL

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ

Mayıs 2018, 115 Sayfa

Kontrollü salım sistemleri geleneksel yöntemler ile kıyaslandığında azaltılmış toksisite, artırılmış verimlilik, hasta uyumu ve rahatlığı içeren avantajlara sahiptir. Biyolojik olarak bozunabilir polimerler, biyolojik uyumu ve çevre dostu özellikleri nedeniyle son yıllarda kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler arasında aktif bir taşıyıcı olarak şiddetle tavsiye edilmektedir. Bunların yanı sıra küratif etkilere sahip malzemeler kullanarak da kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmekte ve bu sayede hem etken maddenin yan etkilerinden uzaklaşmakta hemde kullanılan malzemenin tedavi edici özelliğinden faydalanılmaktadır. Kontrollü salım sistemlerinden nanopartiküller ilacın terapötik indeksini iyileştirmekte, toksisitesini azaltmakta, çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmakta ve uzun zaman periyodunda ilacın sürekli salımını sağlayarak kararlı etkin terapötik etki oluşturmalarını sağlamaktadır. Bu sebeplerden dolayı, sunulan tez kapsamında, kanser tedavisinde kullanılmak üzere kil-protein kompozit nanopartiküller sentezlenmiş, karakterize edilmiş ve kolon kanseri hücre hattı üzerinde saponin taşıyıcı sistem olarak sitotoksik etkinliği araştırılmıştır.

Sunulan doktora tezi kapsamında, literatürde ilk defa kompozit nanopartiküllerin desolvasyon tekniği ile hazırlanmasında protein olarak insan serum albümin (HSA) ve kil olarak montmorillonit (MMT) kullanılmıştır. HSA'nın, toksik etkisinin ve immunojenitesinin olmaması ve kolay modifiye edilmesi kullanım sebebidir. MMT ise yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve katyon değişim kapasitesi ile birlikte nanopartiküllerin gastrointestinal bariyeri geçmesi için muko-yapışkanlık sağlamasından dolayı tercih edilmiştir. Bu malzemeler kullanılarak hazırlanan kompozit nanopartiküllerin morfolojik özellikleri Taramalı ve Geçirimli Elektron mikroskobu (SEM, TEM) ile analiz edilmiştir. Kimyasal özellikleri ise Dinamik Işık Saçılımı (DLS), Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR), Enerji Dağılımlı X-Ray Analizi (EDX), Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Kütle Spektroskopisi (MALDI-TOF MS) ve Termogravimetrik Analiz (TGA) tekniği ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın son basamağında MMT-HSA kompozit nanopartiküllerin kanserli hücrelerle olan etkileşimleri incelenmiştir. Bu amaçla etken madde olarak, saponin (SAP) kanser hücreleri üzerinde sitostatik ve sitotoksik etkilere sahip olmasından dolayı tercih edilmiştir. Bu amaçla kompozit nanopartiküllerin kolon kanseri hücre hattı (DLD-1) üzerinde sitotoksik etkinliği belirlenmesi için gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA) ve nitel ve nicel hücre alım çalışmaları için konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ve fluorometre çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda, literatürde ilk defa sentezlenen MMT-HSA kompozit nanopartiküllerin kontrollü ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımının ümit vaad ettiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: İnsan serum albümin, montmorillonit, saponin, kolon kanseri, kompozit nanopartikül, kontrollü ilaç taşıyıcı sistem

ABSTRACT

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CLAY-PROTEIN COMPOSITE NANOPARTICLES USING AS DRUG DELIVERY SYSTEM

ÖZNUR AKBAL

**Doctor of Philosophy, Nanotechnology and Nanomedicine
Division**

Supervisor: Prof. Dr. HANDAN YAVUZ ALAGÖZ

May 2018, 115 Pages

Controlled release systems have advantages compared to conventional methods, including reduced toxicity, increased efficiency, patient compliance and comfort. Biodegradable polymers are strongly recommended as an active carrier among controlled drug delivery systems in recent years due to their biocompatibility and environmentally friendly properties. In addition to these, controlled drug delivery systems are developed by using materials with curative effects, both removes the side effects of the active substance and the therapeutic properties of the material are exploited. From controlled release systems, nanoparticles improve the therapeutic index of the drug, reduce toxicity, increase solubility and stability, and provide sustained release of the drug over a prolonged period of time to provide a stable, effective therapeutic effect. Due to these reasons, within the scope of the presented thesis, clay-protein composite nanoparticles were synthesized and characterized for cancer treatment and the cytotoxic activity was investigated on colon cancer as saponin delivery system.

In the scope of the presented doctorate thesis, human serum albumin (HSA) as protein and montmorillonite (MMT) as clay were used in the literature for the first

time to prepare composite nanoparticles with desolvation technique. The lack of toxicity and immunogenicity of HSA and its easy modification are the reasons for use. MMT has been preferred because of its high surface area / volume ratio and cation exchange capacity, as well as its ability to cross the gastrointestinal barrier of nanoparticles by providing mucoadhesion. The morphological characteristics of composite nanoparticles prepared using these materials were analyzed by Scanning and Transmission Electron Microscopy (SEM, TEM). Also, their chemical properties were evaluated by Dynamic Light Scattering (DLS), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX), Matrix Supported Laser Desorption / Ionization Mass Spectroscopy (MALDI-TOF MS) and Thermogravimetric Analysis. In the last step of the study, the interaction of MMT-HSA composite nanoparticles with cancerous cells was investigated. Saponin (SAP), as the active agent is preferred because it has cytostatic and cytotoxic effects on cancer cells. For this purpose, real-time cell analysis (RTCA) was performed to determine the cytotoxic activity of the composite nanoparticles on the colon cancer cell line (DLD-1) and confocal laser scanning microscope (CLSM) and fluorometer studies were performed for quantitative and quantitative cell uptake studies. As a result of the findings, MMT-HSA composite nanoparticles synthesized for the first time in the literature are promising as a controlled drug delivery system.

Keywords: Human serum albumin, montmorillonite, saponin, colon cancer, composite nanoparticle, controlled drug delivery system

TEŞEKKÜR

Hoşgörü ve sabrını benden esirgemeyen ve en çok teşekkürü hakeden değerli hocam Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş'a ve her zaman yanımda olan sevgili eşi Ayşe Denkbaş'a;

Doktora eğitimim boyunca tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, değerli hocam Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz'e

Tez çalışmam süresince fikirleriyle çalışmalarına yön veren sayın hocalarım Prof. Dr. Mustafa Türk ve Doç. Dr. Nilay Bereli'ye

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum arkadaşlarım Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu (BSRG) üyeleri Doç. Dr. Ebru Kılıçay, Dr. Tamer Çırak, Dr. Betül Bozdoğan Dr. Ebru Erdal, Dr. Zeynep Karahaliloğlu, Göknur Kara, Eda Öztürk, Gizem Daban ve Shukran Alpdemir'e,

Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜNİTEK) çalışma arkadaşlarım; Soheil Malekghasemi, Yeşim Tuğçe Yaman, Serhat Öztürk, Doç. Dr. Murat Demirbilek, Doç. Dr. Ömür Çelikkıçak, Dr. Cem Bayram ve sevgili hocam Prof. Dr. Serdar Abacı'ya;

Deneysel çalışmalarımda ve tez yazım aşamasında maddi manevi desteklerini benden esirgemeyen ve arkadaşlığını hep yanımda hissettiğim bana neşe veren sevgili Dr. Tayfun Vural'a;

Varlıkları ile beni her zaman mutlu eden sevgili çalışma arkadaşlarım Gazi Üniversitesi Polatlı Fen Edebiyat Fakültesi araştırma görevlisi Melek Sofyalıoğlu, Dr. Merve Can Gözcü, Evren Görkem Özdemir, Zeynep Çimen, Emel Karaca'ya;

Benim bu güne gelmemde emeklerini ve karşılıksız sevgilerini esirgemeyen canım anneme, rahmetli babama ve sevgili kardeşlerime;

Sonsuz Teşekkürler

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	I
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ÇİZELGELER.....	X
ŞEKİLLER	11
SİMGELER VE KISALTMALAR	14
1. GİRİŞ.....	16
2. GENEL BİLGİLER	18
2.1. Kanser ve Nanoteknoloji.....	18
2.1.1. Kolon Kanseri.....	19
2.1.2. Kompozit Nanoyapılar.....	21
2.2. Kil.....	24
2.2.1. Kil Minerallerinin Karakteristik Özellikleri.....	25
2.2.1.1. Kation Değişim Kapasitesi, Sorpsiyon ve Yük	26
2.2.1.2. pH	28
2.2.1.3. Şişme Kabiliyeti.....	29
2.2.1.4. Kil Minerallerinin Kristal Yapısı	30
2.2.2. Kil Minerallerinin Sınıflandırılması	32
2.2.2.1. Montmorillonit.....	35
2.2.2.1.1 Örnek Çalışmalar	38
2.3. Protein Temelli Nanoteknoloji	39
2.3.1. Nanopartikül Üretiminde Yaygın Kullanılan Proteinler.....	41

2.3.1.1. İnsan Serum Albümin (HSA).....	43
2.3.1.1.1 Örnek Çalışmalar	46
2.4. Sekonder Metabolitler	48
2.4.1. Saponin	48
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	53
3.1. Kimyasallar	53
3.2. HSA ve MMT-HSA Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu	53
3.2.1. HSA Nanopartiküllerin Hazırlanması	53
3.2.2. MMT-HSA Kompozit Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	54
3.2.3. Saponin Yüklü Albümin (HSA) Nanopartiküllerin Hazırlanması..	54
3.2.4. Saponin Yüklü MMT- HSA Kompozit Nanopartiküllerin Hazırlanması	54
3.2.5. HSA ve MMT-HSA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	55
3.2.5.1. Nanopartiküllerin Morfolojik Karakterizasyonu	55
3.2.5.1.1 Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Analizleri	55
3.2.5.1.2 Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) Analizleri.....	55
3.2.6. Nanopartiküllerin Kimyasal Karakterizasyonu	55
3.2.6.1. Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizleri	56
3.2.6.2. Dinamik Işık Saçılması (DLS) Yöntemi ile Nanopartikül Boyut ve Zeta Potansiyel Analizleri.....	56
3.2.6.3. Enerji Dağılımlı X-Ray Analizi (EDX)	56
3.2.6.4. Matris ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Kütle Spektroskopisi (MALDI-MS) Analizleri	56
3.2.6.5. Termogravimetrik Analiz (TGA).....	57
3.2.7. Su Alım (şişme) Testi	57

3.2.8.	HSA ve MMT-HSA NP'lerin Enkapsülasyon Verimliliğinin (% EE) Hesaplanması.....	57
3.2.9.	<i>In vitro</i> Salım Çalışmaları	58
3.2.10.	Nanopartiküllerin Hücresel Alım Ve Sitotoksosite Çalışmaları.....	58
3.2.10.1.	Hücre Kültürü	58
3.2.10.2.	Florescein İzotiyosinat (FITC) Bağlanmış MMT-HSA NP'lerinin Hazırlanması	59
3.2.10.3.	Nanopartiküllerin Hücresel Alımının Nitel Analizi	59
3.2.10.4.	Nanopartiküllerin Hücresel Alımının Nicel Analizi	59
3.2.10.5.	Sitotoksosite	60
3.3.	İstatistiksel Analizler	60
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	61
4.1.	HSA ve MMT-HSA Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu	61
4.1.1.	Zeta Potansiyel ve Dinamik Işık Saçılması (DLS) Analizi.....	63
4.1.2.	Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Analizleri	65
4.1.3.	Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) Analizleri.....	68
4.1.4.	Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizleri.....	71
4.1.5.	Enerji Dağılımlı X-Ray Analizi (EDX).....	75
4.1.6.	Termogravimetrik Analiz (TGA).....	75
4.1.7.	Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Kütle Spektroskopisi (MALDI-MS) Analizleri.....	76
4.1.8.	Su Alım (Şişme) Testi	79
4.2.	HSA ve MMT-HSA NP'lerin Enkapsülasyon Verimliliğinin (% EE) Hesaplanması	80
4.3.	Saponin Salım Çalışmaları	81
4.4.	Nanopartiküllerin Hücresel Alımının Nitel Ve Nicel Analizi.....	82

4.4.1.	Nanopartiküllerin Hücresel Alımının Nitel Analizi	82
4.4.2.	Nanopartiküllerin Hücresel Alımının Nicel Analizi.....	83
4.5.	Sitotoksosite	84
5.	SONUÇLAR.....	94
6.	KAYNAKLAR	98



ÇİZELGELER

Tablo 2-1. Kil minerallerinin sınıflandırılması.....	33
Tablo 4-1. Saponin ve MMT konsantrasyonunun kompozit nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyeli üzerine etkisi (n=3).....	64
Tablo 4-2. HSA ve MMT-HSA nanopartiküllerin belli süreler sonundaki su tutma miktarları.....	79



ŞEKİLLER

Şekil 2-1. Kolon Kanserinin Evreleri	20
Şekil 2-2. Kil bazlı kompozit yapı eldesinin şematik gösterimi [26]	23
Şekil 2-3. Kil yapılarında katyon değişiminin şematik gösterimi [32].....	26
Şekil 2-4. Ortam pH sınırın kil yüzey yüküne etkisi [28].....	29
Şekil 2-5. Killerde şişme kabiliyetlerinin şematik gösterimi [32]	30
Şekil 2-6. Silika tetrahedral ve alümina oktahedral yapısı [28].	31
Şekil 2-7. Farklı kil minerallerinin yapısı	32
Şekil 2-8. MMT nin 2:1 tabakalı yapısının şematik gösterimi.....	36
Şekil 2-9. Albümin zincir yapısı.....	45
Şekil 2-10. Saponin genel yapısı	49
Şekil 2-11. Steroidal saponinlerin genel yapısı	50
Şekil 2-12. Triterpenoid saponinlerin yapısı.....	51
Şekil 4-1. Kontrollü desolvasyon yöntemi	61
Şekil 4-2. Amino ve aldehit grupları arasındaki kimyasal çapraz bağlanma mekanizmasının şematik gösterimi [121]	62
Şekil 4-3. HSA nanopartiküllerin SEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 200nm	66
Şekil 4-4. SAP yüklü HSA nanopartiküllerin SEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 200 nm	66
Şekil 4-5. HSA-MMT kompozit nanopartiküllerin SEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 200 nm	67
Şekil 4-6. SAP yüklü HSA-MMT kompozit nanopartiküllerin SEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 200 nm.....	67
Şekil 4-7. MMT sonik prob yardımı ile dağıtılmadan önce ki TEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 1 mikron.....	68

Şekil 4-8. MMT sonik prob yardımı ile dağıtıldıktan sonra TEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 200 nm.....	69
Şekil 4-9. HSA NP'lerin TEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 100 nm	70
Şekil 4-10. HSA-MMT kompozit NP'lerin TEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 50 nm. 70	
Şekil 4-11. Saponin yüklü HSA-MMT kompozit NP'lerin TEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 50 nm.....	71
Şekil 4-12. Saponin, HSA NP ve saponin yüklü HSA NP'nin FT-IR spektrumları. 72	
Şekil 4-13. MMT, MMT-HSA NP ve MMT-HSA-SAP NP'lerin FTIR spektrumları. 74	
Şekil 4-14. MMT-HSA NP'lerin EDX analizi	75
Şekil 4-15. MMT, SAP, HSA NP'leri ve MMT-HSA-SAP NP'lerinin TGA analizi ...	76
Şekil 4-16. MMT-HSA-SAP NP'lerin MALDI-TOF kütle spektrumu (ek küçük resim: HSA'nın MALDI-TOF kütle spektrumu).....	78
Şekil 4-17. Saponin kalibrasyon grafiği	80
Şekil 4-18. SAP'nin HSA ve MMT-HSA NP'lerden (%) kümülatif salımı	81
Şekil 4-19. MMT-HSA NP'lerin hücre alımı ve hücre içi dağılımı. NP'ler (yeşil), 2 saat boyunca DLD-1 hücre çizgisi ile 0,5 mg/ml (A), 3 mg/ml (B) ve 5 mg/ml (C) konsantrasyonda inkübe edildi ve 40x büyütme kullanılarak CLSM ile görselleştirildi. Hücre zarları CF594-WGA ile boyanmıştır. FITC-bağlı MMT-HSA NP'lerin hücre alımı, sırasıyla FITC kanalı (sol panel), CF594 kanalı (orta panel) ve kombine CF594 ve FITC kanalları (sağ panel) tarafından görüntülendi.	83
Şekil 4-20. Farklı nanopartikül konsantrasyonların da (A) ve farklı inkübasyon sürelerinde (B) hücre ile etkileşim gösteren FITC bağlı MMT-HSA NP'ler	84
Şekil 4-21. 5, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonda HSA-SAP MMT-HSA ve MMT-HSA-SAP NP'lerinin DLD-1 hücre hattı üzerinde gerçek zamanlı hücre analizleri.....	85
Şekil 4-22. 5, 25 ve 50 µg / ml konsantrasyonda MMT-HSA-NP'lerinin DLD-1 hücre hattı üzerinde gerçek zamanlı hücre analizleri	87
Şekil 4-23. 5, 25 ve 50 µg / ml konsantrasyonda HSA-SAP NP'lerinin DLD-1 hücre hattı üzerinde gerçek zamanlı hücre analizleri	88

Şekil 4-24. 5, 25 ve 50 µg / ml konsantrasyonda MMT-HSA-SAP NP'lerinin DLD-1 hücre hattı üzerinde gerçek zamanlı hücre analizleri	89
Şekil 4-25. 50 µg / ml konsantrasyonda MMT, HSA ve SAP nin DLD-1 hücre proliferasyon hızları üzerindeki etkileri	90
Şekil 4-26. MMT-HSA-SAP NP'lerinin DLD-1 ve L929 hücre hatları üzerindeki Gerçek Zamanlı Hücre Analizi.....	92



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ζ zeta potansiyel

Kısaltmalar

MMT	Montmorillonit
HSA	İnsan serum albümin
SAP	Saponin
GA	Glutaraldehit
PLL	poli-L-lisin
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
ATR-FTIR	Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
DLS	Dinamik Işık Saçılması
MALDI-Tof-MS	Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi
TGA	Termogravimetrik Analiz
EDX	Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi
CHCA	α-cyano-4-hydroxycinnamic acid
DHB	2,5-Dihydroxybenzoic acid
HSA NP	HSA ile sentezlenmiş protein nanopartiküller
MMT-HSA NP	MMT ve HSA ile sentezlenmiş kompozit nanopartiküller
MMT-HSA-SAP NP	MMT ve HSA ile sentezlenmiş SAP yüklü kompozit nanopartiküller
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide)
mV	Milivolt
PBS	Fosfat tampon çözeltisi

DLD-1

İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı

L929

Fare fibroblast hücre hattı

RTCA

Gerçek zamanlı hücre analizi



1. GİRİŞ

Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra hastalığa bağlı ölümlerin ikinci en yaygın nedenidir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2014 yılında yapılan bir rapora göre 2030 yılında 25 milyon yeni kanser vakası beklenmektedir. Bunlara ek olarak, kolon kanseri, 2016 yılında kansere bağlı mortalitenin en yaygın nedenlerinden biri olarak ortaya çıkmıştır. Cerrahi, kemoterapi ve radyasyon terapisi, immünoterapi, hedefe yönelik tedavi, hormon tedavisi veya bu yaklaşımların kombinasyonu gibi kanser için birçok tedavi stratejisi vardır. Fakat bu tedavilerin hepsi ciddi yan etkileriyle sınırlıdır. Özellikle geleneksel kemoterapinin dezavantajlarından biri, ilacın istenmeyen yan etkileri olmaksızın tümör bölgesine yeterli miktarda ulaştırılamamasıdır. Nanoteknoloji, kanserli doku hedeflemesini arttırmak, biyolojik engelleri aşmak, ilaç çözünürlüğünü geliştirmek, ilaç dolaşım süresini arttırmak ve sistemik toksisiteyi azaltmak açısından kanserin tanı ve tedavisine yeni bir bakış açısı getirmektedir. Boyutları 1-500 nm olan, DNA gibi temel biyolojik malzemelere karşılık gelen nanomalzemeler, büyük ölçüde artmış yüzey alanı ve eşsiz mekanik, elektronik, fotonik ve manyetik özelliklerin dolaylı olarak ilaç ve gen dağıtımından biyomedikal görüntülemeye kadar geniş bir yelpazeye sahip uygulama alanı bulunmaktadır. Ayrıca, protein nanopartiküller, lipozomlar, lipid nanopartiküller, dendrimerler, miseller, altın nanopartiküller, kompozit nanopartiküller gibi nanoplatformlar kanser teşhis ve tedavisinde çeşitli sorunlara çözümler sunabilmektedirler. Bunların ötesinde, eşzamanlı teşhis, görüntüleme ve tedavi için çok fonksiyonlu nanopartiküller (MNP'ler), teragnostik olarak adlandırılan alan da kişiselleştirilmiş tıp için geliştirilmektedirler.

Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanan insan serum albümini (HSA), kandaki en bol miktarda bulunan proteindir ve karaciğer tarafından sentezlenir. Özellikle lipitlere, ilaçlara ve metal iyonlarına (bakır, nikel ve kalsiyum) yüksek bağlanma afinitesi göstererek onların taşınımında görev alır. Biyolojik bozunabilirlik, toksik etkisinin ve immunojenitesinin olmaması ve yüzey fonksiyonel grupları aracılığıyla kimyasal modifikasyonlar için uygunluk gibi üstün özelliklerinden dolayı tercih edilen bir ilaç taşıyıcıdır.

Kil mineralleri, jeoloji, kozmetoloji, malzeme bilimi, ilaç bilimleri, tıp, gıda bilimi ve biyoteknoloji gibi çok çeşitli alanlarda birçok araştırmanın odak noktası olmuştur. Bilinen dört binden fazla mineral arasında, otuz civarında hali hazırda ilaç ve

kozmetik endüstrilerinde kullanılmaktadır. Özellikle, kil mineralleri farmakoloji de giderek daha fazla kullanılmaktadır ve bu materyallerle ilgili araştırma ve inovasyonda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Çevre bilinci, kil minerallerinin kullanımına artan bir ilgi göstermiştir, bunun sebebi ise çevreye zarar vermemeleri ve her yerde kolayca bulunabilmeleridir. Her kil minerali kendine özgü yara iyileşmesi, cilt aydınlatması, deri hastalığı tedavisi, sebum (cildin doğal yağ yapısı) emilimi, antisepsi, nemlendirme, vaskülarizasyon ve toksin eliminasyonu gibi benzersiz bir kozmetik veya terapötik işleve sahiptir. Montmorillonit yüksek yüzey alanı/hacim oranı ve katyon değişim kapasitesi nedeniyle mükemmel adsorban özelliklerine sahip güçlü bir detoks ajanıdır. Kalın bağırsaktaki aşırı suyu emebilir ve böylece antidiyaretik olarak hareket edebilir. MMT nanopartiküllerin gastrointestinal bariyerini geçmesi için muko-yapışkanlık sağlar. Ayrıca, hematolojik, biyokimyasal ve histopatolojik analizlerle toksik olmadığı kanıtlandığı için bu özelliklerden dolayı kontrollü salım sistemleri için ilaç taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

Saponinler (SAP), bitki dokularında (kök, yaprak, gövde vb.) doğal olarak ortaya çıkan ve antimikrobiyal, antifungal, anti-enflamatuar ve hipokolesterolemik etkiler gibi çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip ikincil metabolitlerdendir. Doğada SAP'leri barındıran 100'den fazla bitki türü ve 150'den fazla SAP türü antikanser aktivitesi sergiler. SAP'ler bir lipofilik çekirdek ve bir karbonhidrat yan zincirine sahip bir grup glikozittir. Bitkiler tarafından, kuraklık ve parazit gibi stresli koşullardan kendilerini korumak için üretilmektedir. Karbon iskeletindeki varyasyonlara dayanarak, SAP'ler triterpen ve steroid olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Ve her iki tür saponin kanser hücreleri üzerinde sitostatik ve sitotoksik etkilere sahiptir.

Hem HSA hem de MMT'nin üstün özelliklerinden dolayı literatürde ilk defa MMT-HSA kompozit nanopartikül ilaç taşıyıcı sistem sunulan tez kapsamında sentezlenmiş, saponin taşınımı ve kolorektal adenokarsinoma hücreleri (DLD-1) üzerinde etkinliği değerlendirilmiştir. Bu doktora tezi ile küratif etkilere sahip materyaller kullanılarak nanopartiküler sistemlerin üretilmesi açısından yeni bir yaklaşım sunması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser ve Nanoteknoloji

Kanser, tedavisi hala tam olarak mümkün olmayan önemli bir ölüm sebebidir. 2008 yılında dünya çapında yaklaşık 12,7 milyon kişiye kanser teşhisi konmuş ve bu sayının 2030'a kadar 21 milyona çıkması beklenmektedir [1]. Başlıca kanser tedavisi yöntemleri arasında cerrahi, radyasyon, kemoterapi ve immünoterapi yer almaktadır. Bu tedavi yöntemlerinin her birinin avantaj ve dezavantajları vardır ve en etkili sonuçları elde etmek için genellikle bu yöntemlerin kombinasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır [2]. İnsanların sahip olduğu çoğu kanser (>% 85) katı tümörler olduğundan, mevcut kanser tedavi stratejileri genellikle, cerrahi tedavi öncesi katı tümörleri kemoterapi tedavisi ile küçültmek gibi birçok zorlu basamaktan oluşmaktadır [3]. Bunu daha sonra kalan tümör hücrelerini öldürmek için daha fazla kemoterapi ve / veya radyasyon tedavisi izlemektedir. Son 25 yılda kanser tedavisinin etkinliğini arttırmaya yönelik araştırma çabaları, hastanın hayatta kalmasında önemli bir iyileşmeye yol açmıştır. Ancak, kanser hastalarında tedavinin yan etkiler ve yaşam kalitesinin kötü olması ile ilişkili sorunlar hala önemli bir konudur [4].

İlaç etkinliğini iyileştirmek ve kanser tedavisinin yan etkilerini azaltmak için çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiş ve kullanılmıştır [5]. Bu taşıyıcılar arasında, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyo-uyumlu nanopartiküller (<100 nm) en çok dikkati çekmiştir. Antikanser ilaçların sistemik olarak verilmesi için, genellikle küçük partiküllerin (<500 nm) retiküloendotelyal sistemden (RES) kaçabileceği ve daha uzun bir sirkülasyon süresine yol açtığı kabul edilir [6]. Katı tümörler söz konusu olduğunda nanopartiküller tümörün bozuk damar sisteminden içeriye kolaylıkla sızarken, normal dokulardaki sağlıklı damarlardan çıkarılırlar. Tümör damar dokusunun gözenek büyüklüğü 200 ila 600 nm arasında değişmektedir ve bunun tümörlere nanopartiküllerin pasif hedeflenmesi için kullanılabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda, kanser tedavisi için çok sayıda nanopartikül ilaç taşıma sistemi geliştirilmiştir [7]. Birçok lipozomal sistem, polimer-ilâç konjugatları ve nanoküre ve nanokapsül formülasyonları, klinikte mevcut olan son teknolojinin ürünleridir. Hatta birçok nanopartikül formülasyonu çeşitli prelinik aşamadır ve gelişimleri test edilmektedir. Bu ilaç taşıma sistemlerinin birçoğu, ilaç direnci ve metastaz dahil olmak üzere zorlu kanser sorunlarıyla mücadele etmek için taşıma

sistemlerinin etkinliğini arttırmak amacıyla hem teşhis hem tedavi gibi hedeflemeye yönelik özelliklerde barındırır.

İdeal olarak, antikanser ajanlarının kanser tedavisinde etkili olması için;

- İlk önce vücuttaki çeşitli bariyerlerden geçerek kan dolaşımında çok az kayıp ile hedef tümör dokularına ulaşabilmelidirler.
- İkinci olarak, tümör alanlarına ulaştıktan sonra, normal hücrelere zarar vermeden tümör hücrelerini seçici olarak öldürme kabiliyetine sahip olmalıdırlar.
- Üçüncü olarak, istenen terapötik etkiye sahip olmak için kontrollü bir şekilde salınmalıdırlar [7], [8].

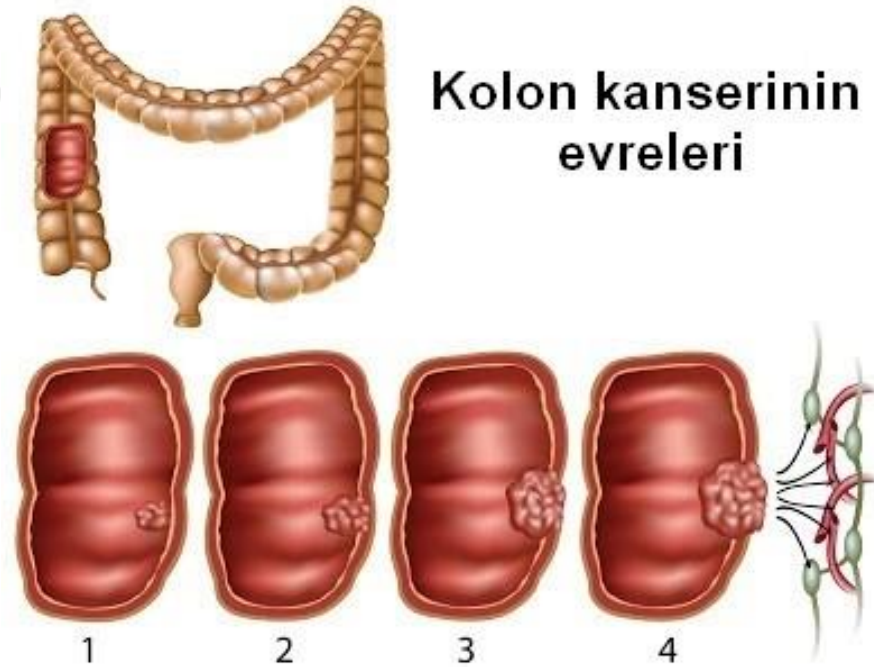
Parçacık büyüklüğü ve yüzey modifikasyonları sayesinde, nanopartiküller, bu gereksinimleri kanser tedavisi için etkili ilaç taşıyıcıları olarak karşılama potansiyeline sahiptirler. Protein bazlı nanopartiküller özellikle ilgi çekicidir çünkü nispeten güvenli ve hazırlanması kolaydır ve boyut dağılımı kolaylıkla ayarlanabilmektedir [9]. Çeşitli modifikasyon basamaklarından geçerek fonksiyonel ve hedefleme etkinlikleri birleştirilebilmektedir. Birçok çalışma, albüminin katı tümörlerde biriktiğini ortaya koymuştur ve bu özellik albümin bazlı nanopartiküllerin antitümör ilaçların hedefe yönelik olarak verilmesi için potansiyel bir taşıyıcı haline getirmiştir. Albümin, kaveole (oyuk) aracılı transsitoz yoluyla endotelial membranlar boyunca moleküllerin doğal biyolojik taşıyıcısı olduğundan albümin nanopartiküllerin kaveoleler vasıtasıyla hücreler tarafından alındığı düşünülmektedir [10].

2.1.1. Kolon Kanseri

Yüksek veya çok yüksek HDI'lı (Human Development Index) ülkelerde akciğer, meme, prostat ve kolorektal kanser en sık görülen kanserdir [11]. HDI, uzun süreli ve sağlıklı yaşam, eğitim seviyesi ve kişi başına düşen milli gelir ile ölçülen yaşam standardını gösteren birleşik bir endekstir. Son yıllarda, düşük veya orta HDI'lı ülkeler de meme, kolorektal ve akciğer kanserindeki artış, bu ülkelerin ekonomik ve insani gelişimlerini göstermektedir. IARC (Uluslararası Kanser Kayıtları Derneği) tahminine göre, dünya genelinde her yıl yaklaşık 12,6 milyon yeni kolon kanseri vakası ve 7,6 milyon ölüm olduğu bildirilmiştir. Kolorektal kanser yemek alışkanlıklarımıza ve yaşam biçimimize bağlı bir hastalık olarak ortaya çıkmakla birlikte genetik faktörlere de bağlı olabilmektedir. Erken tedavi edildiğinde ise, kolon

kanseri % 65-70'in üzerinde tatmin edici bir 5 yıllık kontrol oranına sahiptir ve erken teşhis için aile geçmişi çok önemlidir [12].

Kolon kanseri, sindirim sisteminizin son kısmı olan kalın bağırsak (kolon) kanseridir. Kalın bağırsaklar, ince bağırsakların devamında bulunan yaklaşık 1,5-2 metre uzunluğundaki alt sindirim sistemini oluşturan yapıdır. Rektum kalın bağırsağın son 10-15 cm lik kısmına verilen isimdir. Birlikte kolorektal kanserler olarak adlandırılır. Kolon kanseri vakalarının çoğu, adenomatöz polipler olarak adlandırılan hücrelerin küçük, kansersiz (benign) kümeleri halinde başlar. Zaman içinde bu poliplerin bazıları kolon kanserlerine dönüşebilmektedir. Kolon kanseri olan birçok insan, hastalığın erken evrelerinde hiçbir belirti yaşamaz. Semptomlar görüldüğünde, kalın bağırsaktaki kanserin büyüklüğüne ve konumuna bağlı olarak değişebilmektedir. Kolorektal kanser (CRC) dünya çapında mortalitenin önde gelen nedenlerinden biridir ve dünya nüfusunun artan yaşam beklentisi ve sağlıksız batı yaşam tarzı alışkanlıklarının edinilmesi nedeniyle insidansının artacağı tahmin edilmektedir [12], [13].



Şekil 2-1 Kolon Kanserinin Evreleri

Kolon kanserinin ilerlemesi 4 evrede gerçekleşmektedir. Bunlar;

EVRE I Kanserli doku kalın bağırsak iç yüzeyinde (mukoza) sınırlıdır. Kolon duvarından dışarı çıkmamıştır.

EVRE II Kalın bağırsak duvarına yayılmıştır fakat yakın lenf bezelerine geçmemiştir.

Evre III. Kanser hücreleri yakın lenf bezelerine yayılmıştır.

Evre IV. Uzak organ (akciğer, karaciğer vb) metastazı vardır [14].

Kolon kanserini tedavi etmek için kullanılabilen kemoterapi, yaşam süresinin uzatılmasını sağlar, ancak hastalığın iyileşmesine genellikle yardımcı olmaz. 5 - Flurourasil, kolon kanserinin tedavisinde kullanılan ilk ilaçtır [14]. Fakat diğer kemoterapi ilaçlarında olduğu gibi oldukça fazla yan etkiye sahiptir [15]. Bu nedenle, devam etmekte olan birçok araştırma, daha iyi bir güvenlik endeksine sahip çeşitli kaynaklardan yeni bir antikanser molekülü geliştirmeye odaklanmaktadır. Çeşitli nutrasötikler de çeşitli kanser türlerinin tedavisinde etkili oldukları için çalışılmıştır ve bitkilerin iyileştirici özellikleri esas olarak ikincil metabolitlerine dayanmaktadır [16]. Terpenoidler, alkaloidler, flavonoidler ve fenoller gibi birçok ikincil metabolit, çeşitli kanser türlerine karşı umut verici sitotoksik aktivite göstermiştir [17]–[19]. Buradan yola çıkarak, sunulan çalışmada DLD-1 kolorektal adenokarsinoma hücre hattı üzerinde bitki sekonder metabolitlerden olan saponin etkinliği araştırılmıştır.

2.1.2. Kompozit Nanoyapılar

Kompozitler, malzemelerden birinin takviye fazı olarak adlandırıldığı, lifler, tabakalar veya parçacıklar halinde olduğu ve matris fazı olarak adlandırılan diğer malzemenin içine gömüldüğü, iki malzemenin kombinasyonu dur [20]. Nanokompozitler ise, fazlardan en az birinin nanometre aralığında boyutlara sahip olduğu kompozit yapılardır. Ek olarak, boyutlar nanometre seviyesine ulaştığında, faz arayüzlerindeki etkileşimler büyük ölçüde artacağından dolayı, malzeme özelliklerini geliştirmek için de ayrıca önem arz etmektedir [21]. Yüksek performanslı bir malzeme olan nanokompozitler, sıra dışı özellik kombinasyonları ve benzersiz tasarım olanakları sergilerler. Geleneksel kompozitlerde bulunmayan tasarımdaki eşsiz özelliklere sahip olmaları bakımından 21. yüzyılın malzemesi oldukları bildirilmektedir.

Nanokompozitlerde, bileşenler nanometre ölçeğinde en az bir boyuta sahiptir. Bunlar;

- Nanopartiküller (Üç nano ölçekli boyut)
- Nanofiberler, nanotüpler, nanoteller (İki nano ölçekli boyut)
- Nanokiller, grafen (Bir nano ölçekli boyut) olarak yapıya katılabilmektedir [22].

Nanokompozit malzemeler, matris malzemelerine göre üç farklı kategoride sınıflandırılabilirler. Bunlar; Seramik Matris Nanokompozitler (CMNC), Metal Matris Nanokompozitler (MMNC) ve Polimer Matris Nanokompozitler (PMNC) dir [23].

Nanokompozitler, yapıya çok önemli özellikler katmaktadırlar [24]. Bunlar;

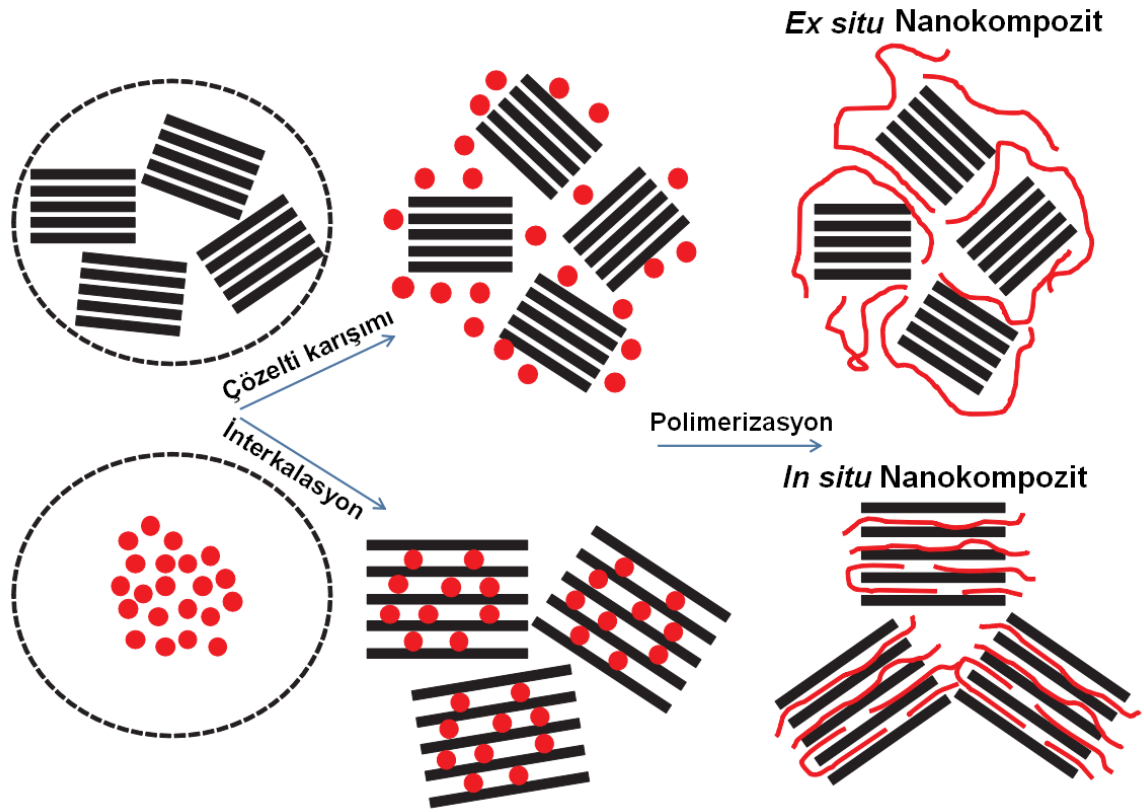
- ✓ Kuvvet, modül ve boyutsal kararlılığı içeren mekanik özellikler
- ✓ Elektriksel iletkenlik
- ✓ Azaltılmış gaz, su ve hidrokarbon geçirgenliği
- ✓ Alev Geciktirici
- ✓ Termal kararlılık
- ✓ Kimyasal direnç
- ✓ Yüzey görünümü
- ✓ Optik netlik

Nanokompozitlerin yayıldığı ve kullanıldığı alan sayısı hızla artmaktadır. Özellikle son zamanlarda, aşağıda bahsedilen alanlarda birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir [24], [25]. Bunlar;

- ✓ İlaç dağıtım sistemleri
- ✓ Anti-korozyon engelleyici kaplamalar
- ✓ UV koruma jelleri
- ✓ Yağlayıcılar ve çiziksiz boyalar
- ✓ Yeni yangın geciktirici malzemeler
- ✓ Yeni çizilme / aşınmaya dayanıklı malzemeler
- ✓ Üstün mukavemetli lifler ve filmler

Okpala'ya (2013) göre, bugün, nanokompozit araştırmaları çok yaygındır ve tüm dünyadaki şirketler ve üniversiteler tarafından yürütölmektedir. Basell USA, Bayer, Dow Chemical, Eastman Chemical, Mitsubishi Gas Chemical, Nanocor, Triton Systems, Honeywell ve RTP Co gibi firmalar bu yapıların ticarileşme potansiyelini ortaya koyan firmalardır. Bu firmalar daha çok poliolefin ve naylon üzerine yoğunlaşsalar da kil katkılı nanopartiköllerin de çok revaıda olduğunu bildirmiştir [20].

Polimer (protein)- kil nanokompozitlerin hazırlanması, iki şekilde yapılmaktadır. (şekil 2-2). şekilde de göröldüğü üzere, polimer-kil nanokompozitler, monomeri ve daha sonra kil süspansiyonunu içeren iki sulu çözeltinin doğrudan karışımı ile hazırlanabilir, polimer bir polimerizasyon maddesinin eklenmesiyle veya termal ya da ışık sergilenmesiyle oluşturulabilir.



şekil 2-2. Kil bazlı kompozit yapı eldesinin şematik gösterimi [26]

Birinci yöntemde elde edilen materyale ex situ nanokompozit denir çünkü polimerin büyük kısmı kil aralıkları dışında bulunur. Başlangııdaki kil konsantrasyonunun modöle edilebileceğinin ve bazı durumlarda kil tabakalarının tamamen ayrıldığının

belirtilmesi önemlidir, sonuç olarak ortaya çıkan materyal, eksfoliye polimer-kil nanokompozit olarak bilinir. İkinci yöntemde, monomer, killerin ara-katman boşluğunda, daha önce bir organik tuz ile modifiye edilmiş olan kil galerilerinin içinde ya da yük alışverişiyle ya da difüzyonla interkalasyona tabi tutulur. Daha sonra, interkalasyona uğramış polimer, polimerize edilebilir ve sonuçtaki materyal, in situ bir nanokompozit olarak bilinir çünkü polimerik içeriğin büyük kısmı, kil ara-boşlukları içinde yer alır [22], [26].

2.2. Kil

Yapısında birden fazla mineral ile birlikte eser miktarda metal oksit ve organik madde barındıran, ince taneli doğal kaya veya topraktan oluşan malzemeye kil denir. Su ile karıştırıldığında plastik özelliği gösterirken kurutulduğunda sertleşmekte ve fırınlandığında ise kalıcı olarak kimyasal ve fiziksel değişime uğramaktadır. Bu değişimlerden dolayı kil, seramik malzemeye dönüşmektedir. Devamında ise çeşitli dekoratif malzeme (çaydanlık, vazo vb.) yapımında kullanılmaktadır. Farklı minerallere sahip killeri kullanıldığında ve fırınlanma özelliği değiştirildiği takdirde çanak, çömlek ve porselen yapımında kullanılabilir [27].

Tamamen saf olarak bulunması mümkün olmayan kil yapısında daha çok hidrat alüminyum filo silikatlarla birlikte magnezyum, sodyum ve kalsiyum elementleri bulundurmaktadır. Diğer ince taneli maddelerden farklı olarak daha küçük boyut (2 μm) ve farklı mineral yapısına sahiptir ve yine bulunduğu toprak veya kayaya göre farklı renklerde olabilmektedir. Örneğin toprakta bulunan alüvyonların hem parçacık boyutu büyüktür (4-5 μm) hem de kil minerali barındırmamaktadır [28].

Kilin sahip olduğu özellikler sınıflandırılmasına oldukça yardımcı olmaktadır. Bu özelliklerden en önemlisi kil yapısının şişme özelliği olarak isimlendirilen su moleküllerini veya diğer polar iyonları absorblama yeteneğidir. Bu nedenle killeri şişme özelliği olan veya olmayan mineraller olarak sınıflandırılmaktadır. Şişme özelliğine sahip olan killeri smektit olarak isimlendirilmektedir [26].

Amorf (düzensiz) yapıda olduğu sanılan kil minerallerinin ilk kez 1930'da Hendricks ve 1931'de Kelly tarafından X-Işınları cihazında yapılan çalışmalarla kilin tabakalı yapıda oldukları fark edilmiştir. Yine yapılan farklı çalışmalar ile killerin yapısında kil minerali olmayan quartz, kalsit, illit ve prite gibi mineraller de içerdiği belirlenmiştir.

Sahip oldukları bu farklı minerallerden ve özelliklerden dolayı killerin renkleri (beyaz, gri, pembe, mavi, yeşil ve kahverengi) de farklılık göstermiştir [29].

Killerin küçük çapa sahip toz yapısında olması ve kristalografik özellikleri killere yüksek yüzey alanı özelliği katmaktadır. Bu özellik ile suyu yüzeylerine çekmekte ve etraflarında su kütlesi birikimine sebep olmaktadır buda suda süspansiyon oluşturmalarına olanak sağlamaktadır. Diğer yandan bütün kil yapıları suyu adsorblama özelliğine sahip iken bazıları suyu yapılarına katmaktadır (absorblama). Yani bazı killer suyu kristal yapılara yerleştirirken bazıları da yüzeye yerleştirmektedir. Smektitler suyu tabakaların aralarına yerleştirmektedir. Bu sayede hacimlerini yüksek oranda arttırabilmekte ve yapılarına eşsiz şişme özelliği katabilmektedirler [30], [31].

2.2.1. Kil Minerallerinin Karakteristik Özellikleri

Kil ve kil minerallerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri, yapı ve bileşimine bağlıdır. Kullanımı yaygın olan killerin yapısı ve bileşimi, her birinin temel bina yapısı olarak oktahedral ve tetrahedral tabakalardan oluşmasına rağmen çok farklıdır. Fakat tabiki oktahedral ve tetrahedral tabakaların düzeni ve bileşimi, fiziksel ve kimyasal özelliklerinde ki çoğu farklılığı açıklar.

Çoğu uygulamada, killer, son ürüne katkıda bulunan belirli fiziksel özellikler nedeniyle kullanılmaktadır. Fakat bazı durumlarda, kil kimyasal bileşimi için kullanılmaktadır (özellikle ilaç, kozmetik, gıda uygulamalarında) [31].

Kil materyalinin uygulamaları ile ilgili önemli fiziksel ve kimyasal özellikleri aşağıdaki gibidir;

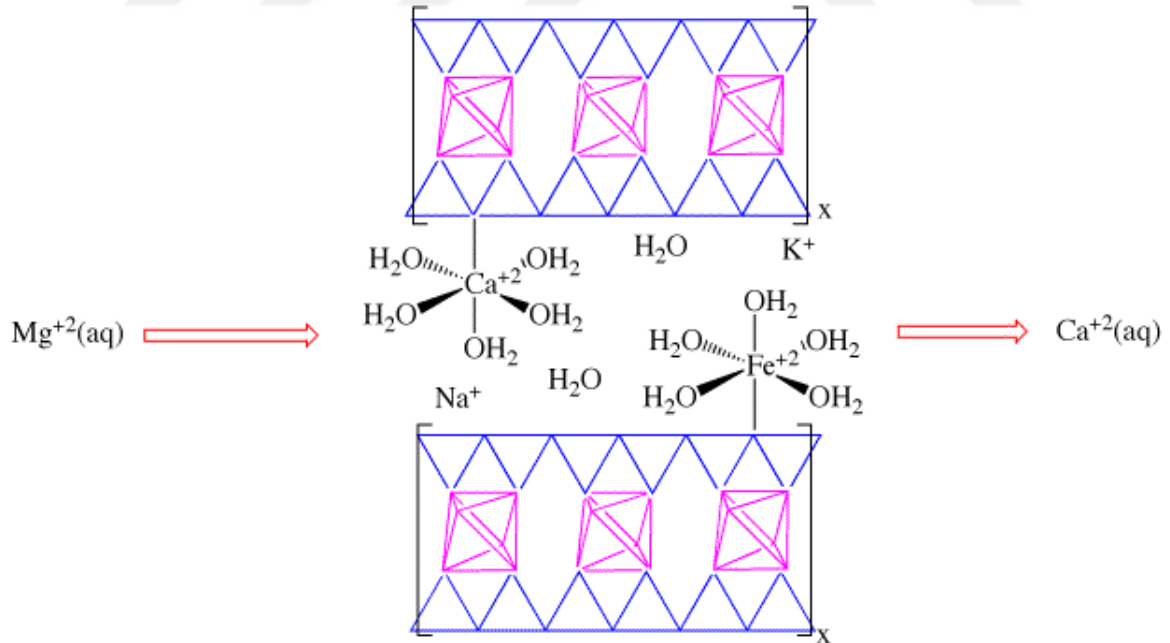
- Parçacık büyüklüğü, şekli ve dağılımı
- Mineraloji
- Yüzey alanı, yük ve kimyasal yapı
- pH
- İyon değişim kapasitesi
- Parlaklık ve renk
- Sorpsiyon kapasitesi

- Reoloji
- Seramik özellikleri
- Şişme kabiliyeti

2.2.1.1. Katyon Değişim Kapasitesi, Sorpsiyon ve Yük

Katyon değiştirme kapasitesi 100 g kil tarafından adsorplanan katyonların milieşdeğer sayısı (meq) olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir deyişle 100 g kildeki meq Na_2O miktarı olarak da ifade edilir.

Katyon değişim kapasiteleri killerin iki temel özelliğini ortaya çıkarmaktadır, bunlar yüzey alanı ve bu alanın yüküdür. Yüzey hem iç hem de dış olmak üzere iki yönlü olabilir. Dış katyon değişim kapasitesi sadece ortalama kristal boyutunu verirken iç katyon değişim kapasitesi ise hem katman yapısı üzerindeki genel yük dengesizliğini hem de killerin emme kapasitesini yansıtır. Değişim kapasitesi kil yapısının katmanları arasındaki ve dış yüzeyindeki emilen iyon sayısını (pozitif yüklü) ortaya çıkarır (Şekil 2-3).



Şekil 2-3. Kil yapılarında katyon değişiminin şematik gösterimi [32]

Kasyon değişim kapasitesinin farklılık göstermesi veya nedenleri;

1- Her bir kil biriminin (Silika-alümina birimlerinin) kenarındaki kırık bağlar, değişebilir kasyonlarla dengelenmiş yükler oluştururlar. Tanecik boyutu küçüldükçe kırık bağ sayısı artar bu da dolaylı yoldan Kasyon değişim kapasitesini artırır.

2- Kil yapısının içindeki katmanlar arasındaki dengelenmemiş yüklerin çoğu adsorplanmış kasyonlarla dengelenmiştir. Dengelenmemiş yük farkı kasyon değişim kapasitesini etkilemektedir.

3- Kırık bağların ya da açıkta kalan hidroksil grubunun hidrojeni ortamdaki protonlanmış yapılarla yer değiştirebilmektedir.

Tipik olarak küçük tane boyutu ($<2 \mu\text{m}$) olan kil mineralleri, geniş yüzey alanlarının varlığına neden olur. Bu yüzey alanları, katılar ve çevreleyen çözeltiler arasında iyon ve molekül değişimi için kullanılabilir. Bu değişim genellikle hızlı olan adsorpsiyon ve desorpsiyon yöntemleri ile gerçekleşir. Fakat burada bağlama kuvveti, zayıf van der Waals (fiziksel adsorpsiyon) ile güçlü absorpsiyon (elektrostatik adsorpsiyon) ve güçlü kimyasal bağlara (kemisorpsiyon) kadar değişir, bundan dolayı sadece adsorpsiyon olarak adlandırılır [33].

Kil minerallerinin yüksek emilim kabiliyeti vardır. Killer ayrıca, kristal yapıları ve diğer süreçlerindeki atomik ikameler tarafından üretilen elektrostatik yükler nedeniyle iyonları adsorbe eder. Adsorbe olmuş iyonlar, kil yüzeylerine sıkıca tutturulabilir veya kolayca hidratlanabilir ve değiştirilebilir. Bazı durumlarda, iyonlar silikat katmanları içindeki yapısal pozisyonlarda sabitlenebilir. Organik madde ve oksitler / hidroksitler aynı zamanda kil açısından zengin malzemelerin sorpsiyon kapasitesine önemli ölçüde katkıda bulunurlar [33]–[35].

Johnston ve arkadaşları, killerin üzerindeki organik moleküllerin emilimini etkileyen altı aktif bölgeyi listelemiştir [36].

1) Aynı şekle sahip olan ve izomorfik yer değiştirmeye sahip olmayan nötr 2:1 tabakalı kil yüzeylerinde ki değişim farkı Lewis baz bölgesi sonucu oluşur.

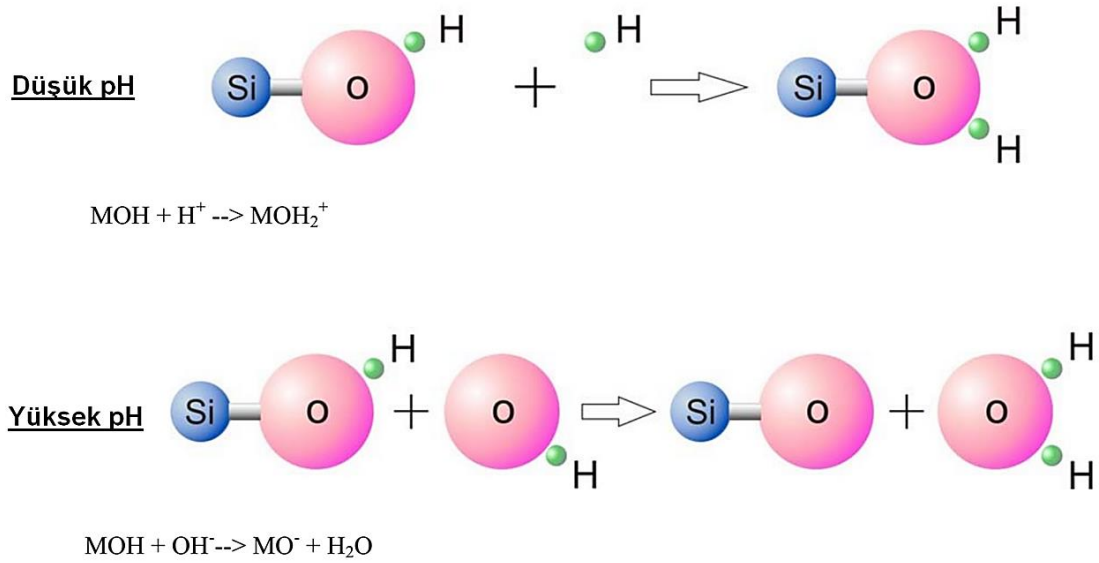
2) Kalıcı yüklü bölgeler (genellikle negatif), tetrahedral veya oktahedral tabakalarda izomorfik yer değiştirmenin meydana geldiği yerlerde olur.

3) İzomorfik yer değiştirme bölgelerindeki değiştirilebilir metal kasyonlar veya metaller, adsorbe edilen moleküller ile doğrudan etkileşime girebilir.

- 4) Değiştirilebilir katyonlar veya koordineli metal iyonları altında koordineli olarak yapılandırılmış polarize su molekülleri, yüzey asitliği sağlayan bölge olarak işlev görür.
- 5) Kil yüzeylere emdirilmiş organik moleküller, hidrofobik yüzeyler oluşturabilir veya değişim molekülleri için moleküler sütunlar olarak işlev görebilir.
- 6) Koordine metal iyonları ile ilişkili kırık kenar bölgeleri, bölgenin en aktif grupları arasında olan yüzey hidroksil grupları oluştururlar.

2.2.1.2. pH

Kil yapıları düşük pH'ta, protonların adsorpsiyonu nedeniyle pozitif bir yük geliştirirler. Daha yüksek pH'ta nötr bölgeler olabilmekte ve sonunda negatif bir yük geliştirebilmektedirler. Bu pH-bağımlı yük küçük parçacık boyutlarına ve sınırlı izomorfik yer değiştirmeye sahip killer için önemli bir faktör olabilir. Bunların ötesinde, proton ve hidroksillerin yanı sıra diğer potansiyel belirleyici katyon ve anyonların eşzamanlı adsorpsiyonu, yüzeyde katyonlar ve anyonların toplam yüklerinin sıfıra eşit olduğu “sıfır yük alanı” kavramına yol açar. Yükün sıfır olması solüsyondaki anyonlara karşı katyonların eşit olduğu anlamına gelmez. Çünkü, kil mineralleri için potansiyel belirleyici iyonlar H^+ ve OH^- ve H^+ ve OH^- ile bağlanarak oluşan kompleks iyonlardır. Örneğin bazı killerin (kaolinit) bazal oksijen yüzeyinde, O_2 molekülleri hidroksil oluşturmak için H^+ ile bağlanır. Bu yüzeyler, diğer protonlar veya hidroksiller ile asitler veya bazlar olarak da reaksiyona girer: Bu nedenle yüzey yükü pH'a bağımlıdır (Şekil 2-4) [30], [35].



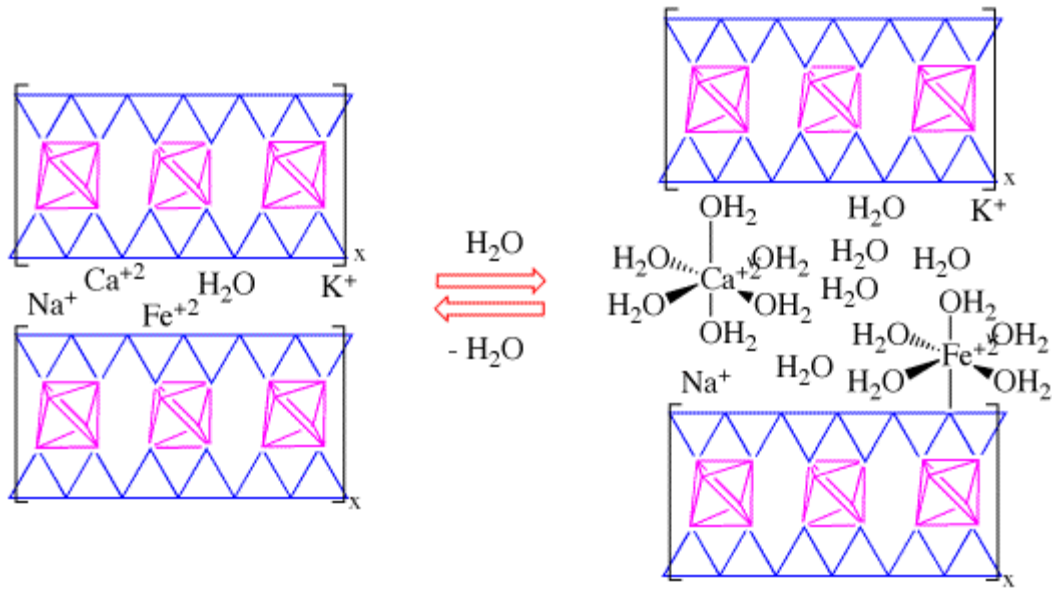
Şekil 2-4. Ortam pH sınırı kil yüzey yüküne etkisi [28]

2.2.1.3. Şişme Kapiliyeti

Smektitlerdeki ara katman sadece hidrate değil, aynı zamanda genişleyebilme özelliğine sahiptir (Şekil 2-5). Bireysel smektit tabakaları arasındaki boşluk aşağıdakilere bağlı olarak değişir:

- 1) mevcut iç katyonların türü (Na^+ gibi tek değerlikli katyonlar ya da Ca^{2+} gibi daha fazla genişlemeye neden olan iki değerli katyonlar),
- (2) çevreleyen çözeltideki iyon konsantrasyonu ve
- (3) mevcut su miktarı.

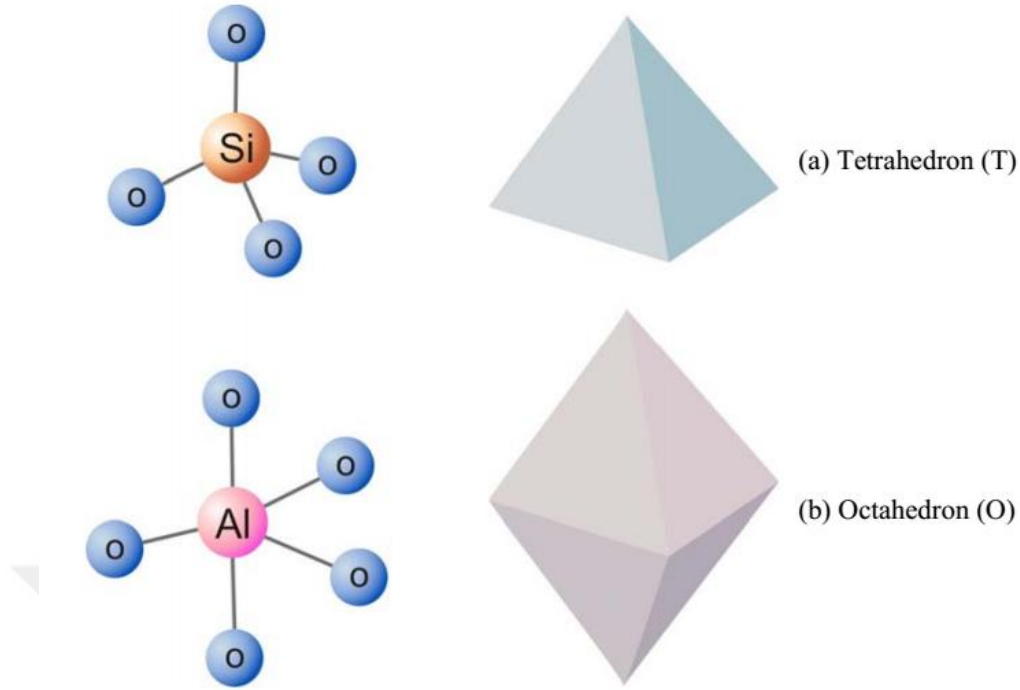
Ara tabakanın genişleyebilir olması nedeniyle, smektitler genellikle "şişebilen kil" olarak adlandırılır [37], [38].



Şekil 2-5. Killerde şişme kabiliyetlerinin şematik gösterimi [32]

2.2.1.4. Kil Minerallerinin Kristal Yapısı

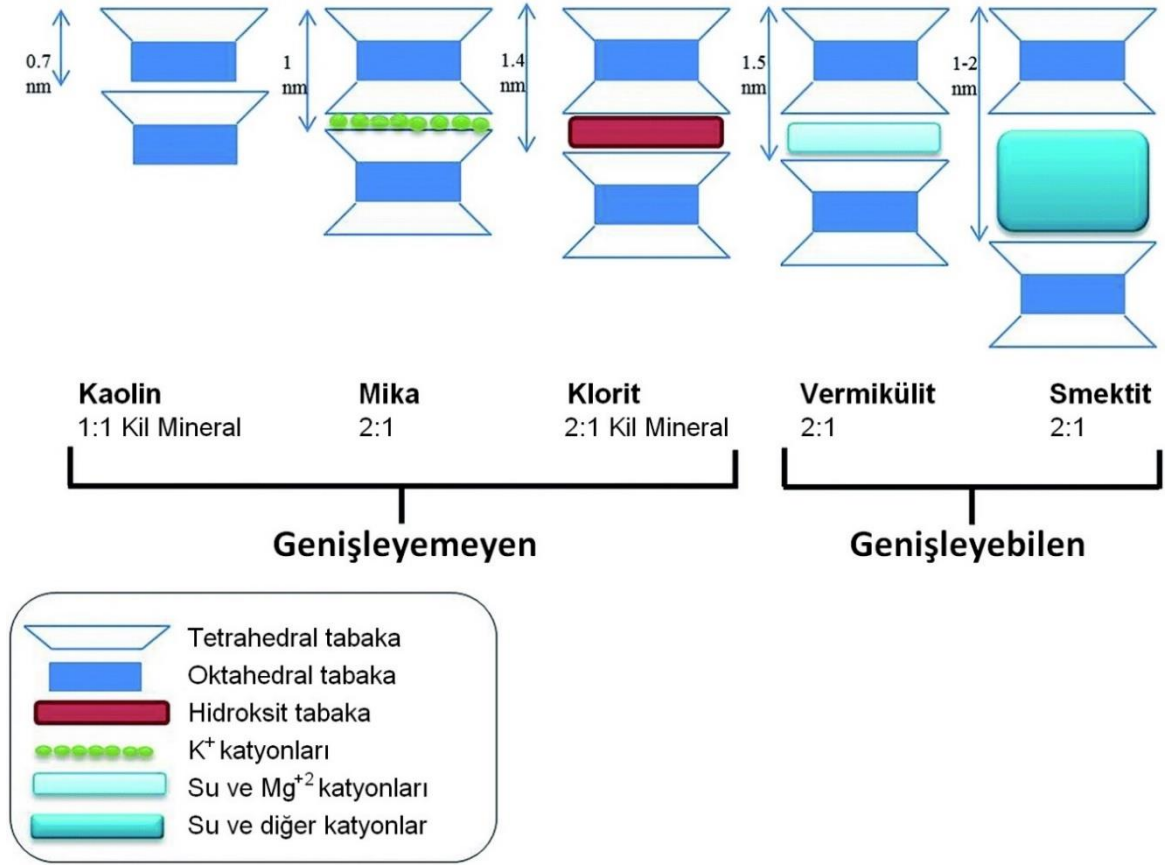
Kil mineralleri önceden de bahsedildiği gibi katmanlı silikat veya filosilikat yapılardan oluşmaktadır. Yapılarındaki atomların dizilişinden dolayı düz ve katmanlı bir morfolojiye sahiplerdir. Tetrahedral (düzgün dört yüzlü) ve oktahedral (düzgün sekiz yüzlü) olarak isimlendirilen kafes şeklinde kristal yapılardır. Tetrahedral ve oktahedral tabakalarının üst üste ve yan yana paket şeklinde bir araya getirilmesi ve ortak konumdaki oksijen atomları aracılığıyla birbirine bağlanmasıyla oluşturulur (Şekil 2-6).



Şekil 2-6. Silika tetrahedral ve alümina oktahedral yapısı [28].

Tetrahedral tabakası bir silisyum katyonunun dört tane oksijen ile bağ yapmasıyla oluşmaktadır ve kil yapısının en basit halidir ve SiO_4 ($2\text{Si}^{4+}\text{O}_4$) olarak ifade edilir. Silikon atomları birbirine oksijen atomlarını paylaşılarak kovalent olarak bağlanırlar. Yapıdaki her bir katyon etrafı koordine olmuş oksijen veya hidroksil iyonları ile sarılıdır. Oktahedral tabakası, katyon atomları olan alüminyum (Al), demir (Fe) ve magnezyum (Mg) gibi iyonların etrafında 6 oksijen veya hidroksil (OH^-) iyonları olacak şekilde sekiz yüzlü bir yapıdadır ve oktahedral oksijenlerinin diğer oktahedral birimler ile paylaşılmasından alümina tabakaları oluşur. Böyle bir yapının temel içeriği xR^nO_3 olarak ifade edilir. Burada x: $6/n$ ve R: katyon (iki veya üç değerlikli) olmasını ifade eder. Katyon iki değerlikli yani divalent ise yapı dioktahedral, üç değerlikli yani trivalent ise trioktahedral adını alır.

Tetrahedral ve oktahedral tabakaların dizilimi ve oksijen paylaşımları farklı yapıda ve özellikle minerallerin oluşmasına sebep olmaktadır (Şekil 2-7) [30], [39], [40].



şekil 2-7. Farklı kil minerallerinin yapısı

İki veya üç tabakadan oluşan kil minerallerine doğada tamamen teorik olarak açıklanan yapıda rastlamak zordur. Çünkü kafes yapısındaki iyonlar birbirinin yerine geçebilmektedir ki buna izomorf yer değişimi denir. Doğada bulunan killerin  eşitleri veya türleri, tetrahedral ve oktahedral bölgelerdeki aynı veya farklı yüklerin kanyonlarının ikameleri yoluyla oluşur. Bu ikameler mineralojistler tarafından verilen mineral adını belirlemede yardımcı olur ve parçacıkların fiziksel özelliklerini ve termal ve kimyasal parametrelerin bir fonksiyonu olarak kil minerallerinin kararlılık limitlerini belirler [26], [28].

2.2.2. Kil Minerallerinin Sınıflandırılması

Kil minerallerinin birçok sınıflandırma yolunun olması ile birlikte genel olarak tabaka sayısı ve oranına göre üç temel gruba ayrılır. Bunlar 1:1 (bir düzgün dört yüzlü, bir düzgün sekizyüzlü) tabakalı olanlar; kaolinit, 2:1 (iki düzgün dört yüzlü, bir düzgün sekizyüzlü) tabakalı olanlar; smektit (montmorillonit) ve ilit, 2:1:1 (iki düzgün

sekizyüzlü, bir düzgün dörtyüzlü ve bir düzgün sekizyüzlü) tabakalı olanlar; klorit olarak adlandırılırlar [41].

Kil mineralleri arasındaki önemli yapısal ve kimyasal farklılıklar, bireysel mineral tür isimlerinin ve türlerin gruplar halinde düzenlenmesinin yani sınıflandırılmasının temel sebebidir. Kil minerallerinin sınıflandırılması, CMS ve AIPEA Adlandırma Komiteleri tarafından yapılmıştır ve buna göre yaygın kil mineralleri olan düzlemsel sulu fillosilikatlar, tabaka tipine, net tabaka yükünün büyüklüğüne, ara katman malzemesinin tipine, oktahedral tabakanın karakterine ve tek tek türlerin kompozisyonuna veya yapısına göre sınıflandırılmışlardır. Birçok kil grubu olmasına rağmen en yaygın bilinen ve kullanılanları kaolin, simektit, illit, klorit ve paligorsit'dir [22], [42]. Genel yapılan sınıflandırma Tablo 2-1'de açıklanmıştır.

Tablo 2-1. Kil minerallerinin sınıflandırılması [43],

<i>Sınıf ve yapı</i>	<i>Tabaka</i>	<i>Grup</i>	<i>Altgrup</i>	<i>Çeşit</i>
Tabaka fillosilikatlar	1:1 tabakalı olanlar	Kaolin	Kaolinit	
			Halloysit	
			Dikit	
			Nakrit	
	2:1 tabakalı olanlar	Smektit	Dioktahedral smektit	Montmorillonit
				Beidellit
				Nontronit
			Trioktahedral smektit	Saponit
		İllit		Hektorit
				Saukonit
	2:1:1 tabakalı olanlar	Mika	Dioktahedral	Muskovit
				İllit
				Fengit
			Trioktahedral	Biogit
İskelet fillosilikatlar	Tektosilikatlar	Zeolit		
		Kuartz		
		Feldispat		
Zincir silikatlar	Sepiyolit	Sepiyolit		
	Paligorsit	Paligorsit		
		Atapulgit		

Kaolin grubu mineralleri, kaolinit, nakrit, dikit ve halloysit içerir ve doğada en yaygın kil mineralleri arasındadır. Her tabaka bir tetrahedral ve bir oktahedral silikat tabakadan oluşan 1:1 katmanlı bir yapıya sahiptir ve oktahedralin üçte ikisinde alüminyum yer almaktadır. Kaolinit, nakrit, dikit minerallerinin tümü aynı kimyasal bileşime sahiptir: $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$, birbirlerinden sadece 1:1 katmanlarının istiflenme şekli açısından birbirinden ayrılırlar. Halloysit, tamamen hidratlanmış formunda, $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ideal kimyasal formüle sahiptir. Kaolin grubu mineralleri içerisinde en çok bulunan kaolinit yapısı, özellikleri ve endüstriyel uygulamaları bakımından en çok ilgi çekmektedir. Doğal olarak oluşan kaolinler tipik olarak çok çeşitli parçacık büyüklüklerine, parçacık kristallenmesine, küçük element kompozisyonlarına ve interkalasyon reaksiyonları için kimyasal reaktiviteye sahiptir. Bu özelliklerin yanı sıra opaklık ve viskozite, kaolinleri, kağıt, boya, dolgu malzemeleri, seramik ve porselen olmak üzere çok çeşitli kullanım alanları sunar. Dahası, eğer spesifik yüzeyleri ve/veya katyon değişim kapasiteleri arttırılırsa katalizörler, metal temizleyiciler, taşıyıcılar ve emiciler olarak kullanımı dahil olmak üzere birçok başka uygulamada kullanılabilmektedirler [44], [45].

İllit, smektit grubu minerallerden farklı olarak potasyum içermektedir ve bu gruba mika grubu da denir. Genel formülü $(\text{K},\text{H})\text{Al}_2(\text{Si},\text{Al})_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ dur. K'nın boyutu, yükü ve koordinasyon numarası, bitişik silika tetrahedral tabakalarındaki oksijenin altıgen halkasına tam olarak oturacak şekildedir. Bu özellik yapıya katmanları bir arada tutan ve su moleküllerinin simektit içinde olduğu gibi ara katmanı işgal etmesini önleyen güçlü bir birbirine geçmeli iyonik bağ sağlar. Bu nedenle illitin bir potasyum simektiti olduğu söylenebilir. Muskovit minerali olarak adlandırılmakla birlikte dolgu maddesi olarak ve sondaj çamurunda kullanılırlar [46], [47], [48].

Klorit grubu üyeleri, değişken x ve ara kat hidroksit tabakası olan bir 2:1:1 katmanı içerir. Oktahedral tabakanın her ikisi de dioktahedral (di / di) veya trioktahedral (tri / tri) veya karışık (di / tri veya tri / di) olabilir. 2:1:1 tabakasındaki oktahedral tabaka Mg ile doldurulur, ancak ara katman hidroksit tabakası Al'in Mg ile yer değiştirmesi ile oluşmuştur. Bu nedenle ara katman net bir pozitif yüke sahiptir. Klorit grubu killeri ince taneli ve yeşil renklidir. Bu grup killeri bol miktarda, magnezyum, demir (II),

demir (III) ve alümina içerir. Genel formülü $X_{4.6}Y_4O_{10}(OH)_8$ olup endüstriyel bir kullanımı yoktur [49].

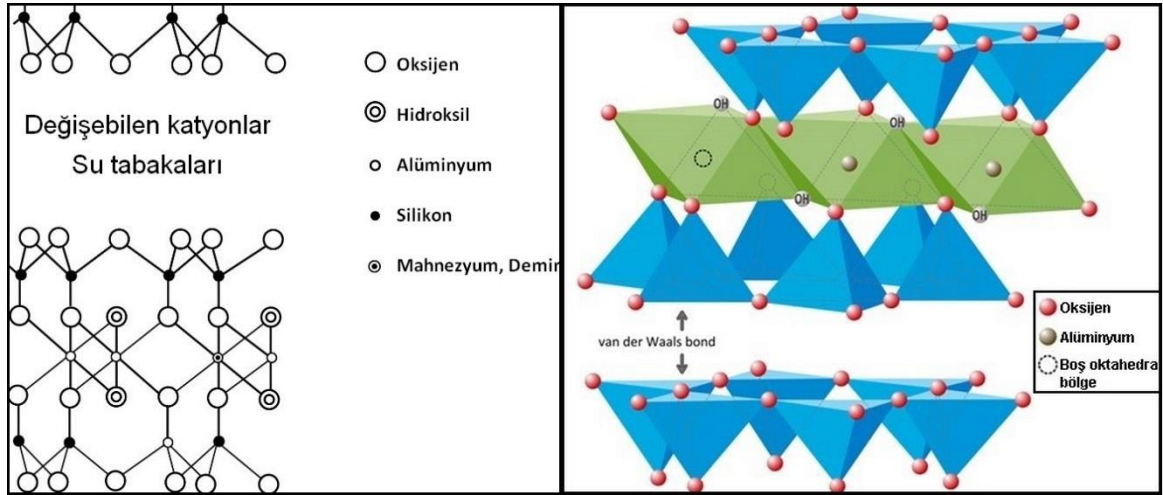
Paligorsit, oktahedral tabakasında Mg^{+2} iyonları iki farklı yapısal pozisyonadadır: (1) su moleküllerine koordine edilen yapısal blokların sınırları üzerinde; ve (2) blokların içinde, hidroksil gruplarına bağlı olarak. *Paligorsit* in genel formülü $(Mg; Al)_2Si_4O_{10}(OH).4H_2O$. *Paligorsit* yapısındaki sudan biri oktahedral katyonlara koordine edilen ve zeolitik olarak adlandırılan kanallara yerleşiktir ve bu kanallar ayrıca değiştirilebilir katyonlar içerebilir. Sahip olduğu eşsiz kimyasal özellik, bu modüle edilmiş materyallerle ilgili "zeolit benzeri" kanalların bir sonucudur [40].

Smektit, başlıca simektit mineralleri Na-montmorillonit, Ca-montmorillonit, saponit (Mg-montmorillonit), nontronit (Fe-montmorillonit), hektorit (Li-montmorillonit) ve beidelit (Al-montmorillonit) 'dir. *Smektit* mineralleri, merkezi oktahedral tabakalı iki silika tetrahedral tabakadan oluşur ve 2: 1 tabakalı mineral olarak adlandırılır. Teorik formül $Ca_{0.17}(Al,Mg,Fe)_2(Si,Al)_4O_{10}(OH)_2.nH_2O$ olup, ara katman malzemesi içermeyen teorik bileşim SiO_2 , % 66.7; Al_2O_3 , % 28,3; ve H_2O , % 5 dir. Bununla birlikte, simektit olarak, oktahedral tabakasında ve bazılarında tetrahedral tabakanın içinde önemli bir yer değiştirme vardır. Tetrahedral tabakasında, alüminyum ile silikonun ve oktahedral tabakasında, magnezyum ve demir yer değiştirebilmektedir. Eğer oktahedral tabaka çoğunlukla Al tarafından doldurulursa, simektit minerali beidelittir; Mg ile doldurulursa, mineral saponittir; ve Fe tarafından doldurulur ise, mineral Nontronittir. Beidellitlerin toprak ortamlarında daha yaygın olduğu, oysa montmorillonitin tipik bir jeolojik malzeme olduğu bilinmektedir. *Smektit* mineral parçacıkları çok küçüktür ve bundan dolayı X-ışını kırınım verilerinin analiz edilmesi zordur. Sunulan tez kapsamında smektit grubu killerden olan montmorillonit kompozit nanopartikül üretiminde kullanılmıştır [50], [51].

2.2.2.1. Montmorillonit

Montmorillonit (MMT), ticari adı bentonit olan ve alüminyum ve magnezyumca zengin volkanik kül, tuf ve lavların kimyasal ayrışması ile veya bozulmasıyla oluşmuş yapısında çok küçük kristallere sahip ve alüminyum silikat yapıda, yumuşak, gözenekli ve kolayca şekil verilebilen kilin saflaştırılması ile elde edilir. Yapısında magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), demir (Fe), sodyum (Na), alüminyum (Al) ve potasyum (K) gibi elementler barındırır. Doğada teorik olarak genel

formülüne hiç rastlanmamıştır bu nedenle yapısal değişiklik olmadan genel formülü $(OH)_4Si_8Al_4O_{20}.nH_2O$ dur. Doğada bulunduğu hali ise su molekülleri ile bir arada olduğu formudur. MMT genişleyebilen dioktahedral tabakalı killerdendir ve diğer kil gruplarına göre yüksek şişme yani su adsorblama ve absorblama kapasitesine sahiptir. MMT nin 2:1 tabakaları van der Waals ve zayıf katyon-oksijen bağları ile bir arada tutulur (Şekil 2-8). Ara tabakada su molekülleri arasında yer alan değiştirilebilir katyonların varlığı, kristal kafes yapısının mineral hidrat olarak genişlemesini sağlar. Kurak ortamda katlar arasındaki bazal aralık 1 nm den az iken mineral su ile doyurulduğunda bazal aralık 2 nm' ye yaklaşabilir. Farklı renkte ve çeşitte MMT lere rastlamak mümkündür. Yüksek adsorpsiyon (katyon değişimi) ve plastisite kabiliyetine sahip olmaları, taneciklerin elektrik yüklü olmaları, gelişmiş sıvı emme yetenekleri, kolloidal yapı göstermeleri, boyutlarının küçük, yüzey alanlarının büyük olmaları suda oldukça iyi şişebilmeleri gibi özellikler MMT nin endüstride kullanımına olanak sağlamıştır. Kristal yapısı monoklinik-prizmatik, ortalama yoğunluğu 2,35 g/cm³, molekül ağırlığı 549,07 g/mol olan, yumuşak, şekillenebilir, gözenekli, iyonlaşma kapasitesi oldukça yüksek olan smektit grubu bir kildir [52], [31], [53].



Şekil 2-8. MMT nin 2:1 tabakalı yapısının şematik gösterimi

Kil taneciğinin alanı küçüldükçe kilin yüzey alanı artar. MMT için bu değer yaklaşık 800 m²/g'dır ve bunlar ağırlıklarının 5-6 katı kadar su adsorplaya bilmektedir. Bunun yanı sıra MMT için sıfır yük dengesi <pH 2-3 tür. Bu nedenle düşük pH'ta, tetrahedral

tabakanın bazal oksijen yüzeyi ile temas halinde olan solüsyon aşırı protonlar içerecektir. Bu nedenle yüzey daha sonra bir anyon değişim kapasitesi sergileyecektir. İzoelektrik nokta karşılık gelen pH aralığında, ki bu MMT için pH 2-3 arasındadır, tetrahedral tabakanın bazal oksijen yüzeyi proton ve hidroksil dengesinde olacaktır. Bu nedenle yüzey daha sonra hiçbir değişim kapasitesi göstermeyecektir. Yüksek pH'ta ise, tetrahedral tabakanın bazal oksijen yüzeyi ile temas halinde olan solüsyon, fazla hidroksil içereceğinden MMT yüzeyi daha sonra bir katyon değişim kapasitesi sergileyecektir. Buradan yola çıkarak MMT için hesaplanan katyon değişim kapasitesi 80-120 meq/100g'dır. Bu özelliklerin tümü MMT'nin bağlanmasını veya su alımını etkilemektedir. MMT'nin hızlı su alma ve genişleme yeteneği, değiştirilebilir katyonların bileşimine bağlı olarak 105 ila 390° C arasında değişen kritik bir sıcaklığa ısıtıldıktan sonra kaybolur. Su alma yeteneği MMT kullanımını ve ticari değerini etkiler [54], [43].

Montmorillonitin endüstri ve sanayi gibi birçok kullanım alanı vardır. Bunlardan en önemlileri; eczacılık ve kozmetik alanında özellikle dolgu maddesi olarak, sanayide sıvı ve katı yağ rafinesinde asitlerle yapısı değişen yağları ağartmak ve kirlilikten arındırmak da kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra, suyun sertliğinin giderilmesi, su geçirmez malzeme üretimi, boya, emaye ve kimya endüstrisinin çeşitli kollarında, çimento ve sıvalarda, yol, kanal ve baraj yapımında da (yapı mühendisliği) kullanılmaktadır [41], [29].

MMT'nin birçok kullanım alanı olmakla birlikte son zamanlarda çeşitli polimerler ile karıştırılarak kompozit üretim çalışmalarında kullanılmıştır. Bu sayede kullanılan polimere killerin muhteva ettiği özellikler eklenince yepyeni bir kompozit polimer yapısı ortaya çıkmaktadır. Bu özellikler polimeri, daha dayanıklı, daha yumuşak, ısı ve pH değişimlerine karşı kuvvetli hale getirmek gibi özellikler katmaktadır. Tüm bunların yanı sıra nanokil olarak isimlendirilen nano boyutta kil veya montmorillonit kullanılarak ilaç taşıyıcı sistemlere yeni bir yaklaşım getirilmiştir [55].

Medikal kil olarak adlandırılan MMT farmasötik ürünlerde aktif ajan olarak kullanılmaktadır. İnterkalasyon, şişme, iyon değişimi ve süper emici özelliklere sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı, bir detoksifikatör olarak vücudun içindeki zararlı ve toksik maddeleri adsorbe edebilir ve aynı zamanda antidiyare görevi alır. Bağırsağın yüzeyinde mukus, mukozanın epitel hücrelerine yapışır. MMT, doğrudan mukus üzerine etki ederek mukozal bariyeri stabilize eder ve yapışkan mukusun

kalınlığını ve reolojik özelliklerini değiştirebilir. Bu sayede, gastrointestinal mukozanın doğal savunmasını destekler. MMT içeren polimerik nanoparçacıklar, anti kanser ilaçların gastrointestinal bariyeri geçerken meydana gelebilecek bozulmalara karşı aktif koruma sağlayabilir. Aynı zamanda yüksek adsorblama özelliğinden dolayı bu ilaçların bariyerdan geçişini kolaylaştırır. Bu sayede hem ilaçlar korunmuş olacak hem de ilaç kaynaklı olası yan etkiler hedef dokuya ulaşana kadar elimine edilmiş olacaktır [56], [57].

Sunulan tez kapsamında saponin yüklü HSA nanopartiküllerin gastrontestinal bariyerdan geçişini kolaylaştırmak, saponinin korumak ve vücuda verebileceği olası yan etkilerinden uzaklaştırmak için MMT-HSA kompozit nanopartiküller hazırlanmış ve karakterize edilmiştir.

2.2.2.1.1 Örnek Çalışmalar

MMT özellikle farmasötik ilaç uygulamalarında tercih edilen malzemelerdendir. Tercih edilmesinin en önemli sebepleri, gastrointestinal (GI) bariyeri geçme ve steroidal metabolitler gibi bakteriyel ve metabolik toksinleri adsorbe etmek için geliştirilmiş jel mukavemeti, muko-yapışkanlık yeteneği gibi özelliklere sahip olmasıdır.

Hua ve ark., 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada MMT- kitosan karışımı ile hidrojel yapı hazırlamış ve bunu yaygın olarak çeşitli bakteriyel hastalıkların tedavisinde kullanılan florokinolon türü bir antibiyotik olan oflaksinin taşınımında kullanmışlardır. Bunun için interkalasyon yöntemi kullanmışlar ve ardından iyonik olarak çapraz bağlamışlardır. Elde ettikleri nanokompozit yapıyı daha sonra SEM, FT-IR ve XRD ile karakterize etmişlerdir. Son aşamada şişme ve in vitro ilaç salım testleri uygulamışlardır [58].

Başka bir çalışmada Banik ve ark., 2014 yılında sundukları makalede, karboksimetil-kitosan ile MMT kullanarak iyonik jelasyon yöntemi ile kompozit nanopartikül sentezlemişler ve isoniazidin, antitüberküloz ilaç, kontrollü salımında kullanmışlardır. Sonrasında karakterizasyon çalışmaları yapmışlar ve bunun için SEM, TEM, XRD, NMR, FT-IR kullanmışlardır. Çalışmanın devamında ilaç hapsetme verimliliği, yüzde şişme derecesi ve kümülatif salım açısından verimliliğini değerlendirmişlerdir. Sonuçta elde ettikleri kompozit yapının ilaç salım çalışmalarında kullanılabilecek uygun aday olduğunu tespit etmişlerdir [59] .

Li ve ark., 2013 yılında Poly(D, L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite ile modifiye solvent ekstraksiyon / buharlaştırma metodu ile nanokompozit partiküller üretmiş ve eksemestan, erken evre veya ileri evre meme kanseri olan postmenopozal kadınların tedavisinde kullanılan bir steroidal aromataz inaktivatörü, yüklemiş ve çeşitli fizikokimyasal ve farmasötik özelliklerini karakterize etmişlerdir. Caco-2 ve MCF-7 hücre hatlarında *in vitro* sitotoksikite çalışmalarını değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda oldukça biyouyumlu ve eksemestanın oral yoldan taşınımı için yüksek potansiyele sahip olduğunu tespit etmişlerdir [60]. Yine Sun ve ark., 2008'de yaptıkları bir çalışmada PLGA/MMT nanopartikülü hazırlayıp meme kanseri tedavisinde trastuzumab taşınımı için kullanmışlardır. Sonuçlar oldukça umut vaad edicidir [61] .

Feng ve ark., 2009'da poly(lactic-co-glycolic acid)–montmorillonite nanopartikül (PLGA/MMT NPs) ve poly(lactide)– vitamin E TPGS/montmorillonite nanopartikül (PLA–TPGS/MMT NPs) formülasyonlarını sentezlemişler ve Dosetaksel yükleyerek *in vitro* sitotoksikite ve salım çalışmalarını değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonunda sentezlenen nanopartiküllerin Dosetaksel'in oral yoldan biyoyararlanımını arttırdığını tespit etmişlerdir [52].

Sarmah ve ark., 2015 yılında gelatin ile MMT den nanokompozit hazırlayıp isoniazid yüklemişlerdir. Çalışmanın sonucunda MMT ile kompozit yapılmış nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerinde MMT içermeyen nanopartiküllere kıyasla daha sitotoksik etki gösterdiği bilgisine ulaşmışlardır [62].

MMT ile kompozit yüzey sentez çalışmaları çok yapılmış ancak nanokompozit olarak özellikle ilaç taşıyıcı sistem uygulamalarına literatürde çok az rastlanmıştır. Tez kapsamında literatürde yer almayan HSA ile MMT den nanokompozit elde edilmiş, model ilaç olarak saponin yüklenmiş ve kolon kanseri hücre hattı üzerinde *in vitro* sitotoksik etkisine bakılmıştır.

2.3. Protein Temelli Nanoteknoloji

Protein temelli nanoteknoloji, nanoteknolojinin genişleyen alanı ile nano ölçekli proteinlerin çalışmasını birleştirir. Proteinler, molekül taşıma ve DNA replikasyonu gibi önemli biyolojik fonksiyonların temelini sağlayan amino asit zincirlerinden oluşan çok yönlü biyomoleküllerdir.

Proteinin eşsiz yapısı ve kendiliğinden düzenlenme özelliği, proteinlerin işlevsel biyolojik malzemelere dönüştürülmesine uygun hale getirir. Protein temelli nanoteknolojide ortaya çıkan gelişmeler, proteinin nanoteknoloji uygulamalarında önemli bir element olarak kullanımına olanak sağlamaktadır.

Proteinler, biyolojide benzer rollere sahip oldukları için materyal geliştirmede ve nano ölçekli makineler oluşturmak için uygundur. Biyolojik ortamda meydana gelen karmaşık protein oluşumları, halkalar, tüpler ve kafesler, nanomakineler için potansiyel yapı bloklarıdır. Nano ölçekli yapıların birbiri içinde montajı yani bir araya gelip yeni bir yapı oluşturmaları küçük boyutlarda manipülasyon zor olduğu için zorluk teşkil etmektedir. Proteinlerin kullanımı, diğer biyomoleküllere doğal afinite gösterdiği ve kendiliğinden düzenlenebildiği için çözüm sunmaktadır [63], [64].

Nanopartikülleri inşa etmek için proteinlerin uygulanmasının avantajları şunlardır:

- Protein yapılarının doğal oluşumu, kendiliğinden düzenlenen nanopartikül oluşumuna özellikle uygundur. Ayrıca hem lifli hem globüler proteinler büyük stabiliteye sahiptir.
- Proteinlerin temel amino asit zinciri yapısı, modifikasyon için oldukça uygundur. Sahip olduğu fonksiyonel uçlar ile taşıma, tutunma vb işlemlerde kullanılabilirler.
- Amino asitleri oluşturan birincil sekansın genetik kontrolü, fonksiyonelliğin artması için daha fazla fırsat sağlar. Genetik modifikasyon ile yeni yapıların üretimi söz konusu olabilmektedir.
- Proteinler büyük miktarlarda üretilebilmeleri kolay temin edilebilen bir kaynak malzeme olarak karşımıza çıkmasını sağlamaktadır [64], [9].

Nanopartiküller, özellikle terapötik ve diagnostik ajanların taşınımı ve dağıtımı için çeşitli uygulamalarda giderek daha fazla kullanılmaktadır. Kanser tedavisi için çok sayıda nanoparçacık ilaç verme sistemi geliştirilmiştir ve antikanser ilaçların terapötik etkinliğini ve güvenliğini arttırmak için çeşitli maddeler ilaç dağıtım ajanları olarak araştırılmıştır. Proteinler gibi doğal biyomoleküller, güvenliklerinden dolayı

ilaç formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan sentetik polimerler için cazip bir alternatiftir. Genel olarak, protein nanopartikülleri biyouyumluluk ve biyo-bozunurluk dahil olmak üzere bir dizi avantaj sunar. Toksik kimyasallar veya organik çözücüler kullanılmadan uygun koşullarda hazırlanabilirler. Ayrıca, tanımlanmış birincil yapıları nedeniyle, protein temelli nanopartiküller, ilaçların kovalent bağlanmasını ve hedefleme ligandlarını içeren yüzey modifikasyonları için çeşitli olanaklar sunmaktadır [65].

2.3.1. Nanopartikül Üretiminde Yaygın Kullanılan Proteinler

Genel olarak proteinler, hem biyomedikal hem de malzeme biliminde eşsiz işlevselliklere ve potansiyel uygulamalara sahip bir doğal moleküller sınıfıdır. Hem ilaç hem de çözücü ile iyi etkileşime girmelerine olanak tanıyan amfifilitesi nedeniyle nanopartikül hazırlığı için ideal malzemeler olarak kabul edilirler. Doğal proteinlerden türetilen nanoparçacıklar, biyolojik olarak parçalanabilir, metabolize edilebilir ve ilaçların bağlanmasına ve ligandların hedeflenmesine olanak sağlayarak yüzey modifikasyonlarına kolayca uyum sağlarlar. Suda çözünebilir proteinler (örn., sığır ve insan serum albümini) ve çözünmeyen proteinler (ör., zein ve gliadin) dahil olmak üzere çeşitli proteinlerden başarıyla sentezlenmiştir. Yaygın kullanılan proteinler aşağıda kısaca açıklanmıştır [9]

Jelatin, nanopartiküllerin üretimi için kullanılabilecek protein temelli malzemelerden biridir. Cilt, kemik ve bağ dokularının önemli bir bileşeni olan kolajenin kontrollü hidrolizi ile elde edilen en yaygın hayvansal proteinlerdendir. Asit veya baz hidrolizini takiben iki farklı tipte jelatin, A ve B, üretilir. Bu da farklı izoelektrik nokta (pI), moleküler ağırlık, amino asit bileşimi ve viskoziteye sahip proteinler ile sonuçlanır. Örneğin jelatin tip A, 7-9 aralığında pI değerine sahipken, jelatin B tipi 4-5 aralığında bir pI'ye sahiptir. Jelatin, genel olarak, jelatin kapsüller gibi farmasötik preparasyonlarda kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmış güvenli (GRAS) bir yardımcı madde olarak kabul edilir. Toksik olmaması, çapraz bağlanabilmesi ya da kimyasal olarak modifiye edilmesi kolaydır. Bu nedenle, mikroküreler ve nanopartiküller gibi ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılmak üzere muazzam bir potansiyele sahiptir. Jelatin, başka birçok avantaja sahiptir: (a) ucuzdur, (b) sterilize edilebilir ve heterojen değildir ve (c) düşük antijeniteye sahiptir. Jelatinin temel bir özelliği yüksek glisin, prolin (esas olarak hidroksprolin) ve alanin içeriğidir. Jelatin, konjugasyon veya kimyasal modifikasyon için potansiyel bölgeler

olan karboksil, amino, fenol, guanidin ve imidazol gibi birçok iyonize edilebilir gruba sahiptir. Glutaraldehit gibi kimyasal çapraz bağlama maddelerinin eklenmesi, modifiye edilmemiş jelatine kıyasla jelatin stabilitesini, şeklini ve in vivo olarak artan dolaşım süresini vermektedir. Bu özelliklerin hepsi nanopartikül üretiminde jelatini uygun bir aday yapmaktadır [64], [66], [67]

Zein, yüksek oranda hidrofobik amino asitler, prolin ve glutamin içeren prolamin açısından zengin bir proteindir. Mısır çekirdeğinin endosperminden elde edilen bir proteindir. Bu hidrofobik protein, filmler ve kaplamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Zein, insan uygulamaları için FDA tarafından onaylanmış bir GRAS polimerdir. İlaç verme ve gıda uygulamalarında partikül sistemleri hazırlamak için kullanılmıştır. Zein proteinlerinden elde edilen nanopartiküller, ivermektin, kumarin ve 5-Florourasil (5-FU) dahil olmak üzere çeşitli ilaçları ve biyoaktif bileşikleri kapsüllemek üzere hazırlanmıştır. Bu çalışmalar, zeinin güçlü bir ilaç taşıma materyali olarak kullanımını göstermiştir [68], [69].

Soya fasulyesi (*Glycine max L.*) en bol bitki protein kaynağıdır. *Soya protein* izolatu (SPI) olarak bilinen zenginleştirilmiş soya proteini formunun, yüksek besin değerlerine ve içerik fonksiyonlarına sahip olduğu bildirilmiştir. Özellikle gıda çalışmalarında geniş yer tutmaktadır. Ek olarak, SPI, çeşitli ilaçların kullanılmasına izin veren dengeli polar, polar olmayan ve yüklü amino asit bileşimlerine sahiptir. SPI'nin ana bileşenleri glisinin (MW = 360,000, ~% 60) ve β -konglisinindir (MW = 180,000, ~% 40). Sulu bir ortamda, bu bileşenler, bir miktar suda çözünür agregatlar olarak hidrofilik kabuk ve hidrofobik çekirdekten oluşan küresel yapılar olarak bulunurlar. Çözücü veya çapraz bağlama ajanlarının eklenmesi ile SPI molekülleri, mikroküreler, hidrojel ve polimer karışımları gibi çeşitli yapıların oluşumuna katılabilmektedir [70], [71].

Gliadin, buğdayda biyo-yapışma özelliği gösteren, oral ve topikal ilaç verme uygulamaları için araştırılan bir gluten proteindir. Gliadin, mukus membranlarına yapışabilen muko-yapışkan nanopartiküllerin hazırlanması kullanılan bir polimerdir. Biyolojik olarak bozunabilirliği, biyouyumluluğu ve doğal kaynağı nedeniyle nanopartikül üretiminde kullanılmıştır. Hidrofobikliği ve çözünürlüğü, yüklü ilaçları koruyabilen ve serbest bırakılmalarını kontrol edebilen nanopartiküllerin tasarımına olanak sağlar. Gliadin, nötr ve lipofilik amino asit kalıntıları bakımından zengindir ve

müsin ile bağ geliştirebilen amin ve disülfür grupları içerir. Bu özellikleri gliadini nanopartikül üretiminde güçlü bir aday yapmıştır [72], [73].

Legümen, bezelye tohumlarının (*Pisum sativum* L.) ana depolama proteinlerinden biridir. Kazeine benzeyen ve kükürt içeren amino asit kaynağı olarak işlev gören bir albümine benzer bir proteindir. Bu protein, agregasyon veya glutaraldehit ile çapraz bağlandıktan sonra nanopartiküller oluşturmak için kendiliğinden düzenlenebilmektedir[74], [75].

Peynir altı suyu proteinleri, değişken bileşimin ve fonksiyonel özelliklerin globüler proteinlerinin bir karışımıdır. Peynir altı suyu protein konsantreleri (WPC) ve peynir altı suyu protein izolatları (WPI) gibi çeşitli peynir altı suyu protein ürünleri, gıda protein bileşenleri olarak endüstriyel üretilmektedir. Peynir altı suyu proteini ilaç taşıma sistemlerinin üretiminde kullanılmıştır. Peynir altı suyu proteinleri hidrofobik bileşenlere bağlanma yeteneği nedeniyle lipofilik bileşikler için ilaç taşıma sistemlerinin hazırlanmasında uygun bir adaydır [76], [77].

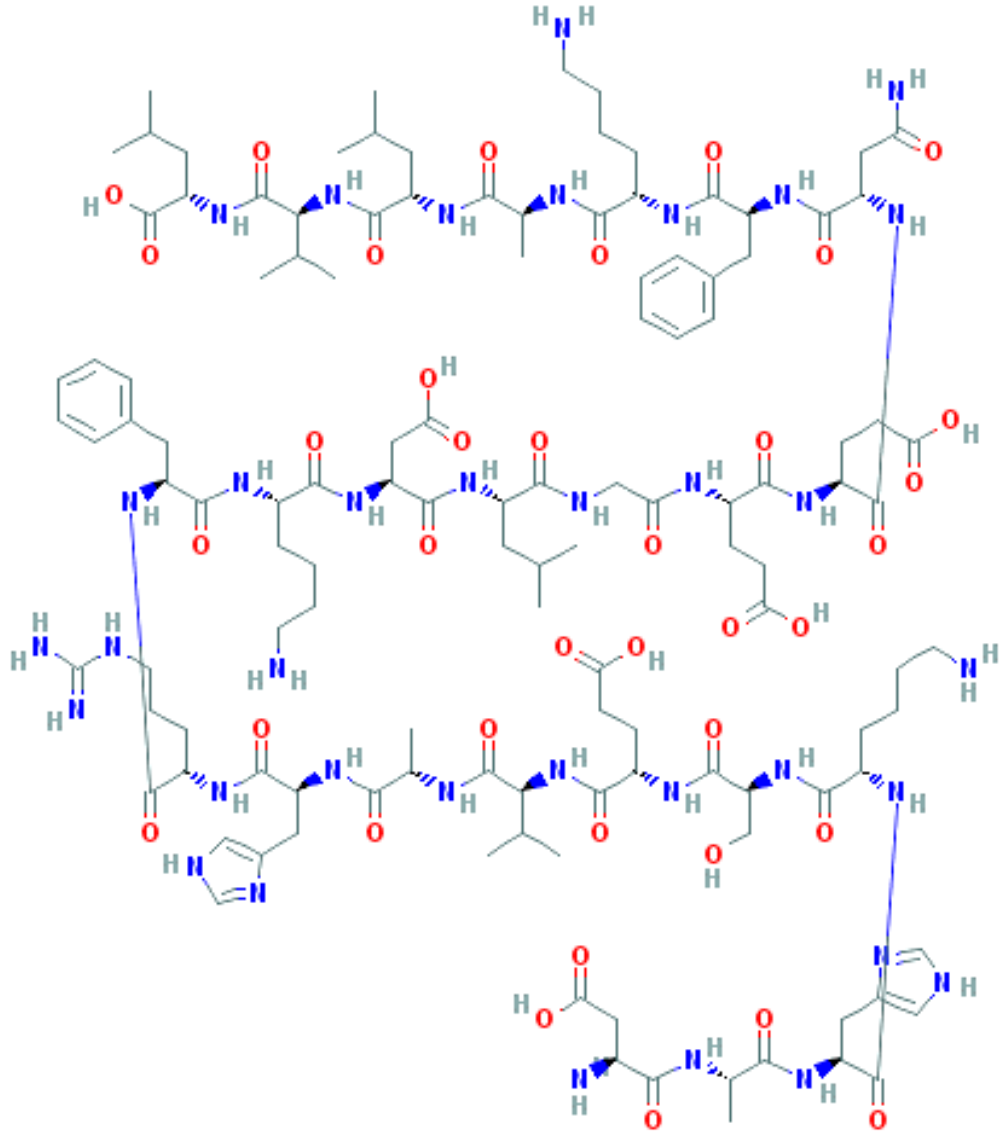
Elastin, bağ dokularında elastik olan ve vücudun birçok dokusunun gerilmeden veya büzülmeden sonra şeklini yeniden oluşturmaya izin veren temel bir bileşendir. Elastin, çözünebilir öncü tropoelastinin lizin aracılı çapraz bağlanmasıyla oluşturulur. İlaç taşıma uygulamaları için iki tür elastin türevi polipeptid vardır. Bunlar, α -elastin ve elastin benzeri polipeptidlerdir [78], [79].

Tüm bu proteinlerin yanı sıra sunulan çalışmada insan serumundan elde edilen albümin proteini (HSA) MMT ile kompozit nanopartikül üretiminde kullanılmıştır.

2.3.1.1. İnsan Serum Albümin (HSA)

Albümin insan kan plazmasında en fazla bulunan proteindir ve karaciğerde N-uç peptidine sahip preproalbümin olarak sentezlenir ve Endoplazmik Retikulum tarafından salınır. Salınan proalbümin Golgi veziküllerinden ayrılarak albümin olarak dolaşıma katılır. Albümin, kan serum proteininin yaklaşık yarısını içeren çözünür, monomerik bir proteindir. Özellikle steroidler, yağ asitleri ve tiroit hormonları için bir taşıyıcı protein olarak işlev görür ve hücre dışı sıvı hacmini stabilize etmede rol oynar. Albümin, molekül ağırlığı 66,437 Da olan küresel ve glikolizlenmemiş serum proteindir. 584 amino asit ve 16,961 nükleotid uzunluğuna sahiptir. Yapısında 35 adet sistin isimli tiyol grubu ve bunların oluşturduğu 17 disülfid bağı barındırır. Bu disülfid bağları küresel yapıya dayanıklılık kazandırırken

çevreleyen ortamda meydana gelen varyasyonlara yanıt olarak yapısal değişikliklere izin verecek kadar esneklik sağlar. Sistin-34 isimli tiyol grubu bağ yapmadan serbest halde kalır. Günde 10 ile 15 g arasında üretilmekte olup bu nedenle ucuz ve kolay elde edilir. Albümin asidik bir yapıya sahiptir ve suda kolay çözülür. Albüminde oleik, linoleik, linolenik, arasidonik, palmitik ve miristik asit gibi uzun yağ asidi moleküllerinin bağlanabildiği, altı bağlanma yeri vardır. Ayrıca, küçük aromatik karboksilik asitlerin ve negatif yük içeren çok halkalı bileşiklerin bağlandığı iki bağlanma yeri daha vardır. Kullanılan ilaçlar buralardan albümine bağlanarak taşınır. Yüzeyinde fonksiyonel grup olarak karboksilik asit (COOH), amin (NH₂) ve hidroksil (OH) uçları bulunur. pH 4-9 arasında oldukça stabil, %40 lık etanolde çözünebilir bir yapısı vardır ve 10 saat kadar 60 °C ye dayanıklılık göstermektedir. Ticari versiyonları post translasyonel değişiklikler ve genetik varyasyonlar sonucu elde edilir. Albümin oldukça biyouyumlu ve biyobozundur. Bu özelliklerinden dolayı nanopartikül üretiminde kullanılmaktadır (Şekil 2-9). Protein nanopartikül sentezlerken çapraz bağlama derecesindeki bir artış, daha yoğun parçacıkların oluşması nedeniyle genellikle nanopartikül boyutunu azaltır. Albümindeki lizin uçları genellikle çapraz bağlanmada yer alır. Albümin durumunda, çapraz bağlanmamış albümin nanopartikülleri ayrı bir faz oluşturmak üzere birleşirler ve bu nedenle, çapraz bağlama, protein nanopartiküllerini stabilize eder ve nanopartiküllerden enzimatik bozunmayı ve ilaç salımını azaltır. Albümin nanopartiküllerin çapraz bağlayıcı ajanı genellikle glutaraldehitir. Glutaraldehit lizin uçlarından çapraz bağlar ve miktarı çapraz bağlanma derecesini belirler. Ne kadar yüksek oranda çapraz bağlanırsa o kadar stabil bir yapı oluşur [80], [81], [82].



Şekil 2-9. Albümin zincir yapısı

Albümin katkılı nanoküreler üretilmiş ve FDA tarafından onay alınarak kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, Abraxane (Albümin-bağlı Paklitaksel), Abraxis Bioscience/ Celgene firması tarafından 2005 yılında FDA tarafından onay alarak meme kanseri üzerinde kullanılmaya başlanmıştır. Abraxane, insan serum albümini (HSA) ile paklitaksel gibi çözünmeyen bir ilacın taşınmasını sağlayan ve çapı yaklaşık olarak 130 nm olan nanoküre yapıda bir formülasyondur. İlk metastatik tümör hücreleri üzerinde kullanılmaya başlanmış olsa da 2012 yılında küratif cerrahi veya radyasyon tedavisi uygulanamayacak hastalar için ilerlemiş akciğer kanseri tedavisinde karboplatin ile kombinasyon halinde birinci basamak tedavi olarak

kullanılmıştır. Ayrıca gelişmiş pankreatik kanserin tedavisi için ümit vaat etmiştir ve FDA tarafından 2013 yılında gelişmiş pankreas kanserini de içerecek şekilde onay almıştır. Albümin-bağılı paklitaksel, tümörlerin endotel hücre duvarlarındaki gp60 reseptör (albondin) aracılı yoldan yararlanarak, tümör içi konsantrasyonun artırılması için kullanılan ilk biyolojik kemoterapötik bileşiktir. Bu yol ile paklitakselin biyoyararlanımını arttırmıştır. Ayrıca, hastalar diğer formülasyonlar ile karşılaştırıldığında toksisiteyi artırmadan daha yüksek bir yanıt oranı ve uzun süreli tümör progresyonu göstermektedir. En önemlisi, hastalar albümine bağlı paklitaksel ile daha yüksek bir paklitaksel dozunu tolere edebilir raporu sunulmuştur. Buradan yola çıkarak albümin nanopartiküller veya albümin katkılı kompozit yapılar özellikle kanser uygulamalarında önemli yere sahiptir [65], [83]–[86].

Sunulan çalışmada albüminin bu eşsiz özelliklerinden faydalanarak kolon kanseri tedavisinde kullanılmak üzere kompozit nanopartiküller sentezlenmiş ve *in vitro* uygulaması yapılmıştır. Nanopartiküllere ilaç yüklenmesi iki yol ile gerçekleştirilebilmektedir, içine hapsedme ve yüzeye adsorbe olma. HSA nanopartikül ile yapılan çalışmalarda yüzeye adsorbe olmasından ziyade nanopartikül içine hapsedilen ilacın daha verimli etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle tez kapsamında saponin etken maddesi HSA nanopartiküllere üretim aşamasında eklenmiş ve nanopartikülün içine hapsedilmesi gerçekleştirilmiştir.

2.3.1.1.1 Örnek Çalışmalar

1993 yılında Lin ve ark., ve 2003 yılında Langer ve ark., insan serum albümin nanopartikülü desolvasyon tekniği kullanarak glutaraldehit ile çapraz bağlayarak sentezlemişlerdir. Optimizasyon basamaklarında protein, çapraz bağlayıcı, çözelti ortamı ve pH etkisini nanopartikül boyut ve yük bakımından değerlendirmişlerdir. Bu şekilde literatüre giren HSA nanopartiküller birçok çalışmada kullanılmaya başlanmıştır [87], [88].

İlaç hedefleme kabiliyetini arttırmak için, protein nanopartikülleri spesifik hücreleri ve dokuları tanıyan hedefleme ligandlarını içerecek şekilde kimyasal olarak modifiye edilmiştir. Örneğin, Wartlick ve ark., (2004) biyotin ile HER2 antikorunu bağlamak için kullanılan avidin'i yüzeye kovalent olarak bağlayarak modifiye albümin nanopartikülleri sentezlemiştir. Bu modifikasyon, albümin nanoparçacıklarının HER2'yi aşırı ifade eden meme kanseri hücrelerine hedeflenmesini sağlamıştır [89].

Cohen ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada HSA nanopartiküllerin yakın kızılötesi ışınlarından faydalanarak kontrast arttırıcı ajan olarak kullanmışlardır. HSA nanopartiküllerin NIR floresans özellikleri, düşük otofloresans ve düşük biyomatriks emilimine bağlı olarak derin penetrasyonu ile in vivo tümör teşhisinde derinlemesine bir penetrasyon sağladığı için oldukça önemli olduğu varsayılmıştır. Bunun için nanopartiküllere floresan boya yüklenmiş ve tavuk embriyo modeli ile fare modelinde in vivo testler yapılmıştır [90].

Akbal ve ark., 2017 yılında HSA ile protein bazlı, karboksimetil-kitosan/polihidroksi bütirat ile polisakkarid bazlı nanopartikül sentezlemiş ve ilaç hapsetme, stabilite, sitotoksikite açısından iki nanopartikülü de değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonunda HSA nanopartiküllerin yüksek biyoyumluluğa sahip olduğu, hapsetme kapasitesinin yüksek olduğu ve kontrol edilebilir boyut yapısına sahip olduğunu tespit etmişlerdir [63].

Zhang ve ark., 2017 yılında albümin nanopartikül sentezlemiş ve Itrakonazol (ITA), fungus hücre ölümüne yol açan mantarların 14 α -demetilazını (sitokrom P450) inhibe ederek fungal hücre zarında sterol biyosentezine müdahale eden geniş spektrum aktivitesi ve iyi toleransı olan yaygın olarak kullanılan bir triazol antifungal ajan, taşınımında kullanmışlardır. Özellikle anjiyogenez tedavisi için uygun bir ajan olduğunu tespit etmişlerdir [91].

Park ve ark., 2017 de HSA ile 30Kc19 kullanarak nanopartikül sentezlemişlerdir. Enzim taşınımında kullanmışlar ve bu şekilde iki farklı proteinin karıştırılması ile elde edilen nanopartikülün hücresel alımı arttırdığı ve enzimleri stabil tuttuğunu yani uzun süreli koruduğu sonucuna varmışlardır [92].

Lu ve ark., 2017 de, albümin-polikaprolakton konjuge nanopartikül hazırlamışlar ve mikro tubül fonksiyonlarını bozarak oral geniş spektrumlu benzimidazol karbamat antelmintik hücre ölümüne yol açar albendazol taşınımında kullanmışlardır. Pankreatik karsinom hücrelerini tedavi etmek için kullanmışlar ve sentezledikleri nanopartiküller ilacın pankreatik çok hücreli tümör sferoidlerine etkili bir şekilde verilmesini sağlamıştır. Çalışmanın sonucunda yüksek inhibisyon gözlemlemişlerdir [84].

2.4. Sekonder Metabolitler

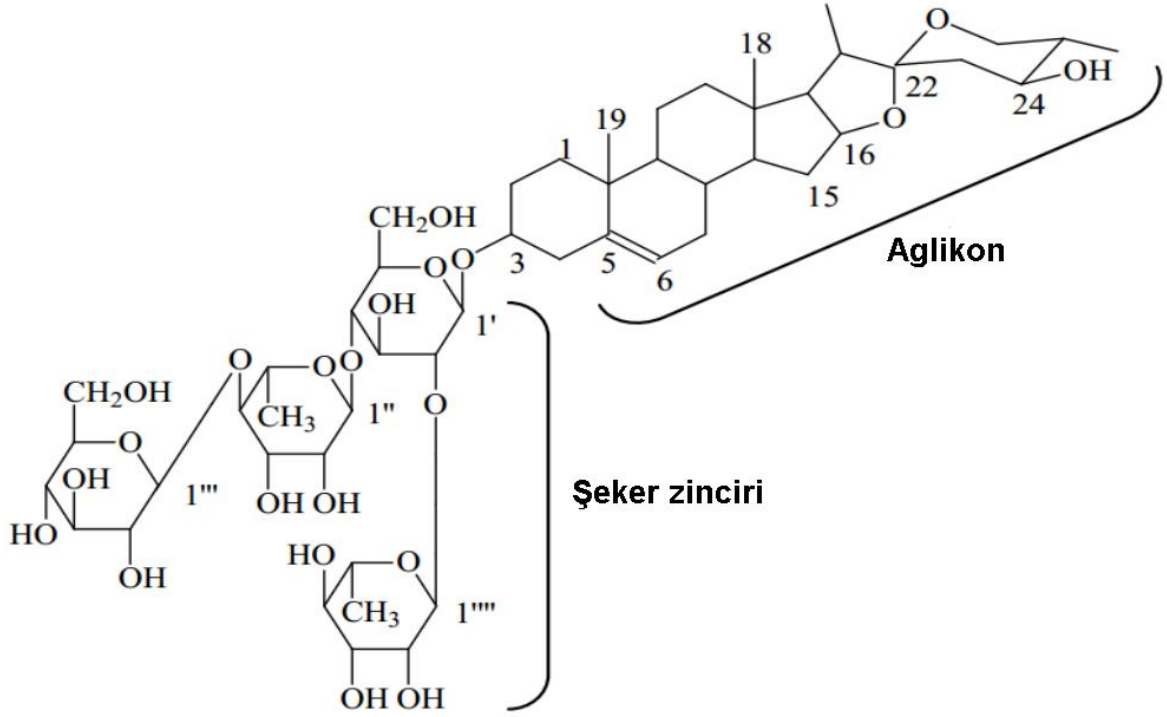
Metabolitler, metabolizmanın ara ürünleridir. Metabolit terimi genellikle küçük moleküller ile sınırlıdır ve yakıt, yapı, sinyal, enzim üzerinde uyarıcı ve inhibitör etkisi, katalizör aktivitesi, savunma ve diğer organizmalar ile etkileşimler gibi çeşitli işlevlere sahiptir. Bitkiler, birincil (primer) metabolitler ve ikincil (sekonder) metabolitler olmak üzere çeşitli bileşikler üretirler. Birincil metabolitler bitkinin hayatta kalması için gereklidir ve lipitler (trigliserit, fosfolipit), karbonhidratlar (nişasta, selüloz vb.), proteinler, mineraller (tuzlar, anyonlar, katyonlar vb.) ve hormonlar gibi yapısal büyüme, gelişme ve çoğalmalar için gerekli olan metabolitlerdir. Birincil metabolitlerden gelişen sekonder metabolitler, organizmanın normal büyümesi, gelişimi ve çoğalmasıyla doğrudan ilişkili olmayan bitkinin çevre ile adaptasyonunu sağlayan, organizmanın hayatta kalma ve homeostazında rol oynayan moleküllerdir. Sekonder metabolitler, atık maddelerin ve toksik ürünlerin vücuttan uzaklaştırılması dahil olmak üzere bitkiyi dış çevreden gelecek zararlı yapılara karşı korumaktadır. Bitkilerde bulunan sekonder metabolitler fitosteroller, terpenler, terpenoidler, alkaloidler, fenolikler ve flavonoidlerdir [16], [93].

Sekonder metabolitler kimyasal yapı (örneğin, bir şeker içeren halkalar), bileşim (nitrojen içermeyen), çeşitli çözücülerdeki çözünürlüğü veya sentezlendiği yol (örneğin tanen üreten fenilpropanoidler) bakımından sınıflandırılırlar. Genel olarak Fenolik, Terpenoidler ve Alkaloidler (nitrojen içerenler) olarak sınıflandırılırlar ve glikozitler, tanenler ve saponinler ise bu gruplarda yer almaktadırlar [94].

2.4.1. Saponin

Bitkiler bünyesinde birçok fitokimyasal madde barındırmaktadır. Bu maddeler fizyolojik aktiviteler ve reaksiyonlarda önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle bitkinin bünyesinde bulunan bu kimyasallar daha ayrıntılı incelenmekte ve toplum için daha kullanışlı hale getirilmektedir. İkincil metabolitler bitkiyi zor şartlara karşı korumak amacı ile bitki tarafından üretilirler. Bitkiyi özellikle kurak şartlarda ve parazitik durumlarda koruma görevini gerçekleştirirler [95]. Önceleri herhangi bir işlevi olmayan atık maddeler olarak kabul edilen sekonder (ikincil) metabolitlerin, bitki bünyesinde önemli roller taşıdığının belirlenmesinden sonra, söz konusu bileşiklere verilen önem gün geçtikçe artmıştır. *Tribulus terrestris* bitkisinde bulunan saponin bitkinin ürettiği ikincil metabolitlerdendir ve terpenoid grubuna girmektedir (Şekil 2-

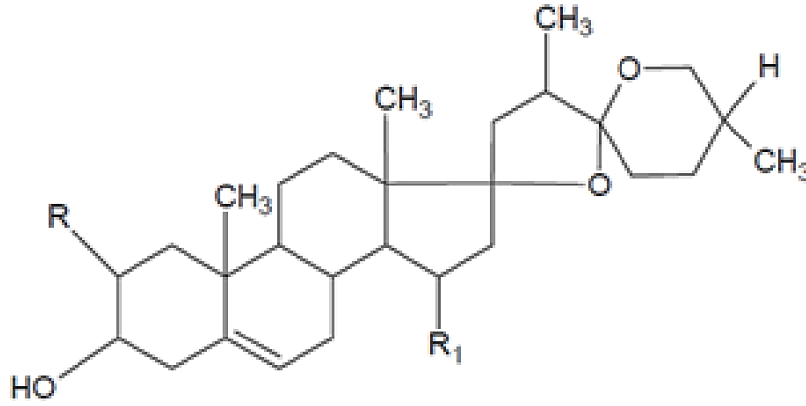
10). Halk arasında çöven olarak bilinmekle birlikte köpürtme özelliğinden dolayı helva yapımı ve deterjan üretiminde doğal köpük oluşturunca madde olarak kullanılmaktadır. Tüm bunların yanı sıra sahip olduğu antibakteriyal, antifungal, antiprotozoal, antioksidan özelliklerinden dolayı ilaç sanayinde oldukça geniş yer bulmaktadır [96]. Belli miktarları hemolitik olmakla birlikte antibiyotik aktiviteye sahip olmaları, kolesterol ile kompleks yapabilmeleri, yüzey gerilimini düşürücü özelliğe sahip olmaları kullanım alanını genişletmiştir.



Şekil 2-10. Saponin genel yapısı

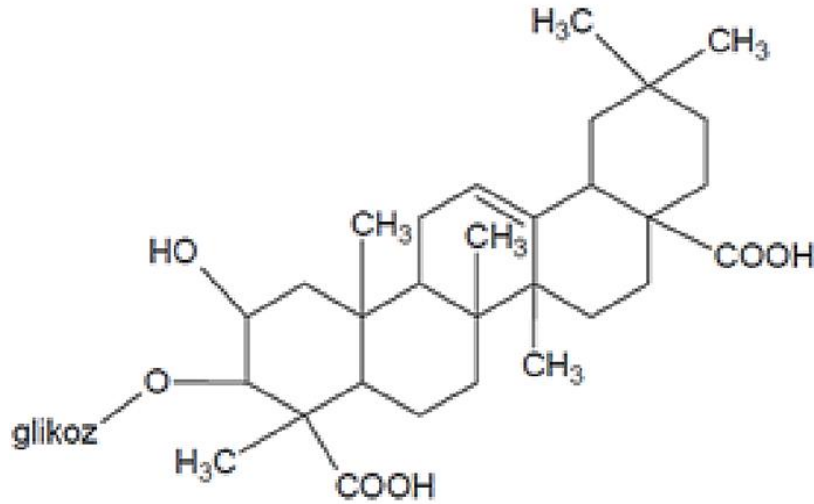
Saponin genelde amorf ve renksizdir. Yapısal olarak glikan ve aglikan (sapogenin) olarak iki kısımdan oluşur [97]. Aglikan kısmı yapısına göre steroidal (C_{27}) ve triterpenoidal (C_{30}) saponin olarak iki grup altında toplanır (Şekil 2-11, 2-12) ve $-COOH$ ve $-CH_3$ gibi çeşitli fonksiyonel gruplara sahiptir. Glikan kısmı ise $-OH$ veya $-COOH$ grubuna bağlı düz ya da dallanmış oligosakkaridlerden oluşmaktadır [98], [99]. Aglikan kısmında bağlanma bölgelerine bağlanan şeker sayısına göre monodezmodize, bidezmodize olarak adlandırılmaktadır [100]. Dolayısı ile saponinlerin birçok türü ve yapısına bağlı olarak farklı özellikleri olabilmektedir. Örneğin *Astragalus* bitkisinden elde edilen saponin S fazı ile G2/M fazı arasında hücre proliferasyonunu engellemektedir buda p21 ekspresyonunu ve siklin bağımlı

kinaz aktivitesini baskılamaktadır [101]. *Quillaja saponaria Molina* bitkisinde bulunan saponin hemolitik, antiinflamator ve immune uyarıcı özelliklere sahiptir [102].



Şekil 2-11. Steroidal saponinlerin genel yapısı

Saponinler, sapogenin olarak bilinen aglikanların yapısına bağlı olarak iki ana gruba ayrılırlar. Steroidal sapogeninler 30. karbondan üç metil grubunun oksidatif olarak ayrılması sonucu 27 karbon atomu; triterpenoid sapogeninler ise 30 karbon atomu içerir. Yaklaşık 360 sapogenin ve 750 triterpen glikozit yapısı bilinmektedir. Triterpenoid saponinlerin en yaygın şekerleri, heksozlar (başlıca o-glikoz ve o-galaktoz), pentozlar (başlıca D- ve L-arabinoz ve o-ksiloz), metil pentozlar (L-ramnoz ve kuinopoz) ve üronik asitlerdir (o -glukuronik asit ve n-galakturonik asit). Steroidal saponinler de ise glukoz, galaktoz, ramnoz, ksiloz ve arabinoz şekerlerine sıklıkla rastlanmaktadır. Bu durumda, saponinlerin karmaşıklığı, sapogeninlerin ve çeşitli şekerlerin farklı kombinasyonlarından kaynaklanmaktadır [103], [99]. Genel olarak saponin aktivitesi için hem glikan hemde aglikan kısmı etkilidir. Saponinler sulu çözeltilerde sabun benzeri özelliklere sahiptir. Bu, intravenöz olarak enjekte edildiğinde akut toksisitenin ana nedenidir. Çoğu saponinler kırmızı kan hücrelerini hemolize eder. Bitkinin herhangi bir bölgesinde oluşabilmesi ile birlikte özellikle kök ve gövdede depo edilmektedir. Özellikle *Dioscorea* türleri, *Trigonella foenumgraecum*, *Agave wightii* ve *Tribulus terrestris* bitkileri ekonomik öneme sahip saponin içermektedir [104], [105]. Sunulan çalışma da *Tribulus terrestris* bitkisine ait triterpenoid saponinin kanser hücresi üzerine etkinliği değerlendirilmiştir.



Şekil 2-12. Triterpenoid saponinlerin yapısı

Tribulus terrestris, Zygophyllaceae familyasına ait olan yıllık veya çok yıllık bir bitkidir. Genellikle geyik boynuzu veya kuzu dili olarak adlandırılır. Bitki, Güney Avrupa, Güney Asya, Afrika ve Avustralya'da ılıman ve tropikal bölgelerde yaşar ve çöl iklimi gibi zorlu şartlarda bile hayatta kalabilmektedir. Kalp hastalıkları, ödem, cilt kaşıntısı, akut konjunktivit, baş ağrısı, baş dönmesi, ödem, abdominal distansiyon, antelmintik, vitiligo tedavisi için birçok ülkede geleneksel tıpta kullanımı ile bilinmektedir. Bunların yanı sıra, halk arasında anti-ürolitik, diüretik özelliklerinden dolayı ve idrar bozuklukları, karaciğer hastalıkları, hemoraji, böbrek taşı ve gut tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bitkide tigogenin, neotigogenin, gitogenin, neogitogenin, hekogenin, neohekogenin, diosgenin, klorogenin, ruscogenin ve sarkasapogenin tipinin furostanol ve spirostanol saponinleri sıklıkla bulunur [106], [107].

2002 yılında Hu ve Yao *Tribulus terrestris* den izole edilmiş protodioscin (65) and methylprotodioscin saponini altmış farklı kanser hücresi hattında sitotoksik aktivitelerini test etmişlerdir. Özellikle protodioscin'in kanser hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etkisinin olduğunu rapor etmişlerdir [108], [109].

Li et al 2002 yılında saponinlerin hipoglisemik etkisini araştırmışlar ve serum glukoz düzeyini anlamlı derecede düşürdüğünü bulmuşlardır [110].

2008 yılında Sun ve ark., yaptıkları bir çalışma da, *Tribulus terrestris* den izole edilmiş triterpenoid saponinin kardiyosit hücreleri üzerindeki apoptotik etkisine bakmışlardır [111].

Yine, *Tribulus terrestris* bitkisinden elde edilen saponin ile fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, karaciğerde ve serum da toplam kolesterol azalması gözlemlenmiş ve bu yol ile hiperlipidemi önlenmiştir. Kolesterolün bu kontrolü, safra yoluyla atılan çözünmez kompleksler üreten, böylece entero-hepatik kolesterolün geri dönüşümünü inhibe eden ve kan kolesterol seviyelerini azaltan, saponinler ile etkileşim yoluyla gerçekleşir [112].

Yukarıda bahsedilen çalışmalara benzer birçok çalışma yapılmış ve raporlanmıştır. Bu çalışmalardan yola çıkarak DLD-1 kolon kanseri hücre hattı üzerinde daha önce herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Sunulan tez kapsamında hem sentezlediğimiz kompozit nanopartiküller hem seçtiğimiz hücre hattı üzerinde hiç çalışılmamış ve saponinin kontrollü taşınımı ve salımı gerçekleştirilmemiştir. Bu sonuçlar ve seçimler tezin özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasallar

Yapılan çalışmalarda kompozit nanopartikül sentezi için Albümin (human, Sigma, Almanya), Montmorillonite K10 (MMT) (Sigma, Almanya) kullanılmıştır. Desolvasyon ajanı olarak etanol ve kloroform (Merck, Almanya) ve kompozit nanopartiküllerin stabilitesini artırmak için çapraz bağlayıcı olarak glutaraldehit (Sigma, ABD) kullanılmıştır. İlaç etkinlik ve salım çalışmalarında *Tribulus terrestris* den elde edilen saponin (Dshine, Çin) kullanılmıştır. Hücre sitotoksikite testleri için, Tripsin-EDTA (Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit), DMEM F-12 ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium") besiyeri ve Fetal Sığır Serum (FBS), DMSO (Dimetilsülfoksit) Biological Industries (İsrail) firmasından temin edilmiş olup herhangi bir işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır. Çoklu kuyucuklu kültür kapları ve hücre kültür kapları Corning (ABD) firmasından temin edilmiştir. Model kanser hücresi olarak DLD-1 ve L929 hücre hatları Kırıkkale Üniversitesi Merkez Araştırma laboratuvarından temin edilmiştir.

Mikroskop görüntüleme çalışmalarında kullanılmak üzere α -Poli-L-lizin hidrobromür (α -PLL, M(monomer, Lys.HBr, $C_6H_{13}N_2OBr$) = 209.09 g.mol⁻¹, Mw = 15000–30000 g.mol⁻¹, hesaplanmış ortalama polimerizasyon derecesi =108) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. PLL ultrasaf suda çözündükten sonra çözelti suya karşı diyaliz edilerek toksik olan hidrobromür uzaklaştırılmıştır. PLL stok çözeltisi 0,22 μ m'lik filtre ile steril edilerek +4°C'de saklanmıştır. PLL dışında yapılan çalışmaların tamamında kullanılan kimyasallar analitik saflıkta olup herhangi bir ilave saflaştırma işlemine tabi tutulmamıştır.

3.2. HSA ve MMT-HSA Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

3.2.1. HSA Nanopartiküllerin Hazırlanması

İnsan serum albümin nanopartikülleri (HSA-NP) desolvasyon yöntemine göre hazırlanmıştır [88]. Buna göre, 30 mg albümin 1 mL ultrasaf su da çözülmüştür. 3 mL etanol, albümin solüsyonuna sabit karıştırma altında (550 rpm) damlatılarak eklenmiştir. Desolvasyon işlemi solüsyonun rengi bulanıklaşana kadar devam ettirilmiş ve ardından nanopartiküllerin çapraz bağlanması için glutaraldehit (% 8) eklenmiştir. Çözelti 24 saat 600 rpm sabit karışma hızı ile oda ısısında

karıştırılmıştır. Son aşamada ise elde edilen süspansiyon 12000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiş ve ardından nanopartiküller ultrasaf su ile 3 kez yıkanarak yapıda bulunan fazla glutaraldehit ve etanol uzaklaştırılmıştır. En son 1 ml ultrasaf su ile süspanse edilen nanopartiküller liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur.

3.2.2. MMT-HSA Kompozit Nanopartiküllerin Hazırlanması

Öncelikle farklı konsantrasyonlarda MMT çözeltisi hazırlanmış ve nanoboyutta elde edilebilmesi için sonik prob yardımı ile ultrasaf su ortamında dağıtılmıştır. Ardından, 12000 rpm de çöktürülüp pellet kısmı atılmış ve süpernatant alınmıştır. DLS yardımı ile boyutları bakıldıktan sonra kompozit nanopartikül hazırlanmasında kullanılmıştır.

30 mg albümin 1ml ultrasaf suda çözülmüştür. Farklı oranlarda MMT çözeltisi hazırlanmıştır (% 1 ve 3, 5 w/v). Hazırlanan MMT çözeltileri HSA çözeltisine eklenmiştir. Ardından 3 ml etanol, HSA çözeltisine sabit karıştırma altında (550 rpm) damlatılarak eklenmiştir. Desolvasyon işlemi solüsyonun rengi bulanıklaşana kadar devam ettirilmiş ve ardından nanopartiküllerin çapraz bağlanması için glutaraldehit (% 8) eklenmiştir. Çözelti 24 saat 600 rpm sabit karışma hızı ile oda ısısında karıştırılmıştır. Son aşamada ise elde edilen süspansiyon 12000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenmiş ve ardından nanopartiküller ultrasaf su ile 3 kez yıkanarak yapıda bulunan fazla glutaraldehit ve etanol uzaklaştırılmıştır. En son 1 ml ultrasaf su ile süspanse edilen nanopartiküller liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur.

3.2.3. Saponin Yüklü Albümin (HSA) Nanopartiküllerin Hazırlanması

Saponin yüklü HSA nanopartiküllerin hazırlanması için öncelikle ultra saf su ile 30 mg/ml albümin çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından 1, 3, 5 mg/ml derişimlerde saponinin sulu çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan saponin çözeltileri albümin çözeltisine eklenmiştir. Ardından etanol albümin solüsyonuna sabit karıştırma altında (550 rpm) damlatılarak eklenmiştir. Glutaraldehit ile çapraz bağlanan saponin yüklü nanopartiküller 4 saat oda ısısında sabit hızda karıştırılmıştır. Son olarak elde edilen nanopartiküller 3 defa ultrasaf su ile yıkanıp, liyofilize edilerek kurutulmuştur.

3.2.4. Saponin Yüklü MMT- HSA Kompozit Nanopartiküllerin Hazırlanması

Saponin yüklü HSA NP'lerin hazırlanması için öncelikle ultra saf su ile 30 mg/ml albümin çözeltisi hazırlanmıştır. HSA çözeltisine % 3 lük hazırlanan MMT solüsyonu

eklenmiştir. Ardından 3, 5 mg/ml saponin çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan saponin çözeltileri albümin çözeltisine eklenmiştir. Ardından etanol albümin solüsyonuna sabit karıştırma altında (550 rpm) damlatılarak eklenmiştir. Glutaraldehit ile çapraz bağlanan saponin yüklü nanopartiküller 4 saat oda ısısında sabit hızda karıştırılmıştır. Son olarak elde edilen nanopartiküller 3 defa ultrasaf su ile yıkanıp, liyofilize edilerek kurutulmuştur.

3.2.5. HSA ve MMT-HSA Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.5.1. Nanopartiküllerin Morfolojik Karakterizasyonu

HSA ve MMT-HSA NP'lerin morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.5.1.1 Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Analizleri

SEM analizi, 10 keV'lik bir elektron ışını enerjisi ile çalıştırılan EVO 50 EP mikroskobu (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile gerçekleştirildi. Numuneler, silikon levhalar üzerine 5 µL nanopartikül süspansiyon damlatılarak hazırlandı ve azot gazı altında kurutulan nanopartiküller daha sonra Hassas Yüzey Aşındırma ve Kaplama Sistemi (PECS, Model 682, Gatan Inc., Pleasanton, ABD) kullanılarak 10 nm kalınlığında altın ile kaplandı. Alınan SEM görüntüsü ile nanopartiküller şekil ve boyut dağılımı açısından değerlendirilmiştir.

3.2.5.1.2 Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) Analizleri

TEM analizi, 100 keV'lik bir elektron ışını enerjisi ile çalıştırılan bir JEM 1220 mikroskobu (JEOL, Peabody, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Numuneleri hazırlamak için 5 µL nanopartikül süspansiyonu bir bakır gride damlatıldı ve vakumla kurutuldu. Özellikle örneklerin MMT hapsetme özellikleri incelenebilmesi için TEM görüntüleri alınmıştır.

3.2.6. Nanopartiküllerin Kimyasal Karakterizasyonu

HSA ve MMT-HSA nanopartiküllerim kimyasal karakterizasyonu; zayıflatılmış toplam yansıma-fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR), dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi, matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/ionizasyon kütle spektroskopisi (MALDI-MS), enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX), termogravimetrik analiz (TGA) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.6.1. Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizleri

Sentezlenen nanopartiküllerin FTIR analizleri Nicolet TM İSTM 50 (Thermo Fisher Scientific, ABD) marka ve model IR spektrometre cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Spektrumlar 4000 cm⁻¹ ve 600 cm⁻¹ aralığında 16 sayım ile 4 cm⁻¹'lik aralıklarla kaydedilmiştir.

3.2.6.2. Dinamik Işık Saçılması (DLS) Yöntemi ile Nanopartikül Boyut ve Zeta Potansiyel Analizleri

Hazırlanan NP'lerin ortalama partikül büyüklüğü dağılımı ve zeta potansiyeli analizleri dinamik ışık saçılması yöntemiyle Zeta Sizer (Malvern Instruments, Model 3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Analiz, ultrasaf suya (viskozite: 0,8872 cP, refraktif indeks (RI): 1,33, dielektrik sabiti: 78,5), karşı 25 °C'de ve 173° gerisaçılma açısıyla gerçekleştirilmiştir. Ölçümler için numuneler ultrasaf suyla seyreltilmiş ve agregasyonu önlemek için analizden önce 2 dakika sonikasyona tabi tutulmuştur.

1 mg/ml örnek derişimindeki nanopartikül çözeltisinin elektroforetik mobilitesi ölçülerek, bu değer Helmholtz-Smoluchowski eşitliğiyle ζ -potansiyel ve boyut değerlerine dönüştürülmüştür.

3.2.6.3. Enerji Dağılımlı X-Ray Analizi (EDX)

Nanopartiküllerde bulunan MMT'yi tanımlamak için EDX, EVO 50 EP SEM ile donatılmış Kompakt Dedektör Birimi (CDU) (EDAX, Mahwah, NJ, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnek hazırlamak için, MMT-HSA NP'ler su içinde dağıtılmış ve bir damla solüsyon bir karbon plaka üzerine yerleştirilip havayla kurutulmuştur. EDX spektrumu, 20 keV'luk bir hızlanma voltajında elde edilmiş ve 19 saniye boyunca toplanmıştır.

3.2.6.4. Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Kütle Spektroskopisi (MALDI-MS) Analizleri

Nanopartiküllerin kütle spektrumu bir Voyager-DE Pro MALDI-TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) cihazı kullanılarak değerlendirilmiştir. Numunelerin desorpsiyonu ve iyonlaşması, atımlı azot lazerden (Spectra Physics, Santa Clara, CA, ABD) 337 nm çıkış kullanılarak yaklaşık 10⁻⁷ Torr'luk bir basınçta

gerçekleştirilmiştir. İyon ekstraksiyonu için 25 kV'luk bir hızlanma potansiyeli uygulanmıştır. Tüm ölçümler, pozitif ve doğrusal modda ortalama 500 lazer vuruşu ile kaydedilmiş ve kalibre edilmiştir.

α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (CHCA) ve sinapinik asit (SA) matrisleri, 10 mg / ml'lik bir konsantrasyonda asetronitril:su (1:1, v/v) içinde düzenlenmiştir. MALDI örnekleri, analiz edilecek nanopartikülleri daha önce bahsedilen matrislerle (1:5, v/v) karıştırarak hazırlanmıştır. Ardından, bu karışımın 5 μ L'si örnek plakasına damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutularak analiz edilmiştir.

3.2.6.5. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Saponin yüklü HSA ve MMT-HSA NP'lerin termal özelliklerinin değerlendirilmesi, 10 °C/dakika'lık bir ısıtma hızında çalışan Termogravimetrik analiz cihazı (TA® instruments Inc., New Castle, DE) ile gerçekleştirilmiştir. Kompozit nanopartiküllerin termal ayrışma davranışlarının analizi bu cihaz ile değerlendirilmiştir. Analiz, 0 °C ila 800 °C sıcaklık aralığında % 99,5 azot atmosferi altında yürütülmüştür. Yaklaşık olarak, 8 mg'lık her numune, her test için açık platin bir potada ısıtılmıştır.

3.2.7. Su Alım (şişme) Testi

HSA ve MMT-HSA NP'lerin şişme davranışını değerlendirmek için, su alım deneyleri, şişme ortamında (PB, pH 7,4) 0 saat ila 48 saat arasında değişen farklı zaman periyotları için yürütülmüştür. Bu amaçla, kuru nanopartiküller (8 mg) bir filtre kâğıdı torbasına aktarılmış ve şişme ortamı içine daldırılmıştır. Farklı zaman aralıklarında, şişme ortamından çıkarılmış ve fazla sudan arındırılarak tartılmıştır. Nanopartiküllerin su alımı (W), denklem (1) ile belirlenmiş, burada W_1 su alan (şişmiş) nanopartiküllerin ağırlığını, W_2 ise su alımı öncesinde kuru nanopartiküllerin ağırlığını ifade etmektedir. Su alım çalışması üç kere tekrar edilmiş ve ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir.

$$\% W = [(W_1 - W_2) / W_2] \times 100 \quad (1)$$

3.2.8. HSA ve MMT-HSA NP'lerin Enkapsülasyon Verimliliğinin (% EE) Hesaplanması

HSA ve MMT-HSA NP'lerin SAP enkapsülasyon verimlilikleri (% EE) hesaplanmıştır. Bunun için, nanopartiküller saponin yükleme çalışmalarının

ardından santrifüj yapılmıştır (12000 rpm, 30 dakika) ve süpernatandaki saponin miktarı 204 nm'de UV-Visible spektrofotometre (Thermo Scientific, Waltham, MA) yardımı ile belirlenmiştir. Saponinin enkapsilasyon verimlilik yüzdesi Eşitlik (2) ile hesaplanmıştır; burada A, kullanılan toplam saponin miktarını ve B, yüklenmemiş saponin miktarını ifade eder.

$$\% EE = [(A-B)/A] \times 100 \quad (2)$$

3.2.9. *In vitro* Salım Çalışmaları

Saponinin HSA ve MMT-HSA NP'lerin salım profilini belirlemek için diyaliz membranı tekniği kullanılmıştır. Bunun için, 10 ml saponin yüklü HSA ve MMT-HSA nanopartikül dispersiyonları (PBS'de 1 mg/ml, pH 7,4) lizozim ile bir diyaliz torbasına yerleştirilmiş ve torbalar daha sonra PBS çözeltisine daldırılmıştır. 37 °C'de çalkalama yapan bir su banyosu içerisinde inkübe edilmiştir. Belli zaman aralıklarında, numunenin 500 µl'si alınmış ve eşzamanlı olarak aynı ortamı sürdürebilmek için taze PBS ile değiştirilmiştir. Diyaliz solüsyonlarının absorbanşı 204 nm'de UV-Visible spektrofotometre ile analiz edilmiş ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak saponin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.10. Nanopartiküllerin Hücresel Alım Ve Sitotoksisite Çalışmaları

3.2.10.1. Hücre Kültürü

DLD-1 (İnsan kolorektal adenokarsinoma) ve L929 (Fare fibroblast) hücre hatları, nanopartiküllerin hücresel alımı ve sitotoksisitesinin in vitro değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

Hücreler, nemlendirilmiş % 5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C'de % 10 FBS ve % 1 penisilin/streptomisin ile takviye edilmiş Dulbecco's Modified Eagle besiyeri (DMEM-F12) içinde kültüre edilmiştir.

Plaka % 80 hücre doygunluğuna eriştikten sonra besiyer ortamdan alınmış ve hücreler, % 0,25 tripsin/EDTA çözeltisi ile tripsinize edilmiştir. Hücreler daha sonra santrifüj (3000 rpm, 3 dakika) edilerek toplanmış ve FBS ile DMEM içinde muhafaza edilmiştir.

3.2.10.2. Floresein İzotiyosinat (FITC) Bağlanmış MMT-HSA NP'lerinin Hazırlanması

Nanopartiküllerin hücresel alımını araştırmak için floresan işaretleyici olan FITC ile nanopartiküller boyanmıştır. Bunun için, karbonat tamponundaki (0,01 M, pH 9,0) 4 ml nanopartikül çözeltisine 0,1 ml FITC çözeltisi (etanol içerisinde 40 mg/ml) ilave edilmiş ve daha sonra karışım gece boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Reaksiyona girmemiş FITC'yi uzaklaştırmak için nanopartiküller (12000 rpm, 30 dakika) üç kez ultrasaf su ile yıkanmıştır.

3.2.10.3. Nanopartiküllerin Hücresel Alımının Nitel Analizi

FITC bağlı MMT-HSA NP'lerinin DLD-1 hücreleri tarafından alımının kalitatif olarak belirlenmesi için FV1000 konfokal lazer tarama mikroskopu (CLSM, Olympus, Tokyo, Japonya) kullanılmıştır. Bunun için öncelikle hücreler 6 kuyucuklu bir hücre plakasında poli-L-lisin (PLL) kaplanmış cam lamel üzerinde büyütülmüştür. Daha sonra DLD-1 hücreleri, hücre zarındaki N-asetil glukosamin ve sialik asite seçici olarak bağlanan Alexa Fluor® 594 Buğday Germ Agglutinin (WGA, Invitrogen) ile üreticinin protokolüne göre boyanmıştır. Hücre büyütülmüş cam lameller lam üzerine kapatılarak 40X de imersiyon yağı yardımı ile analiz edilmiştir. Floresan sinyalleri, WGA (kırmızı) için 593/614 nm ve FITC (yeşil) için 488/530 nm uyarma/emisyon dalga boylarında tespit edilmiştir.

3.2.10.4. Nanopartiküllerin Hücresel Alımının Nicel Analizi

Nanopartiküllerin DLD-1 hücreleri tarafından alımının niceliksel olarak belirlenmesi, CLARIOstar® mikropalak okuyucu (BMG Labtech, Ortenberg, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle FITC bağlı MMT-HSA NP'ler hücre besiyeri ile çeşitli konsantrasyonlara seyreltilmiştir. Daha sonra nanopartiküller tek tabaka olarak çoğalan hücreler ile 37 °C'de farklı sürelerde inkübe edilmiş ve hücresel alım gerçekleştirilmiştir. Ardından ortamdaki nanopartikül içeren besiyer uzaklaştırılıp hücreler PBS tamponu ile üç defa yıkanmıştır. Hücrelerin parçalanması için 0,2 M NaOH içinde 1 ml % 0,5 Triton X-100 ile muhafaza edilmiştir. Hücrelere bağlanan FITC bağlı nanopartiküller floresan yoğunluk okunarak tespit edilmiştir [113].

3.2.10.5. Sitotoksosite

Nanopartiküllerin sitotoksitesinin *in vitro* değerlendirilmesi, xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizörü (RTCA) SP sistemi (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DLD-1 ve L929 hücre hatları, altın mikroelettrot kaplı 96 kuyucuklu plakalarda (E-plaka) kültüre edilmiştir. Hücrenin sayı ve yapışma davranışı gibi hücre çoğalma sürecindeki herhangi bir değişiklik, boyutsal olmayan faktör olarak bilinen ve hücre indeksi (CI) olarak ifade edilen bir elektriksel empedans kaymasına neden olur. Bu farklılık ölçülerek hücre işlemi hakkında bilgi elde edilir. Bunu değerlendirmek için öncelikle hücreler her bir kuyuda 5000 hücre olacak şekilde inkübe edilmiştir. Ardından hücreler 5, 25, and 50 µg/ml konsantrasyonda nanopartikül ile muamele edilmiştir. Hücre ve nanopartikül ile muamele edilmiş E-plaka 37 °C'de % 5 CO₂ içeren atmosferde inkübasyona bırakılarak 120 saat boyunca her 15 dakikada bir ölçüm alacak şekilde RTCA SP sistemi ile analiz edilmiştir [114].

3.3. İstatistiksel Analizler

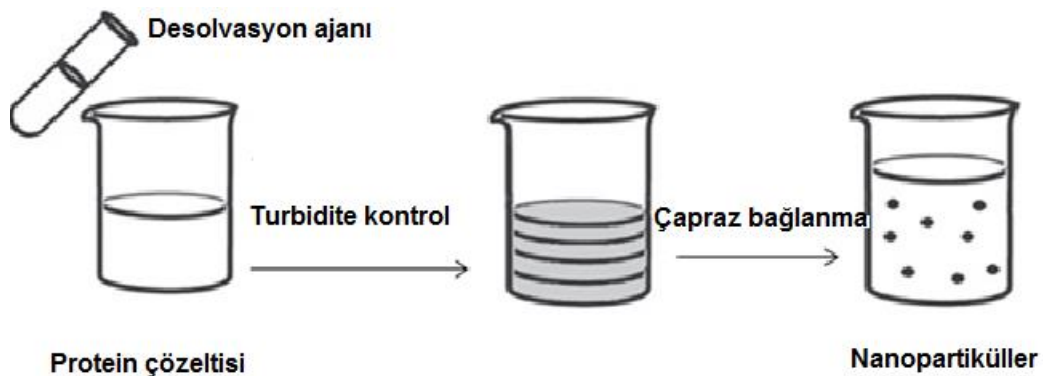
Tüm veriler için ortalama $\pm$ standart sapma (SD) ve istatistiksel testler Student's t-testi ile yapılmıştır. P değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. HSA ve MMT-HSA Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

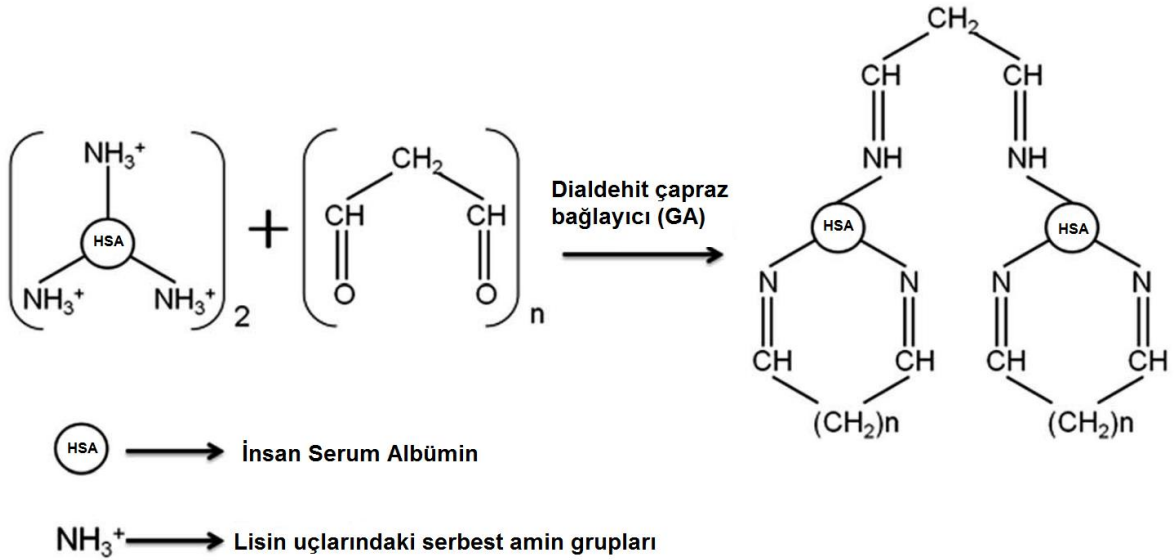
Tez kapsamında, üstün mukoadesiv ve yüksek su alım (şişme) özellikleri ile montmorillonit başarılı bir şekilde HSA NP'lerin yapısına katılmıştır. Bu yolla nanopartiküllerin kolaylıkla gastrointestinal bariyerden geçmeleri hedeflenmiştir. Daha önce yapılan bir çalışmada, yapısına MMT katılmış kompozit nanopartiküllerin, antikanser ilaçları gastrointestinal geçişi sırasında pertürbasyonlardan koruma sağlayabileceği bildirilmiştir [115]. Önceki çalışmamızda, süspansiyon ortamının pH değeri, çapraz bağlayıcı (Glutaraldehit-GA) miktarı ve protein konsantrasyonunun HSA NP boyut dağılımı üzerindeki etkilerini değerlendirmiştik [63]. Tez kapsamında yaptığımız çalışmada ise MMT'nin nanopartikül yapısına dahil edilmesi hem ilaç hapsetme kapasitesini hem de kontrollü ve sürdürülebilir ilaç salımını sağlamıştır.

Nanopartiküller Langer ve ark.'nın daha önce bahsettiği desolvasyon tekniği ile üretilmiştir. Proteintemelli NP'lerin hazırlanması için hafif koşullar altında desolvasyon işlemi tercih edilir. NP matrisinin çözeltisi, çözücü olmayan bir faza ekstrakte edildiğinde kolloidal bir sistem oluşur (Şekil 4-1). Desolvasyon pH, protein ve çözücü olmayan madde (etanol, aseton vb.) miktarı tarafından da kontrol edilen kendi kendine düzenlenme sürecidir ve özellikle insan ve sığır serum albümini gibi protein temelli nanopartiküllerin üretilmesinde kullanılmaktadır.



Şekil 4-1. Kontrollü desolvasyon yöntemi

MMT katkılanmış HSA, GA ile çapraz bağlanarak, literatürde ilk kez kil-protein (MMT-HSA) kompozit nanopartikülleri oluşturulmuştur. Nano boyutlu kil minerallerinin bir polimer veya protein matrisine dahil edilmesinin, bu malzemelerin farklı temel özelliklerinde belirgin bir iyileşmeye neden olduğu iyi bilinmektedir [116], [117]. Doğrusal bir dialdehit olan GA, proteinlerin amin, tiol, fenol ve imidazol gruplarıyla nötr pH da reaksiyona girer [118]. GA'nın aldehit uçları, Schiff baz (-C = N-) oluşumu yoluyla proteinlerin amin grupları ile bağ oluşturur ve Schiff bazlarının çapraz bağlanma koşulları altında stabil olduğu öne sürülmüştür. HSA'nın GA ile çapraz bağlanması, HSA zincirinin lizin kalıntılarındaki serbest amin grupları vasıtasıyla gerçekleşir ve bu sayede Schiff baz ara maddeleri oluşur (Şekil 4-2) [119], [120].



Şekil 4-2. Amino ve aldehit grupları arasındaki kimyasal çapraz bağlanma mekanizmasının şematik gösterimi [121]

HSA sulu çözeltisine bir organik çözücü eklendiğinde, karışımın dielektrik sabiti azalır ve daha küçük partiküler yapının oluşmasını sağlar. Aynı zamanda küçük boyutta partiküller elde etmek için, parçacıklar arasında yüksek itici güçler üretilmelidir. Bu nedenle HSA çözeltisinin pH değerini artırarak partikül büyüklüğünün azaltılması hedeflenmiştir. Bunun sebebi ise pH değeri arttıkça izoelektrik noktası 5,3 olan HSA daha negatif özellik kazanmakta, bu da ortama aktarılan parçacıkların yığın oluşturmasını engellemekte ve daha düşük boyutta

partikül oluşmasını sağlamaktadır [122], [123]. Sunulan çalışmada, nanopartikül sentezi için ortam pH değeri 8,5 olarak ayarlanmıştır.

Karsinojenitesine ve dolayısıyla parçacık üretiminden sonra tamamen çıkarılması ihtiyacına rağmen glutaraldehit, albümin nanopartiküllerini stabilize etmek için geleneksel ve etkili bir çapraz bağlayıcıdır. Proteinlerin primer yapısı, $-NH_2$, $-COOH$, $-SH$ ve diğer fonksiyonel grupları içerir ve glutaraldehit, parçacık yüzeyindeki lizin kalıntılarının $-NH_2$ gruplarının aldehit kısımları ile reaksiyona girerek azalmasına neden olmakta ve dolayısıyla nanopartiküllerin stabilitesini ve biyo-bozunmasını etkilemektedir. Beklenildiği üzere, çapraz bağlayıcı miktarını arttırdıkça, çapraz bağlanma derecesi de artmaktadır ve daha stabil ve kompleks yapılar ortaya çıkmaktadır. Teorik olarak, 100 mg albüminin sahip olduğu serbest lizin aminoasitlerine ait 60 amin grubunun % 200 oranında çapraz bağlanabilmesi için 117,6 µl % 8'lik glutaraldehit kullanılmalıdır. Sunulan çalışmada % 60 çapraz bağlanma derecesini sağlayacak kadar glutaraldehit eklenmiştir. Yine teorik olarak, çapraz bağlayıcı miktarını arttırdıkça daha stabil ve kompakt yapılar elde edileceğinden enzim ile degradasyon çalışmaları yapılmış ve % 60 oranında çapraz bağlanma derecesinin nanopartiküller için daha iyi sonuçlar verdiğini elde etmişlerdir [122].

4.1.1. Zeta Potansiyel ve Dinamik Işık Saçılması (DLS) Analizi

Nanopartiküllerin Zeta-Potansiyeli ve boyut dağılımı Zetasizer kullanılarak belirlenmiştir. Bu cihaz, parçacık boyutu ve zeta potansiyelini belirlemek için sırasıyla dinamik ışık saçılımı (DLS) ve lazer doppler elektroforez (LDE) yöntemi prensibine dayanmaktadır.

DLS, koloidal çözeltideki parçacıkların boyut dağılımını ölçmek için kullanılan bir tekniktir. Koloidal dispersiyondaki parçacıklar gelen ışığın dalga boyundan daha küçükse, saçılmış ışığın yoğunluğu her yönden eşittir (Rayleigh saçılması). Bununla birlikte, daha büyük parçacıklar için yoğunluk açığa bağlıdır (Mie saçılması). Lazer gibi tek renkli bir ışık kullanılırsa, bir detektör yardımıyla zamanın bir fonksiyonu olarak dağınık şiddetteki dalgalanmaları tespit etmek mümkün hale gelir. Dalgalanmaların nedeni, parçacıkların rastgele Brownian hareketidir ve bu hareket komşu parçacıkların yaydığı ışığın yapıcı veya yıkıcı girişimi ile sonuçlanır. Zamana

bağlı yoğunluk dalgalanmalarının analizi bize parçacıkların difüzyon katsayısını verir ve dolayısıyla parçacıkların çapı hesaplanabilir.

Zeta potansiyeli, süspansiyon ortamındaki parçacıklar için, parçacığın dağıtıldığı ortam ile etrafındaki sabit akışkan tabakası arasındaki potansiyel farkı olarak tanımlanmaktadır. Zeta potansiyelinin değeri, kolloid boyunca bir elektrik alan uygulanarak ölçülebilir. Kolloidal dispersiyon boyunca uygulanan elektrik alan, yüklü partiküllerin zıt yüklü elektrotlara doğru göçüne neden olur. Ortamın viskozite kuvveti parçacıkların hareketine engel olabilmektedir; dengede ise parçacıklar sabit bir hızla hareket ederler. Bu hız, cihaz tarafından ölçülür ve parçacığın zeta potansiyelini elde etmek için kullanılabilir.

Tez kapsamında, HSA ve MMT-HSA NP'ler, SAP ve MMT konsantrasyonunun değiştirilmesi ile üretilmiş ve optimize edilmiştir (Tablo 4-1). Dinamik ışık saçılması yöntemi, parametre değişikliklerinin ortalama nanopartikül çapına ve lazer dopler mikroelektroforez yöntemi zeta potansiyellerine etkisi incelenmiştir.

Tablo 4-1. Saponin ve MMT konsantrasyonunun kompozit nanopartiküllerin boyut ve zeta potansiyeli üzerine etkisi (n=3)

Örnek	Zeta Potansiyel (mV)	Ortalama Boyut (nm)	Polydispersity
HSA NPs	-22,0±0,85	55,0±2,97	0,070±0,02
HSA-SAP NPs			
1mg/ml saponin	-20,5±0,96	61,5±2,07	0,167±0,01
3mg/ml saponin	-20,8±0,74	59,7±0,42	0,119±0,01
5mg/ml saponin	-21,9±0,45	80,4±2,27	0,071±0,02
HSA-MMT NPs			
% 1 MMT	-21,2±0,78	43,9±2,62	0,150±0,02
% 3 MMT	-17,3±0,53	50,6±2,09	0,190±0,02
% 5 MMT	-15,5±0,60	65,5±4,70	0,177±0,01

HSA-MMT-SAP NPs			
1 mg/ml sap, % 3 MMT	-18,0±0,23	56.7±2,18	0,112±0,03
3 mg/ml sap, % 3 MMT	-19,7±0,35	71,7±3,85	0,100±0,02
5 mg/ml sap, % 3 MMT	-20,1±0,51	74,2±1,33	0,087±0,01

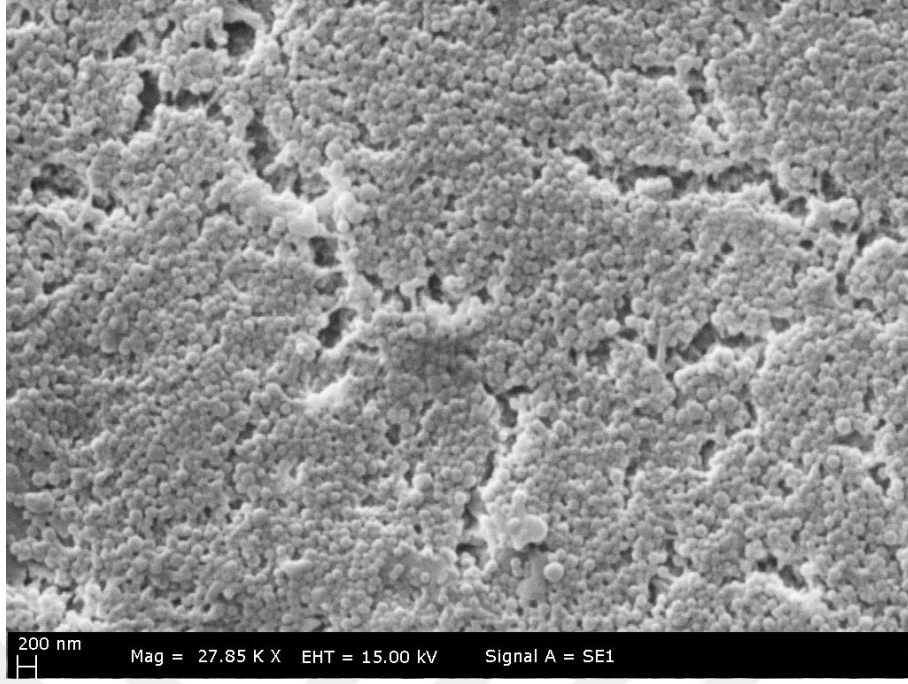
Tablo 4-1’de görüldüğü üzere HSA NP’lerin ortalama çapı 55±3 nm olarak tespit edilmiştir. MMT’nin eklenmesinden sonra, yaklaşık olarak 15 nm’lik bir artış tespit edilmiştir. Bu parçacık boyutu gastrointestinal mukozadan geçmek için idealdir [124]. Yine aynı şekilde HSA NP’lerin zeta potansiyelinin yaklaşık -20 mV olduğu bulunmuştur. MMT’nin nanopartikül yapısına eklenmesi, NP’lerin zeta potansiyelini etkilememiştir. MMT-SAP’ın optimum konsantrasyonları MMT-HSA NP’ler için sırasıyla % 3 ve 3 mg/ml olarak bulunmuştur. Her adımda değişken grup dışındaki tüm parametreler sabit tutulmuştur.

4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Analizleri

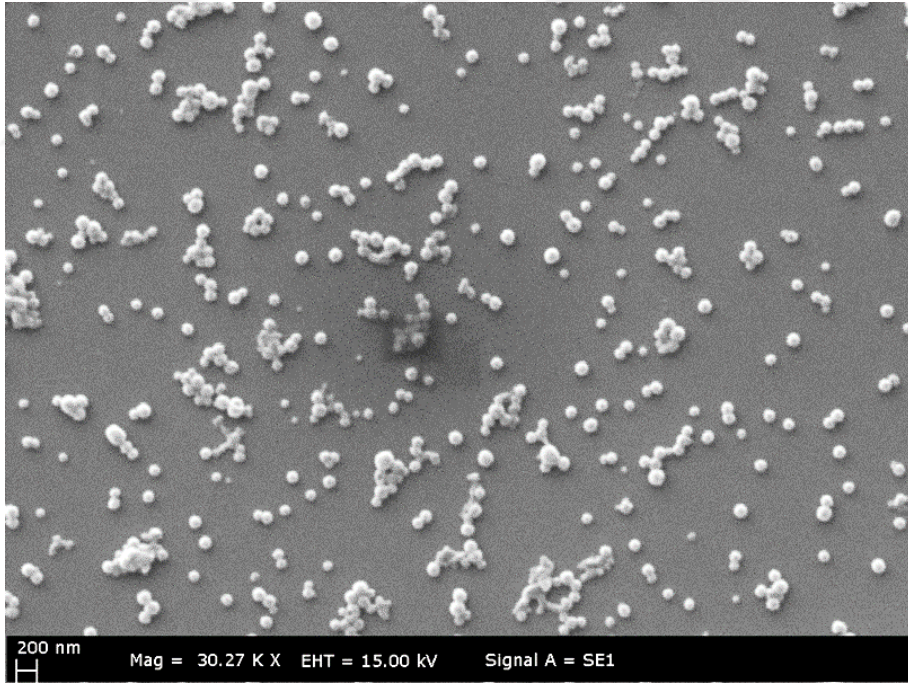
Sunulan çalışmalar kapsamında hazırlanan HSA, HSA-MMT ve saponin yüklü NP’lerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinden yararlanılmıştır.

Elde edilen HSA nanopartiküllere ait SEM görüntüleri Şekil 4-3, 4-4, 4-5 ve 4-6’da sunulmuştur.

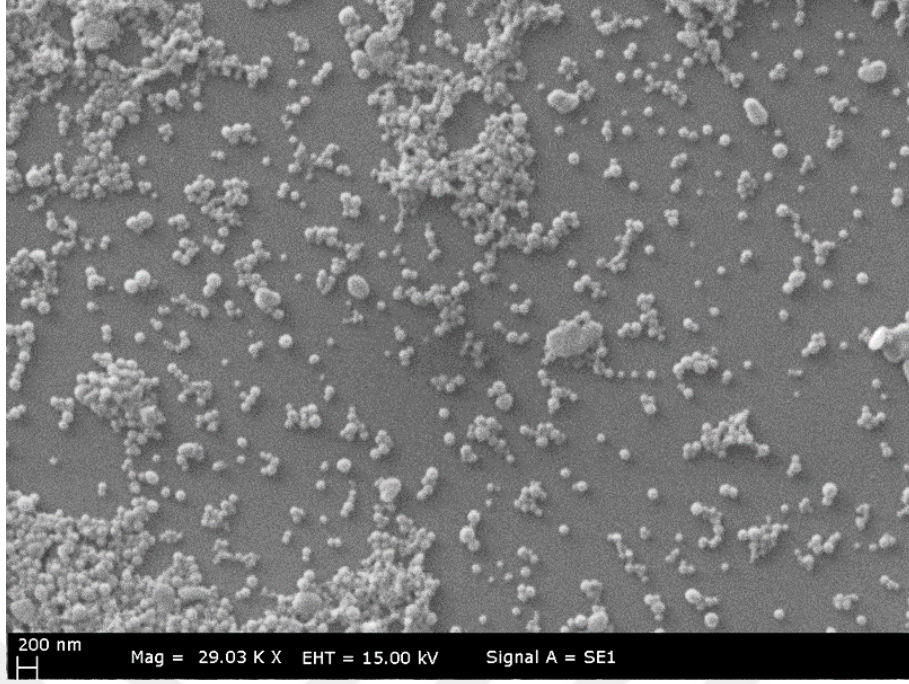
Elde edilen SEM görüntülerinden anlaşılabacağı gibi HSA, HSA-MMT ve saponin yüklü NP’lerin ortalama büyüklüklerinin yaklaşık olarak 50 ile 100 nm dolayında olduğu ve oldukça düzgün, küresel formda ve monolayer oldukları anlaşılmaktadır.



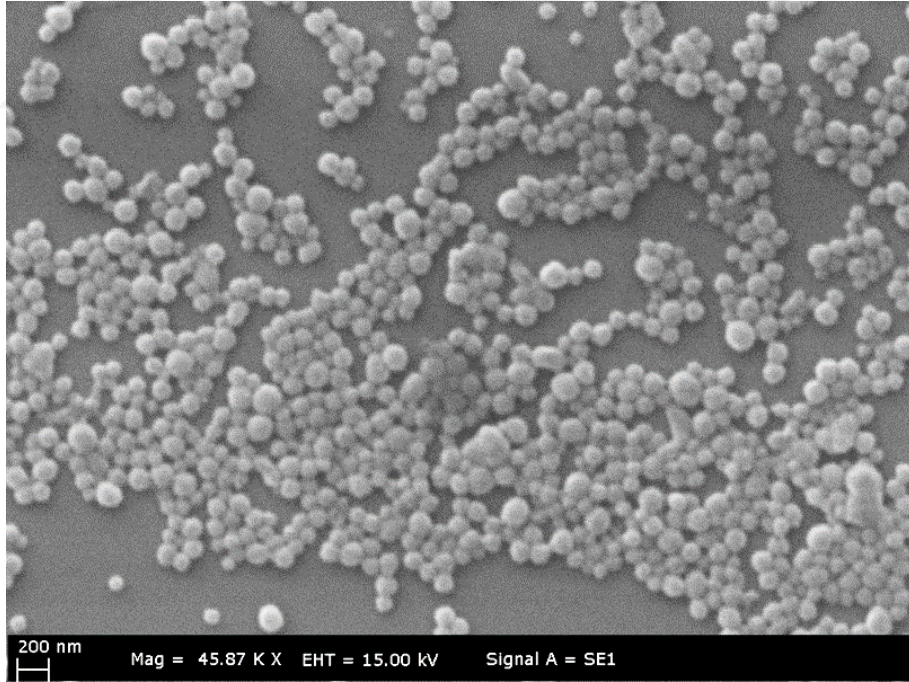
Şekil 4-3. HSA nanopartiküllerin SEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 200 nm



Şekil 4-4. SAP yüklü HSA nanopartiküllerin SEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 200 nm



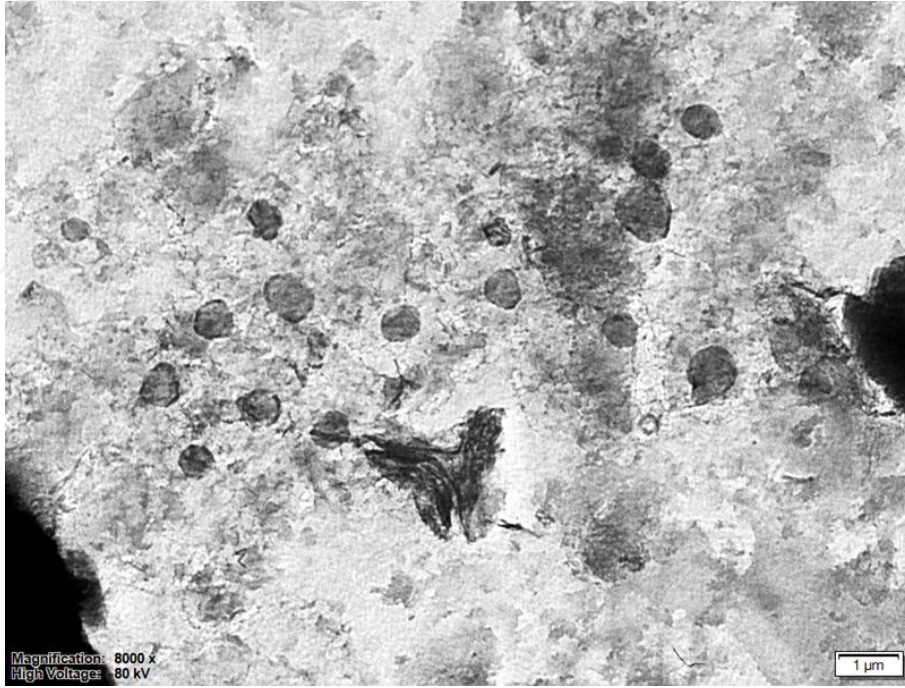
Şekil 4-5. HSA-MMT kompozit nanopartiküllerim SEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 200 nm



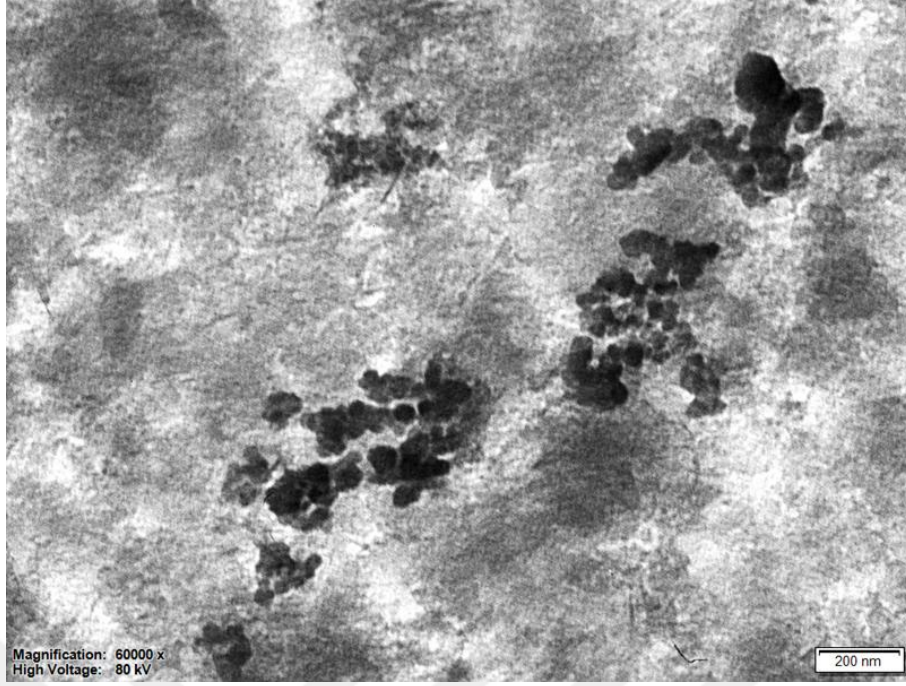
Şekil 4-6. SAP yüklü HSA-MMT kompozit nanopartiküllerim SEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 200 nm

4.1.3. Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) Analizleri

MMT, nanopartikül sentezi sırasında yapıya katılmadan önce boyut değerlendirilmesi yapılmıştır. Kullanılan ticari MMT K10 partikül büyüklüğü yaklaşık olarak 1-5 mikron arasındadır. Nano boyutta kompozit yapılar elde edebilmek için öncelikle belli konsantrasyonlarda MMT ultrasaf suda dağıtıldıktan sonra ultrasonik prob homojenizatör ile 20 Mhz ve % 90 amplitüte ile farklı sürelerde bekletilerek MMT süspansiyonu hazırlanmıştır. Elde edilen süspansiyon 10000 rpm hızında çöktürölüp pellet ile süpernatant ayrılmıştır. Pellet atılmış ve süpernatantındaki MMT partikül boyutu DLS yardımıyla analiz edilmiştir. Böylece nano boyutta MMT yapıları elde edilmiştir. Şekil 4-7 ve 4-8'deki TEM görüntüleri MMT'ye sonik prob uygulanmadan önce ve sonraki görüntülerini göstermektedir.



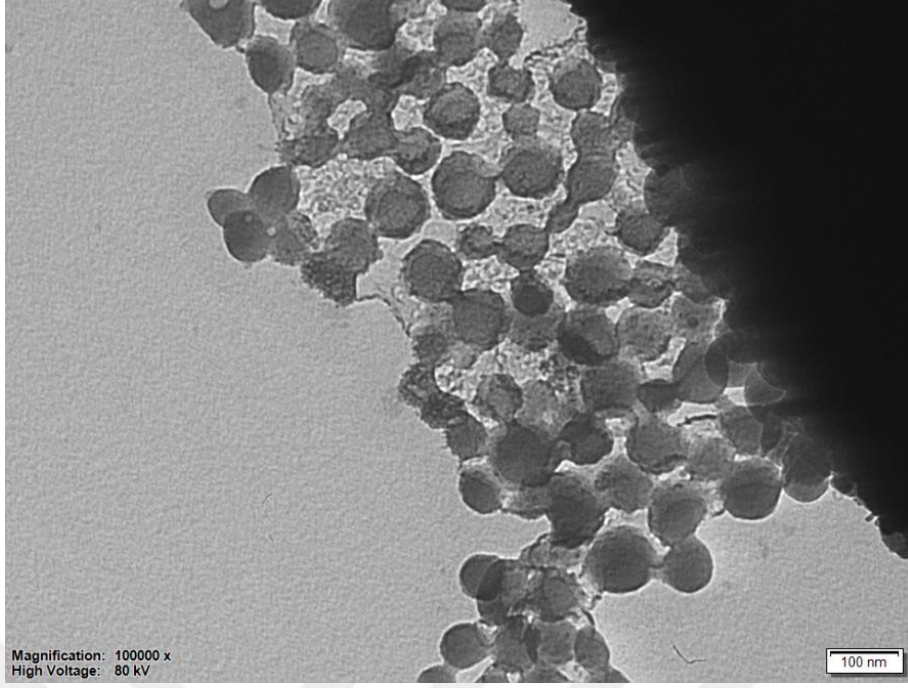
Şekil 4-7. MMT sonik prob yardımı ile dağıtılmadan önce ki TEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 1 mikron



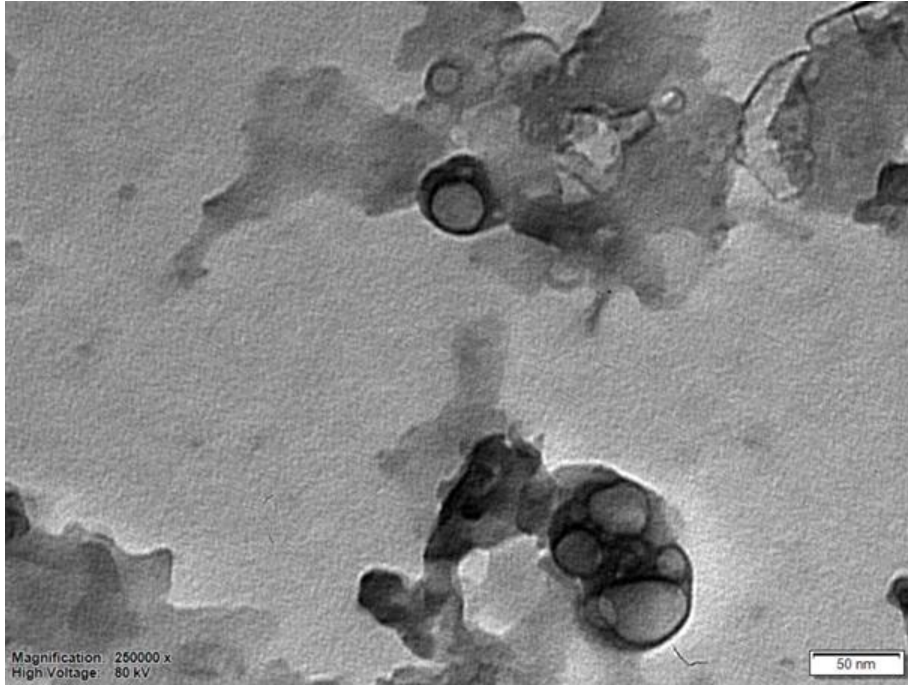
Şekil 4-8. MMT sonik prob yardımı ile dağıtıldıktan sonra TEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 200 nm

Şekilde de görüldüğü gibi sonik prob uygulanmadan önceki MMT boyutu yaklaşık bir mikron iken sonik prob sonrası boyutları 50 nm altına düşmüştür. Elde edilen MMT süspansiyonu kompozit nanopartikül sentezinde kullanılmıştır.

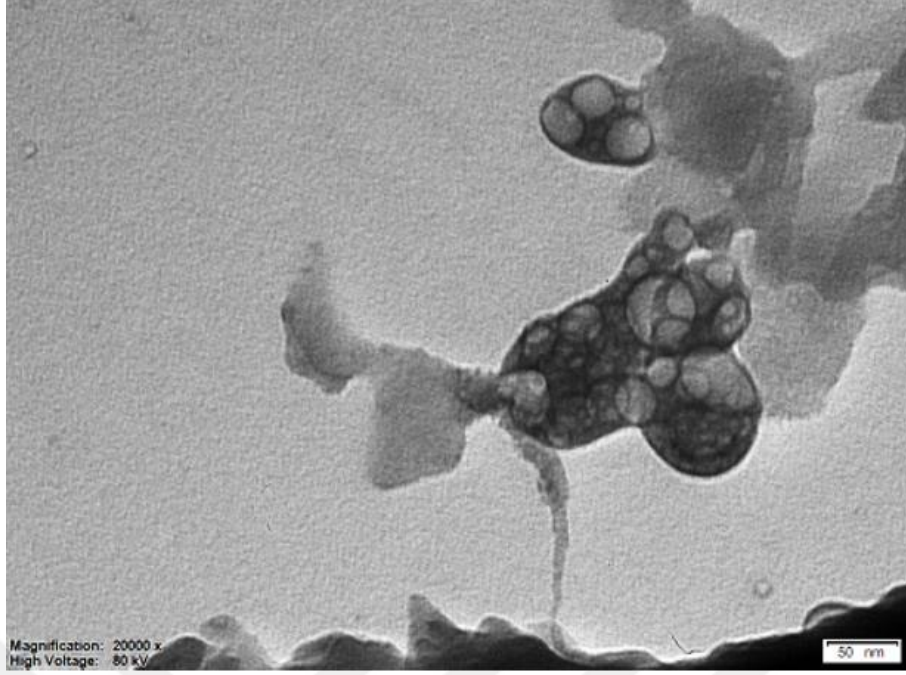
MMT'nin HSA NP'ler ile kompozit yapıya katıldığını değerlendirmek için TEM görüntülerinden faydalanılmıştır (Şekil 4-9, 4-10, 4-11). TEM görüntüleri incelendiğinde MMT'nin HSA NP yapısına katıldığı gözlemlenmektedir.



Şekil 4-9. HSA NP'lerin TEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 100 nm



Şekil 4-10. HSA-MMT kompozit NP'lerin TEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 50 nm



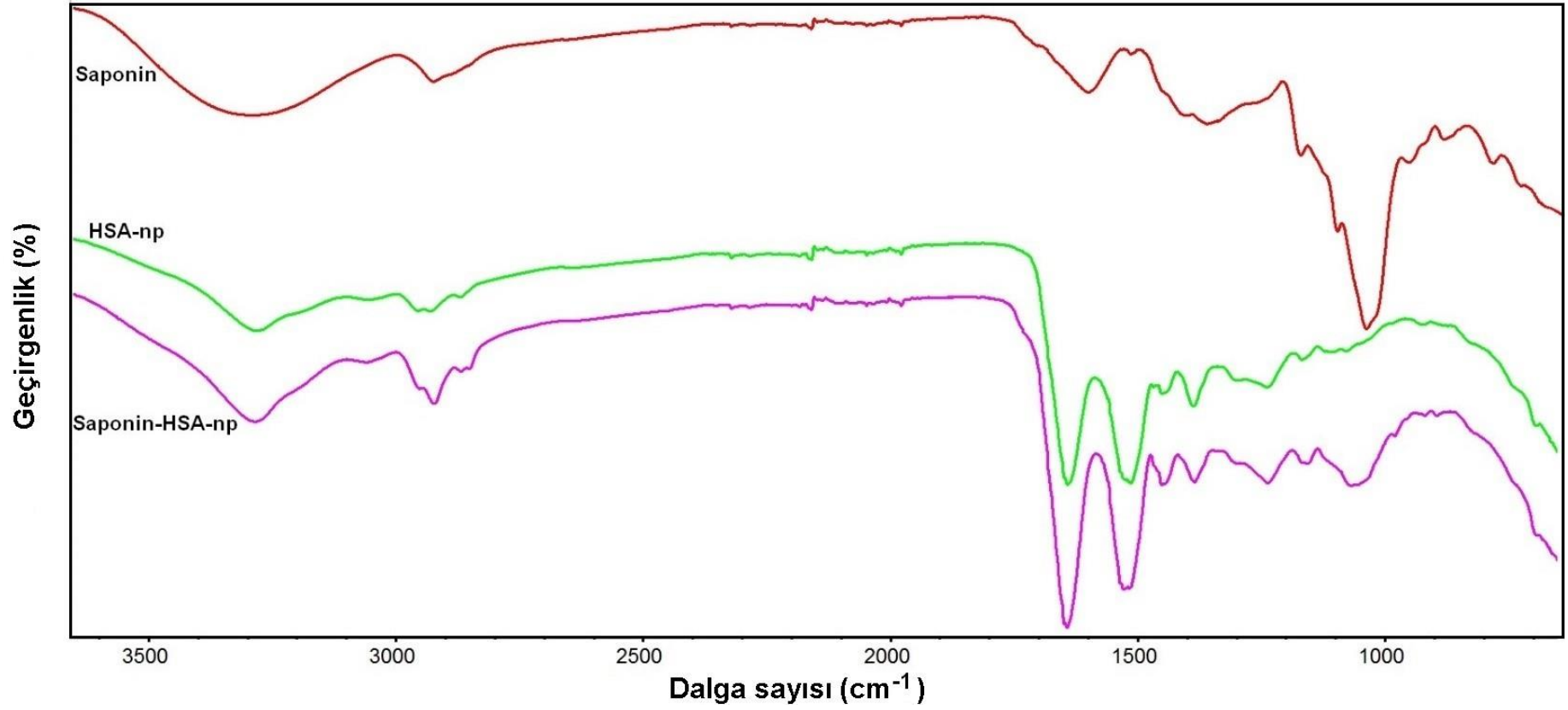
Şekil 4-11. Saponin yüklü HSA-MMT kompozit NP'lerin TEM görüntüsü. Ölçek çubuğu: 50 nm

4.1.4. Zayıflatılmış Toplam Yansıma-Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) Analizleri

Nanopartiküllerin kimyasal bileşimini değerlendirmek için kızılötesi spektroskopisi yöntemi kullanılmıştır. Şekil 4-12'de HSA, SAP, ve HSA-SAP'a ait 4000-600 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki IR spektrumları gösterilmiştir.

HSA NP spektrumu, proteinlere ait amid-I grubunun $\text{C}=\text{O}$ gerilmesi ve amid-II grubunun $\text{C}-\text{N}-\text{H}$ bükülmesi için sırasıyla yaklaşık 1650 cm^{-1} ve 1520 cm^{-1} 'deki karakteristik absorpsiyonları içermektedir [125].

SAP spektrumunda, 1602 cm^{-1} 'deki bant, $\text{C} = \text{C}$ bağındaki gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. SAP'ın şeker kısımları 1015 cm^{-1} 'de $\text{C}-\text{O}$ gerilme bandı ve lipidlerin 1065 cm^{-1} de $\text{CO}-\text{O}-\text{C}$ (ester) simetrik gerilmesi göstermiştir. Bunların yanı sıra 3310 cm^{-1} de $\text{O}-\text{H}$ grubunun gerilme bandı, 2930 cm^{-1} de $\text{C}-\text{H}$ ve 1712 cm^{-1} de $\text{C}=\text{O}$ (karbonil) gruplarının gerilme bandı yer almaktadır. Bu sonuçlar saponin varlığını desteklemekle birlikte literatür ile de uyumludur [126]. HSA-SAP NP spektrumunda, HSA'nın karakteristik absorpsiyonuna ek olarak, 1018 cm^{-1} 'de SAP absorpsiyonu da mevcuttur.

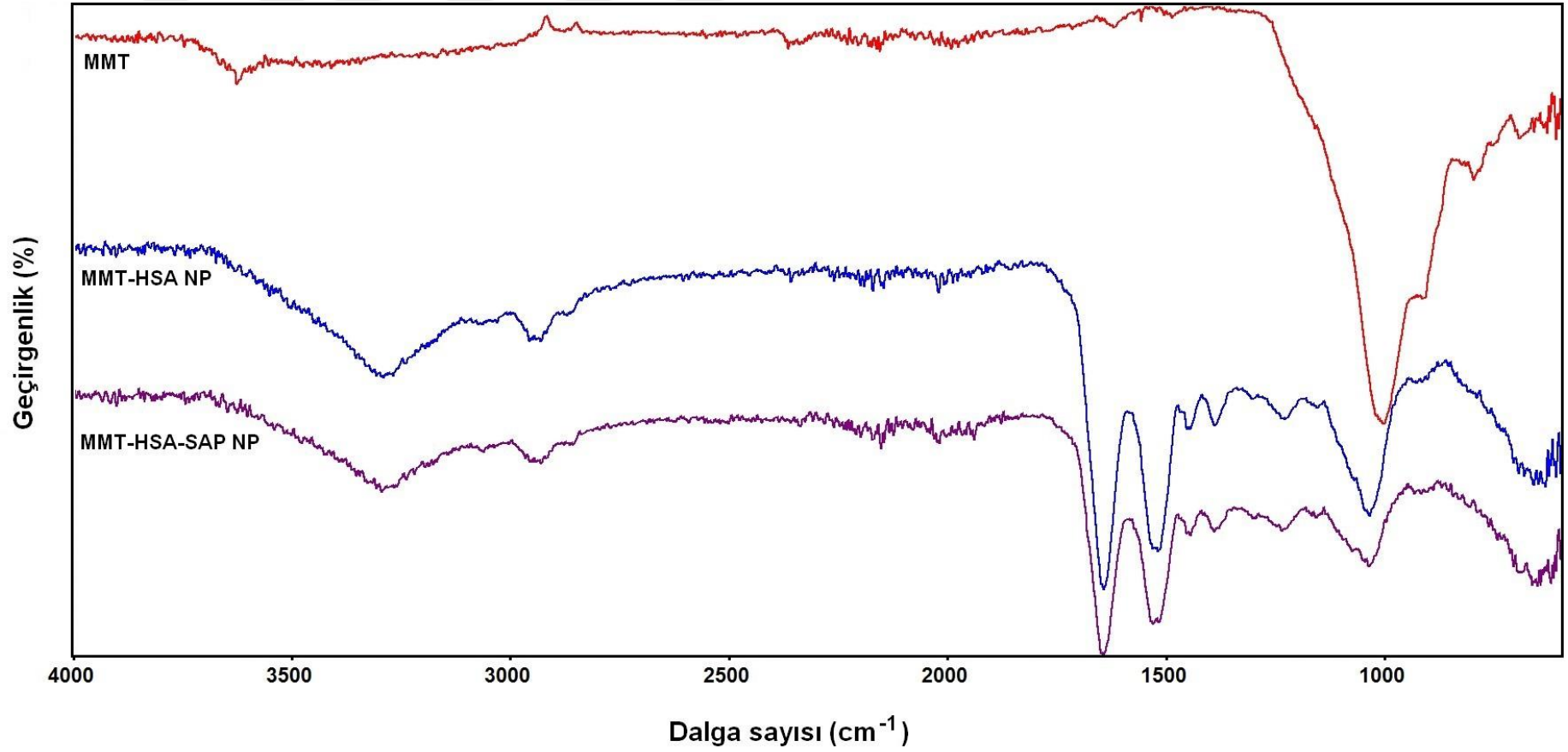


Şekil 4-12. Saponin, HSA NP ve saponin yüklü HSA NP'nin FT-IR spektrumları

Şekil 4-13'de MMT spektrumunda görülen 1010 cm^{-1} 'deki Si-O-Si gerilme bandı, MMT nin tanımlanması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra 873 cm^{-1} deki band ise Si-O-Al gerilmesinden ve 1610 cm^{-1} daki bant ise suyun OH deformasyonundan kaynaklanmaktadır [127].

MMT-HSA NP spektrumu, HSA'nın karakteristik piki ile birlikte MMT'nin Si-O-Si gerilmesine ait 1030 cm^{-1} absorpsiyon frekansında küçük bir kayma ile MMT ve HSA varlığını desteklemiştir.

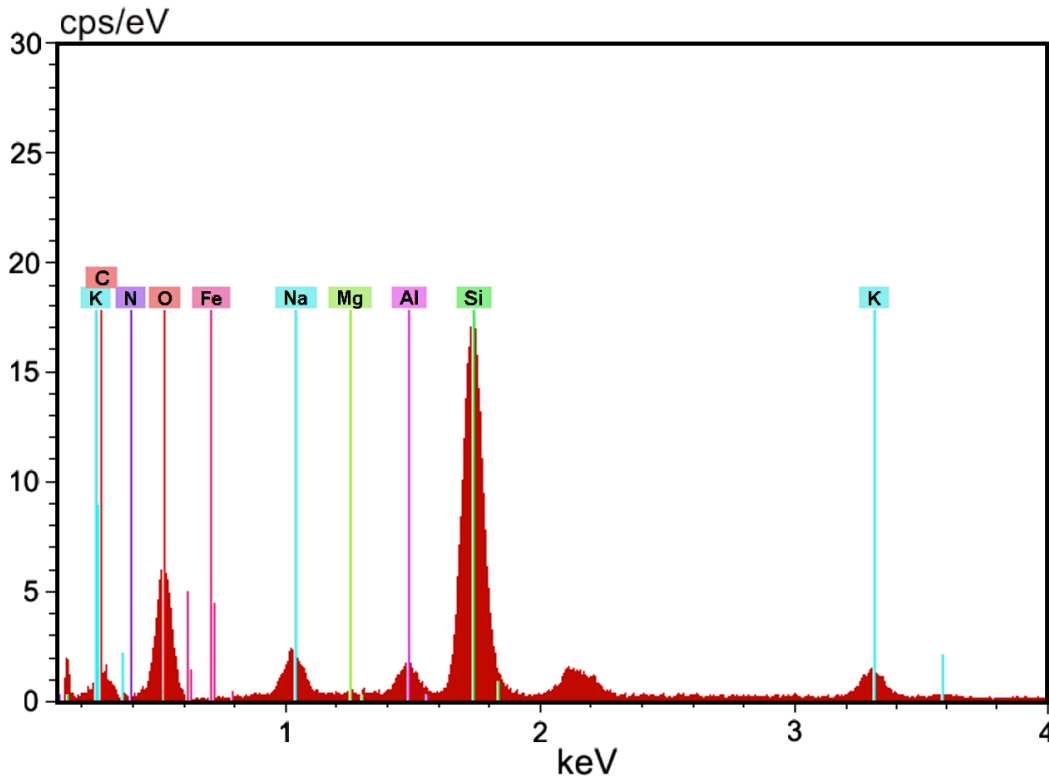
Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak, ATR-FTIR analizine göre hem MMT hem de SAP'nin HSA NP'lerine başarılı bir şekilde dahil edildiği tespit edilmiştir. MMT-HSA-SAP NP'lerin spektrumunda HSA'dan amid bağı, MMT'den Si-O bağı ve SAP'dan C-O bağı bulunmaktadır [125], [128], [129] .



Şekil 4-13. MMT, MMT-HSA NP ve MMT-HSA-SAP NP'lerin FTIR spektrumları

4.1.5. Enerji Dağılımlı X-Ray Analizi (EDX)

MMT'nin HSA NP'lerine dahil edilmesi de EDX analizi ile doğrulanmıştır. MMT-HSA NP'lerinin EDX spektrumu altı element göstermektedir. Bunlar; oksijen (O), demir (Fe), magnezyum (Mg), alüminyum (Al), silikon (Si) ve potasyum (K) dur [130]. Bu elementler, MMT K10 un bileşenlerini tanımlamaktadır. EDX tarafından belirlenen MMT K10'da Fe, Al, Si ve K atomik yüzdeleri sırasıyla 0,14; 1,60; 24,53; 2,48 ve eser miktarlarda Mg tespit edilmiştir. Buna ek olarak, HSA doğada karbon (C), azot (N) ve oksijen (O) içerir. Bu nedenle, EDX spektrumundaki C, N, O pikleri HSA'dan gelmektedir (Şekil 4-14).



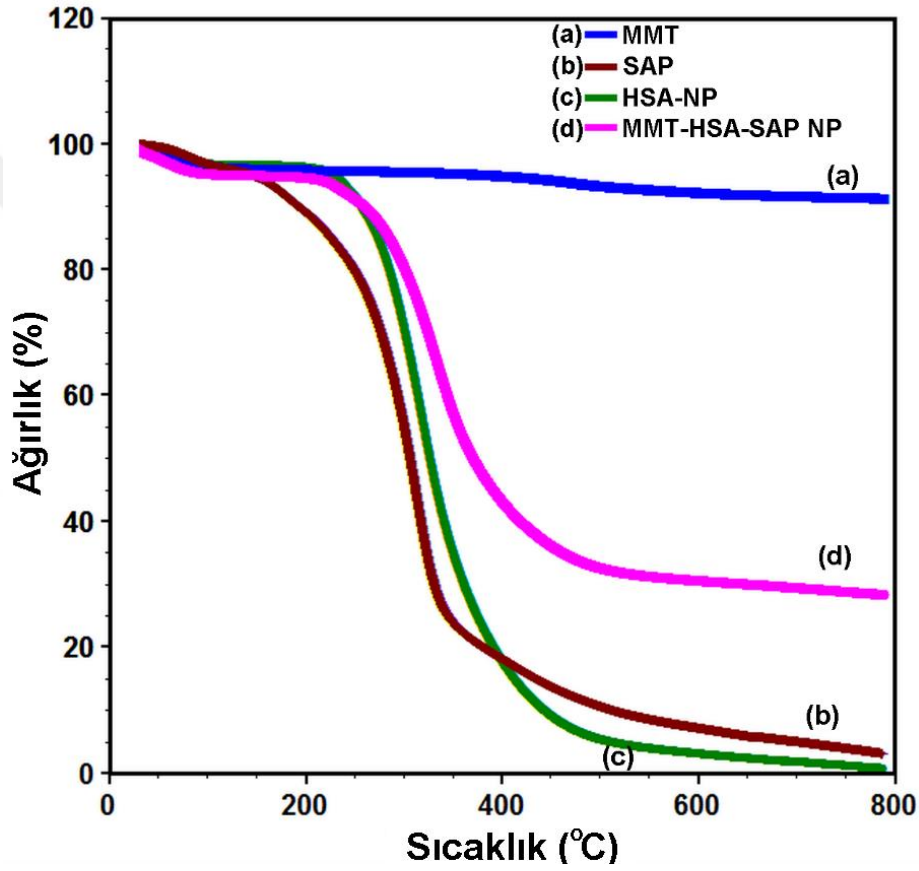
Şekil 4-14. MMT-HSA NPlerin EDX analizi

4.1.6. Termogravimetrik Analiz (TGA)

MMT, SAP, HSA NP ve HSA-MMT-SAP NP'lerin termal bozunma profilleri TGA ile araştırılmıştır (Şekil 4-15). Termal bozunma profili kompozit nanopartiküllerin yapısında MMT olup olmadığını ortaya çıkarmak için tercih edilmiştir. MMT, 800 °C'ye kadar yüksek kararlılığa sahiptir fakat interkalsize edilmiş kristalin suyun

moleküllerinin desorpsiyonu nedeniyle kendi kütlesinin bir kısmını yaklaşık 400 °C'de kaybeder [81].

Şekilde MMT nin TGA grafiğine bakacak olursak 400 civarında MMT den interkalize suyun uzaklaşması sebebi ile MMT kütle kaybı başlamıştır. SAP ve HSA-NP'nin bozunma sıcaklığı sırasıyla 290 °C ve 330 °C'dir. MMT-HSA-SAP NP'lerinin bozunma sıcaklığı 330°C iken, 800 °C 'de % 28'lik bir kalıntı oluşmuştur. TGA çalışmaları, zaman içindeki sıcaklık artışına karşı kütle değişimine göre MMT'nin ve SAP'nin HSA NP'leriyle potansiyel etkileşimini desteklemiştir.



Şekil 4-15. MMT, SAP, HSA NP'leri ve MMT-HSA-SAP NP'lerinin TGA analizi

4.1.7. Matris ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Kütle Spektroskopisi (MALDI-MS) Analizleri

MMT-HSA-SAP NP'lerin MALDI-TOF kütle spektrumu Şekil 4-16'da verilmiştir. Bu spekturumu incelediğimizde tüm SAP'ler (*Tribulus terrestris* den elde edilen) fragmentasyon davranışı sergilediğinden, SAP'lere ve fragment iyonlarına ait 670 ve 1300 m/z arasında çok sayıda pik görünmektedir.

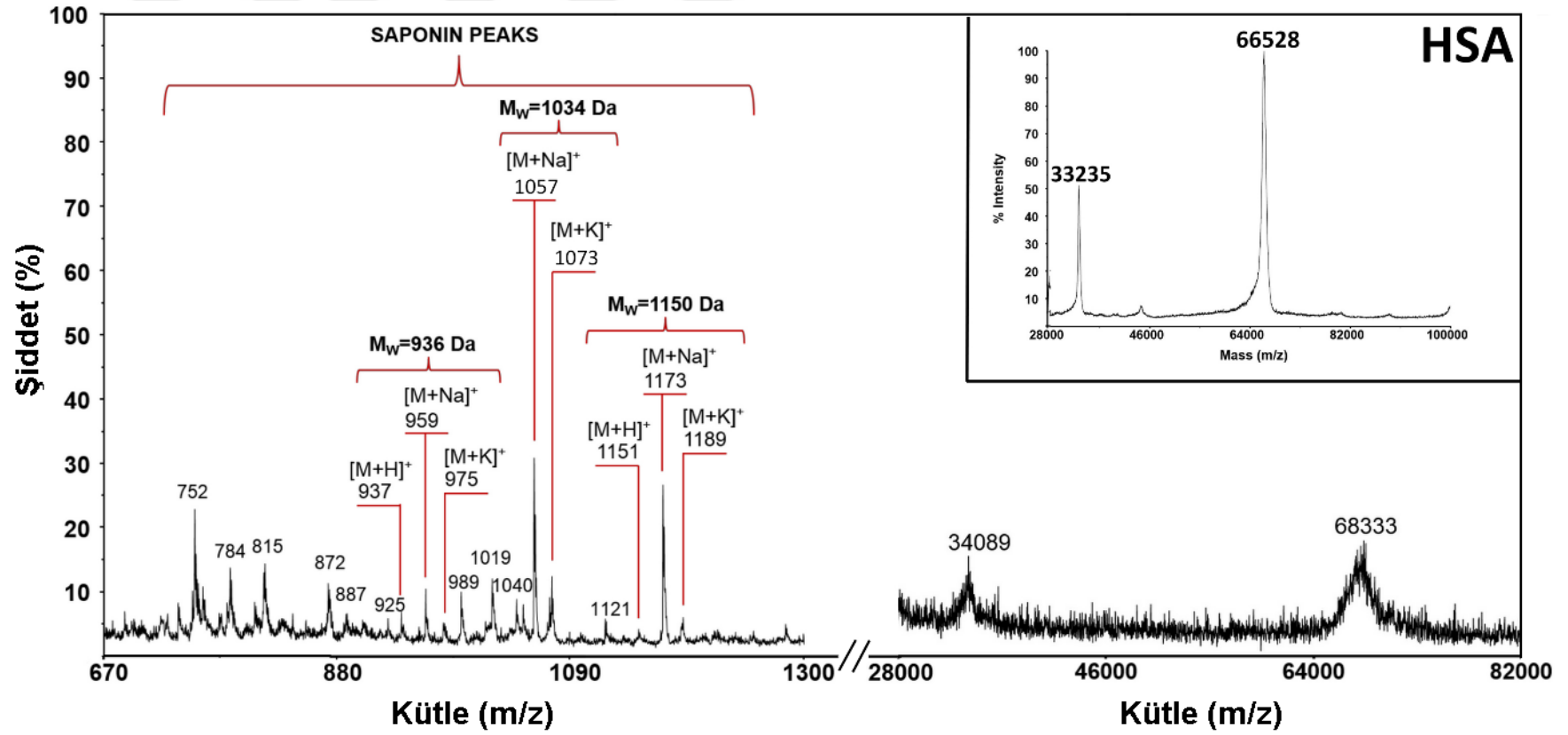
Sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+) iyonlarının varlığı ve SAP'lerin katyonlara olan yüksek afinitesi nedeniyle, tüm ana pikler sodyum ve potasyum katyonize türlere, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ve $[\text{M} + \text{K}]^+$, ait olduğu belirlenmiştir. 1189, 1173 ve 1151 m/z deki iyon pikleri, molekülün sırasıyla K^+ , Na^+ ve H^+ ile katyonlaştırılmasıyla oluşturulmuştur. Bu iyon pikleri ortalama molekül ağırlığı 1150 Da'dır ve tribülozine ($\text{C}_{55}\text{H}_{90}\text{O}_{25}$) atfedilebilir.

1041, 1019, 887 ve 872 m/z deki iyonlar, tribülozinin şeker birimlerinin kaybindan dolayı oluşan fragmentleri, yani sırasıyla $[(\text{M} + \text{Na}) - \text{ksiloz}]^+$, $[(\text{M} + \text{H}^+) - \text{ksiloz}]^+$, $[(\text{M} + \text{H}^+) - 2 \text{ksiloz}]^+$, ve $[(\text{M} + \text{H}^+) - \text{ksiloz} - \text{ramnose}]^+$ ifade etmektedir.

Benzer şekilde, 1073 ve 1057 m/z deki iyon pikleri $[\text{M} + \text{K}]^+$ ve $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 'yı temsil eder ve ortalama molekül ağırlığı 1034 Da olan desgalaktotigonin / gitonine ($\text{C}_{50}\text{H}_{82}\text{O}_{22}$) atfedilebilir.

925 m/z deki parçacık iyonu, desgalaktotigonin $[(\text{M} + \text{Na}) - \text{pentoz}]^+$ un bir pentoz biriminin kaybını gösterir. Bu özellikler, dallanmış şeker zincirleri olan SAP'lerin karakteristik özelliklerini taşımaktadır [131], [132]. 975, 959 ve 937 m/z deki pikler, terrestrosin F'ye ($\text{C}_{45}\text{H}_{76}\text{O}_{20}$) verilen 936 Da'lık bir ortalama moleküler ağırlığını göstermektedir [104]. Bu bulgular saponinin, MMT-HSA nanopartiküllere başarılı bir şekilde yüklendiğini göstermiştir.

SAP ve MMT'nin proteinlere afinitesi iyi bilinmektedir [133]–[135]. HSA'nın MALDI-TOF kütle spektrumunda $[\text{HSA} + \text{H}]^+$ ve $[\text{HSA} + 2\text{H}]^+$ iyonlarına ait 66,528 ve 33,235 m/z de iki keskin ve bir yoğun pik gözlemlenmiştir. Bu pikler, HSA'ya karşılık gelen 66,5 kDa'lık ortalama moleküler ağırlığı temsil etmektedir. NP oluşumu sırasında HSA'nın SAP ve MMT ile etkileşiminden sonra, HSA sinyali gürültülü ve genişleyerek ortalama molekül ağırlığı 68,3 kDa'ya karşılık gelmiştir. Bu bulgular SAP ve MMT'nin HSA ile diffüz ve elektrostatik olarak birleştiğini göstermektedir.



Şekil 4-16. MMT-HSA-SAP NP'lerin MALDI-TOF kütle spektrumu (ek küçük resim: HSA'nın MALDI-TOF kütle spektrumu)

4.1.8. Su Alım (Şişme) Testi

HSA NP'leri ve MMT-HSA NP'leri için su alımı (şişme) testi, fizyolojik pH da (PBS pH 7,4) gerçekleştirilmiştir. Yüzde su alımı (% W) 24 ve 48 saat sonra HSA nanopartiküller için sırasıyla $237,5 \pm 4,7$ ve $337,5 \pm 6,1$ ve MMT-HSA NP'ler için sırasıyla $650,0 \pm 19$ ve $1237,5 \pm 18,8$ olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4-2. HSA ve MMT-HSA NP'ler belli süreler sonundaki su tutma miktarları

Süre	HSA NPs	MMT-HSA NPs
0	8 mg	8 mg
24 saat	27 mg	35 mg
48 saat	60 mg	107 mg

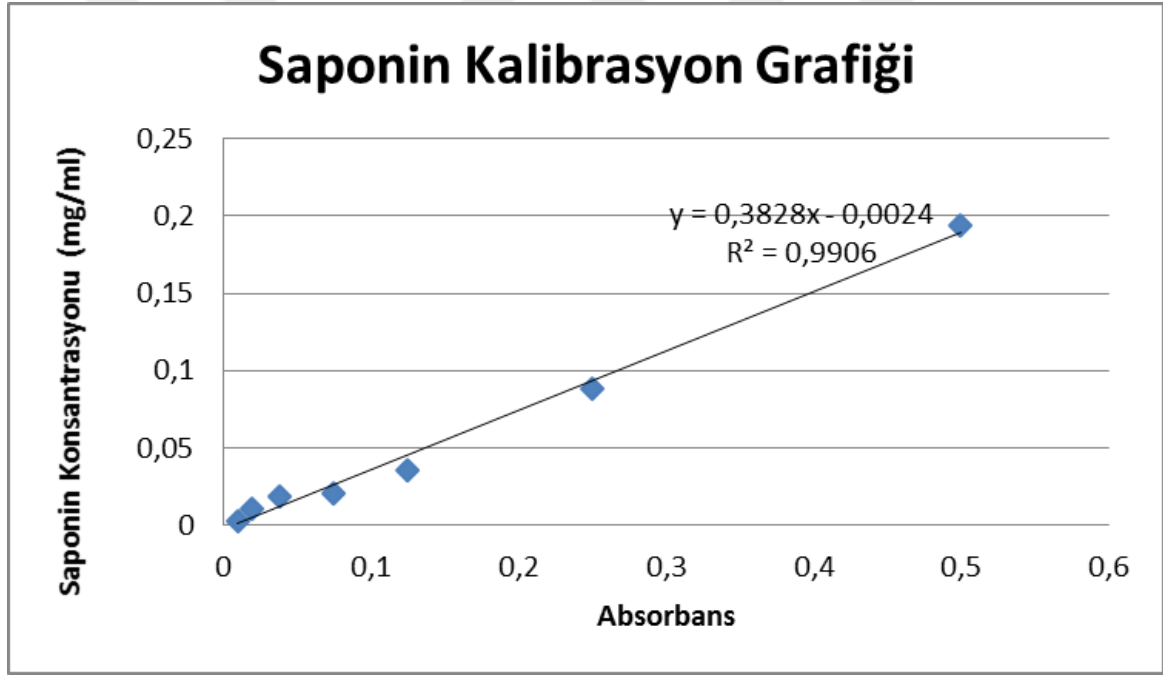
MMT'nin dahil edilmesi, NP'lerin su alımını arttırmıştır. Ayrıca, HSA NP'leri ve MMT-HSA NP'lerinin su alımı zamanla artmıştır. Bunun nedeni, mükemmel absorpsiyon kapasitesine sahip MMT'nin fazla su emmesi ve çevredeki katı madde ile su arasındaki dengeyi sağlamasıdır [60].

Daha düşük pH'ta, serbest amin grupları protonlanmış hale gelir ve bitişik pozitif yüklü polimer zincirleri arasında itici bir kuvvet meydana getirir. Polimerin şişmesine ve sonuç olarak daha fazla miktarda suyun polimer matrisine difüzyonuna neden olur. Fakat düşük pH aralığı üretilen HSA NP'lerin stabilitesi için uygun değildir. Su alım kapasitesi genellikle, çapraz bağlanma derecesi ve eksfoliyasyon MMT tabakaları ile koşullandırılan, uzun HSA zincirleri ile MMT katmanları arasındaki temel iyonik etkileşimlerden etkilenmektedir. Bu da çapraz bağlanma derecesinin arttırılmasına yardımcı olmuştur. Bu nedenle, MMT'nin HSA'ya dahil edilmesi nanopartiküllerin ağını güçlendirmiş ve su alımını ve tutmasını arttırmıştır (Tablo 4-2) [58], [136].

4.2. HSA ve MMT-HSA NP'lerin Enkapsülasyon Verimliliğinin (% EE)

Hesaplanması

Kompozit nanoyapıların enkapsülasyon verimliliğinin hesaplanabilmesi için öncelikle saponin kalibrasyon çalışması yapılmıştır (Şekil 4-17). NP'ler için, EE'nin saptanması, ilaç taşıma sistemlerinde kullanılması için önemlidir. NP'lerin daha yüksek % EE değerine sahip olmasının kanser hücresi ölüm oranlarını arttırdığı bilinmektedir. 204 nm'de UV spektrometre ile okunan saponin absorpsiyonlarının konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmesi sonucu elde edilen denklem ile konsantrasyon hesaplaması yapılmıştır. Bu hesaplamanın ardından % EE eşitliği uygulanarak sonuçlar elde edilmiştir.



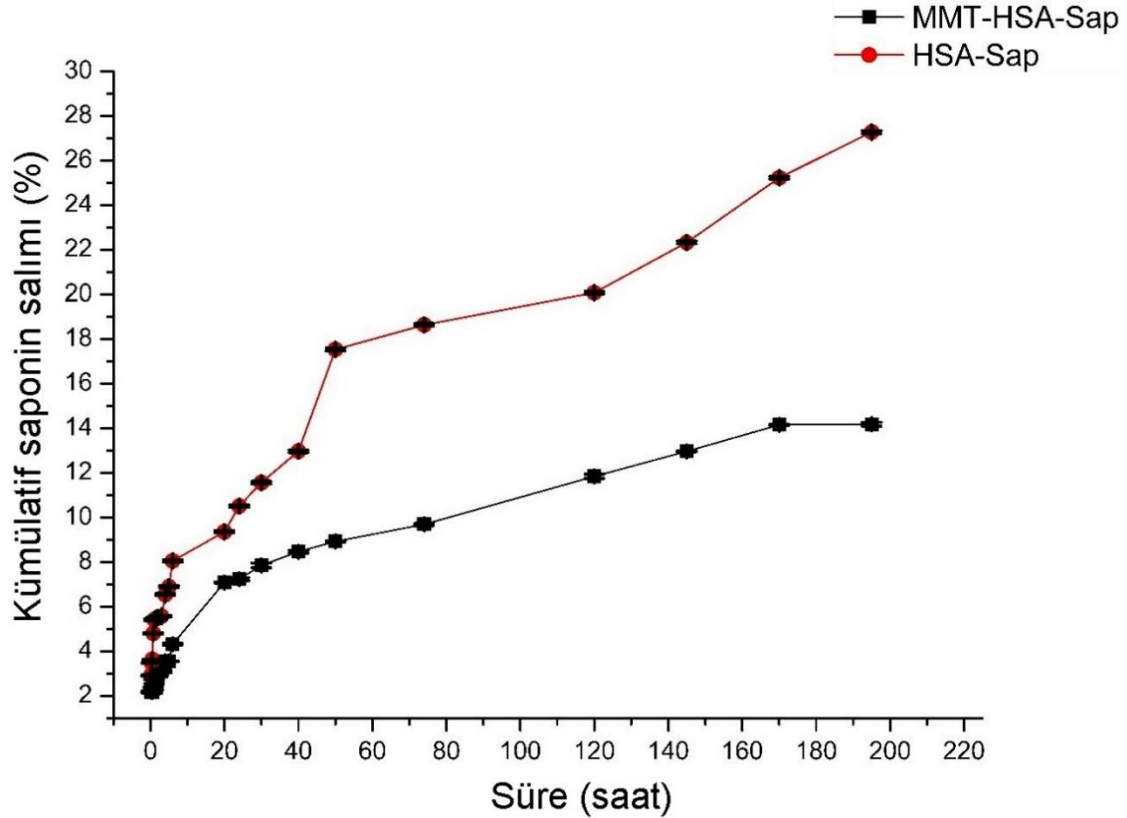
Şekil 4-17. Saponin kalibrasyon grafiği

Yapılan çalışmalar sonucunda kompozit nanopartikül yapısına katılan MMT miktarını arttırdıkça % EE'nin de arttığı tespit edilmiştir fakat stabil ve istenilen boyutta kompozit nanopartikül elde etmek için % 3'lük MMT çözeltisi tercih edilmiştir. HSA NP ve MMT-HSA NP'lerdeki SAP'ın EE yüzdesi sırasıyla % 55,0 ± 2,0 ve % 88,4 ± 1,3 bulunmuştur. NP'nin EE oranı, MMT'nin birleşmesiyle artmıştır. Bunun nedeni, MMT'nin yüksek spesifik yüzey alanına ve SAP'ın hapsedilmesini arttıran yüksek bir ara kat alanı sağlayan silikat tabakalarına sahip olmasıdır [58].

4.3. Saponin Salım Çalışmaları

Diyaliz membranı tekniği, HSA ve MMT-HSA NP'leri için ilaç salım çalışmalarını yapmak için kullanılmıştır. Buna göre bağırsak sıvısını taklit eden salım ortamı (pH 7,4) ve iç ortamı sağlamak için 1mg/ml lizozim kullanılmıştır. Ortamdaki lizozim, HSA'nın disülfid bağlarına etki eder ve SAP'ı, lizozim tarafından enzimatik parçalanma nedeniyle NP polimer matrisinden serbest bırakılmasını sağlamaktadır [137].

SAP salım çalışmaları, 8 günün sonunda % 27 SAP'in HSA NP'lerinden salındığını ve % 13 SAP, MMT-HSA NP'lerinden serbest bırakıldığını (Şekil 4-18) göstermiştir. MMT'nin SAP'ni hem dış hem de iç katmanlarda emebileceği düşünülmektedir. Nanopartiküllerden SAP salımı, sadece difüzyon tarafından değil, aynı zamanda polimerik matrisin enzimatik bozulmasıyla oluşmaktadır. Anlatıldığı gibi, MMT katmanlı yapısından dolayı nanopartiküllerin çapraz bağlanmasını arttırmaya yardımcı olur; bu nedenle MMT'nin dahil edilmesi ilacın EE'sini arttırmakla kalmaz, aynı zamanda HSA nanopartiküllerine kıyasla daha yavaş ve sürekli bir ilaç salınmasına neden olur.



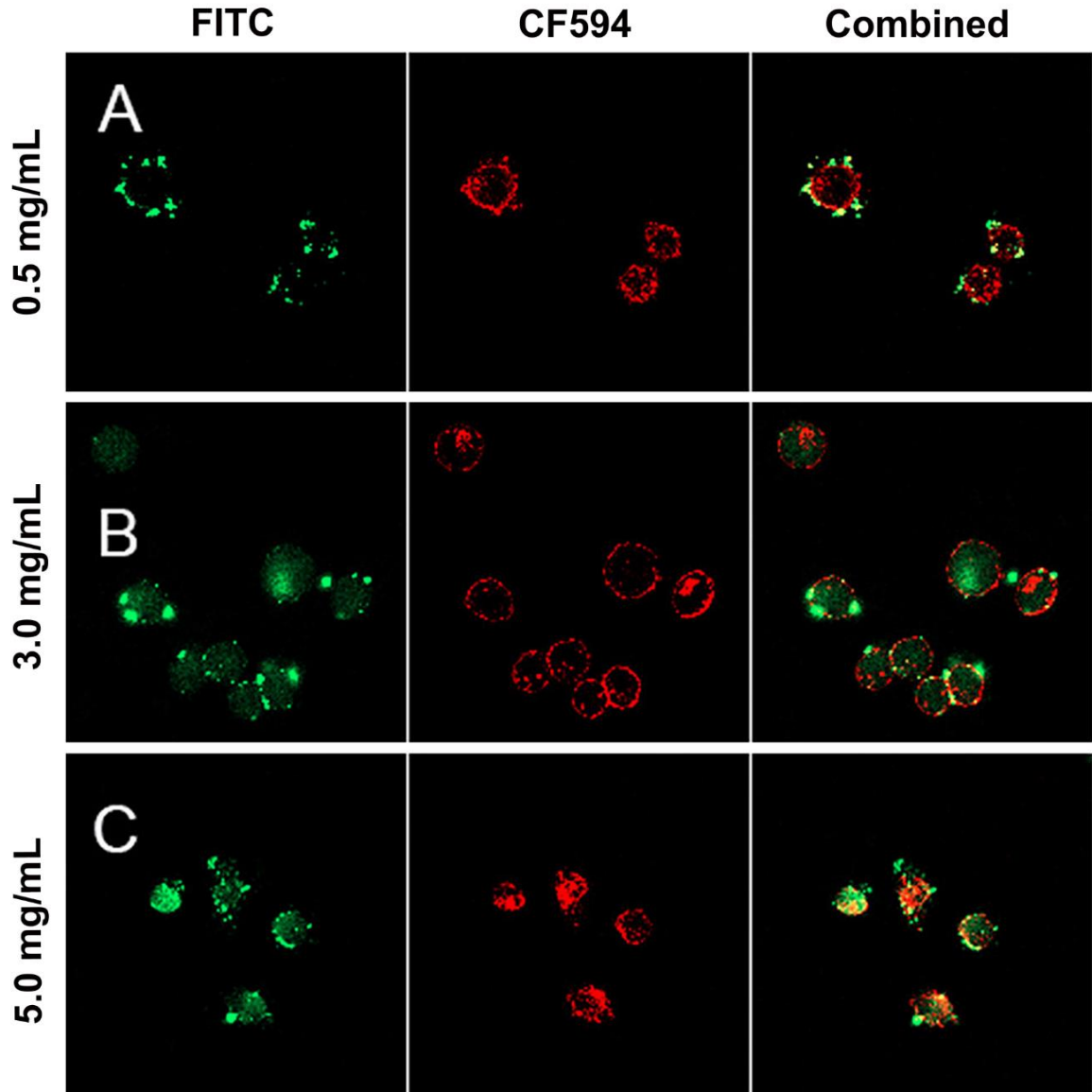
Şekil 4-18. SAP'nin HSA ve MMT-HSA NP'lerden (%) kümülatif salımı

4.4. Nanopartiküllerin Hücresel Alımının Nitel Ve Nicel Analizi

4.4.1. Nanopartiküllerin Hücresel Alımının Nitel Analizi

FITC-konjuge MMT-HSA NP'lerin hücresel alımının nitel analizi CLSM kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DLD-1 hücre membranlarının ve MMT-HSA NP'lerin görüntülenebilmesi için sırası ile CF594-Wheat Germ Agglutinin (WGA) (kırmızı floresan) ve floresein izotiyosiyanat (FITC) (yeşil floresan) kullanılmıştır. Kontrol hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüsünde hiçbir floresans gözlenmemiştir. Bu da DLD-1 hücrelerinin oto-floresan özellik taşımadığını göstermektedir. Sunulan tez kapsamında, DLD-1 hücreleri ile inkübasyon sonrası MMT-HSA NP'lerinin konsantrasyona bağlı alımı gösterilmiştir.

Hücreler, 37 °C'de 2 saat boyunca 0,5, 3 ve 5 mg/ml MMT-HSA NP'ler ile inkübe edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda MMT-HSA NP'lerin (yeşil), CF594-WGA ile boyanan membran etrafına (kırmızı) lokalize olduğu ve daha yüksek konsantrasyonda hücre içinde görüldüğü tespit edilmiştir. Bu da NP'lerin hücreler tarafından konsantrasyona bağlı bir şekilde (Şekil 4-19) alındığını göstermiştir.

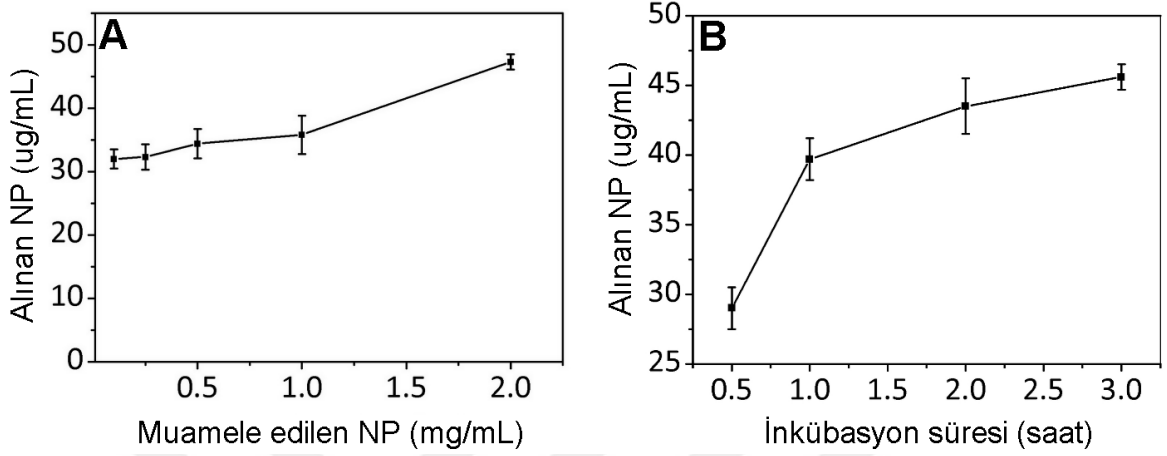


Şekil 4-19. MMT-HSA NP'lerin hücresel alımı ve hücre içi dağılımı. NPler (yeşil), 2 saat boyunca DLD-1 hücre çizgisi ile 0,5 mg/ml (A), 3 mg/ml (B) ve 5 mg/ml (C) konsantrasyonda inkübe edildi ve 40x büyütme kullanılarak CLSM ile görselleştirildi. Hücre zarları CF594-WGA ile boyanmıştır. FITC-bağlı MMT-HSA NP'lerin hücresel alımı, sırasıyla FITC kanalı (sol panel), CF594 kanalı (orta panel) ve kombine CF594 ve FITC kanalları (sağ panel) tarafından görüntülendi.

4.4.2. Nanopartiküllerin Hücresel Alımının Nicel Analizi

Farklı konsantrasyonlarda FITC-konjuge MMT-HSA NP'lerin hücresel alımı nicel çalışma ile de araştırılmıştır. DLD-1 hücreleri tarafından FITC-konjuge MMT-HSA NP alımı 2 saat inkübasyondan sonra 0,12 ile 2 mg/ml partikül konsantrasyonu aralığında 1,5 kat artış göstermiştir (Şekil 4-20). Aynı eğilim, aynı NP'ler DLD-1

hücreleri ile farklı sürelerle inkübe edildiğinde görülmüştür. İnkübasyon süresi 0,5 saatten 3 saate arttırıldığında, hücresel alımda 1,6 kat artış görülmüştür. Floresan ölçümleri zamana bağlı olduğu için, FITC konjuge MMT-HSA NP'lerinin hücrelerle inkübasyon süresi 3 saat ile sınırlandırılmıştır.



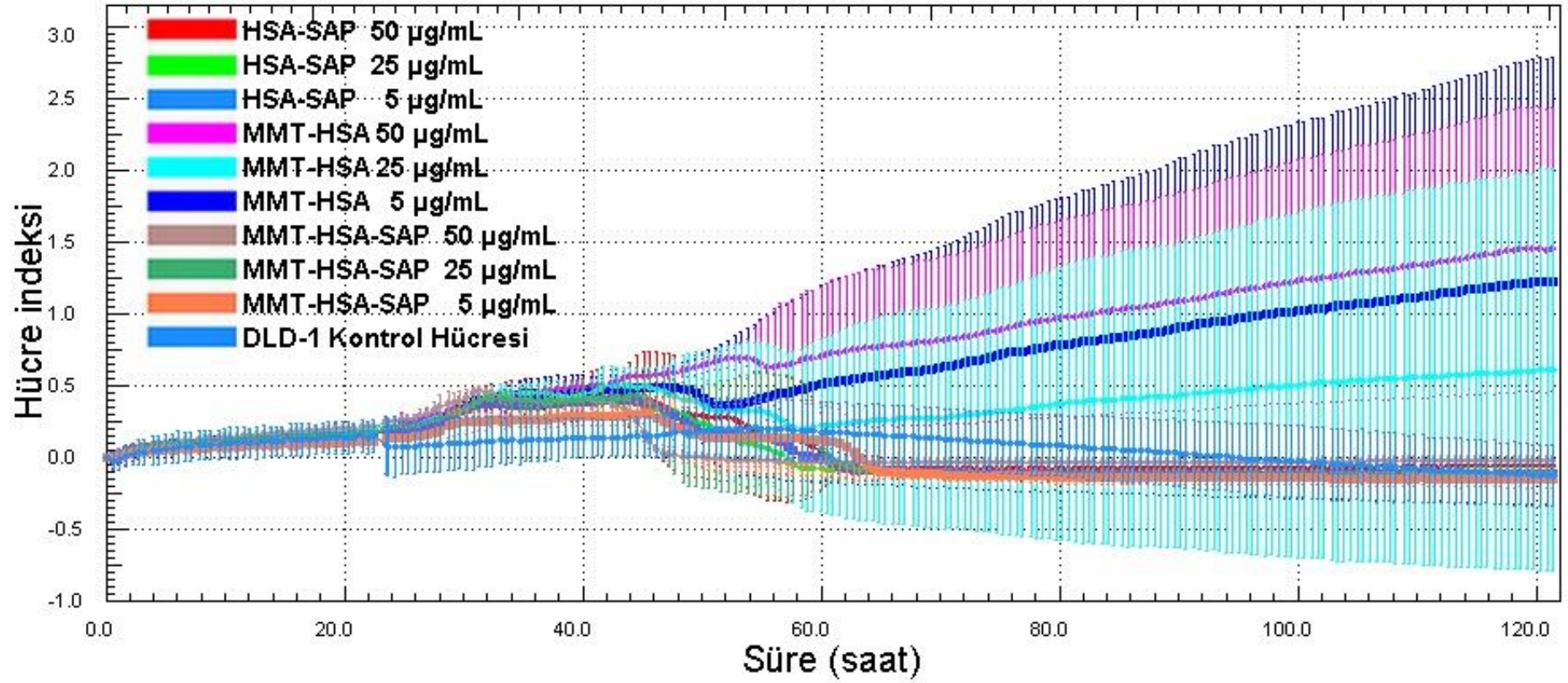
Şekil 4-20. Farklı nanopartikül konsantrasyonların da (A) ve farklı inkübasyon sürelerinde (B) hücre ile etkileşim gösteren FITC bağlı MMT-HSA NP'ler

Tüm bu sonuçlara göre, hücrelerin maruz bırakıldığı NP'lerin konsantrasyonu arttığında, hücre tarafından alım miktarı da artmıştır. Bu sonuçlar MMT-HSA nanopartiküllerin DLD-1 hücreleri için toksik olmadığı, konsantrasyon ve zamana bağlı bir şekilde hücreler tarafından alındığını göstermiştir [113], [138].

4.5. Sitotoksosite

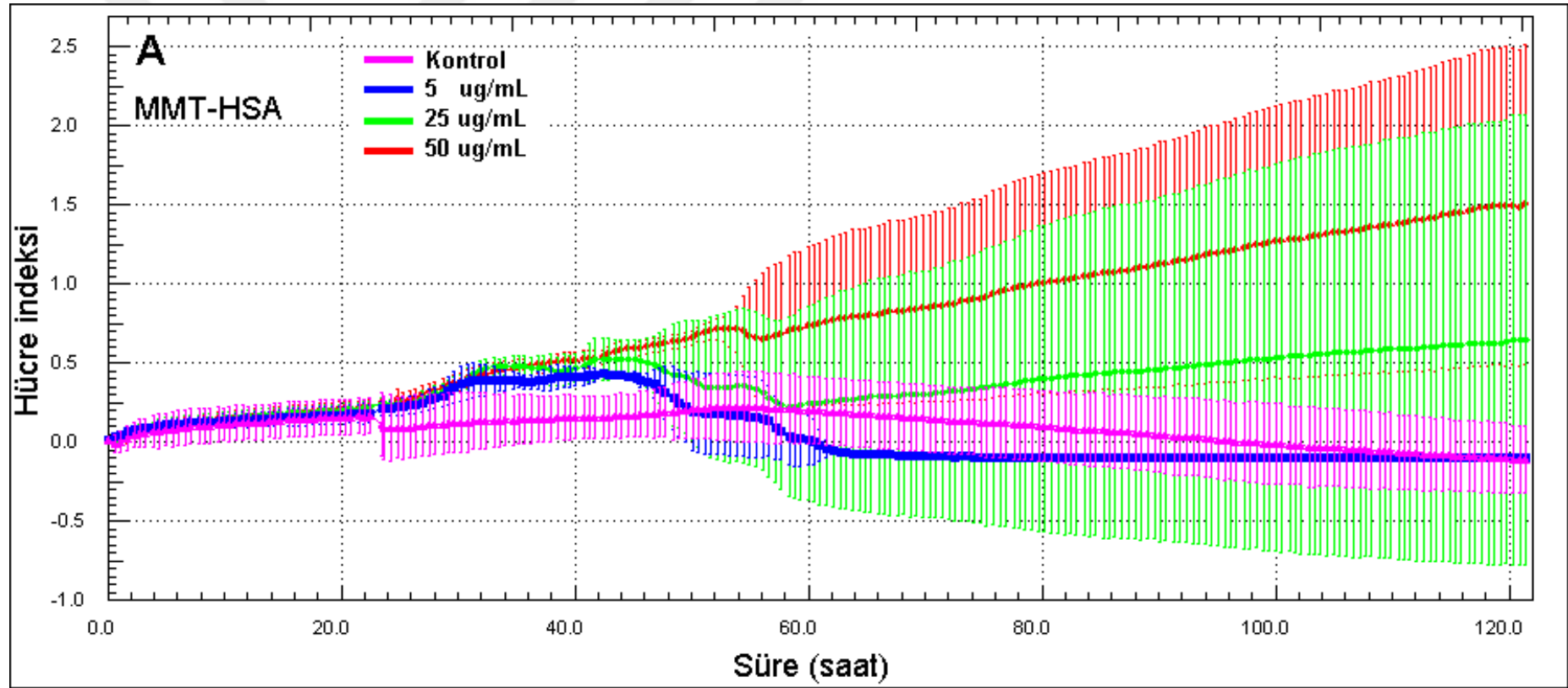
HSA-SAP, MMT-HSA ve MMT-HSA-SAP NP'lerinin DLD-1 ve L929 hücre dizileri üzerinde sırasıyla 5, 25 ve 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında etkisi incelenmiştir. Hücreler, RTCA sistemi kullanılarak izlenmiştir. Bu sistemde 96 kuyucuklu bir E-plakasının her bir kuyucuklarındaki empedans değişiklikleri 5 günlük bir süre boyunca ölçülmüş ve hücre indeksine (CI) dönüştürülmüştür.

Yapılan analizlerde ilk olarak tüm formülasyonlar üç farklı konsantrasyonda incelenerek Şekil 4-21. deki grafik elde edilmiştir.

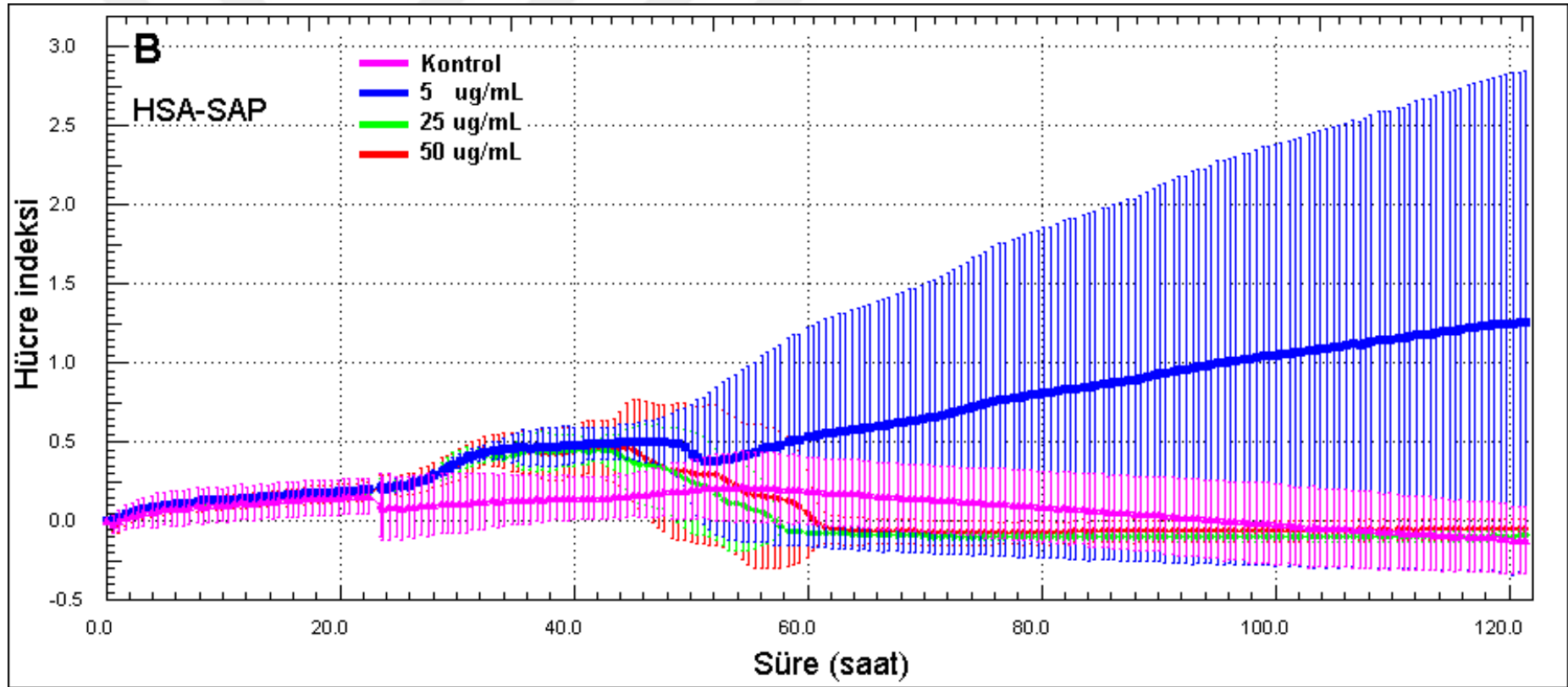


Şekil 4-21. 5, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonda HSA-SAP MMT-HSA ve MMT-HSA-SAP NP'lerinin DLD-1 hücre hattı üzerinde gerçek zamanlı hücre analizleri

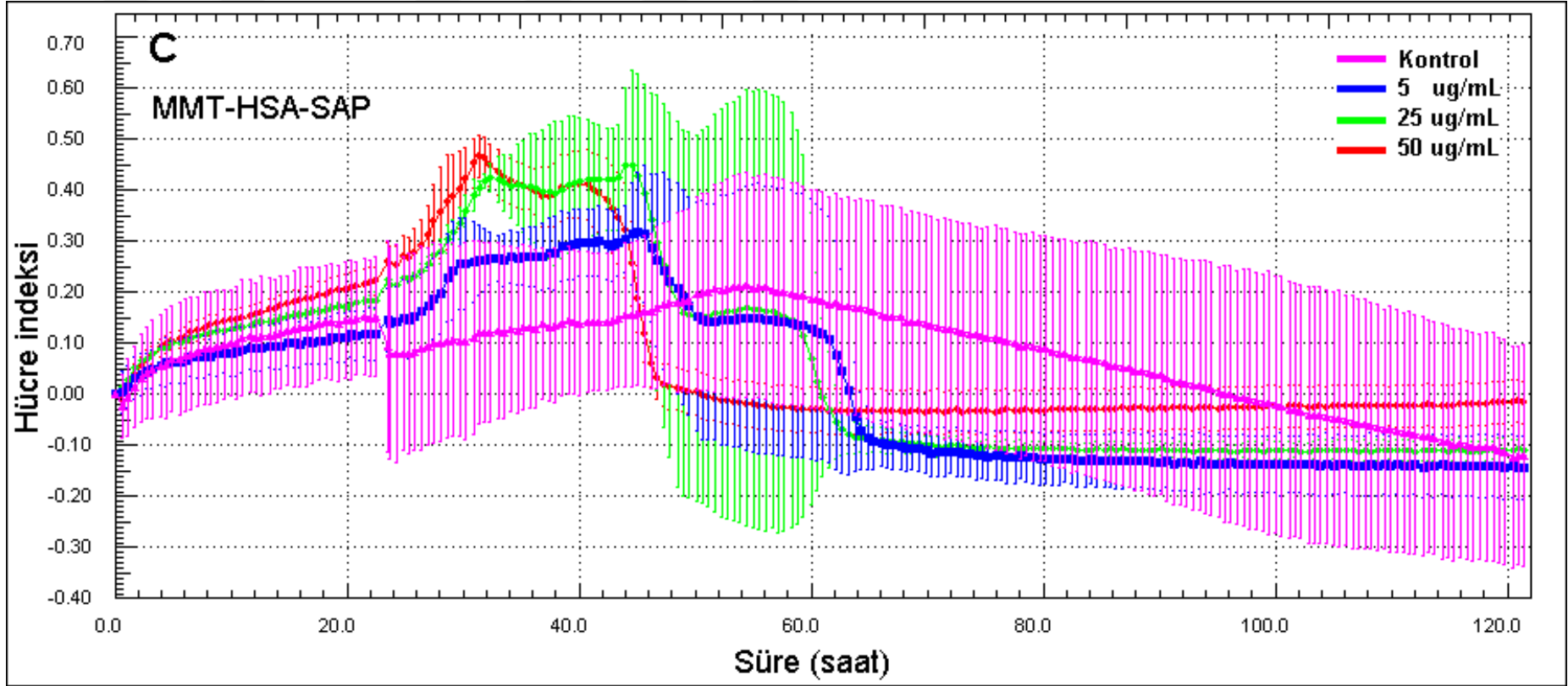
Şekil 4-21’de görüldüğü üzere MMT-HSA kompozit nanopartikül formülasyonunun tüm konsantrasyonu hücre proliferasyonunda olumlu etki sergilemiş ve hücrelerin çoğaldığı gözlemlenmiştir. Bu da sentezlenen kompozit yapıların toksik etki göstermediğini ortaya koymuştur. Farklı olarak, saponin yüklü kompozit nanopartiküllerin tüm formülasyonları toksik etki göstermiş ve hücre proliferasyonunu durdurmuştur. Aynı etki saponin yüklü albümin NP’lerde de gözlemlenmiştir. Bundan sonraki gerçek zamanlı hücre analiz grafiğinde formülasyonlar daha detaylı incelenmiştir. MMT-HSA NP’ler ile muamele edilen hücrelerin proliferasyon oranı (PR), doza bağlı bir artış göstermiştir. Bu dikkat çekici fark, hücre proliferasyonunun oluşumunu belirtmektedir (Şekil 4-22). MMT-HSA NP’leri, MMT’nin sahip olduğu mukoza koruma etkisi ve sitokompatibilitesi sonucunda hücre çoğalma oranlarını artırdığı öngörülmektedir [117], [136], [138], [139]. Sonuçlar kontrol gruplarınıninkile karşılaştırıldığında, MMT hücrelere karşı toksisite göstermemiştir.



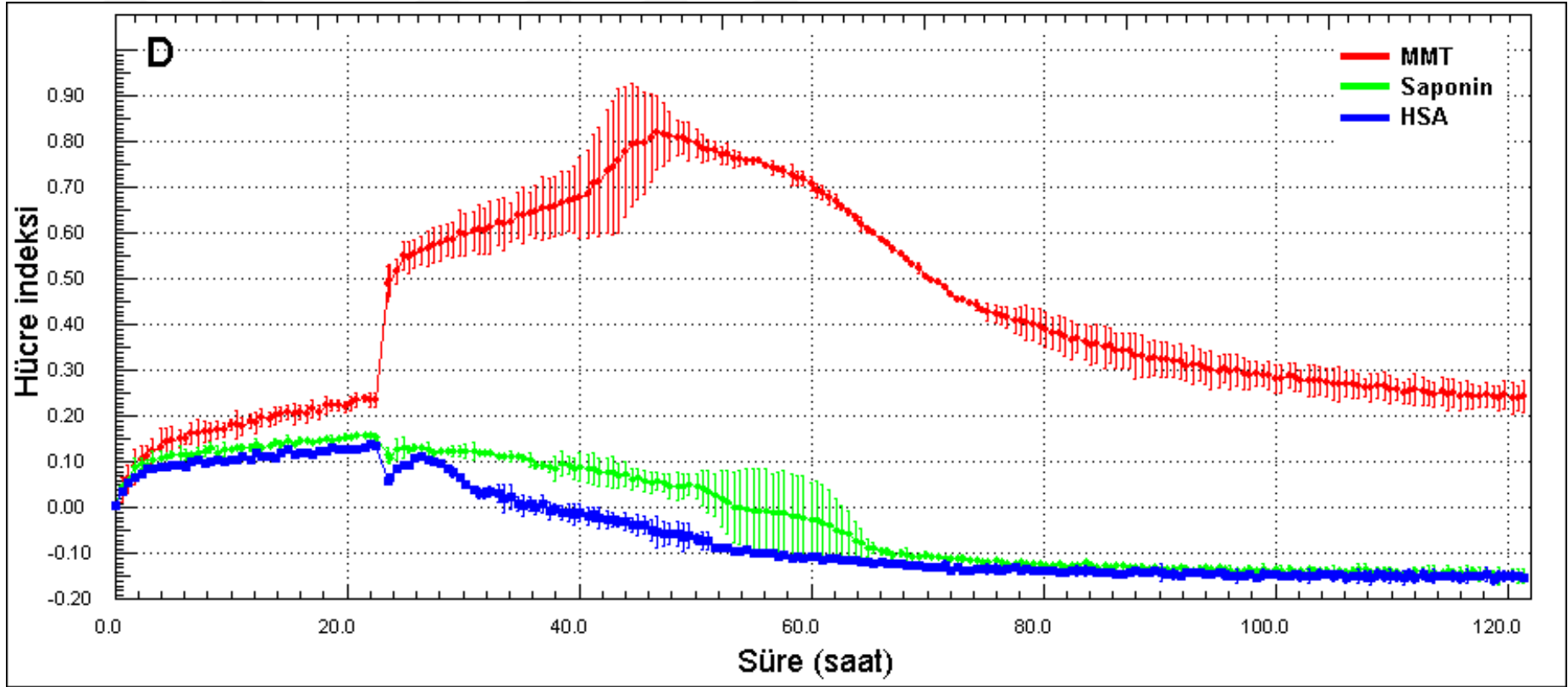
Şekil 4-22. 5, 25 ve 50 μg / ml konsantrasyonda MMT-HSA-NP'lerinin DLD-1 hücre hattı üzerinde gerçek zamanlı hücre analizleri



Şekil 4-23. 5, 25 ve 50 µg / ml konsantrasyonda HSA-SAP NP'lerinin DLD-1 hücre hattı üzerinde gerçek zamanlı hücre analizleri



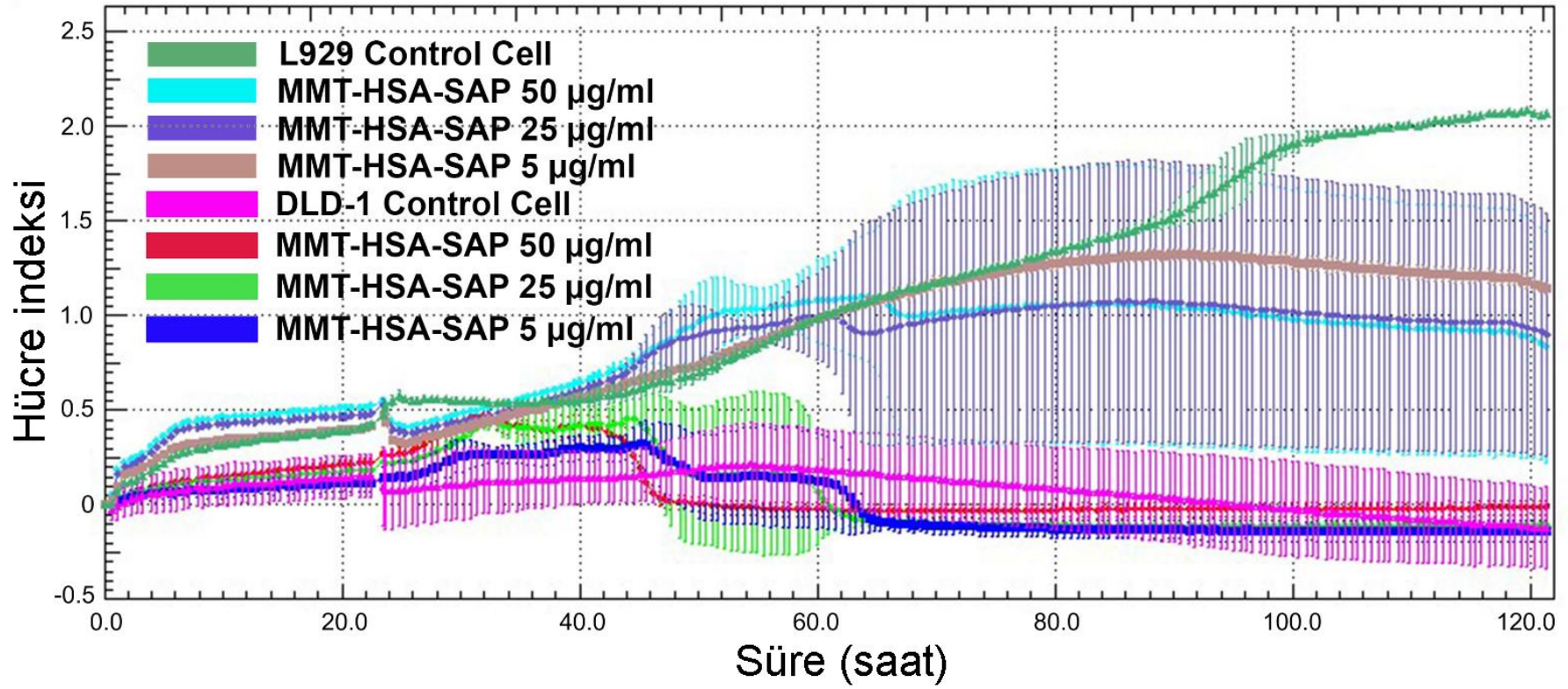
Şekil 4-24. 5, 25 ve 50 μg / ml konsantrasyonda MMT-HSA-SAP NP'lerinin DLD-1 hücre hattı üzerinde gerçek zamanlı hücre analizleri



Şekil 4-25. 50 µg / ml konsantrasyonda MMT, HSA ve SAP nin DLD-1 hücre proliferasyon hızları üzerindeki etkileri

5, 25 ve 50 µg/ml derişimlerde HSA-SAP NP'lerin hücre proliferasyon oranı üzerindeki etkinliği araştırıldığında, konsantrasyona bağlı bir düşüş gözlenmiştir (Şekil 4-23). Fakat en düşük derişimde (5 µg/ml) proliferasyonu arttırıcı etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. 5, 25 ve 50 µg/ml MMT-HSA-SAP NP ile muamele edilen hücrelerin proliferasyon oranı, tedaviden 30 saat sonraya kadar hafifçe artmış ve ardından dramatik bir şekilde düşüş göstermiştir (Şekil 4-24). Bu derişime bağlı hücre proliferasyon oranı düşüşü, MMT-HSA-SAP NP'lerinin hücre yayılımı üzerindeki inhibitör etkisini ve kanser hücreleri üzerindeki toksik etkinliğini göstermiştir.

SAP'ın kanser hücre hattı üzerindeki toksik etkisi Şekil 4-25 ve 4-26'da gösterilmiştir. SAP yüklü NP'ler ile tedavi edilen hücrelerin proliferasyon oranı dikkat çekici şekilde azalmıştır. Bu sonuç ayrıca SAP yüklü MMT-HSA NP'lerinin, antikanser ilaçların taşıyıcıları olarak işlev görmek için ideal aday olduğunu doğrulamaktadır. Çalışmanın devamında, MMT-HSA-SAP NP'lerinin DLD-1 ve L929 hücre hatları üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir.



Şekil 4-26. MMT-HSA-SAP NP'lerinin DLD-1 ve L929 hücre hatları üzerindeki Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

SAP, NP'lere yüklendikten sonra, MMT-HSA-SAP NP'leri DLD-1 hücreleri üzerinde proliferasyonu durdurucu bir etki göstermiştir. SAP, kanserli veya sağlıklı hücrelere karşı belirgin ve karmaşık mekanizmalar yoluyla önemli sitotoksik aktivite göstermiştir. Sahip oldukları yapısal fragmentasyona göre farklı türlerde saponin vardır. Tribulosin ve terrestrosin de bir çeşit saponindir ve onlarla birlikte *Tribulus terrestris*'ten elde edilen SAP'in sitotoksik etkilerini net bir şekilde ortaya koyan 60 farklı kanser hücresi hattı üzerinde anti kanser aktiviteleri değerlendirilmiştir [116], [140]–[142].

SAP özellikle hücre zarında kolesterol ile reaksiyona girer ve kanser hücreleri yüksek kolesterol seviyeleri içerir. Sonuç olarak, SAP normal hücrelerden daha etkin bir şekilde kanser hücreleri ile etkileşir, ancak düşük bir terapötik indeks ile sonuçlanan, membran hasarı ve nekrozuna neden olur [143]. Ayrıca SAP, eritrositlere karşı hemolitik aktiviteye sahiptir [144]–[146], . SAP tarafından vücuda doğrudan uygulamayı takiben sergilediği bu toksik etkiler nedeniyle, nanoteknolojik yaklaşımlar kullanılarak bazı ilaç taşıyıcı sistemlerle birlikte uygulanması gerekmektedir. Ek olarak, NP'ler SAP'nin kontrollü salınımına izin verir ve onu kimyasal-biyolojik bozunmadan korur. Bu nedenle, MMT-HSA NP'ler SAP etkinliğini artırır ve kolon kanserini tedavi etmenin alternatif bir yolu olarak hizmet edebilir.

5. SONUÇLAR

Sunulan doktora tez çalışması kapsamında kanser tedavisine yönelik hem HSA hem de MMT' nin üstün özelliklerinden yararlanılarak literatürde ilk defa MMT-HSA kompozit nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemler hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Ardından saponin taşınımı ve kolorektal adenokarsinoma hücreleri üzerinde etkinliği değerlendirilmiştir. Bu doktora tezi ile küratif etkilere sahip materyaller kullanılarak nanopartiküler sistemler üretilerek literatüre yeni bir yaklaşımın sunulması hedeflenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

- Çalışmanın ilk bölümünde modifiye desolvasyon yöntemi ile hazırlanan HSA ve MMT-HSA NP'lerin kimyasal karakterizasyonu FT-IR, DLS, EDX, MALDI ve TGA, morfolojik karakterizasyonu ise SEM ve TEM cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kimyasal bulgular sonucunda HSA ve MMT'nin kompozit yapılar oluşturduğu ve saponinin nanopartiküllere yüklendiği doğrulanmıştır. Morfolojik incelemeler sonucu nanopartiküllerin oldukça küresel yapıya ve düzgün yüzeye sahip oldukları belirlenmiştir.
- İnsan serum albümin (HSA) ile sentezlenen nanopartiküller DLS analizlerine göre ortalama çapı $55 \pm 2,97$ nm olan ve $-22 \pm 0,85$ zeta potansiyeline sahip olan eş boy dağılımlı küresel yapılardır. Yapıya MMT katkılандırıldığında ise yaklaşık olarak 15 nm'lik bir artış tespit edilmiş fakat nanopartiküllerin zeta potansiyelini etkilememiştir. SEM ve TEM sonuçları da bu bulguları doğrulamıştır.
- MMT-HSA kompozit NP üretiminde optimizasyon çalışmaları için, saponin ve MMT konsantrasyonu nanopartikül boyutuna etki eden parametreler olarak değerlendirilmiştir. Derişimlerdeki artış daha büyük nanopartikül eldesi ile sonuçlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda $43,9 \pm 2,62$ elde edilen en düşük kompozit nanopartikül boyutu olarak bulunmuştur. Fakat hem boyut hem zeta potansiyel hemde polidispersity endeks dikkate alındığında, MMT-SAP'in optimum konsantrasyonları sırasıyla % 3 ve 3 mg / ml olarak tespit edilmiştir.
- Elde edilen FT-IR spektrumlarının analizleri sonucunda MMT-HSA-SAP kompozit NP'lerin HSA'dan amid bağı, MMT'den Si-O bağı ve SAP'dan C-O bağına sahip olduğunu göstermektedir. HSA'nın karakteristik piki ile birlikte MMT'nin Si-O-Si gerilmesine ait 1030 cm^{-1} 'de absorpsiyon frekansında

küçük bir kayma ile MMT varlığı doğrulanmıştır. Ayrıca saponinin C-O gerilmesine ait 1018 cm⁻¹'deki kayma ile saponin varlığı da desteklenmiştir. Bu sonuçlar MMT ve saponin içeren kompozit HSA NP'lerin oluşmasında GA ve HSA arasında Schiff bazı oluşturarak bağlandığını doğrulamaktadır.

- MMT-HSA kompozit NP'lerin yapısında MMT varlığını desteklemek için EDX analizi yapılmış ve bu analiz sonucunda yapıda MMT'ye ait Fe, Al, Si ve K elementleri yüzdeleri sırasıyla 0,14; 1,60; 24,53; 2,48 olarak tespit edilmiş ve ayrıca eser miktarlarda Mg tespit edilmiştir.
- Yine MMT varlığını desteklemek için TGA analizi ile MMT, SAP, HSA NP ve HSA-MMT-SAP NP'lerinin termal bozunma profilleri değerlendirilmiş 400 °C de interkalsize su moleküllerinin desorpsiyonu sonucu MMT kütle kaybetmeye başlamış ve 800 °C ısı da % 28 lik kalıntı tespit edilmiştir. Bu da yapıda MMT varlığını desteklemektedir.
- Elde edilen MALDI-TOF bulguları sonucunda sodyum (Na⁺) ve potasyum (K⁺) iyonlarının varlığı ve SAP'lerin katyonlara olan yüksek afinitesi nedeniyle, tüm ana pikler sodyum ve potasyum katyona türler, [M + Na]⁺ ve [M + K]⁺, ait olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda saponinin fragmentasyonu sonucunda birden fazla yapı tespit edilmiştir. Yapıda, 1150 Da molekül ağırlığına sahip tribülozin (C₅₅H₉₀O₂₅), 1034 Da molekül ağırlığına sahip desgalaktotigonin / gintonin (C₅₀H₈₂O₂₂), 936 Da'lık bir ortalama moleküler ağırlığına sahip terrestrosin F (C₄₅H₇₆O₂₀) tespit edilmiştir. Bunlar saponin varlığını desteklemektedir.
- Yine MALDI-TOF sonuçlarına göre, 66,5 kDa'lık ortalama moleküler ağırlığına sahip HSA sinyali, kompozit nanopartikül sentezi sonucu yani yapıya SAP ve MMT katkılандırıldığında gürültülü ve genişleyerek ortalama molekül ağırlığı 68,3 kDa'ya karşılık gelmiştir. Bu bulgular SAP ve MMT'nin HSA ile birleştiğini göstermektedir.
- HSA NP'leri ve MMT-HSA NP'leri için su alımı (şişme) testi, fizyolojik pH'da (pH 7,4) gerçekleştirilmiştir. Yüzde su alımı (% W) 24 ve 48 saat sonra HSA NP'leri için sırasıyla 237,5 ± 4,7 ve 337,5 ± 6,1 ve MMT-HSA NP'ler için sırasıyla 650,0 ± 19 ve 1237,5 ± 18,8 olarak hesaplanmıştır. MMT'nin HSA'ya dahil edilmesi NP'lerin ağırlığını güçlendirmiş ve su alımı arttırmıştır. Bu sonuç özellikle ilaç enkapsülasyon çalışmaları için oldukça önemlidir. MMT nin

varlığı sonucu kompozit nanoyapı yüksek ilaç hapsetme kapasitesine sahip olmuştur.

- HSA nanopartiküllere etken madde yükleme çalışmalarında, kullanılan etken madde (saponin) miktarı arttıkça yüzde etken madde hapsetme miktarında artış gözlemlendiği bulunmuştur. HSA NP ve MMT-HSA NP'lerdeki SAP'nin enkapsülasyon etkinliği yüzdesi (% EE) sırasıyla $55,0 \pm 2,0$ ve $88,4 \pm 1,3$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar şişme testi ile doğrulanmış ve MMT varlığını desteklemiştir.
- Lizozim varlığında HSA ve MMT-HSA kompozit NP'lerden diyaliz membranı tekniği ile saponin salım çalışması yapılmış ve 8 günün sonunda % 27 SAP'in HSA NP'lerinden salındığını ve % 13 SAP, MMT-HSA kompozit NP'lerinden serbest bırakıldığı tespit edilmiştir. MMT katmanlı yapısından dolayı NP'lerin çapraz bağlanmasını arttırmaya yardımcı olmuş ve bu nedenle MMT'nin dahil edilmesi ilacın EE'sini arttırmakla kalmamış aynı zamanda HSA NP'lerine kıyasla daha yavaş ve sürekli bir ilaç salınmasına yol açmıştır.
- MMT-HSA NP'lerin hücresel alımının kalitatif (nitel) analizi CLSM ile gerçekleştirilmiştir. DLD-1 hücre membranlarının ve MMT-HSA NP'lerin görüntülenebilmesi için sırası ile CF594-Buğday Germ Aglutinin (WGA) (kırmızı floresan) ve floresein izotiyosiyanat (FITC) (yeşil floresan) kullanılmıştır. Düşük konsantrasyonlarda MMT-HSA NP'lerin, CF594-WGA ile boyanan membran etrafına lokalize olduğu ve daha yüksek konsantrasyonda hücre içinde görüldüğü tespit edilmiştir. Bu da NP'lerin hücreler tarafından konsantrasyona bağlı bir şekilde alındığını göstermiştir.
- Farklı konsantrasyonlarda FITC-konjuge MMT-HSA NP'lerin hücresel alımı kantitatif olarak değerlendirilmiş ve DLD-1 hücreleri tarafından FITC-konjuge MMT-HSA NPs alımı 2 saat inkübasyondan sonra 0,12 ile 2 mg/ml partikül konsantrasyonunda bir artış ile 1,5 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte inkübasyon süresi 0,5 ile 3 saat arasında arttırıldığında, hücresel alımda 1,6 kat artış görülmüştür.
- Nanopartiküllerin kolon kanseri hücre hattı (DLD-1) ve fibroblast hücre hattı (fare- L929) üzerinde etkinliğine bakmak için gerçek zamanlı hücre analizi (RTCA) yapılmış ve hücre-nanopartikül etkileşimi altın elektrot kaplı plakalarda 5 gün boyunca gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda, MMT-HSA

kompozit NP formülasyonunun tüm konsantrasyonlarının hücre proliferasyonunda toksik etki göstermediği ve hücrelerinin çoğaldığı gözlemlenmiştir.

- RTCA sonucu, saponin yüklü kompozit nanopartiküllerin tüm formülasyonları toksik etki göstermiş ve hücre proliferasyonunu durdurmuştur. Aynı etki saponin yüklü albümin nanopartiküllerde de gözlemlenmiştir. Hücre ölümü doza bağlı bir şekilde artmıştır.
- MMT-HSA NP'ler ile muamele edilen hücrelerin proliferasyon oranı (PR), doza bağlı bir artış göstermiştir.
- Son olarak, MMT-HSA-SAP NP'lerinin DLD-1 ve L929 hücre hatları üzerindeki etkinliği değerlendirildiğinde kompozit nanopartiküllerin L929 sağlıklı hücre hattı üzerinde toksik etki göstermediği hatta proliferasyonu arttırdığı ama söz konusu DLD-1 kolon kanseri hücre hattı olduğunda proliferasyonu durdurduğu ve hücre ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir. Bu da sentezlenen kompozit nanopartiküllerin seçici özelliğinin olduğunu göstermektedir.
- Sonuç olarak gerçekleştirilen tüm çalışmalar dikkate alındığında kanser tedavisi için gerekli olan altyapının hazır olduğu sonucuna varılmıştır. HSA nanopartikül ile MMT katkılı kompozit HSA nanopartikülü kıyaslayacak olursak, yapıya MMT eklendiğinde boyut ve zeta potansiyel açısından büyük farkların olmadığı, her iki yapısında küresel ve monodispers oldukları, etken madde hapsedme kapasitelerinin MMT katkılı kompozit yapılarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Sitotoksikite testlerinde MMT-HSA kompozit nanopartiküllerin daha efektif olup hücresel alım testlerinde daha yüksek etken madde taşıdığı için etkinliğinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. İleriki çalışmalarda nanopartiküllere ligand takılarak ve ilaç yüklenerek etkinlikleri tespit edilip, hayvan deneylerinin yer aldığı *in vivo* çalışmalara geçilecektir.

6. KAYNAKLAR

- [1] World Health Organization, *World Health statistics 2014*, WHO Press, Switzerland, **2014**.
- [2] Grobmyer, S.R., Iwakuma, N., Sharma, P., and Moudgil, B. M., What is cancer nanotechnology?, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 624, 1–9, **2010**.
- [3] Panchapakesan, B. and Wickstrom, E., Nanotechnology for sensing, imaging, and treating cancer., *Surgical oncology clinics of North America*, 16, 293–305, **2007**.
- [4] Sudhakar, A., History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods Akulapalli, *Journal of Cancer Science and Therapy*, 1, 1–4, **2010**.
- [5] Chithrani, D. B., Nanoparticles for improved therapeutics and imaging in cancer therapy., *Recent patents on nanotechnology*, 4, 171–180, **2010**.
- [6] Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. and Hori, K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review, *Journal of Controlled Release*, 65, 271–284, **2000**.
- [7] Shi, J., Kantoff, P. W., Wooster, R. and Farokhzad, O. C., Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities, *Nature Reviews Cancer*, 17, 20–37, **2017**.
- [8] Brigger, I., Dubernet, C. and Couvreur, P., Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 24–36, **2012**.
- [9] Lohcharoenkal, W., Wang, L., Chen, Y. C. and Rojanasakul, Y., Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy, *BioMed Research International*, 2014, 1-12, **2014**.
- [10] Çokaklı, M., Hepatosellüler Karsinoma Dokularında Ve Hücre Hatlarında Kaveolin- c-Met İlişkisinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir, **2006**.
- [11] American Cancer Society, *Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016*, American Cancer Society, Atlanta, 1–32, **2014**.
- [12] Pereira, L. P., Silva, P., Duarte, M., Rodrigues, L. Duarte, C. M. M., Albuquerque, C. and Serra, A. T., Targeting colorectal cancer proliferation, stemness and metastatic potential using Brassicaceae extracts enriched in isothiocyanates: A 3D cell model-based study, *Nutrients*, 9, 1–26, **2017**.
- [13] Kindler, H. L. and Shulman, K. L., Metastatic colorectal cancer, *Current Treatment Options in Oncology*, 2, 459–471, **2001**.
- [14] Kawamori, T., Lubet, R., Steele, V. E., Kelloff, G. J., Kaskey, R. B., Rao, C. V. and Reddy, B. S., Chemopreventive Effect of Curcumin, a Naturally Occurring Anti-Inflammatory Agent, during the Promotion/Progression Stages

of Colon Cancer, *Cancer Research*, 59, 597–601, **1999**.

- [15] Kabbinar, F., Hurwitz, H. I., Fehrenbacher, L., Meropol, N. J., Novotny, W. F., Lieberman, G., Griffing, S. and Bergsland, E., Phase II, Randomized Trial Comparing Bevacizumab Plus Fluorouracil (FU)/Leucovorin (LV) With FU/LV Alone in Patients With Metastatic Colorectal Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 21, 60–65, **2003**.
- [16] Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R. and He, X., Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377–392, **2014**.
- [17] David S.S., *Plant Secondary Metabolism*, Newyork: Springer, 759p, **1998**.
- [18] Wink, M., Secondary Metabolites from Plants Inhibiting ABC Transporters and Reversing Resistance of Cancer Cells and Microbes to Cytotoxic and Antimicrobial Agents, *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-130, **2012**.
- [19] Eid, S. Y., El-Readi, M. Z. and Wink, M., Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells, *Phytomedicine*, 19, 1307–1314, **2012**.
- [20] Okpala, C. C., “Nanocomposites – An Overview,” *International Journal of Engineering Research and Development*, 8, 2278–67, **2013**.
- [21] Paul D. R. and Robeson, L. M., “Polymer nanotechnology: Nanocomposites,” *Polymer*, 49, 3187–3204, **2008**.
- [22] Hernández, K. A. H., Polymer-Clay Nanocomposites and Composites: Structures, Characteristics, and their Applications in the Removal of Organic Compounds of Environmental Interest, *Medicinal Chemistry*, 6, 201–210, **2016**.
- [23] Henrique, P., Camargo, C., Satyanarayana, K. G. and Wypych, F., “Nanocomposites: Synthesis, Structure, Properties and New Application Opportunities,” *Materials Research*, 12, 1–39, **2009**.
- [24] Okpala, C. C., The Benefits and Applications of Nanocomposites, *International Journal of Advanced Engineering Technology*, 5, 12–18, **2014**.
- [25] Lau, A. K. T., Bhattacharyya, D. and Ling, C. H. Y., Nanocomposites for engineering applications, *Journal of Nanomaterials*, 2009, **2009**.
- [26] Morari do Nascimento, G., Clays, Clay Minerals and Ceramic Materials Based on Clay Minerals, 192p, **2016**.
- [27] Velde, B., *Clays And Clay Minerals In Natural And Synthetic Systems*. Elsevier, **1977**.
- [28] Al-Ani T. and Sarapaa, O., Clay and clay mineralogy, Geologian Tutkuskeskus, 91p, **2008**.

- [29] Velde, B., Introduction to Clay Minerals, Springer, 5. **1992**.
- [30] Brigatti, M. F., Galn, E. and Theng, B. K. G., Structure and Mineralogy of Clay Minerals, Elsevier, 1, 19-86, **2013**.
- [31] Bektaş, N., Modifiye Montmorillonitlerin Hazırlanması Ve Adsorpsiyon Kinetiklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2009**.
- [32] Shapley, P., Clay Minerals, **2010**. [Online]. Available: <http://butane.chem.uiuc.edu/pshapley/Environmental/L28/2.html>. [Accessed: 25-Mar-2018].
- [33] Malayoğlu, U. and Akar, A., Killerin Sınıflandırmasında ve Kullanım Alanlarının Saptanmasında Aranılan Kriterlerin İrdelenmesi, *Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu*, 2, 125–133, **1995**.
- [34] Çankaya, N. and Sökmen, Ö., Chitosan-Clay Bionanocomposites, *Journal of Polytechnic*, 19, 283–295, **2016**.
- [35] Barton C. D. and Karathanasis, A. D., Clay Minerals,” *Encyclopedia of Soil Science*, 187–192, **2002**.
- [36] Maes, A. and Cremers, A., Cation Exchange in Clay Minerals: Some Recent Developments, Elsevier, 5, 205-232, **1979**.
- [37] Theng, B. K. G., Developments in Clay Science, Elsevier B.V., **2012**.
- [38] Pham, H. and Nguyen, Q. P., Effect of silica anoparticles on clay swelling and aqueous stability of nanoparticle dispersions, *Journal of Nanoparticle Research*, 16, **2014**.
- [39] Technical data and Nanocor, Polymer Grade Montmorillonites, **2006**.
- [40] International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 231 Bentonite, Kaolin and Selected Clay Minerals, World Health Organization, Geneva, **2005**.
- [41] Moraes, J. D. D., Bertolino, S. R. A., Cuffini, S. L., Ducart, D. F., Bretzke, P. E. and Leonardi, G. R., “Clay minerals: Properties and applications to dermocosmetic products and perspectives of natural raw materials for therapeutic purposes—A review,” *International Journal of Pharmaceutics*, 534, 213–219, **2017**.
- [42] Guggenheim, S., Martin, R. T., Alietti, A., Drits, V. A., Formoso, M. L. L., Galán, E., Köster, H. M., Morgan, D. J., Paquet, H., Watanabe, T., Bain, D. C., Ferrell, R. E., Bish, D. L., Fanning, D. S., Guggenheim, S., Kodama, H. and Wicks, F. J., “Definition of clay and clay mineral: Joint report of the AIPEA nomenclature and CMS nomenclature committees,” *Clays and Clay Minerals*, 43, 255–256, **1995**.
- [43] Ismadji, S., Soetaredjo, F. E. and Ayucitra, A., *Clay Materials for*

Environmental Remediation, SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability, 2007, **2015**.

- [44] Bergaya, F. and Lagaly, G., "Chapter 1 General Introduction: Clays, Clay Minerals, and Clay Science," in *Handbook of Clay Science*, F. Bergaya, B. K. G. Theng, and G. Lagaly, Eds. Elsevier, 1, 1–18, **2006**.
- [45] Murray, H. H., "Traditional and new applications for kaolin, smectite, and palygorskite: a general overview," *Applied Clay Science*, 17, 207–221, **2000**.
- [46] Harvey C. C. and Lagaly, G., "Chapter 4.2 - Industrial Applications," in *Handbook of Clay Science*, F. Bergaya and G. Lagaly, Eds. Elsevier, 5, 451–490, **2013**.
- [47] Saffer, D. M. and Marone, C., "Comparison of smectite- and illite-rich gouge frictional properties: application to the updip limit of the seismogenic zone along subduction megathrusts," *Earth and Planetary Science Letters*, 215, 219–235, **2003**.
- [48] Du, Q., Sun, Z., Forsling, W. and Tang, H., "Acid–Base Properties of Aqueous Illite Surfaces," *Journal of Colloid and Interface Science*, 187, 221–231, **1997**.
- [49] Murray, H. H., "Chapter 2 Structure and Composition of the Clay Minerals and their Physical and Chemical Properties," in *Applied Clay Mineralogy*, H. H. Murray, Ed. Elsevier, 2, 7–31, **2006**.
- [50] Odom, I. E., "Smectite clay minerals: properties and uses," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 311, 391–409, **1984**.
- [51] Oku, T., Rubber Clay Nanocomposites, *Agricultural and Biological Sciences Grain Legumes*, 91-120, **2016**.
- [52] Feng, S. S., Mei, L., Anitha, P., Gan, C. W. and Zhou, W., Poly(lactide)-vitamin E derivative/montmorillonite nanoparticle formulations for the oral delivery of Docetaxel, *Biomaterials*, 30, 3297–3306, **2009**.
- [53] Occelli, M. L., Physicochemical Properties of Montmorillonite Interlayered with Cationic Oxyaluminum Pillars, *Clays and Clay Minerals*, 31, 22–28, **1983**.
- [54] Kurt, A., Çağlayan, Z. and Bektaş, H. S., "Preparation Of Poly(Methyl Methacrylate)/Clay Nanocomposites And Investigation Of Some Physical Properties," *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 416, 71–80, **2014**.
- [55] Uddin, F., Clays, nanoclays, and montmorillonite minerals, *Metallurgical and Materials Transactions A: Physical Metallurgy and Materials Science*, 39, 2804–2814, **2008**.
- [56] Ross, C. S. and Kerr, P. F., The Kaolin Minerals, *Journal of American Ceramic Society*, 13, 151-160, **1930**.
- [57] Hang, P. T. and Brindley, G. W., "Methylene blue absorption by clay minerals,

Determination of surface areas and cation exchange capacities (clay-organic studies XVIII),” *Clays and Clay Minerals*, 18, 203–212, **1970**.

- [58] Hua, S., Yang, H., Wang, W. and Wang, A. “Controlled release of ofloxacin from chitosan-montmorillonite hydrogel,” *Applied Clay Science*, 50, 112–117, **2010**.
- [59] Banik, N., Ramteke, A. and Maji, T. K., Carboxymethyl chitosan-montmorillonite nanoparticles for controlled delivery of isoniazid: evaluation of the effect of the glutaraldehyde and montmorillonite, *Polymers for Advanced Technologies*, 25, 1580–1589, **2014**.
- [60] Li, Z., Liu, K., Sun, P., Mei, L., Hao, T., Tian, Y., Tang, Z., Li, L. and Chen, D., Poly(D, L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for improved oral delivery of exemestane, *Journal of Microencapsulation*, 30, 432–440, **2013**.
- [61] Sun, B., Ranganathan, B. and Feng, S. S., Multifunctional poly(d,l-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer, *Biomaterials*, 29, 475–486, **2008**.
- [62] Sarmah, M., Banik, N., Hussain, A., Ramteke, A., Sharma, H. K. and Maji, T. K., Study on crosslinked gelatin/montmorillonite nanoparticles for controlled drug delivery applications, *Journal of Materials Science*, 50, 7303–7313, **2015**.
- [63] Akbal, Ö., Erdal, E., Vural, T., Kavaz, D. and Denkbaş, E. B., Comparison of protein- and polysaccharide-based nanoparticles for cancer therapy: synthesis, characterization, drug release, and interaction with a breast cancer cell line, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45, 193-203, **2017**.
- [64] Jahanshahi, M. and Babaei, Z., Protein nanoparticle: A unique system as drug delivery vehicles, *African Journal of Biotechnology*, 7, 4926–4934, **2008**.
- [65] Pillai, G., Nanomedicines for Cancer Therapy : An Update of FDA Approved and Those under Various Stages of Development, *SOJ Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 1, 1–13, **2014**.
- [66] Coester C.J., Langer, K., van Briesen, H., Kreuter, J., “Gelatin nanoparticles by two step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake,” *Journal of Microencapsulation*, 17, 187–193, **2000**.
- [67] Balthasar, S., Michaelis, K., Dinauer, N., von Briesen, H., Kreuter, J. and Langer, K., Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes, *Biomaterials*, 26, 723–732, **2005**.
- [68] Lai, L. F. and Guo, H. X., Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting, *International Journal of Pharmaceutics*, 404, 317–323, **2011**.

- [69] Zhong, Q. and Jin, M., Zein nanoparticles produced by liquid–liquid dispersion, *Food Hydrocolloids*, 23, 2380–2387, **2009**.
- [70] Teng, Z., Luo, Y. and Wang, Q., Nanoparticles synthesized from soy protein: Preparation, characterization, and application for nutraceutical encapsulation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2712–2720, **2012**.
- [71] Liu, F. and Tang, C. H., Emulsifying properties of soy protein nanoparticles: Influence of the protein concentration and/or emulsification process, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 2644–2654, **2014**.
- [72] Arangoa, M. A., Campanero, M. A., Renedo, M. J., Ponchel, G. and Irache, J. M., Gliadin Nanoparticles as Carriers for the Oral Administration of Lipophilic Drugs. Relationships Between Bioadhesion and Pharmacokinetics, *Pharmaceutical Research*, 18, 1521–1527, **2001**.
- [73] Duclairoir, C., Nakache, E., Marchais, H. and Orecchioni, A. M., Formation of gliadin nanoparticles: Influence of the solubility parameter of the protein solvent, *Colloid and Polymer Science*, 276, 321–327, **1998**.
- [74] Irache, J. M., Bergougnoux, L., Ezpeleta, I., Gueguen, J. and Orecchioni, A.M., Optimization and in vitro stability of legumin nanoparticles obtained by a coacervation method, *International Journal of Pharmaceutics*, 126, 103–109, **1995**.
- [75] Mirshahi, T., Irache, J. M., Nicolas, C., Mirshahi, M., Faure, J. P., Gueguen, J., Hecquet, C. and Orecchioni, A. M., Adaptive immune responses of legumin nanoparticles, *Journal of Drug Targeting*, 10, 625–631, **2002**.
- [76] Gülseren, İ., Fang, Y. and M. Corredig, “Whey protein nanoparticles prepared with desolvation with ethanol: Characterization, thermal stability and interfacial behavior, *Food Hydrocolloids*, 29, 258–264, **2012**.
- [77] Wu, J., Shi, M., Li, W., Zhao, L., Wang, Z., Yan, X., Norde, W. and Li, Y. Pickering emulsions stabilized by whey protein nanoparticles prepared by thermal cross-linking, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 127, 96–104, **2015**.
- [78] Bessa, P. C., Machado, R., Nürnberger, S., Dopler, D., Banerjee, A., Cunha, A. M., Rodríguez-Cabello, J. C., Redl, H., van Griensven, M., Reis, R. L. and Casal, M. Thermoresponsive self-assembled elastin-based nanoparticles for delivery of BMPs, *Journal of Controlled Release*, 142, 312–318, **2010**.
- [79] Shi, P., Aluri, S., Lin, Y. A., Shah, M., Edman, M., Dhandhukia, J., Cui, H. and MacKay, J. A., Elastin-based protein polymer nanoparticles carrying drug at both corona and core suppress tumor growth in vivo, *Journal of Controlled Release*, 171, 330–338, **2013**.
- [80] Kratz, F., Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles,” *Journal of Controlled Release*, 132, 171–183, **2008**.

- [81] Yang, M., Dutta, C. and Tiwari, A., Disulfide-bond scrambling promotes amorphous aggregates in lysozyme and bovine serum albumin, *Journal of Physical Chemistry B*, 119, 3960–3981, **2015**.
- [82] Elsadek, B. and Kratz, F., Impact of albumin on drug delivery: New applications on the horizon, *Journal of Controlled Release*, 157, 4–28, **2012**.
- [83] Elmer, J., Cabrales, P., Wang, Q., Zhang, N. and Palmer, A. F., Synthesis and biophysical properties of polymerized human serum albumin, *Biotechnology Progress*, 27, 290–296, **2011**.
- [84] Lu, H., Noorani, L., Jiang, Y., Du, A. W. and Stenzel, M. H., Penetration and drug delivery of albumin nanoparticles into pancreatic multicellular tumor spheroids, *Journal of Materials Chemistry B*, 5, 23–26, **2017**.
- [85] Sharma, A. Kaur, A., Jain, U. K., Chandra, R. and Madan, J. “Stealth recombinant human serum albumin nanoparticles conjugating 5-fluorouracil augmented drug delivery and cytotoxicity in human colon cancer, HT-29 cells,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, 200–208, **2017**.
- [86] Erdal, E., Demirbilek, M., Yeh, Y., Akbal, Ö., Ruff, L., Bozkurt, D., Cabuk, A., Senel, Y., Gumuskaya, B., Algin, O., Colak, S., Esener, S. and Denkbaz, E. B., A Comparative Study of Receptor-Targeted Magnetosome and HSA-Coated Iron Oxide Nanoparticles as MRI Contrast-Enhancing Agent in Animal Cancer Model, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185, 91–113, **2017**.
- [87] Lin, W., Coombes, A., Davies, M., Davis, S. and Illum, L., Preparation of Sub-100 nm Human Serum Albumin Nanospheres Using a pH-Coacervation Method, *Journal of Drug Targeting*, 1, 237–243, **1993**.
- [88] Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., Von Briesen, H. and Schubert, D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles, 257, 169–180, **2003**.
- [89] Wartlick, H., Spänkuch-Schmitt, B., Strebhardt, K., Kreuter, J. and Langer, K., Tumour cell delivery of antisense oligonucleotides by human serum albumin nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 96, 483–495, **2004**.
- [90] Cohen, S., Pellach, M., Kam, Y., Grinberg, I., Corem-Salkmon, E., Rubinstein, A. and Margel, S., Synthesis and characterization of near IR fluorescent albumin nanoparticles for optical detection of colon cancer, *Materials Science and Engineering C*, 33, 923–931, **2013**.
- [91] Zhang, L., Liu, Z., Yang, K., Kong, C., Liu, C., Chen, H., Huang, J. and Qian, F., Tumor Progression of Non-Small Cell Lung Cancer Controlled by Albumin and Micellar Nanoparticles of Itraconazole, a Multitarget Angiogenesis Inhibitor, *Molecular Pharmaceutics*, 14, 4705–4713, **2017**.
- [92] Park, H. H., Woo, Y. H., Ryu, J., Lee, H. J., Park, J. H. and Park, T. H., Enzyme delivery using protein-stabilizing and cell-penetrating 30Kc19 α protein nanoparticles, *Process Biochemistry*, 63, 76–83, **2017**.

- [93] Shitan, N., Secondary metabolites in plants: Transport and self-tolerance mechanisms, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80, 1283–1293, **2016**.
- [94] Nayeem, N., Effect Of Seasonal And Geographical Variation On The Phytoconstituents And Medicinal Properties Of Tribulus Terrestris, 4, 983–989, **2017**.
- [95] Bleddyn Hughes, H., Morrissey, J. P. and Osbourn, A. E., Characterisation of the saponin hydrolysing enzyme avenacoside- α -l-rhamnosidase from the fungal pathogen of cereals, *Stagonospora avenae*, *European Journal of Plant Pathology*, 110, 421–427, **2004**.
- [96] Sun, W., Li, H. and Yang, S. J., A triterpene saponin from Tribulus terrestris attenuates apoptosis in cardiocyte via activating PKC signalling transduction pathway, *Journal of Asian Natural Products Research*, 10, 39–48, **2008**.
- [97] Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. and Takaishi, Y., Traditional medicine in Turkey. V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains, *Journal of Ethnopharmacology*, 46, 133–152, **1995**.
- [98] Oleszek, W. A., Chromatographic determination of plant saponins, *Journal of Chromatography A*, 967, 147–162, **2002**.
- [99] Oleszek, W. and Stochmal, A., Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of Trifolium species, *Phytochemistry*, 61, 165–170, **2002**.
- [100] Mahato, S. B., Sarkar, S. K. and Poddar, G., Triterpenoid saponins, *Phytochemistry*, 27, 3037–3067, **1988**.
- [101] Tin, M. M. Y., Cho, C. H., Chan, K., James, A. E. and Ko, J. K. S., Astragalus saponins induce growth inhibition and apoptosis in human colon cancer cells and tumor xenograft, *Carcinogenesis*, 28, 1347–1355, **2007**.
- [102] Wang, P., Kim, Y. J., Navarro-Villalobos, M., Rohde, B. D. and Gin, D. Y. Synthesis of the potent immunostimulatory adjuvant QS-21A, *Journal of the American Chemical Society*, 127, 3256–3257, **2005**.
- [103] Mimaki, Y., Kuroda, M., Kameyama, A., Yokosuka, A. and Sashida, Y., Steroidal saponins from the underground parts of *Ruscus aculeatus* and their cytostatic activity on HL-60 cells, *Phytochemistry*, 48, 485–493, **1998**.
- [104] Bedir, E. and Khan, I. A., New Steroidal Glycosides from the Fruits of Tribulus terrestris, *Journal of Natural Products*, 63, 1699–1701, **2000**.
- [105] Xu, X. H., Li, T., Fong, C. M. V., Chen, X. X. J., Chen, X. X. J., Wang, Y. T., Huang, M. Q. and Lu, J. J., Saponins from chinese medicines as anticancer agents, *Molecules*, 21, 1–27, **2016**.
- [106] Kostova, I. and Dinchev, D., Saponins in Tribulus terrestris - Chemistry and bioactivity, *Phytochemistry Reviews*, 4, 111–137, **2005**.

- [107] Hashim, S., Bakht, T., Bahadar Marwat, K. and Jan, A., Medicinal properties, phytochemistry and pharmacology of *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae), *Pakistan Journal of Botany*, 46, 399–404, **2014**.
- [108] Hu, K. and Yao, X., The cytotoxicity of methyl protodioscin against human cancer cell lines in vitro, *Cancer Investigation*, 21, 389–393, **2003**.
- [109] Hu, K. and Yao, X., Protodioscin (NSC-698792): Its spectrum of cytotoxicity against Sixty Human Cancer Cell Lines in an Anticancer Drug Screen Panel, *Anti-Cancer Drugs*, 12, 541–547, **2002**.
- [110] Li, M., Qu, W., Wang, Y., Wan, H. and Tian, C., Hypoglycemic effect of saponin from *Tribulus terrestris*, *Zhongyaocai, Journal of Chinese medicinal materials*, 25, 420–422, **2002**.
- [111] Sun, W. E. I., Li, H. and Yang, S. J., A triterpene saponin from *Tribulus terrestris* attenuates apoptosis in cardiocyte via activating PKC signalling transduction pathway, *Journal of Asian Natural Products Research*, 10, 39–48, **2008**.
- [112] Escobar-Sánchez, M. L., Sánchez-Sánchez, L. and Sandoval-Ramírez, J., Steroidal Saponins and Cell Death in Cancer, in *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*, Ntuli, T. M., Ed. Rijeka: InTech, **2015**.
- [113] Liu, Y., Kong, M., Feng, C., Yang, K. K., Li, Y., Su, J., Cheng, X. J., Park, H. J. and Chen, X. G., Biocompatibility, cellular uptake and biodistribution of the polymeric amphiphilic nanoparticles as oral drug carriers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 103, 345–353, **2013**.
- [114] Teng, Z., Kuang, X., Wang, J. and Zhang, X., Real-time cell analysis – A new method for dynamic, quantitative measurement of infectious viruses and antiserum neutralizing activity, *Journal of Virological Methods*, 193, 364–370, **2013**.
- [115] Li, Z., Liu, K., Sun, P., Mei, L., Hao, T., Tian, Y., Tang, Z., Li, L. and Chen, D., Poly(D, L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for improved oral delivery of exemestane, *Journal of Microencapsulation*, 30, 432–440, **2013**.
- [116] Salcedo, I., Aguzzi, C., Sandri, G., Bonferoni, M. C., Mori, M., Cerezo, P., Sánchez, R., Viseras, C. and Caramella, C., In vitro biocompatibility and mucoadhesion of montmorillonite chitosan nanocomposite: A new drug delivery, *Applied Clay Science*, 55, 131–137, **2012**.
- [117] Wang, X., Du, Y. and Luo, J. Biopolymer/montmorillonite nanocomposite: preparation, drug-controlled release property and cytotoxicity, *Nanotechnology*, 19, 65707, **2008**.
- [118] Olde Damink, L. H. H., Dijkstra, P. J., Van Luyn, M. J. A., Van Wachem, P. B., Nieuwenhuis, P. and Feijen, J., Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials, *Journal of Materials Science: Materials in*

Medicine, 6, 460–472, **1995**.

- [119] Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J. and Waldron, K. C., Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking, *BioTechniques*, 37, 790–802, **2004**.
- [120] Richards, F. M. and Knowles, J. R., Glutaraldehyde as a protein cross-linking reagent, *Journal of Molecular Biology*, 37, 231–233, **1968**.
- [121] Yan, E. K., Cao, H. L., Zhang, C. Y. Lu, Q. Q., Ye, Y. J., He, J., Huang, L. J. and Yin, D. C., Cross-linked protein crystals by glutaraldehyde and their applications, *RSC Advances*, 5, 26163–26174, **2015**.
- [122] Langer, K., Anhorn, M. G., Steinhäuser, I., Dreis, S., Celebi, D., Schrickel, N., Faust, S. and Vogel, V., Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation, *International Journal of Pharmaceutics*, 347, 109–117, **2008**.
- [123] Kufleitner, J., Worek, F. and Kreuter, J., “Incorporation of obidoxime into human serum albumin nanoparticles: Optimisation of preparation parameters for the development of a stable formulation, *Journal of Microencapsulation*, 27, 594–601, **2010**.
- [124] Harde, H., Das, M. and Jain, S., Solid lipid nanoparticles: an oral bioavailability enhancer vehicle, *Expert opinion on drug delivery*, 8, 1407–24, **2011**.
- [125] Angelova, N. and Yordanov, G., Entrapment of FeO(OH) nanoparticles in human serum albumin : Preparation , characterization and hemocompatibility, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 516, 317–324, **2017**.
- [126] Mohammed, M. J., Biological Activity of Saponins Isolated from *Tribulus terrestris* (Fruit) on Growth of Some Bacteria Abstract : Introduction : Material And Methods : Results And Discussion : *Tikrit Journal of Pure Science*, 13, **2008**.
- [127] Fil, B. A., Özmetin, C. and Korkmaz, M., Characterization and electrokinetic properties of montmorillonite, *Bulgarian Chemical Communications*, 46, 258–263, **2014**.
- [128] Almutairi M. S. and Ali, M., Direct detection of saponins in crude extracts of soapnuts by FTIR, *Natural Product Research*, 29, 1271–1275, **2015**.
- [129] Eng, C. C., Ibrahim, N. A., Zainuddin, N., Ariffin, H., Yunus, W. M. Z. W., Then, Y. Y and Teh, C. C., Enhancement of Mechanical and Thermal Properties of Polylactic Acid/Polycaprolactone Blends by Hydrophilic Nanoclay, *Indian Journal of Materials Science*, 2013, 1–11, **2013**.
- [130] Harun, F. W., Almadani, E. A. and Radzi, S. M., Metal cation exchanged montmorillonite K10 (MMT K10) : Surface properties and catalytic activity, 3, 90–96, **2016**.

- [131] Fang, S., Hao, C., Liu, Z., Song, F. and Liu, S. Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry Combined with Sequential Tandem Mass Spectrometry Techniques for the Profiling of Steroidal Saponin Mixture Extracted from *Tribulus terrestris*., *Planta medica*, 65, 68–73, **1999**.
- [132] Liu, S., Cui, M., Liu, Z., Song, F. and Mo, W., Structural analysis of saponins from medicinal herbs using electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15, 133–141, **2004**.
- [133] Chen, P. and Zhang, L., Interaction and Properties of Highly Exfoliated Soy Protein/Montmorillonite Nanocomposites, *Biomacromolecules*, 7, 1700–1706, **2006**.
- [134] Tran, A. T. T. and James, B. J., A study the interaction forces between the bovine serum albumin protein and montmorillonite surface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 414, 104–114, **2012**.
- [135] Heng, L., van Koningsveld, G. A., Gruppen, H., van Boekel, M. A. J., Vincken, J. P., Roozen, J. P. and Voragen, A. G. J., Protein–flavour interactions in relation to development of novel protein foods, *Trends in Food Science & Technology*, 15, 217–224, **2004**.
- [136] Liu, K. H., Liu, T. Y., Chen, S. Y. and Liu, D. M., Drug release behavior of chitosan-montmorillonite nanocomposite hydrogels following electrostimulation, *Acta Biomaterialia*, 4, 1038–1045, **2008**.
- [137] Akdogan, Y., Wu, Y., Eisele, K., Schaz, M., Weil, T. and Hinderberger, D., Host-guest interactions in polycationic human serum albumin bioconjugates, *Soft Matter*, 8, 11106–11114, **2012**.
- [138] Huang, M., Ma, Z., Khor, E. and Lim, L. Y., Uptake of FITC-chitosan nanoparticles by A549 cells., *Pharmaceutical research*, 19, 1488–1494, **2002**.
- [139] Ijagbemi, C. O., Baek, M. and Kim, D., Montmorillonite surface properties and sorption characteristics for heavy metal removal from aqueous solutions, 166, 538–546, **2009**.
- [140] . Sparg, S. G., Light, M. E and Van Staden, J., Biological activities and distribution of plant saponins, *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219–243, **2004**.
- [141] Baek, M., Lee, J. A. and Choi, S. J., Toxicological effects of a cationic clay, montmorillonite in vitro and in vivo, *Molecular and Cellular Toxicology*, 8, 95–101, **2012**.
- [142] Chhatre, S., Nesari, T., Somani, G., Kanchan, D. and Sathaye, S., Phytopharmacological overview of *Tribulus terrestris*, *Pharmacognosy Reviews*, 8, 45–51, **2014**.
- [143] Chakraborty, D., Jain, C. K., Maity, A., Ghosh, S., Choudhury, S. R., Jha, T.,

Majumder, H. K. and Mondal, N. B., Chenopodium album metabolites act as dual topoisomerase inhibitors and induce apoptosis in the MCF7 cell line, *MedChemComm*, 7, **2016**.

[144] Xu, J., *Cancer Inhibitors from Chinese Natural Medicines*, **2017**.

[145] Hu, K., Berenjian, S., Larsson, R., Gullbo, J., Nygren, P., Lovgren, T. and Morein, B. Nanoparticulate Quillaja saponin induces apoptosis in human leukemia cell lines with a high therapeutic index, *International Journal of Nanomedicine*, 5, 51–62, **2010**.

[146] Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S. and Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: a review, *British Journal of Nutrition*, 88, 587–605, **2002**.



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Öznur Akbal

Doğum Yeri : Bakırköy / İstanbul

Medeni Hali : Bekar

E-posta : oznurakbal@hacettepe.edu.tr

Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Beytepe Kampüsü, Teknoloji Geliştirme Bölgesi 2. Ar-Ge Binası, İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi, 06800 Beytepe Ankara

Eğitim

Lisans : Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi : İngilizce/ İyi

İş Deneyimi

: Arş. Gör., Gazi Ü. Polatlı Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Bölümü (2014-2018)

Öğr. Gör. Hacettepe Üniversitesi, İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (2018- Halen)

Deneyim Alanları

:Biyosensörler, protein nanoyapılar, ilaç taşıyıcı sistemler, kil kompozit yapılar, hücre kültür çalışmaları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Drug Delivery with Clay-Albumin Composite Nanoparticles for Cancer Therapy, Global Biotechnology Congress, 10-13 Temmuz 2017, Boston, ABD.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ ve NANOTİP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 30/05/2018

Tez Başlığı / Konusu: İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Kullanılmak Üzere Kil-Protein Kompozit Nanopartiküllerin Hazırlanması Ve Karakterizasyonu

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 83 sayfalık kısmına ilişkin, 23/05/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dahil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: ÖZNUR AKBAL
Öğrenci No: N12145910
Anabilim Dalı: NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP
Programı: DOKTORA
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

30.05.18
A.91

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Handan YAVUZ ALAGÖZ