

MANYETİK O-KARBOKSİ METİL KİTOSAN NANOKOMPOZİTE ANTI-KANSER İLAÇ TOPOTEKAN YÜKLENMESİ VE SALIMI

PROF. DR. BİLSEN TURAL
DR.ÖĞR. ÜYESİ TUBA TARHAN
PROF. DR. SERVET TURAL

ÖZET

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser, vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde üremesi ve çoğu zaman komşu dokuları işgal etmesi sonucu oluşur. Biyoloji Penguin Referans Sözlüğü kanseri; “büyüme ve bölünmeyi düzenleyen kontrol mekanizmalarının normalin dışına çıkarak, bölünebilen kardeş hücrelerle koloniler oluşturup, komşu dokulara yayılarak onların aktivitelerini engellemesidir” şeklinde tanımlamıştır. Günümüzde kanser kemoterapisinin en önemli sorunlarına çözüm bulmak için nanoboyutta ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Nanoboyuttaki kontrollü ilaç taşıma sistemleri tümör hedeflenmesine olanak sağlamıştır. Nanotaşıyıcılar arasında, biyoyumlu polimer kaplı süperparamanyetik nanoparçacıklar dışardan uygulanan manyetik alan ile istenilen bölgeye hedeflenebilme özelliklerine sahiptirler. Bu sayede ilaç hedeflenen bölgeye güvenli bir şekilde taşınabilmektedir.

Topotekan en yaygın kullanılan anti-kanser ilaçlardan Kemptotesin analogu olup Topoizomeraz I inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Bu enzim hücre bölünmesi esnasında DNA replikasyonundan sorumlu enzimdir. Topotekan başta yumurtalık kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri olmak üzere meme kanseri ve prostat kanseri tedavisinde de etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Yapısında α -hidroksi δ -lakton halkası bulunup suda iyi çözünür. Asidik koşullar altında aktif lakton form baskındır. Nötral ve alkali pH’da hidroliz ile inaktif karboksilat form oluşmaktadır

Bu çalışmada, Topotekan anti-kanser ilacının biyoyumlu ve biyobozunur, manyetik özellik gösteren, ilaç yükleme verimi yüksek, karboksil grupları içeren polimerik materyale (Manyetik O-Karboksimetil Kitosan nanokompozitine) yükleme ve salım çalışmaları yapılmıştır. Topotekan yükleme koşulları belirlenmesi için pH, konsantrasyon, nanokompozit miktarı ve ayrıca ilaç salımı üzerine pH etkisi çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Manyetik Polimer Nanokompozit, Topotekan, İlaç yükleme, ilaç salım

1.GİRİŞ

Günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser, vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde üremesi ve çoğu zaman komşu dokuları işgal etmesi sonucu oluşur. Biyoloji Penguin Referans Sözlüğü kanseri; “büyüme ve bölünmeyi düzenleyen kontrol mekanizmalarının normalin dışına çıkarak, bölünebilen kardeş hücrelerle koloniler oluşturup, komşu dokulara yayılarak onların aktivitelerini engellemesidir” şeklinde tanımlamıştır (Thain ve Hickman 2004). Kanser %90’nın üzerinde, virüsler, UV ışınlarına aşırı maruz kalma, sigara içme ve beslenmeyi de içeren dış faktörlerin neden olduğu DNA mutasyonundan kaynaklanır. DNA mutasyonunun bir diğer nedeni ise kalıtsaldır. Bu durum daha çok meme ve kolon kanserlerinde görülür. Kanser, dünyada bilinen ölüm nedenlerinin ilk sıralarında yer almaktadır. Günümüzde, insanların beşte biri kanser yüzünden hayatını kaybetmektedir (Thomas 2010).

Topotekan en yaygın kullanılan anti-kanser ilaçlardan Kemptotesin analogu olup Topoizomeraz I inhibitörü olarak görev yapmaktadır (Pommier 1977, Pommier ve ark. 2010).

Bu enzim hücre bölünmesi esnasında DNA replikasyonundan sorumlu enzimdir (Staker ve ark 2002, Bertrand ve ark. 2011). Topotekan başta yumurtalık kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseri olmak üzere meme kanseri ve prostat kanseri tedavisinde de etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Yapısında α -hidroksi δ -lakton halkası bulunup suda iyi çözünür. Asidik koşullar altında aktif lakton form baskındır. Nötral ve alkali pH'da hidroliz ile inaktif karboksilat form oluşmaktadır (Mert ve ark. 2012).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Okuno ve arkadaşları (2000), yapmış oldukları bu çalışmada, toksisitelerine rağmen klinikte yaygın olarak kullanılan kemptotesin (CPT) türevlerinden irinotekan (CPT-11) ve topotekan'ın anti-tümör ajanlar arasında en umut verici sınıflandırmayı oluşturduğunu ifade ettiler. T-0128 olarak belirtilen yeni makro molekül ön ilacın farmakolojik profilini geliştirmek için sentezler yaptılar. 130.000 molekül ağırlığına sahip bu ön ilaç yeni bir CPT analogu olan (T-2513)-karboksimetil (CM) dekstrana triglisin aracılığı ile konjuge ettiler (Okuno ve ark. 2000).

Zhu ve arkadaşları (2008), yapmış olduğu çalışmada manyetik nanoparçacıklarını klasik bir metod olan birlikte çöktürme metodu ile sentezlediler. Sonuçlara göre parçacık boyutunu ortalama 14.1 nm olarak gösterdiler. Bu parçacıkların daha sonra iki polimerin, kitosan ve O-karboksimetil kitosan (OCMCS), bulunduğu ortamda iyi bir şekilde disperse olduğunu kaydettiler. Kitosan/Fe₃O₄ nanoparçacıkları ile OCMCS/Fe₃O₄ nanoparçacıkların çaplarını sırasıyla DLS ile 42 nm ve 38 nm olarak ölçtüler. Fe₃O₄ nanoparçacıklar net pozitif yüke sahip olduğundan karbonil fonksiyonel gruplarını içeren OCMCS ile manyetik Fe₃O₄ nanoparçacıklarını stabil ettiler (Zhu ve ark. 2008, Abushrida 2012).

3. MATERYAL VE METOD

Deneyisel çalışmalarda anti-kanser ilaç Topotekan (Sigma) kullanılmıştır. Asetik asit (Glacial) (Merck 100%), Sodyum hidroksit (NaOH) ve Hidroklorik asit (HCl), Asetonitril (Chromasolv Sigma-Aldrich), Trietil amin (99% Sigma-Aldrich), Fosfat tuzu tamponu (Sigma 100 Tablet) Çalışmalarda kullanılmak üzere 1 mM ve 2 mM olmak üzere Topotekan'dan iki ayrı stok çözelti Dimetil Sülfoksit (DMSO) içinde hazırlanmıştır. Aşağıdaki formül yardımı ile yüklenen % ilaç verimi her bir pH değerinde belirlenmiştir.

$$\text{İlaç yükleme verimi}(\%) = \frac{\text{Başlangıç ilaç konsantrasyonu (mM)} - \text{Süpernatantaki ilaç konsantrasyonu (mM)}}{\text{Başlangıç ilaç konsantrasyonu (mM)}} \times 100$$

4. BULGU VE TARTIŞMALAR

25 mg nanokompozit alınıp 25 °C, 200 rpm'de 2 mL fosfat tamponu içinde çözünmüş 0.118 mM TPT ile üç farklı pH değerinde (pH 5, 5.5 ve 6) etkileştirilmiştir. Nanokompozit için üç farklı pH değerinde (pH 5, 5.5 ve 6) ortalama tutunan ilaç konsantrasyonu ile % ilaç yükleme verimi sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.

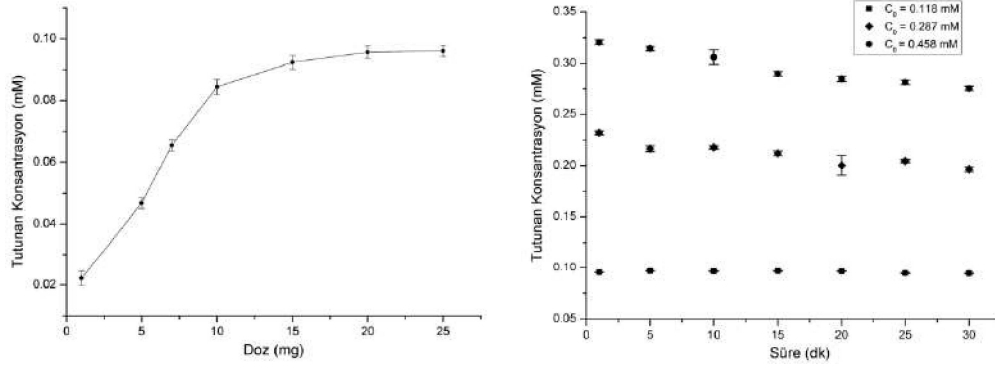
Nanokompozit	pH	Tutunan Ortalama İlaç (mM)	% İlaç Yükleme Verimi
MC ₂	5	0.0517	43.8
MC ₂	5.5	0.0614	52.0
MC ₂	6	0.0617	52.3

Tablo 1. MC₂ nanokompozitine Tutunan ilaç konsantrasyonu ve % ilaç yükleme verimi

Optimum doz belirleme çalışmalarında MC₂'den farklı miktarlarda alınıp 2 mL pH 5 fosfat tamponunda çözünmüş 0.118 mM TPT ile 25 °C, 200 rpm'de etkileştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 1a'da verilmiştir. Şekil 1b'de verilen grafikte görüldüğü gibi tutunan ilaç konsantrasyonunun süreye bağlı değişimi verilmiştir.

a

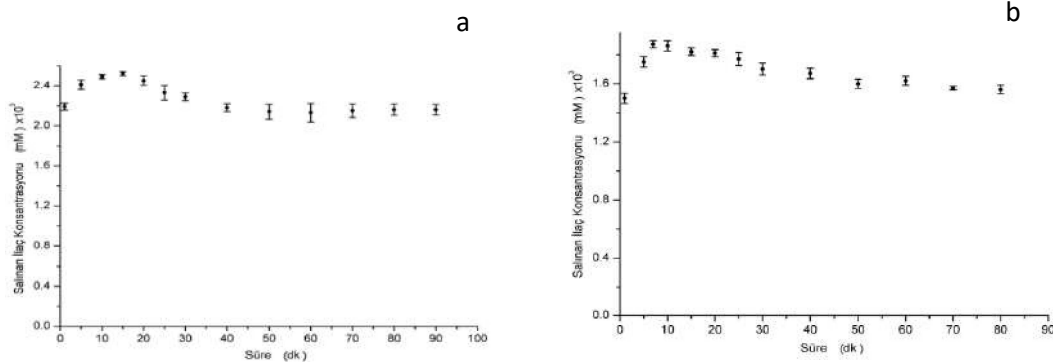
b



Şekil 1. MC₂ nanokompoziti için doza karşı tutunan ilaç konsantrasyonu (a), tutunan ilaç konsantrasyonunun süreye bağlı çalışması (b)

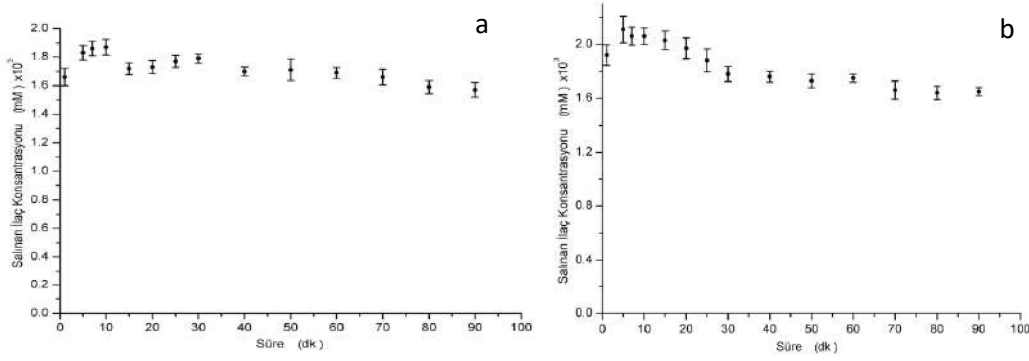
25 mg'lık nanokompozit ile fosfat tamponu içinde, vücut sıcaklığında farklı pH değerlerinde ilaç salınım çalışmaları yapılmış, her süre için üç tekrar çalışılmış olup sonuçlar Şekil 2 ve şekil 3'teki grafiklerde verilmiştir.

MC₂ ile pH 5'te ilaç yükleme çalışması yapılmış olup pH 5.8'de 36.5 °C'de salım çalışılmıştır. pH 5'te tutunan ilaç konsantrasyonu 0.108 mM olup, 90 dakika sonunda 0.00165 mM ilaç salımı olmuştur. Sonuçlar Şekil 2a'da verilmiştir. MC₂ ile pH 5'te ilaç yükleme çalışması yapılmış olup pH 6'da 36.5 °C'de salım çalışılmıştır. pH 5'te tutunan ilaç konsantrasyonu 0.103 mM olup, 90 dakika sonunda 0.00156 mM ilaç salımı olmuştur. Sonuçlar Şekil 2b'de verilmiştir.



Şekil 2. MC₂ nanokompoziti için pH 5.8'de zamana karşı ilaç salami (a), pH 6'da zamana karşı ilaç salami (b)

MC₂ ile pH 5'te ilaç yükleme çalışması yapılmış olup pH 6.5'te 36.5 °C'de salım çalışılmıştır. pH 5'te tutunan ilaç konsantrasyonu 0.1055 mM olup, 90 dakika sonunda 0.00157 mM ilaç salımı olmuştur. Sonuçlar şekil 3a'da verilmiştir. MC₂ ile pH 5'te ilaç yükleme çalışması yapılmış olup pH 7.4'te 36.5 °C'de salım çalışılmıştır. pH 5'te tutunan ilaç konsantrasyonu 0.106 mM olup, 90 dakika sonunda 0.00216 mM ilaç salımı olmuştur. Sonuçlar şekil 3b'de verilmiştir.



Şekil 3. MC₂ nanokompoziti için pH 6.5'te zamana karşı ilaç salımı (a), pH 7.4'te zamana karşı ilaç salımı (b)

5. SONUÇ

Bu çalışmanın sonucunda; pH arttıkça tutunan konsantrasyon artmıştır ancak pH artışı ile birlikte ortamda kalan karboksilat formda da artış görülmüştür. Yani tutunan ilaç konsantrasyonu sadece lakton form olmayıp, bir miktar karboksilat form da tutunmuştur. Karboksilat formun sağlıklı hücreler üzerine de toksik etkisinin olması istenmeyen bir durumdur. Dolayısıyla bu çalışma için optimum pH değeri 5 olarak belirlenmiştir. Ayrıca etkileşim süresinin artmış olması da ortamdaki karboksilat konsantrasyonunu arttırdığı için etkileşim süresi için ilk 30 saniye dikkate alınmıştır. Optimum miktar belirleme çalışmalarda sitotoksikite deneyleri de göz önünde tutularak 5 mg'lık örneklerin bu çalışma için en uygun miktar olduğu tespit edilmiştir. Topotekan ile ilgili sitotoksikite çalışmalarında, genellikle μM veya nM düzeyde ilaç konsantrasyonu ile çalışıldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışma için 0.118 mM konsantrasyon değerinin uygun olduğu görülmüştür. Salım çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında her pH değerinde 45 dakika sonucunda dengeye geldiği ancak en iyi salımın pH 5.8'de olduğu görüldü.

6. REFERANSLAR

1. Thain, M., Hickman, M. 2004. Penguin dictionary of biology. Penguin books.
2. Thomas, L.A. 2010. Nanoparticle synthesis for magnetic hyperthermia, University College London.
3. Pommier, Y. 2006. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nature Reviews Cancer*, 6(10), 789-802.
4. Pommier, Y., Leo, E., Zhang, H., Marchand, C. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & biology*, 17(5), 421-433.
5. Staker, B.L., Hjerrild, K., Feese, M.D., Behnke, C.A., Burgin, A.B., Stewart, L. 2002. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 99(24), 15387-15392.
6. Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K.W., Pommier, Y. 1994. Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Experimental Cell Research*, 211(2), 314-321.
7. Mert, O., Esendağlı, G., Doğan, A.L., Demir, A.S. 2012. Injectable biodegradable polymeric system for preserving the active form and delayed-release of camptothecin anticancer drugs. *RSC Advances*, 2(1), 176-185.
8. Abushrida, A. 2012. Formulation of novel polymer coated iron oxide nanoparticles. Doktora Tezi, University of Nottingham. 295.
9. Zhu, A., Yuan, L., Liao, T. 2008. Suspension of Fe₃O₄ nanoparticles stabilized by chitosan and o-carboxymethylchitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, 350(1), 361-368.