

PEGile Nano-Grafen Oksit-İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Kararlılığının Zeta Potansiyel ile İncelenmesi

Neşe Keklikcioğlu Çakmak^{1*}, Ertuğrul Çelik¹

¹Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Sivas Cumhuriyet University, Sivas 58140, Turkey

*nkeklikcioglu@cumhuriyet.edu.tr

Özet – Son zamanlarda nanoteknoloji alanında yapılan çalışmalar ve gelişmeler dikkat çekmektedir. Nanoteknolojinin hızlı ve etkili bir şekilde yaygınlaşmasıyla birlikte kanser başta olmak üzere birçok hastalığın tanı ve tedavisinde kullanılabilir yeni ve etkili nanosistemlerin geliştirilmesi konusunda umut verici çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışma kapsamında modifiye Hummers yöntemiyle grafen oksit nanoparçacığı (nGO) sentezlenmiştir. Sitotoksik etkiyi azaltmak ve süspansiyondaki stabiliteyi arttırmak amacıyla üretilen nanopartiküllerin yüzeyi Polietilen Glikol (PEG) ile iyileştirilmiştir. Daha sonra kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ajan olan Doksorubisin (DOX) ile nGO-PEG-DOX nanopartikül sistemi sentezlenmiştir. Sentezlenen nanotaşıyıcı sistemin karakterizasyon analizi yapılmıştır. Nanoyapılı sistemin stabilite analizi farklı ortamlarda zeta potansiyeli ile analiz edilmiştir. Zeta potansiyeli; kolloidal dispersiyonların stabilitesine karar vermede en önemli analizlerden biridir. Sonuç olarak, çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan aromatik bir ilaç olan DOX, kanser hücrelerine ulaştırılmak üzere nGO-PEG'e başarıyla yüklenmiştir ve zeta potansiyel analizine göre stabilitesini farklı ortamlarda uzun süre korumuştur.

Anahtar Kelimeler – Zeta Potansiyel, Grafen Oksit, Polietilen Glikol, Dox

I. GİRİŞ

Kanser, hücrelerdeki DNA'nın hasar alması sonucu hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır [1]. Kanserle mücadele yaygın olarak kullanılan geleneksel stratejiler arasında cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, kök hücre transplant tedavi, immünoterapi ve çeşitli hedefe yönelik tedaviler bulunmaktadır [2]. Kemoterapide kullanılan ilaçlara karşı direnç gelişmesi, ilaçların düşük duyarlılığı, kemoterapi ilaçlarının tümör hücrelerini seçici olarak hedeflenememesi [3] ve radyasyon tedavisinin kanser hücrelerini yok ederken normal hücrelere de zarar verebilmesi bilim insanlarını bu konularda araştırma yapmaya yöneltmiştir [4]. Nanoteknolojinin, geleneksel yöntemlerin kanser tedavisi, tanı ve tespitinde karşılaştığı bu sorunların çoğunun üstesinden gelmek için muazzam bir potansiyeli bulunmaktadır [5]. Nanoteknolojinin kanser tedavisine yönelik ana

uygulaması hedeflenen ilaç taşıyıcısı olarak nanopartiküllerin kullanılmasıdır [6]. Hedeflenen dağıtımın amacı, ilaçların diğer dokular üzerindeki istenmeyen yan etkilerini en aza indirirken, arzu edilen bölgelere (tümörler, hastalıklı dokular vb.) uygun miktarlarda ilaç taşınmasını sağlamaktır [7]. GO, kimyasal olarak modifiye edilmiş grafitin oksitlenmiş bir şeklidir [8]. Modifiye Hummers yöntemiyle üretilen GO'nun kimyasal indirgeme reaksiyonları ile seri ve fazla miktarda grafen üretilmektedir. Daha düşük toksisitesi, üstün biyoyumluluğundan ve yüksek yüzey alanı nedeniyle, grafen nanomalzemelerin ilaç yükleme oranı diğer ilaç taşıyıcı sistemlerden çok daha yüksektir bundan dolayı ilaç dağıtım uygulamalarında son yıllarda üzerinde yapılan çalışmalar hız kazanmıştır [9]. PEG, biyolojik moleküllerde ve hücrelerde spesifik olmayan adsorpsiyonunu azaltmak, biyolojik uyumluluklarını geliştirmek, dolaşım süresini arttırmak, çeşitli nanomalzemeleri işlevselleştirmek

ve daha iyi tümör hedeflemesi için in vivo farmakokinetiklerini geliştirmesini sağlayan hidrofilik biyo-uyumlu bir polimerdir [10]. Doksorubisin (Adriamisin), kanser kemoterapisinde kullanılan bir ilaçtır. Bir antrasiklin türevi antibiyotiktir, doğal bir ürün olan daunomisin ile yakından ilişkilidir, ve diğer tüm antrasiklinler gibi DNA içine enterkalasyon yapar.

Bu çalışma kapsamında öncelikle modifiye edilmiş Hummers metodu ile grafen oksit nanoparçacığı (nGO) sentezlenmiş daha sonra üretilen nanoparçacığın yüzeyi sitotoksik etkinin azaltılması, süspansiyon içerisinde kararlılığın artırılması ve biyoyumlu nanotaşıyıcı oluşturulması amacıyla nanoparçacığın yüzeyi Polietilen Glikol (PEG) ile iyileştirilmiş ve sonrasında ise kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapik ajan olan Doksorubisin (DOX) ile nGO-PEG-DOX nanotaşıyıcı sistem sentezlenmiştir. Sentezlenen nanotaşıyıcı sistemin karakterizasyon analizi UV ile yapılmıştır. Analizi yapılmış olan nanotaşıyıcı sistemin kararlılık analizine DI su ve PBS (fosfat salin buffer) sıvı ortamlarında Zeta Potansiyel ile bakılmıştır.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

II.I NGO-PEG-DOX Sentezi

Grafen oksit nanopartikülü, grafit tozu kullanılarak modifiye edilmiş Hummers yöntemi ile sentezlenmiştir [11]. Pegilasyon için, NGO sulu süspansiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra berrak bir solüsyon elde etmek için prob sonikatörde 1 saat boyunca sonike edilmiştir. NGO süspansiyonuna NaOH ve kloroasetik asit (Cl-CH₂-COOH) (1.0 g) ilave edilmiş ve GO-COOH veren asetik asit bölümlerinin konjügasyonu yoluyla -OH gruplarını -COOH'ye dönüştürmek için 1-3 saat boyunca prob sonikatörde sonike edilmiştir. Elde edilen GO-COOH solüsyonu nötralize edilmiş ve tekrar tekrar yıkanmış ve santrifüjlenmiştir. GO-COOH süspansiyonuna PEG-amin eklenmiş ve karışım sonike edilmiştir. N-(3-dimetilaminopropil-N'-etilkarbodiimid) hidroklorür (EDC) ilave edilmiş ve gece boyunca reaksiyon tamamlanmıştır. Son ürün (NGO-PEG), 1 saat boyunca 2 x fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde 45 000 rpm'de ultra-santrifüj ile santrifüjlenmiş ve NGO-PEG elde edilmiştir. NGO-PEG üzerine yüklenecek olan DOX pH 8'de gece boyunca NGO-PEG ile karıştırılmıştır.

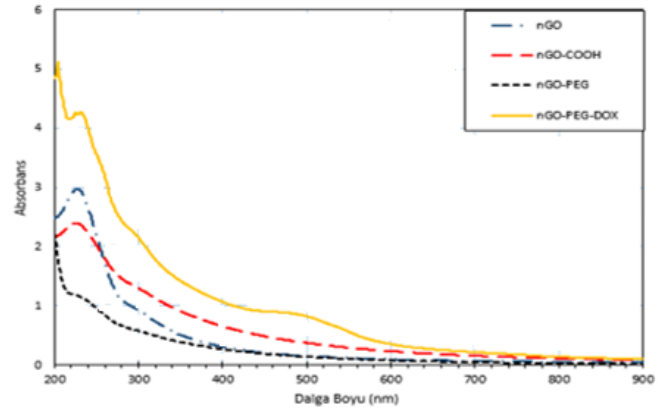
Bağlanmamış fazla DOX, 100 kDa filtreden geçirilerek ayrılmış ve yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Elde edilen NGO-PEG-DOX kompleksleri 4°C'de muhafaza edilmiştir [12].

II.II. Karakterizasyon

Hazırlanan örneklerin bir çok aşamasında sedimentasyonu ve topaklanmayı önlemek amacıyla 750W prob sonikatörü (Sonics & INC, USA) kullanılmıştır. Spektrum ölçümünde UV-Vis spektrofotometresi (UV-1280, Shimadzu, Japonya) kullanılmıştır. Numuneleri kararlılık analizleri ise zeta potansiyel analiz cihazı (Malvern Zetasizer Nano Z) ile gerçekleştirilmiştir.

III. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

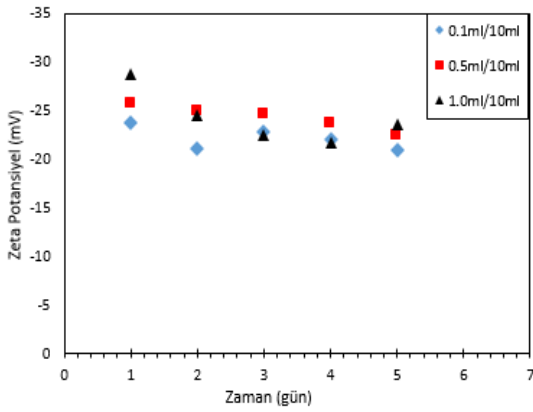
nGO, nGO-COOH, nGO-PEG, nGO-PEG-DOX'un UV-VIS spektrumları Şekil 1' de görülmektedir. NGO-PEG'in ilaç yükleme davranışını incelemek için UV-vis spektrumları kullanılmıştır. Dox'un karakteristik absorpsiyon piki (~490 nm), NGO-PEG-DOX örneğinde gözlenmiştir ve bu, NGO-PEG-DOX' un başarılı bir şekilde oluştuğunu göstermektedir.



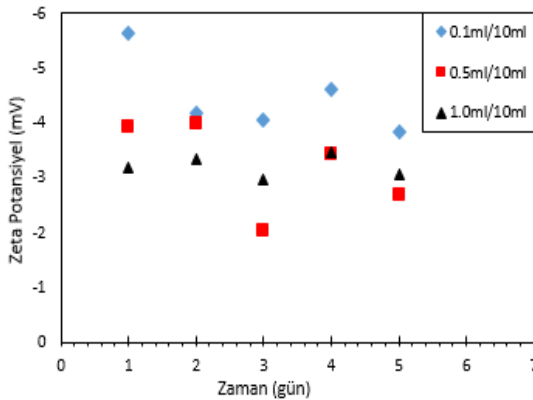
Şekil 1. nGO, nGO-COOH, nGO-PEG, nGO-PEG-DOX'un UV-vis absorptans spektrumları.

Zeta potansiyeli; kolloidal dispersiyonların stabilitesine karar vermedeki en önemli analizlerden birisidir. Kolloidal bir sistemin kararlılığını elektriksel çift tabaka itme ve Van der Waals çekme kuvvetlerinin toplamı belirler. Kolloidal kararlılığın sağlanabilmesi için taneler arasındaki çekme kuvvetine karşı itme kuvvetinin daha fazla olması gerekmektedir. Kolloidal kararlılığı etkileyen iki

temel mekanizma vardır bunlardan birincisi polimerik itme diğeri ise elektrostatik itmedir. Süspansiyondaki yüklü parçacıklar arasındaki elektrostatik itme derecesi, zeta potansiyel değerinin büyüklüğü ile gösterilir [12]. ASTM uyarınca, zeta potansiyeli ± 40 mV'den daha yüksek olan kolloid çözeltilerin kararlılığının çok iyi olduğu kabul edilmektedir [13]. NGO-PEG-DOX'un su ve PBS içerisindeki zeta potansiyel değişimide bakıldığında kararlılığı yüksek olan ortam su içerisinde hazırlanan ortamdır. Besi yeri ortamları içerisinde aminoasitler, karbonhidratlar, vitaminler ve iyonlar bulunduğundan NGO-PEG-DOX PBS içerisinde farklı davranış sergilemiş olabilir. Bu nedenle bu çalışma sonucunda nanotaşıyıcı tabanlı ilaçların önce su içerisinde uygun formlarının hazırlanıp sonra in vitro hücre kültürü ortamlarında çalışılmasının daha uygun olabileceği sonucu ortaya konulmuştur.



Şekil 2. 0.1ml, 0.5ml ve 1.0ml nGO-PEG-DOX'un saf su içerisindeki zamanla zeta potansiyel değişimi.



Şekil 3. 0.1ml, 0.5ml ve 1.0ml nGO-PEG-DOX'un PBS içerisindeki zamanla zeta potansiyel değişimi.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde "Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ajanlar için nanotaşıyıcı sistem sentezi ve kararlılığının incelenmesi" başlıklı yüksek lisans tezi olarak yürütülmüştür. Yazarlar Sivas Cumhuriyet Üniversitesi'ne desteklerinden dolayı teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

- [1] Martínez-Carmona, M, Colilla, M, Vallet-Regí, M. Smart mesoporous nanomaterials for antitumor therapy. *Nanomaterials* 2015; 5(4): 1906–1937.
- [2] Yang, L., Shi, P., Zhao, G. et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther* 5, 8, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0110>
- [3] Youliden, DR, Cramb, SM, Dunn, NAM, et al. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol* 2012; 36(3): 237–248
- [4] Zhu, S, Zhen, H, Li, Y, et al. PEGylated graphene oxide as a nanocarrier for podophyllotoxin. *J Nanoparticle Res* 2014; 16(8): 2530
- [5] Jaishree V, Gupta PD. Nanotechnology: A Revolution in Cancer Diagnosis. *Indian J Clin Biochem.* 2012;27(3):214-220. doi:10.1007/s12291-012-0221-z
- [6] Frank A, June-Wha R, Jerome PR, Radovic-Moreno AF, Robert L, Omid CF. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urol Oncol Semin Orig Invest.* 2008;26:74–85. doi: 10.1016/j.urolonc.2007.03.017.
- [7] In, G. K., and Nieva, J. Emerging Chemotherapy Agents in Lung Cancer Nanopa. *Transl. Cancer Res.* 2015, 4 (4), 340–355. doi:10.3978/j.issn.2218-676X.2015.08.05
- [8] Bianco A., Cheng H. M., Enoki T., Gogotsi Y., Hurt R. H., Koratkar N., et al. All in the graphene family - A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. *Carbon* 2013. 65 1–6. 10.1016/j.carbon.2013.08.038
- [9] Magne TM, de Oliveira VT, Alencar LMR, et al. Graphene and its derivatives: Understanding the main chemical and medicinal chemistry roles for biomedical applications. *Journal of Nanostructure in Chemistry.* 2021:1-35. DOI: 10.1007/s40097-021-00444-3
- [10] Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99(Pt A):28-51. doi:10.1016/j.addr.2015.09.012
- [11] Marcano, D. C., Kosynkin, D. V., Berlin, J. M., Sinitskii, A., Sun, Z., Slesarev, A., ... & Tour, J. M. (2010). Improved synthesis of graphene oxide. *ACS nano*, 4(8), 4806-4814.

- [12] Honary, S., & Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). *Tropical journal of pharmaceutical research*, 12(2), 255-264.
- [13] Standard test methods for zeta potential of colloids in water and waste water, American Society for Testing and Materials (ASTM) Standard D 4187-82, The Annual book of ASTM standards, American Society for Testing and Materials (1985).