

**HEDEFLENDİRİLMİŞ KANSER TEDAVİSİNDE
VİNKRİSTİN ve ϵ -VİNİFERİN YÜKLÜ
POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN
HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU ve *İN*
VİTRO UYGULAMALARI**

Yüksel Ögünç

Yüksek Lisans Tezi

**HEDEFLENDİRİLMİŞ KANSER TEDAVİSİNDE
VİNKRİSTİN ve ϵ -VİNİFERİN YÜKLÜ
POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN
HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU ve *İN
VİTRO* UYGULAMALARI**

Yüksel Ögünç

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Eskişehir, Ağustos 2015

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zerrin İNCESU

Bu tez çalışması, Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: 1406S313).

Jüri ve Enstitü Onayı

Yüksel ÖĞÜNÇ' ün “**Hedeflendirilmiş Kanser Tedavisinde Vinkristin ve ϵ -Viniferin Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve *In Vitro* Uygulamaları**” başlıklı, Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans tezi, 07.08.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof. Dr. Zerrin İNCESU Anadolu Üniversitesi
Üye	Doç. Dr. Müzeyyen DEMİREL Anadolu Üniversitesi
Üye	Doç. Dr. Canan HASÇİÇEK Ankara Üniversitesi

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Dilek AK

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı : Yüksel ÖĞÜNÇ
Doğum tarihi ve yeri : 1989, Isparta
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresleri : Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya ABD No:138, Tepebaşı,
Eskişehir
yukselogunc@anadolu.edu.tr
0(222) 335 0580 / 3723

Eğitim Durumu

İlköğretim : Fatih İlköğretim Okulu, 2003
Lise : Gülkent Yabancı Dil Ağırlıklı Lise, 2007
Üniversite : Akdeniz Ün., Fen Fak., Kimya Böl., 2011
Yabancı Dil : İngilizce

Mesleki Deneyim

Anadolu Ün., Eczacılık Fakültesi, Araştırma Görevlisi, 2013-Devam Ediyor

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar

The European Association for Cancer Research (EACR)

Hücre Ölümü Araştırma Derneği (HÖAD)

Moleküler Kanser Araştırma Derneği (MOKAD)

Bilimsel Etkinlikler

Projeler :

Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) komisyonu tarafından desteklenen 13085303 nolu “İntegrin aktivasyonu sonrasında kalsiyum-bağımlı apoptoz mekanizmasının ovaryum kanser hücrelerinde incelenmesi” başlıklı genel amaçlı projede araştırmacı, 2014-Devam ediyor

Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) komisyonu tarafından desteklenen 1406S313 nolu “Kombine Vinkristin/ ε-viniferin yüklü folik asit

modifiye PLGA-PEG nanopartikül sentezi, karakterizasyonu ve İn vitro ortamda etkisi” başlıklı genel amaçlı projede araştırmacı, 2014-Devam ediyor

Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) komisyonu tarafından desteklenen 1404S130 nolu “Kardomoninin PEO-1 insan ovaryum kanser hücreleri üzerine etkileri” başlıklı yayın ve araştırma teşvik projesinde araştırmacı, 2015-Devam ediyor

Katılınan kurslar ve eğitim programları:

Akdeniz Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi, GMP (Good Manufacturing Practices) İyi Üretim Uygulamaları Temel Eęitimi, Antalya, 2010

Dokuz Eylül Üniversitesi İleri Biyomedikal AR-GE Uygulama ve Araştırma Merkezi, Real Time PCR Cihaz Eęitimi, İzmir, 2013

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, 20. Uygulamalı Flow Sitometri Eęitimi, İstanbul, 2014

Moleküler Kanser Araştırma Derneği, 4.Hücre Ölüm Yöntemleri Kursu, Bursa, 2014

ÖNSÖZ

Tez çalışması kapsamında vinkristin ve ϵ -viniferin yüklü PLGA-b-PEG nanopartikülleri nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanarak karakterizasyonu yapılmıştır. Nanopartiküllerin hücre içine alımının uygun olduğu, aynı konsantrasyonda serbest maddeden daha sitotoksik olduğu gösterilmiş ve apoptoz oranı kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir.

Farklı bir alanda çalışmama imkan veren, analizler için gerekli tüm koşulları sağlayan, ilgili irtibatları kuran, hoşgörü ve sabırla bilgilerimi benimle paylaşan değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zerrin İNCESU'ya,

Bilgi ve deneyimlerini paylaşan güler yüzlü hocam Sayın Doç. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e

Hücre kültürünün prensiplerini öğrenmemi sağlayan çok sevdiğim hocam Sayın Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK'e,

Projedeki destekleri için Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu YAKAR'a,

Laboratuvar olanaklarını bizimle paylaştığı için Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na

SEM analizlerindeki desteği ve özverileri için Arş. Gör. Şerif RÜZGAR'a,

DSC analizlerindeki desteği için Ecz. Fawaz Alheibshy'e,

In Vitro analizlerdeki yardımları için Bio. Elif APAYDIN ve Bio. Aysun AYRIM'a,

Akım sitometri analizlerindeki desteği için Y.Bio. Şennur GÖRGÜLÜ KAHYAOĞLU'na,

Lisans eğitimimdeki yardımları için sevgili arkadaşlarım Kim.Sevgi AKGÖNEN ve Kim. Özlem CAN'a,

Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD ve Farmasötik Teknoloji ABD ailesine,

Dertlerimi paylaşıp, yol gösterenim babama, hayattaki en büyük destekçim fedakar anneme ve güzel yürekli canım kardeşime

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Anneannem'e ...

HEDEFLENDİRİLMİŞ KANSER TEDAVİSİNDE VİNKRİSTİN ve ϵ -VİNİFERİN YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU ve *İN VİTRO* UYGULAMALARI

ÖZET

Konvansiyonel kemoterapi ilaçlarının, biyodağılıma uğraması, yüksek doz gerektirmesi, patolojik bölgelere afinitelerinin düşük olması ve toksik etkilerinden dolayı, bu alandaki çalışmalar ilaçların taşıyıcı sisteme yüklenerek hedeflendirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır.

Vinkristin Sülfat (VS) kemoterapide yaygın kullanılan hücre döngüsüne spesifik anti-kanser bir ajandır. ϵ -Viniferin (EV) ise “*Vitis Vinifera*” dan izole edilen resveratrol türevi bir antioksidandır. EV ve VS’in kombine kullanımının HepG2 hücrelerinde sinerjik etkisinin olduğu önceden gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında, yüksek dozdan kaynaklı yan etkilerin azaltılmasına yönelik olarak, pasif hedeflendirme sağlayabilecek EV ve VS yüklü PLGA-b-PEG nanopartikül formülasyonu hazırlanması amaçlanmıştır. Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan formülasyonun partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite indeksi belirlenmiştir. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile yapılan morfolojik incelemede, nanopartiküllerin küresel şekilde ve düzgün yüzey özellikte olduğu görülmüştür. *In vitro* salım çalışmaları pH 7.4 Tris-HCl tamponu içerisinde, termal analizler ise Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) ile gerçekleştirilmiştir.

Kumarin-6 ile işaretlenmiş nanopartiküllerin HepG2 hücreleri içerisine alımı farklı zaman aralıklarında kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiş ve hücre içine alınımının uygun olduğu görülmüştür. MTT ile yapılan sitotoksikite analizinde ilaç yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin serbest haldeki etkin maddelerden daha etkili olduğu görülmüştür. Akridin oranj/Propidyum iyodür boyamasıyla ve Annexin V-FITC flow sitometri analizleriyle apoptoz oranı kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak EV ve VS yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin pasif hedeflendirmeye kanserli hücreye alınımının ve etkinliğinin artırılmış olması, *in vivo* verilişte yan etkilerde azalma ve hasta yaşam kalitesinin iyileşmesi yönünde fayda sağlayabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Nanopartikül, PLGA-b-PEG, Pasif Hedeflendirme, ϵ -Viniferin, Vinkristin Sülfat

THE PREPARATION, CHARACTERIZATION of VINCRISTINE and ϵ - VINIFERINE LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES and *IN VITRO* APPLICATIONS of THESE NANOPARTICLES ON THE TARGETING CANCER TREATMENT

ABSTRACT

The studies are focused on the targeting of the drug by loading it in the carrier system because of biodistribution, the requirement of high dose, the state of low affinity in the pathological regions and toxic effects of conventional chemotherapy drugs.

Vincristine Sulfate (VS) is commonly used in chemotherapy and is a specific anti-cancer agent against cell-cycle. Previously, it has been shown that the combine use of EV and VS has a synergistic effect on HepG2 cells. The aim of this thesis, the preparation of EV and VS loaded PLGA-b-PEG nanoparticle formulation that can provide passive targeting in order to reduce the adverse effects due to high doses of VS. The particle size, zeta potential and polydispersity index of the formulation prepared by nanoprecipitation method were determined. Atomic Force Microscopy (AFM) results showed that nanoparticles have a spherical shape and smooth surface features. *In vitro* release studies and thermal analysis were performed in pH 7.4 Tris-HCl buffer and by Differential Scanning Calorimetry (DSC), respectively.

The rate of influx of coumarin-6 labelled nanoparticles into HepG2 cells was investigated by either qualitative or quantitative analysis after various of time points. It was appropriate for cellular uptake. The results obtained from MTT assay showed that drug loaded PLGA-b-PEG nanoparticles are highly effective on HepG2 cell viability than free forms of the drug. The rate of apoptosis was determined by Acridine orange/Propidium iodide staining and Annexin V-FITC flow cytometry analysis.

Consequently, using EV and VS loaded PLGA-b-PEG nanoparticles with passive targeting is enhanced uptake and efficacy of cytotoxic effects in HepG2 cells that might reduce the side effects of VS and improve patient quality of life.

Key Words: Nanoparticle, PLGA-b-PEG, Passive Targeting, ϵ -Viniferine, Vincristine Sulfate

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji	2
İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hedeflendirilme Mekanizmaları	3
<i>Pasif hedeflendirme</i>	4
<i>Aktif hedeflendirme</i>	4
Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	5
<i>Nanoküreler ve Nanokapsüller</i>	5
Nanopartiküler Sistemlerde Kullanılan Polimerler	6
<i>Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)</i>	8
<i>Poli (etilen glikol) (PEG)</i>	9
<i>PEGilasyon</i>	10
<i>PLGA-b-PEG</i>	10
Polimerlerin Şekillendirilmesiyle Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	11
<i>Emülsifikasyon/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi</i>	11
<i>Çözücü Yer Değiştirme (Nanoçöktürme) Yöntemi</i>	13
<i>Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon Yöntemi</i>	14
<i>Tuzla Çöktürme Yöntemi</i>	15
Kanser	16
<i>Karaciğer Kanseri</i>	16
Vinkristin Sülfat	17

<i>Vinkristin'in Tedavide Kullanımı</i>	17
ε-Viniferin	18
GEREÇLER	19
Kullanılan Maddeler	19
Kullanılan Cihazlar	20
YÖNTEMLER	21
EV ve VS'nin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analitik Yöntem Validasyonu	21
<i>Doğrusallık</i>	21
<i>Doğruluk</i>	21
<i>Seçicilik</i>	21
<i>Duyarlılık</i>	22
<i>Saptama sınırı</i>	22
<i>Tayin sınırı</i>	22
PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması	22
<i>Çift Emülsiyon Yöntemi ile Plasebo PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması</i>	22
<i>Nanoçöktürme Yöntemi ile Plasebo PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması</i>	23
<i>Nanoçöktürme Yöntemi ile Etkin Madde Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması</i>	23
<i>Floresan işaretli PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması</i>	23
Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu	24
<i>Partikül Büyüklüğü, Zeta Potansiyeli ve Polidisperslik İndeksi Değerlerinin Ölçülmesi</i>	24
<i>Nanopartiküllerin Morfolojik Analizi</i>	24
İn vitro Salım Çalışması	24
Termal Analiz	25
Hücre Kültürü	25
Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımının Kalitatif Tayini	25
Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımının Kantitatif Tayini	25
Sitotoksite Testi	26

Apoptozun Değerlendirilmesi	27
Akridin Oranj/Propidyum İyodür (AO/PI) Çift Boyama ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi	28
BULGULAR ve TARTIŞMA	29
EV ve VS'ın Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri	29
<i>Doğrusallık</i>	29
<i>Doğruluk</i>	31
<i>Duyarlılık</i>	31
<i>Seçicilik</i>	32
PLGA-b-PEG Nanopartikül Formülasyonlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı, Zeta Potansiyeli Ve Morfolojik Analizleri	33
PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinden <i>İn Vitro</i> Etkin Madde Salım Çalışmaları	38
Termal Analiz	40
Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımı	41
Kombine EV ve VS yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	42
Akridin Oranj/Propidyum İyodür (AO/PI) Çift Boyama ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi	44
Kombine EV/VS Nanopartikül Uygulamasının HepG2 Hücrelerinde Fosfotidilserin Lokalizasyonu Üzerine Etkisi	46
SONUÇ ve ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA	
Çizelge 1	Dünya Piyasalarında Bulunan ya da Geliştirilmekte Olan Nanoteknoloji Temelli Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaç Formülasyonları	2
Çizelge 2	Nanotaşıyıcı Sistemlerde Kullanılan Polimerler	7
Çizelge 3	Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	11
Çizelge 4	Tez Çalışmasında Kullanılan Maddeler	19
Çizelge 5	Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	20
Çizelge 6	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Çalışma Koşulları	21
Çizelge 7	AFM Görüntü Parametreleri	24
Çizelge 8	EV'in HPLC ile Doğrusallık Çalışmasına Ait Regresyon Verileri	30
Çizelge 9	VS'in HPLC ile Doğrusallık Çalışmasına Ait Regresyon Verileri	30
Çizelge 10	EV'in Doğruluk Çalışmasına Ait Sonuçlar	31
Çizelge 11	VS'in Doğruluk Çalışmasına Ait Sonuçlar	31
Çizelge 12	HepG2 hücrelerinin 24 saatlik SM ve NP ile inkübasyonu sonrasındaki apoptoz oranı ve yüzde dağılımı	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA	
Şekil 1	Normal ve Tümörlü Doku Arasındaki Farklar	3
Şekil 2	Nanopartikül İlaç Taşıma Sistemleri	6
Şekil 3	PLGA'in Hidrolizi	8
Şekil 4	Poli (Etilen Glikol) (PEG)'ün Molekül Formülü	9
Şekil 5	mPEG-PLGA'in Molekül Formülü	10
Şekil 6	Emülsifikasyon / Çözücü Buharlaştırma Yöntemi	12
Şekil 7	Çözücü Yer Değiştirme (Nanoçöktürme) Yöntemi	13
Şekil 8	Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon Yöntemi	14
Şekil 9	Tuzla Çöktürme Yöntemi	15
Şekil 10	<i>Vinca Rosea</i>	17
Şekil 11	VS'in Molekül Formülü	17
Şekil 12	Oncovin İlacı	17
Şekil 13	Trans-Resveratrol ve ϵ -Viniferin'in Molekül Yapısı	18
Şekil 14	MTT Bileşiğinin Formazan Kristallerine Dönüşümü	26
Şekil 15	Annexin V-PI ile Erken Apoptozun Belirlenmesi	27
Şekil 16	Apoptozun Akım Sitometrisi ile Analizi	28
Şekil 17	EV ve VS'in HPLC ile Miktar Tayin Kromatogramı	29
Şekil 18	EV'e Ait Kalibrasyon Doğrusu	30
Şekil 19	VS'a Ait Kalibrasyon Doğrusu	30
Şekil 20	Hareketli Faz İçerisindeki Plasebo Formülasyona Ait Kromatogram	32
Şekil 21	Hareketli Faza Ait Kromatogram	33
Şekil 22	<i>İn Vitro</i> Salım Ortamına Ait Kromatogram	33
Şekil 23	ÇE Yöntemi ve PVA Kullanılarak Hazırlanan Plasebo PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin SEM Görüntüsü	35
Şekil 24	ÇE Yöntemi ve Tween 80 Kullanılarak Hazırlanan Plasebo PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin SEM Görüntüsü	35

Şekil 25	ÇE Yöntemi ile Hazırlanan Plasebo PLGA-b-PEG Nanopartikül Formülasyonunun Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	35
Şekil 26	ÇE Yöntemi ile Hazırlanan Plasebo PLGA-b-PEG Nanopartikül Formülasyonunun Zeta Potansiyeli	35
Şekil 27	NÇ Yöntemi ile Sentezlenen Plasebo PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin AFM Görüntüsü	36
Şekil 28	NÇ Yöntemi ile Sentezlenen EV-VS Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin AFM Görüntüsü	36
Şekil 29	NÇ Yöntemi ile Hazırlanan Plasebo PLGA-b-PEG Nanopartikül Formülasyonunun Partikül Büyüklüğü, Dağılımı	37
Şekil 30	NÇ Yöntemi ile Hazırlanan Plasebo PLGA-b-PEG Nanopartikül Formülasyonunun Zeta Potansiyeli	37
Şekil 31	NÇ Yöntemi ile Hazırlanan EV-VS Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartikül Formülasyonunun Partikül Büyüklüğü, Dağılımı	37
Şekil 32	NÇ Yöntemi ile Hazırlanan EV-VS Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartikül Formülasyonunun Zeta Potansiyeli	37
Şekil 33	Saf VS ve PLGA-b-PEG Nanopartiküllerine Yüklendiği Olan VS'ın Tris HCl Ortamındaki <i>İn Vitro</i> Salım Profilleri	39
Şekil 34	Saf EV ve PLGA-b-PEG Nanopartikülüne Yüklendiği Olan EV'in Tris HCl Ortamındaki <i>İn Vitro</i> Salım Profilleri	39
Şekil 35	Saf Bileşenler ve Liyofilize Nanopartiküllere Ait DSC Termogramları	40
Şekil 36	Floresan Mikroskop ile Kumarin-6 İşaretli PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin HepG2 Hücreleri İçerisine Alımının Kalitatif Olarak Belirlenmesi	42
Şekil 37	Kumarin-6 İşaretli PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin HepG2 Hücreleri İçine Alım Oranlarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi	42

Şekil 38	Kombine EV-VS Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartikül Formülasyonunun ve Serbest Etkin Maddelerin MTT Analiz Sonuçları	43
Şekil 39	SM ve NP'nin etkisiyle HepG2 hücrelerinin morfolojilerinde gözlenen apoptotik değişimler	45
Şekil 40	HepG2 hücrelerinin 24 saatlik SM ve NP ile inkübasyonu sonrasındaki apoptoz oranı	46

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
AO	: Akridin Oranj
ÇE	: Çift Emülsiyon Metodu
DLS	: Hareketli Lazer Saçınımı
DMEM	: Dulbecco's Modifiye Eagle's Ortamı
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EPR	: Artmış Geçirgenlik ve Alıkonma
EMA	: European Medicine Agency
EV	: ε-Viniferin
FBS	: Fetal Sığır Serum
FDA	: Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
FITC	: Floresanizasiyanat
HepG2	: İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
HBSS	: Hanks' Balanced Salt Solution
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
mA	: Miliamper
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NÇ	: Nanoçöktürme Metodu
nm	: Nanometre
NP	: Nanopartikül
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
PDI	: Polidispersite İndeksi
PEG	: Poli (etilen glikol)
PI	: Propidyum İyodür
PLGA	: Poli (laktik-ko-glikolik asit)

PLGA-b-PEG	: Poli (laktik-ko-glikolik asit)-poli (etilen glikol) blok kopolimeri
PVA	: Poli (Vinil Alkol)
RES	: Retiküloendotelyal sistem
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SM	: Serbest Madde
Tris	: 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
Tris-HCl	: HCl ile pH değeri ayarlanmış Tris çözeltisi
Tween-80	: Polioksietilen-80-sorbitan monooleat
VS	: Vinkristin Sülfat
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
μS	: Mikrosimens (elektrik iletkenliği)

GİRİŞ ve AMAÇ

Konvansiyonel kemoterapi ilaçları deri, kemik iliği, saç folikülleri ve sindirim sistemi zarı gibi sürekli olarak gelişen ve bölünen sağlıklı hücelere de zarar vererek yan etkilere neden olmaktadır. İdeal kemoterapi tedavisinde beklenen, ilacın tümöre ulaşana dek, kan akımında kalabilmesi ve hedef dokuda kontrollü salınım ile normal hüceleri etkilemeden kanserli hüceleri öldürmesidir. Böylece en az yan etki ile etkin tedavi sağlanabilmektedir. Günümüzde kullanılan konvansiyonel antikanser ilaçlar buna uygun değildir. Bu nedenle taşıyıcı sisteme yüklenerek hedeflendirilen ilaçlar üzerindeki çalışmalara yoğunlaşmıştır.

Bu tez çalışmasında, ϵ -viniferin ve vinkristine sülfat yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküller hazırlanarak nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları ve *in vitro* ortamdaki etkileri incelenmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin pasif hedeflendirmeye kanserli hücreye yönlendirilebilmesi, kan dolaşımında daha uzun kalabilmesi ve vinkristinin doza bağlı yan etkilerinin azaltılmasıyla ileriki *in vivo* çalışmalarda kanser tedavisinde ve kanser hastalarının yaşam kalitelerinin artırılması yönünde fayda sağlanması öngörülmektedir.

KAYNAK BİLGİSİ

Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji

Dünyada ölümle sonuçlanan hastalıklar içinde ikinci sırada yer alan kansere her yıl 2,6 milyon kişi yakalanmaktadır (Jemal ve ark.; Siegel ve ark., 2012).

Kanser araştırmaları büyük ölçüde sebeplerin tespit edilmesi, tümör oluşumunun engellenmesi, teşhisi ve tedavisi için doğru stratejilerin geliştirilmesi yönünde ilerlemektedir. Son yıllarda yapılan anti-kanser etkili madde tarama çalışmalarında nanoteknolojik taşıyıcı sistemlerin daha sıklıkla kullanıldığı dikkat çekmektedir. Araştırmacıların taşıyıcı sistemleri kullanmalarının en önemli sebeplerinden biri taşıyıcı sistemin toksik etki göstermemesi, etkin maddelerin vücutta biyodağılıma uğraması, yüksek doz gerektirmesi, patolojik bölgelere afinitelerinin düşük olması, non-spesifik olmasıdır (Alkan, 1983). Bu nedenlerden dolayı, kanser tedavisinde nanoteknoloji ürünü ilaç taşıyıcı sistemleri kullanılmaktadır (Rubinstein ve ark, 2008; Dağar ve ark., 2012). Başlıca bu ilaç taşıyıcı sistemler; polimerik ve fosfolipit miseller, lipozomlar, karbon nanotüpler, dendrimerler ve nanoemülsiyonlardır. Nanoteknoloji ile etkin maddelerin terapötik indeksi iyileştirilerek ilaç, protein, nükleik asit ya da aşuların enkapsülasyonu sağlanır ve hedeflendirilme ile tedavide kullanılma potansiyeline ulaştırılır (Banerjee ve Önyüksel, 2012; Vukovic ve ark., 2011).

Lipozom formülasyonu olan Doxil® in geliştirilmesinden sonra nanoteknoloji temelli lipozomal ve polimerik ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiş ve ruhsatlandırılmıştır. Dünya piyasalarında bulunan ya da geliştirilmekte olan nanoteknoloji temelli kanser tedavisinde kullanılan farmasötik ürünlerin listesi **Çizelge 1**'de verilmiştir. Bu alanda halen 150'ye yakın nanoteknolojik ilacın geliştirilme çalışmaları da devam etmektedir (Prokop ve Davidson, 2008).

Çizelge 1. Dünya Piyasalarında Bulunan ya da Geliştirilmekte Olan Nanoteknoloji Temelli Kanser Tedavisinde Kullanılan İlaç Formülasyonları (Prokop ve Davidson, 2008)

Ürün	Üretici Firma	Uygulama Alanı
Abraxane	American Bioscience, Santa Monica, CA	Kanser Tedavisi
Caelyx	Johnson&Johnson, Bridgewater, NJ	
Daunoxome	Gilead Science, Cambridge, U.K.	
Doxil	Johnson&Johnson, Bridgewater, NJ	
Myocet	Seperion Therapeutics, Princeton, NJ	
Nanoxel	Dabur Pharma, India	
Transdrug	Bioalliance, Paris, France	

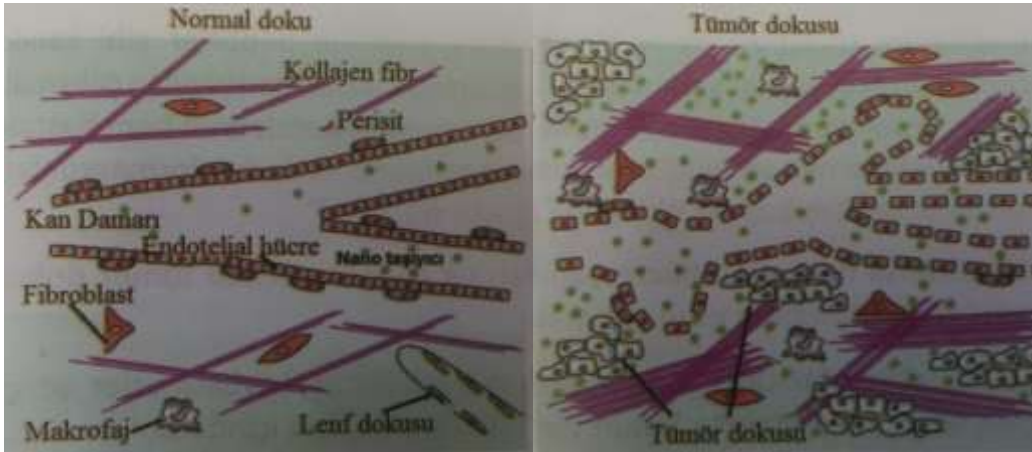
İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hedeflendirilme Mekanizmaları

İlaç hedeflendirme çalışmaları, etkin maddenin seçici olarak yönlendirilmesi ile hedef bölgedeki konsantrasyonunun diğer bölgelere oranla artırılmasını amaçlamaktadır (Manish ve Vimukta, 2011). Böylece etkin maddenin etkinliği artırılırken dozu ve yan etkileri azaltılmış olmaktadır (Allemann ve ark., 1995; Allen, 1997).

Hedeflendirmenin Esası;

- Dozun azaltılmasıyla yan etkilerin en aza indirilmesi,
- İlacın vücutta istenilen bölgeye yönlendirilebilmesi,
- İlacın normalde girilmesi zor olan bölgelere ve hedeflere girebilmesi (örneğin; intraselüler bölgeler, bakteriler, parazitler),
- Reseptöre spesifik ve dayanıksız moleküllerin kanda korunması ve hedef dışı reseptörlerle etkileşmemesidir (Banerjee ve Önyüksel, 2012).

Şekil 1'de gösterildiği üzere normal doku ile tümör dokusu arasında yapısal farklılıklar bulunmaktadır. Anjiyogenez olarak bilinen primer tümörlerinin damarlanması, bazı bölgelerde yoğun olmakla birlikte bazı bölgelerde ise daha az oluşmaktadır (Danhier ve ark., 2010). Bu farklı oluşum aynı zamanda ilaç taşıma sisteminde kullanılan hedeflendirmede önemli bir etkidir. Bu duruma Artmış Geçirgenlik ve Alıkonma (EPR) denmektedir.



Şekil 1. Normal ve Tümörlü Doku Arasındaki Farklar (Danhier Ve Ark., 2010)

Bunun yanı sıra, nanaşıyıcı sistemlerin örneğın; Polietilen glikol (PEG) gibi hidrofıl polimerlerle kaplanması ve bu şekilde suyu içinde tutarak su kabarcığı haline getirilmesi mümkün olmaktadır (Rosler ve ark., 2001). Bu işlem nanaşıyıcı sisteme bazı avantajlar kazandırmaktadır ki; bunlardan bir tanesi EPR etkisiyle tümör hücrelerini hedefleme ve diğeri ise, geleneksel ilaçların temizlenme

sistemi olan retikuloendotelial sistemden (RES) nanotaşıyıcı sistemin korunmasıdır (Li ve Huang, 2008).

Nanotaşıyıcı sistemlerin kılcal damar çeperinden geçmesi için, boyutunun yaklaşık 300 nm'den daha küçük olması gerekmektedir. Çünkü, nanotaşıyıcı sistemin etkisini gösterebilmesi için (özellikle hedeflendirilmiş sistemler) kan dolaşımında sürüklenmesinin yanı sıra hedef bölgede kılcal kan damar çeperini aşip hücrel bir cevaba neden olması gerekmektedir (Narang ve Varia, 2011).

Pasif hedeflendirme

Pasif hedeflendirme; doğal fizyolojik işlemler ya da pasif faktörler aracılığı ile kolloidal partiküllerin belirli bölgelere taşınma işlemidir (Morachis ve ark., 2012; Gabizon, 2001; Moghimi ve ark., 2001).

Nanotaşıyıcı sistemin partikül boyutu pasif hedeflendirmedeki etkin parametrelerdendir (Önyüksel ve Banerjee, 2011).

Yukarıda bahsedilen RES ile hidrofobik yüzeye sahip küçük partiküller kan dolaşımında plazma bileşenleri tarafından hızla kaplanır ve daha sonra RES tarafından yıkıma uğratılır. Nanotaşıyıcı sistemin RES tarafından tespit edilememesi ve kan dolaşımında taşınarak hedeflenen bölgede birikmesi gerekmektedir (Lim ve ark., 2012).

Pasif hedeflendirme hastalıkların patofizyolojisine, hasta dokuların EPR özelliğine dayanır. İntravenöz uygulanan mikro ya da nano partiküllerin boyutunun damarlarda tıkanıklık oluşturmaması ve zararlı etki göstermeden damarlarda dolaşması ve hedef bölgeye ulaşmasıdır (Koo ve ark., 2005; Keller, 2009). Genelde 100 nm'nin altındaki taşıyıcıların etkili bir şekilde hasta dokuya geçtiği öngörülür. Fakat bazı subkütan tümörlerin delik boyutunun 380-720 nm arasında değiştiği belirlenmiştir (Hobbs ve ark., 1998; Hashizume ve ark., 2000). Ayrıca partiküllerin böbreklerden filtre edilmemesi için 10 nm'den büyük olması gerekmektedir. (Manish ve Vimukta, 2011).

Aktif hedeflendirme

Taşıyıcı sistemin hedeflendirmesini arttırmak için dokuların ve hücrelerin biyolojik, kimyasal ve fiziksel özelliklerinden faydalanılır. Nanopartiküllerin aktif hedeflendirilmesinde kimyasal (pH, reaktif oksijen türleri, proteazlar) ve fiziksel (ısı, manyetik alan) faktörlerden ya da spesifik bağlanma ve hücreye penetre olan peptitler ile hedeflendirme gibi yöntemler kullanılmaktadır (Cho ve ark., 2008).

Nanopartikül İlaç Taşıyıcı Sistemler

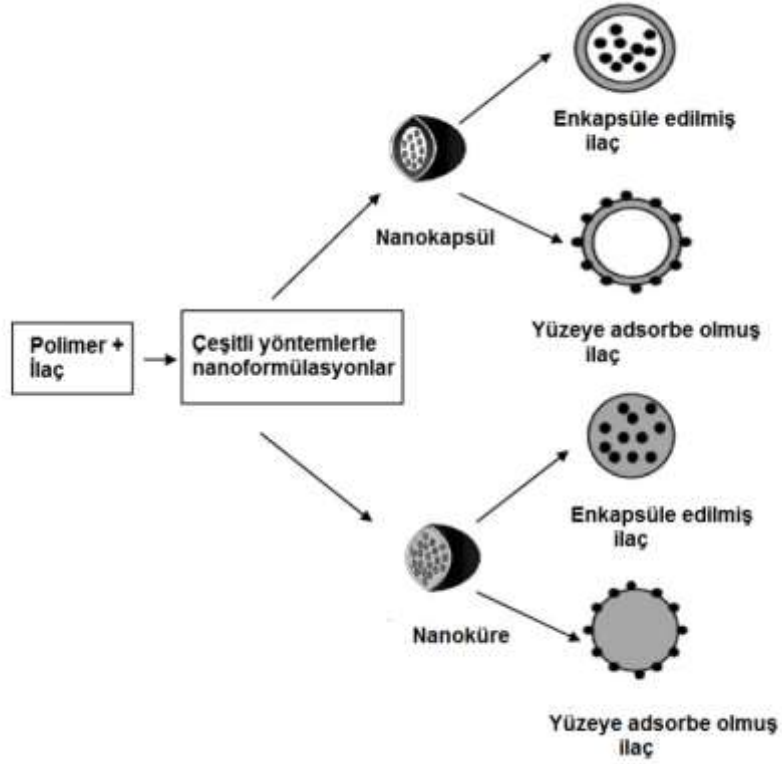
Nanopartiküller submikron boyutlarda, doğal ya da sentetik polimerlerden, seramik ya da inorganik elementlerden hazırlanan katı kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. İlaç nanopartikül içinde çözülmüş ya da tutulmuş olabileceği gibi yüzeyine absorbe edilmiş de olabilir (**Şekil 2**). Ayrıca partikülün yüzeyi modifiye edilerek kan dolaşımında daha uzun süre kalması sağlanabilir, aktif ya da pasif hedeflendirmeye uygun olarak hazırlanabilir (Soppimatha ve ark., 2001; Singh ve Lillard, 2009). Nanopartikülün yüzey yükü anyonik ya da katyonik materyallerle kaplanarak ayarlanabilir ve hedef doku ya da hücre ile daha iyi etkileşime giren formülasyonlar hazırlanabilir, salım profili kontrol edilebilir. Tüm bu özelliklerden dolayı nanopartiküler ilaç taşıma sistemler konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlere göre daha etkin tedavi sağlamaktadır (Hans ve Lowman, 2002).

İlaç taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklüğü çok önemlidir. Partikül büyüklüğüne göre ilaç taşıyıcı sistemler farklı doku ve organlarda birikmektedir (Gaumet ve ark., 2008). İyi bir ilaç taşıyıcı sistemin partikül boyutu kan damarından sızmayacak kadar büyük, mononuklear fagositik sistem tarafından da farkedilmeyecek kadar küçük olmalıdır (Singh ve Lillard, 2009).

Nanoküreler ve Nanokapsüller

Nanoküreler ilacın polimerik küre içinde dağıldığı gibi yüzeye absorbe ya da konjuge halde olabildiği polimerik bir matriksten oluşan sistemlerdir. Nanokürelerde ilaç salınımı polimerik yapının arasından difüze olma ya da polimerik yapının parçalanması ile ya da bu iki durumun eş zamanlı olmasıyla gerçekleşir (Singh ve Lillard, 2009; Brigger ve ark., 2002).

Nanokapsüller ilacın yağlı iç çekirdekte ya da dağılmış halde bulunabildiği gibi yüzeye absorbe ya da konjuge halde de bulunabildiği polimerik bir zarf ve yağlı iç çekirdekten oluşan membran tipi ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Nanokürelere göre ilaç salım hızı daha yavaş ilaç yükleme kapasitesi ise daha yüksektir. Nanoküre ve nanokapsül hazırlama arasındaki en büyük fark organik faza çekirdeği oluşturan yağ eklenmesidir. Polimer zincirleri ve varsa yüzey etkin madde bu çekirdeğin etrafında polimerik bir film tabakası oluşturur (Singh ve Lillard, 2009; Mora-Huertasa ve ark., 2010).



Şekil 2. Nanopartikül İlaç Taşıma Sistemleri (Kumari ve ark., 2010)

Nanopartiküler Sistemlerde Kullanılan Polimerler

Taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında doğal ya da sentetik olmak üzere iki tip polimer kullanılır. Doğal polimerler hidrofilik özellikte olup bitki ya da hayvanlarda bulunurlar. Molekül ağırlıkları ve bileşimleri birbirinden farklı olabilen doğal polimerler biyoyumlu ve biyoparçalanır özelliğe sahiptirler. Sentetik polimerlerin fizikokimyasal özellikleri doğal polimerlere göre daha kolay kontrol edilebilir.

Nanoaşıyıcı sistemlerde biyoparçalanır veya biyoparçalanmayan polimerler kullanılabilir. Materyalin fizyolojik ortamda enzimlerle parçalanması ya da hidrolize olarak kimyasal bozunması biyoparçalanma olarak adlandırılır. Biyoparçalanmanın kaynağı enzimatik, kimyasal ya da mikrobiyolojik olabilir ve eş ya da farklı zamanlarda etkili olabilir (Pillai ve Panchagnula, 2001).

Çizelge 2’de nanoaşıyıcı sistemlerde kullanılan polimerler sınıflandırılmıştır.

Çizelge 2 . Nanotaşıyıcı Sistemlerde Kullanılan Polimerler (Zırh-Gürsoy, 2014)

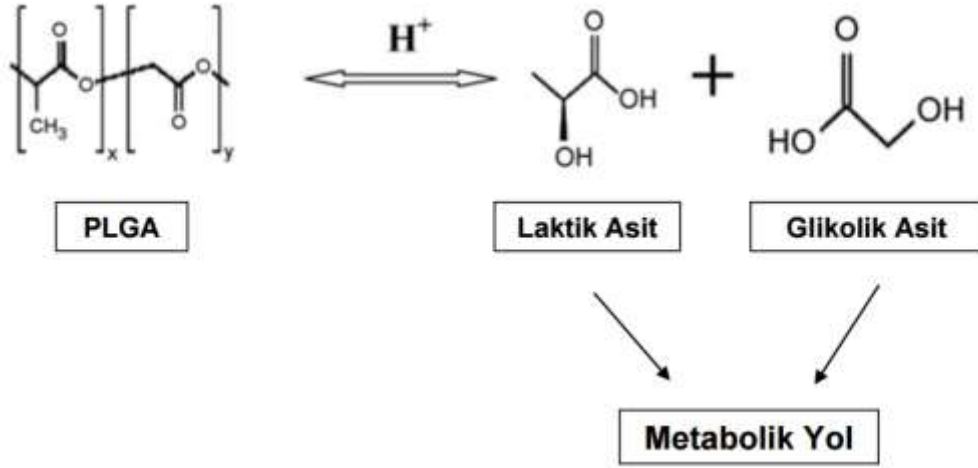
Sınıflandırma	Polimer
Doğal Polimerler	
*Protein-bazlı polimerler	Kolajen, albumin, jelatin
*Polisakkaritler	Agaroz, kitozan, hiyalüronik asit, aljinat, karagen, dekstran, siklodekstrinler
Sentetik Polimerler	
<u>Biyoparçalanır olan</u>	
Poliesterler	Poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(hidroksi bütirat), poli(ϵ -kaprolakton), poli(β -malik asit), poli(dioksanonlar)
Polianhidritler	Poli(sebazik asit), poli(adipik asit), poli(terftalik asit) ve çeşitli kopolimerler
Poliamidler	Poli(imino karbonatlar), poliamino asitler
Fosfor-bazlı polimerler	Polifosfatlar, polifosfonatlar, polifosfazenler
Diğerleri	Poli(siyano akrilatlar), Poli üretanlar, poli orto esterler, polidihidropiranlar, poliasetaller
<u>Biyoparçalanır olmayan</u>	
Selüloz türevleri	Karboksimetil selüloz, etil selüloz, selüloz asetat, selüloz asetat propiyonat, hidroksipropil metil selüloz
Silikonlar	Polidimetil siloksan, Kolloidal silika
Akrilik polimerler	Polimetakrilatlar, poli(metil metakrilat), poli hidro (etil-metakrilat)
Diğerleri	Polivinil piroolidon, etil vinil asetat, poloksamerler, poloksaminler

Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

PLGA laktik ve glikolik asit siklik dimerlerinin birbirine ester bağı ile bağlandığı rastgele halka açılım kopolimerizasyonu ile elde edilen sentetik bir kopolimerdir (Astete ve Sabliov, 2006). Farklı ilaç taşıma sistemlerinde PLGA, FDA (Food and Drug Administration) ve EMA (European Medicine Agency) tarafından onaylanmıştır (Danhier ve ark., 2012).

Laktik asit ve glikolik asit monomer içeriğinin oranı; PLGA'nın kristallik derecesi, mekanik kuvvet, şişme kapasitesi ve hidroliz kapasitesi gibi birçok özelliğini etkilemektedir. Örneğin PLGA (50:50)'in hidrolizi her iki monomerden birinin fazla olduğuna göre kıyaslandığında daha hızlı hidroliz olduğu görülmüştür (Li ve Mc Carthy, 1999; Park, 1994).

PLGA, su varlığında ester bağlarının hidrolizi ile tamamen biyoparçalanırdır (Şekil 3). Laktik asit ve glikolik asit endojendir ve vücutta Krebs döngüsünde metabolize edilerek, CO₂ ve H₂O olarak elimine edilebilir ya da değişime uğramadan böbreklerden atılabilir (Muthu, 2009; Kumari ve ark., 2010). Bu yüzden ilaç taşınmasında ve biyomateryal uygulamalarında PLGA'nın sistemik toksisitesinin çok az olduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda biyoyumlu olduğu gösterilmiştir (Athanasίου ve ark., 1996).



Şekil 3. PLGA'nın Hidrolizi (Kumari ve ark., 2010)

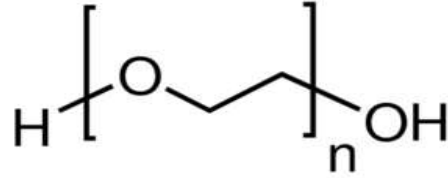
PLGA nanopartikülleri çoğunlukla emülsifikasyon-difüzyon (Sahana ve ark., 2008), solvent emülsion-buharlaştırma (Zambaux ve ark., 1999), interfasiyal pozisyon (Reis ve ark., 2006) ve nanoçöktürme (Barichello ve ark., 1999) metotları ile hazırlanmaktadır. PLGA nanopartikülleri paklitaksel (Fonseca ve ark., 2002), 9-nitrokamptotesin (Derakhshandeh ve ark., 2007), sisplatin (Avgoustakis ve ark., 2002) gibi çeşitli antikanser ajanların enkapsülasyonunda

kullanılmıştır.

Poli (etilen glikol) (PEG)

PEG 300-100000 Da molekül ağırlığı aralığında, etilen glikol monomerinin polimerizasyonu ile sentezlenen sentetik bir polieterdir. PEG biyoparçalanır bir polimer değildir ve vücutta değişime uğramadan böbreklerden atılır. PEG bu dezavantajına rağmen oldukça biyouyumludur ve özellikle düşük molekül ağırlıkta olanları dokularda birikmeye neden olmamaktadır (Locatelli ve Franchini, 2012).

PEG'in toksik olmadığı gösterilmiş ve farklı farmasötik formülasyonlarda taşıyıcı olarak FDA tarafından onaylanmıştır. (Fuertges ve Abuchowski, 1990)



Şekil 4. Poli (etilen glikol) (PEG)'ün Molekül Formülü

Biyolojik olarak inert olan PEG, nanopartikülün yüzeyine inert olarak bağlanır (Alayautdin ve ark., 1997; Kreuter ve ark., 2003).

PEG, hidrofilik ve noniyonik bir polimer (Tobio ve ark., 2000; Kumari ve ark., 2010) olması nedeniyle nanopartikülün kandaki yarılanma ömrü uzamaktadır. Bununla birlikte, PEG non-iyonik bir özelliğe sahiptir ve bundan dolayı DNA gibi yüklü biyolojik moleküllerle karşılaştığında etkileşime girmemektedir (Knop ve ark., 2010).

PEG organik çözücülerde oldukça iyi çözündüğünden uç grup modifikasyonları kolayca yapılabilir. Bunun yanında, PEG suda çözünebilir, toksisitesi düşüktür ve biyolojik uygulamalara uygundur. Hidrofobik ilaç ya da taşıyıcıya bağlandığı zaman onun sulu ortamdaki çözünürlüğünü artırmaktadır (Knop ve ark., 2010).

PEG'in biyoparçalanır olmaması bir dezavantajdır. Bu yüzden düşük molekül ağırlığındaki PEG tercih edilmelidir. Ancak molekül ağırlığı 400 Da'un altındaki oligomerlerin insan için toksik olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla 400 Da'un üzerindeki molekül ağırlıkları tercih edilmelidir (Herold ve ark., 1989; Hinds, 2005)

PEGilasyon

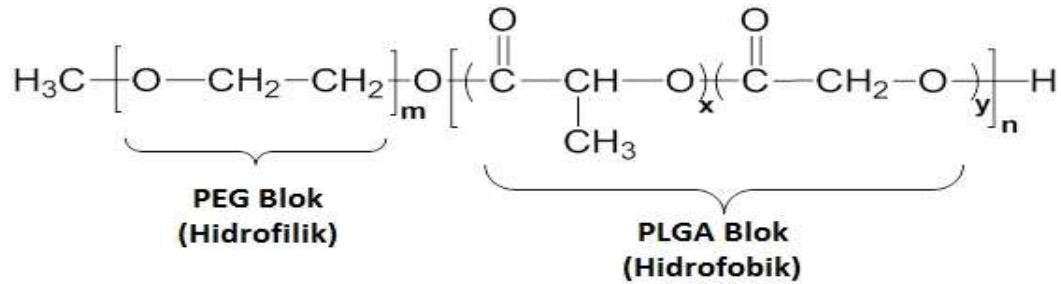
Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için vücutta belirli bir sirkülasyon zamanı gereklidir. Ancak vücut hidrofobik partikülleri yabancı olarak tanımlar (Kumari ve ark., 2010; Brigger ve ark., 2002). RES bu partikülleri kan dolaşımından uzaklaştırarak karaciğer ve dalağa yönlendirir. Bu mekanizma nanopartiküle dayalı ilaç taşıma sistemleri için en büyük biyolojik engellerdendir (Kumari ve ark., 2010; Danhier ve ark., 2012). Nanopartiküllerin yüzeyinin modifiye edilerek hidrofilik polimerik zincirlerin eklenmesiyle partiküller önemli ölçüde opsonizasyon ve sonrasında fagositoza karşı sterik olarak stabilize olur (Avgoustakis, 2004). Partikülün fagozite edilmeden uzun süre kan dolaşımında kalmasını sağlamak için PLGA gibi hidrofobik yüzeye sahip ilaç taşıma sistemlerinin yüzeyi PEG gibi hidrofilik bir polimerle kaplanabilir.

İlaç taşıma sistemlerinde kullanılan ilk PEG 20 yıl önce piyasaya sürülmüştür. PEG polimerlerin saklanması için altın standarttır. 1990 yılında ABD’de PEG ile adenozin deaminaz ilk onaylanan polimer-protein konjugatı olmuştur (Greenwald ve ark., 2003).

PLGA-b-PEG

PLGA mikropartikülünün dış yüzeyinin PEG ile kaplanmasıyla farmakokinetiğinin etkilendiği bilinmektedir. Partikülün yarılanma ömründe ciddi bir artış olmuş ve kaplanmamış partiküller enjeksiyondan yalnızca 5 dakika sonra karaciğer tarafından uzaklaştırılırken, PEG kaplı partiküllerin ise sadece % 30’u 2 saat sonra yakalanmıştı (Gref ve ark.,1994).

PLGA-b-PEG kopolimeri PLGA ve PEG ile kıyaslandığında yeni farklı bir biyomateryal olarak karşımıza çıkmaktadır. PLGA-b-PEG, PLGA’ın biyobozunurluğuna ve biyoyumuna sahip olmasının yanında PEG’in saklanabilme özelliğine sahiptir. Ayrıca PLGA-b-PEG tek başına PLGA ya da diğer tip PLGA-PEG kopolimerlerinden daha iyi misel formu oluşturmaktadır (Locatelli ve Franchini, 2012). PLGA-b-PEG kopolimeri amfifiliktir.



Şekil 5. mPEG-PLGA’ın Molekül Formülü (http-1)

Polimerlerin Şekillendirilmesiyle Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Alkilsiyanoakrilatlar ve poli (dialkylmetiliden malonat) dışında çoğu monomer sulu ortamda biyobozunur ya da biyobozunmayan polimerlere dönüşümü sağlayan misel polimerizasyonu için uygundur. Ayrıca polimerizasyon ortamında kalan monomer, oligomer, yüzey etkin madde gibi kalıntılar kolloidal materyalin saflaştırılmasıyla giderilse de az ya da çok toksik etkiye neden olabilir. Bu sınırlamaları önlemek için monomerler yerine polimerlerin şekillendirilmesiyle nanopartiküllerin hazırlanması tercih edilmektedir (Reis ve ark., 2006).

Etkin maddenin fizikokimyasal yapısı ve çözünürlüğü, polimer vizkozitesi, bileşimi ve molekül ağırlığı, etkin madde/polimer oranı, organik çözücünün tipi, sıcaklık, karıştırma hızı ve süresi gibi etkenler partikül üretimini etkiler (Jain, 2000).

Çizelge 3'de (Alonso, 1996) sık kullanılan nanopartikül hazırlama yöntemleri verilmiştir.

Çizelge 3. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri (Alonso, 1996)

Polimer Tipi	Hazırlama Yöntemi	Etkin Madde
Hidrofilik *Albumin, Jelatin *Aljinat, Kitosan *Dekstran	*S/Y emülsiyonunun ısı denatürasyonu ve çapraz bağlanma *Sulu ortamda desolvasyon ve çapraz bağlanma *Sulu ortamda çapraz bağlanma *Organik çözücünden polimer çöktürmesi	Hidrofilik,Protein Hidrofilik,Protein Hidrofilik
Hidrofobik *Poli(alkilsiyanoakrilat)(PACA) *Poliesterler (PLA,PLGA,PECL)	*Emülsiyon polimerizasyonu *Yüzeyler arası polimerizasyon *Çözücü buharlaştırılması *Çözücü yerdeğişimi *Tuzla çöktürme	Hidrofilik Hidrofobik Hidrofilik/Hidrofobik Polar çözücülerde çözünen

Emülsifikasyon/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

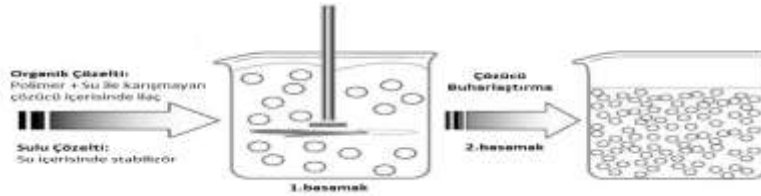
Çözücü buharlaştırma polimerik nanopartikülleri hazırlamak için kullanılan en yaygın tekniktir. Üç tip emülsiyon hazırlama yöntemi vardır. Bunlar;

- Yağ içinde su fazı (s/y)
- Su içinde yağ fazı (y/s)
- s/y/s emülsiyonu gibi tek ve çift emülsiyon hazırlama yöntemleridir.

Emülsifikasyon çözücü buharlaştırma metodu sulu fazdaki polimer solüsyonunun emülsifikasyonunu içeren birinci basamak ve polimer çözücüsünün uçurulmasını ve nanoküre olarak polimerin çökertilmesini içeren ikinci basamaktan oluşur.

Etkin maddenin çözündüğü polimerin içinde bulunduğu organik çözelti, çözücü olmayan kloroform ya da etil asetat gibi süspansiyon ortamında yüksek enerjili homojenizasyon ile (Tice ve Gilley, 1985), emülsifiye edici ajan kullanılarak nanodamlacıklar oluşturulur. Emülsifiye edici ajan olarak sulu fazda jelatin, poli (vinil alkol), polisorbitat 80, poloksamer 188 vb. kullanılır (Soppimatha ve ark., 2001). Emülsifiye edici ajanlar amfifilik özelliktedir ve iki faz arasındaki yüzeylerarası serbest enerjiyi düşürürerek stabiliteyi destekler. Bunun yanı sıra, damlacık yüzeyinde bir yük ya da sterik engel oluşturması, birleşmeyi ve topaklaşmayı (flokülasyon) önler. Etkin madde polimer matriksin arasında dağılmış halde polimerik nanoküre formunun oluşmasıyla çöker. Çözücü, basınç altında sıcaklığın yükseltilmesiyle ya da sürekli karıştırma yoluyla uçurulur (Soppimatha ve ark., 2001). Katılaştıran nanopartiküller ultrasantrifüj ile toplanır ve distile su ile bir kaç kez yıkanarak reaksiyon ortamında bulunan enkapsüle olmayan ilaç, yüzey etkin madde gibi istenmeyen maddelerin uzaklaşması sağlanır. Karıştırma hızı, çözücü ajanın tipi ve miktarı, organik ve sulu fazın viskozitesi ve sıcaklık, oluşan partikülün boyutunu etkiler (Tice ve Gilley, 1985).

Şekil 6'de Emülsifikasyon/ çözücü buharlaştırma yöntemi şematize edilmiştir.



Şekil 6 . Emülsifikasyon/ Çözücü Buharlaştırma Yöntemi (Reis ve ark., 2006)

Farklı emülsiyon tipleri olmasına rağmen yağ/su emülsiyonu ilgi çekicidir. Çünkü nonsolvent olarak su kullanılır ve bu prosesi kolaylaştırır, ekonomik hale getirir, yıkama basamağını iyileştirir ve aglomerasyonu önler (Aftabrouhard ve Dorlker, 1992). Ancak bu metod yalnızca yağda çözünebilen ilaçlarda kullanılır ve homojenizasyonda yüksek enerji gerektirmesi gibi sınırlamaları vardır (Soppimatha ve ark., 2001). PLA (Gurny ve ark., 1981; Ueda ve Kreuter, 1997), PLGA (Tabata ve Ikada, 1989), etilselüloz (EC) (Bodmeier ve Chen, 1990), selüloz asetat fitalat (Alleman ve ark., 1993), poli (ϵ -kaprolakton) (PCL) (Gref ve ark., 1994; Lemarchand ve ark., 2006), ve poli (h-hidroksibutirat) (PHB) (Koosha ve ark.,1987; Koosha ve ark., 1989) gibi polimerler sıklıkla kullanılır. Albumin (Landry ve ark., 1996), testosteron (Gurny ve ark., 1981), loperamit (Ueda ve Kreuter, 1997; Ueda ve ark., 1998), prazin-quantel (Mainardes ve Evangelista,

2005), siklosporin A (Jaiswal ve ark., 2004; Sanchez ve ark., 1993), nukleik asit (Prabha ve ark., 2002), and indometasin (Bodmeier ve Chen, 1990) gibi ilaç ya da model ilaçlar enkapsüle edilir.

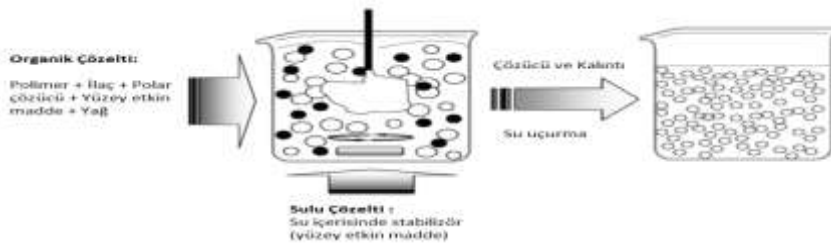
Çift emülsiyon metodu ise suda çözünen ilaçların hapsedilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Genellikle polimer organik çözücü içinde çözünerek yağ fazını oluştururken, su fazında da stabilizör bulunmaktadır.

Çözücü Yer Değiştirme (Nanoçöktürme) Yöntemi

Fessi ve ark. tarafından geliştirilen nanoçöktürme metodu polimerik nanopartiküller üretmek için kullanılmaktadır ve çözücü yer değiştirme metodu olarak da isimlendirilmektedir (Fessi ve ark., 1989; Dinarvand ve ark., 2011).

Çözücü yer değiştirme yöntemi yüzey etkin madde varlığında ya da yokluğunda sulu ortamda organik çözücünün difüzyonu ve organik çözeltilen polimerin şekillenerek çökmesini kapsar (Fessi ve ark., 1989; Ganachaud ve Katz, 2005). Polimer nanoküre oluşumuyla sonuçlanarak suya karışabilen orta derecede polariteye sahip çözücüde çözdürülür. Aseton bu yöntem için en çok kullanılan çözücü olmakla birlikte etanol, hekzan, diklorometan gibi organik çözücüler de su ile karışabilir olduğundan ve kolaylıkla buharlaşabildiğinden dolayı tercih edilir. Oluşan bu faz stabilizör içeren sulu faza eklenir. Bu sırada çözücünün hızlı difüzyonu nedeniyle nanopartiküller hemen oluşmaktadır. Çözücü ise daha sonra manyetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak ya da evaporasyon ile uçurularak reaksiyon ortamından uzaklaştırılır. Kolloidal polimerik partiküllerin oluşumunu kolaylaştırmak için ilk basamakta polimerin çözünmediği, çözücüye tamamen karışabildiği faz ayrımıyla gerçekleştirilebilir (Vauthier ve ark., 2003). Nanoçöktürme metoduyla organik faza küçük miktarda toksik olmayan yağ ilavesiyle nanokapsül de hazırlanabilir. Nanokapsülün yağa dayalı merkezi boşluğu göz önünde bulundurulduğunda genellikle lipofilik ilaçlar için yüksek yükleme etkinliği gösterdiği görülmüştür (Quintanar-Guerrero ve ark., 1998).

Şekil 7'de çözücü yer değiştirme (nanoçöktürme) yöntemi şematize edilmiştir.



Şekil 7. Çözücü Yer Değiştirme (Nanoçöktürme) Yöntemi (Reis ve ark., 2006)

Polimerin çözündürülmesi için kullanılan aseton/diklorometan ilacın hapsedilme

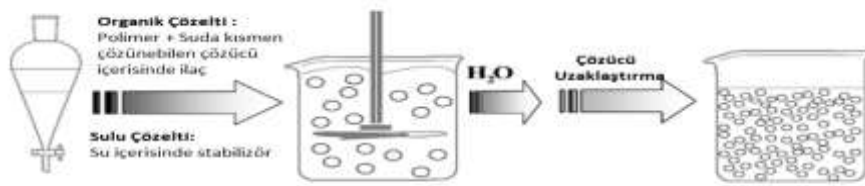
oranını artırmaya rağmen, diklorometan partikül boyutunu artırır (Wehrle ve ark., 1995). Bu metod, sulu faz ile çözücünün karışabilirliğinden dolayı lipofilik ilaçlar için uygundur (Barichello ve ark., 1999), ve suda çözünebilir ilaçların enkapsülasyonu için etkili bir yöntem değildir. Bu metod PLA (Nemati ve ark., 1996), PLGA (Barichello ve ark., 1999), PCL (Molpeceres ve ark., 1996), ve poli (metil vinil eter-ko-maleik anhidrid) (PVM/MA) (Irache ve ark., 2005; Arbos ve ark., 2002) gibi polimerler için uygundur.

Organik fazın sulu faza eklenmesi, organik fazın sulu faza eklenme hızı, sulu fazın karıştırma oranı, organik faz hacminin sulu faz hacmine oranı, bileşenlerin konsantrasyonu gibi etmenler oluşan nanopartiküllerin karakterizasyonunu etkilemektedir (Rao ve Geckelera, 2011).

Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon Yöntemi

Polimer propilen karbonat gibi kısmen suda çözünen çözücüde çözündürülür ve her iki sıvının da başlangıç termodinamik eşitliğe gelmesi için su ile doyurulur. Polimerik nanopartikül çökeltisini üretmek için organik çözücü kısmen su ile ya da diğer bir organik çözücü ile karıştığı zaman suyun fazlası ile seyreltilmesi yoluyla disperse fazın çözücüsünün difüzyonunu teşvik etmek gereklidir. Daha sonra polimer-su stabilizör içeren sulu fazda emülsiyeye çözücü fazı ile doyurulur ve bu dış faza çözücü difüzyonuna ve nanoküre ya da nanokapsül oluşumuna yol açar. Son olarak çözücü kaynama noktasına göre evaporasyon ya da filtrasyon ile uzaklaştırılır (Reis ve ark., 2006).

Şekil 8'da Emülsifikasyon/çözücü difüzyon yöntemi şematize edilmiştir.



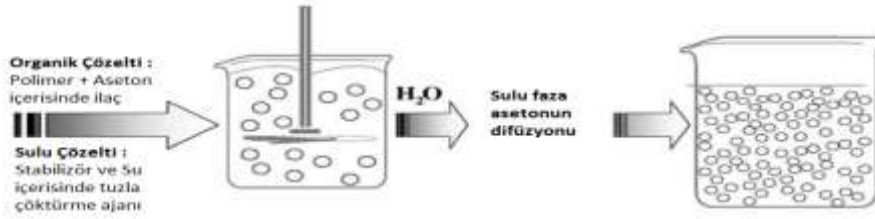
Şekil 8. Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon Yöntemi (Reis ve ark., 2006)

Method yüksek enkapsülasyon etkinliği, homojenizasyona ihtiyaç duyulmaması, yüksek tekrar üretilebilirlik, kolay uygulanabilir olması, dar boyut dağılımı gibi avantajlara sahipken süspansiyondan elimine etmek için yüksek miktarda su kullanımı ve emülsifikasyon boyunca doymuş sulu faza suda çözünebilir ilacın salınımı ile enkapsülasyon etkinliğinin azalması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu metodla üretilmiş ilaç yüklü nanopartiküllerden bazıları mesotetra (hidroksifenil) porfirin-yüklü PLGA (p-THPP) nanopartikülleri (Vargas ve ark., 2004; Konan ve

ark., 2002), doksorubisin-yüklü PLGA nanopartikülleri (Yoo ve ark., 1999), plasmid DNA-yüklü PLA nanopartikülleri (Perez ve ark., 2001), kumarin-yüklü PLA nanopartikülleri (Lu ve ark., 2005), indosiyenin (Saxena ve ark., 2004), siklosporin (Cy-A)-yüklü jelatin and siklosporin (Cy-A)-yüklü sodium gilikolat nanopartikülleri (El-Shabouri,2002)'dir.

Tuzla Çöktürme Yöntemi

Tuzla çöktürme metodu çok sık olarak kullanılmamakla birlikte emülsifikasyon/çözücü difüzyon yönteminin modifiye halidir. Bu metotta, etkin madde ve polimer aseton gibi su ile karışabilen bir çözücüde çözündürüldükten sonra tuzla çöktürme ajanı (magnezyum klorür, kalsiyum klorür ve magnezyum asetat gibi elektrolitler ya da sukroz) ve polivinil pirolidon ya da hidroksietil selüloz gibi stabilizatör içeren su fazına karıştırma ortamında eklenmektedir. Tuzla çöktürme ajanı etkin maddenin ve polimerin su içerisindeki çözünürlüklerini azaltmaktadır. Nano boyutta partiküller organik çözücü su fazına difüze olduğunda dışarıda kalan polimer ve etkin madde su içerisinde de çözünemeyince oluşturmaktadır (Schmidt ve Lamprecht, 2009). Son üründe ilaç salımında yan etki oluşturabilecek yüksek oranda tuzun bulunması yöntemin dezavantajlarından biridir.



Şekil 9 . Tuzla Çöktürme Yöntemi

Kanser

Bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok faktör kanser oluşumuna neden olmaktadır (Williams, 2001; Williams, 1992).

Kanserde değişikliğe uğramış genler hücre siklusu, apoptoz ve diferansiyasyon olmak üzere üç ana biyolojik yolu etkiler. Bu yollardan birinde oluşan aksamalar, bir diğerinde ciddi sonuçlara neden olabilir (Corn ve El-Deiry, 2002).

Tümör oluşumu, neoplastik transformasyon ve neoplastik gelişim olmak üzere ikiye ayrılır. Onkogenez ve karsinogeneizde ilk basamağı neoplastik transformasyon oluşturmaktadır (Berenblum, 1974; Elenbaas ve ark., 2001). Neoplastik transformasyon kendiliğinden olabileceği gibi baz çifti değişikliklerini, mispairing, delesyon, translokasyonları ve amplifikasyonları gibi çeşitli şekillerde indüklenerek de oluşabilir (Devereux ve ark., 1999). Yani neoplastik transformasyon, DNA replikasyonunun ve tamir mekanizmalarının düzgün çalışmaması sonucu hücrelerde oluşan mutasyonların sonucudur. Onkogenezin ikinci basamağı olan neoplastik gelişme, kanser hücresinin klonal proliferasyonuna yol açarak (Devereux ve ark., 1999; Nowell, 1976), önce çevre dokulara sonra da uzak dokulara yayılarak büyümesini sağlar (Butterworth ve ark., 1992).

Karaciğer Kanseri (Hepatoselüler Karsinoma)

Hepatoselüler karsinoma (HSK) olarak bilinen hepatositlerden köken alan primer karaciğer kanseri dünyada kanserle ilişkili ölümlerde 3., en sık görülen kanserler arasında ise 5. sıradadır. Dünya genelinde yılda 250 bin ile 1 milyon arasında insanın ölümüne yol açmaktadır (Munoz ve Bosch, 1989; Okuda, 1992).

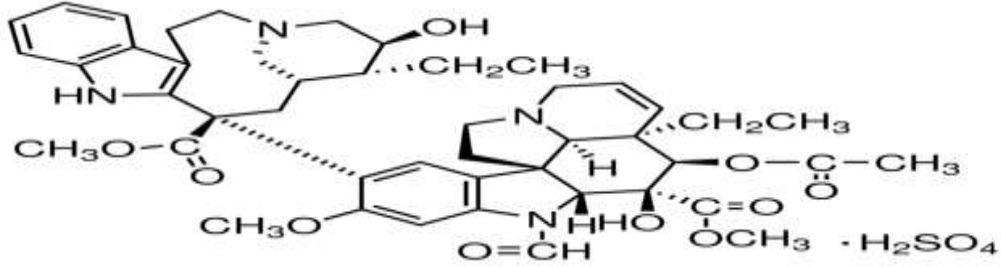
HSK'nın patofizyolojisi tam anlaşılammakla birlikte karaciğerin fonksiyonunu nıpseten kaybetmesi, özellikle siroz zemin hazırlayan bir durumdur. Hepatokarsinogenez epigenetik ve genetik birikimlerle kompleks olarak ilişkili bir süreçtir. Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptozun baskılanmasıyla, kanserli hücrelerin hayatta kalmasını etkileyen birçok faktörün artan ekspresyonu, hücreyel olaylara eşlik etmektedir. HSK'nın tedavisi için hücreyel, fizyolojik ve hastalığın moleküler mekanizmasının anlaşılması için araştırmalar devam etmektedir (Aravalli ve ark. 2008; Okuda 2000; Wang ve ark. 2002; Cho ve ark. 2010).

Vinkristin Sülfat

Vinkristin, Sülfat, Madagaskar orjinli Cezayir menekşesi olarak da bilinen Catharanthus Roseus (Vinca Rosea) isimli bitkiden izole edilen alkaloidin sülfat tuzudur. Kimyasal formülü $C_{46}H_{56}N_4O_{10} \cdot H_2SO_4$, molekül ağırlığı 923,1g/mol dür. Dihidroindol yapısı içeren vindolin ile indol yapısı içeren katarantin C-C bağı ile bağlanmasıyla meydana gelmektedir (Neuss ve ark., 1962; Burns, 1972). Suda (50mg/ml), metanolde (20mg/ml) ve etanolde çözünür.



Şekil 10. Vinca Rosea



Şekil 11. VS'm Molekül Formülü (<http-2>)

Vinkristin'in Tedavide Kullanımı

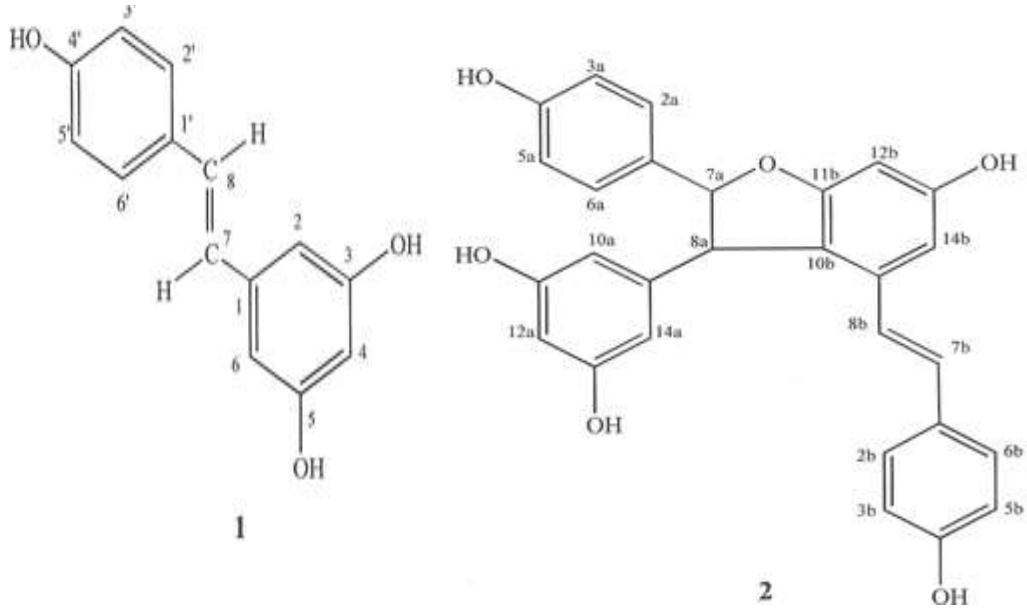


Şekil 12. Oncovin İlacı (<http-3>)

1957 yılının Aralık ayında ilk Vinca Rosea ekstraktı yapılmıştır. O dönem leurokristin olarak adlandırılan vinkristinin ilk başarılı klinik kullanımı 1962 de Noble tarafından gerçekleştirilmiştir (Giddinga ve ark., 1999). Vinkristin Dr.J.G.Armstrong önderliğinde bir grup tarafından geliştirilip Temmuz 1963'te FDA tarafından Oncovin ticari adıyla onaylanmıştır. Eli Lilly ve şirketi tarafından piyasaya sürüldü. Akut lenfositik lösemi, myeloid lösemi, Hodgkin lenfoması, Hodgkin dışı lenfomalar testiküler karsinoma, küçük hücreli anaplastik akciğer karsinoması, sarkom, nöroblastoma, meme kanseri, serviks kanseri, multipl myeloma gibi birçok kanser türünde etkilidir.

ϵ -Viniferin

ϵ -viniferin “*Vitis Vinifera*” “*Vitis coignetiae*” “*Dryobalanops aromatica*” dan izole edilen stilbenoid ailesine ait resveratrol türevidir (Privat ve ark., 2002; Wibowo ve ark., 2011). Molekül formülü $C_{28}H_{22}O_6$, molekül ağırlığı 454.48g/mol dır.



Şekil 13. Trans-resveratrol(1) ve ϵ -viniferin'in(2) Molekül Yapısı (Amalfitano ve ark., 2000)

Resveratrol ve ϵ -viniferin'in antiinflamatuvar (Chen ve ark., 2010; Kang ve ark., 2010) antioksidan (Jang ve Surh, 2001; Chen ve ark., 2004; Chen ve ark., 2009) ve antikarsinojenik özellikleri (Saiko ve ark., 2008, Bai ve ark., 2010 and Zghonda ve ark., 2011) gibi sağlık üzerindeki faydaları gösterilmiştir (Vang ve ark., 2011)

ϵ -viniferinin resveratrole göre daha yüksek biyolojik aktivitesinin bulunduğu gösterilmiştir (Zghonda ve ark., 2011). Üzüm asmasındaki ϵ -viniferin içeriği resveratrole göre daha yüksek olmasına rağmen yeterince çalışılmamıştır. (Landrault ve ark., 2002; Mazauric ve Salmon, 2005; Vitrac ve ark., 2005).

ϵ -viniferin'in lösemi b-hücrelerinde apoptozu indüklediği (Kolb ve Billard, 2004) sıçan hepatositleri üzerinde karaciğeri koruyucu etkisinin olduğu (Oshima ve ark., 1995), insan sitokrom P450 enzimlerini inhibe ettiği (Piver ve ark., 2003) ve antioksidan kapasiteye sahip olduğu (Privat ve ark., 2002) gösterilmiştir.

GEREÇLER

Kullanılan Maddeler

Tez çalışması kapsamında kullanılan tüm maddeler **Çizelge 4**'te verilmiştir.

Çizelge 4. Tez Çalışmasında Kullanılan Maddeler

Kimyasal	Marka
Poli(etilen glikol)metil eter-blok-poli(laktid-ko-glikolid)	Sigma Aldrich, ABD
Vinkristin Sülfat	Sigma Aldrich, Çin
E-Viniferin	Applichem, Almanya
Aseton	Sigma Aldrich, ABD
Pluronic F68	D-Basf,Almanya
Kumarin-6	Sigma Aldrich, ABD
Fetal Bovin Serum(FBS)	Biochrom, Berlin
Penisilin-Streptomisin	Gibco, ABD
Tripsin-EDTA	Biochrom, Berlin
Dulbecco'nun Minimum Esansiyel Ortam (DMEM)	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich, ABD
Tween 80	Merck, Almanya
Polivinil Alkol	Sigma Aldrich, ABD
Dikloro metan	Sigma Aldrich, Almanya
Etanol	Sigma Aldrich, Almanya
Hidroklorik Asit	Merck, Almanya
Metanol	Sigma Aldrich, İsrail
Orto-Fosforik Asit	Merck, Almanya
Sodyum Hidroksit	Merck, Almanya
Triton-X 100	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum Bikarbonat	Sigma Aldrich, ABD
Trietilamin	Merck, Almanya
MTT	AppliChem, Almanya
Akridin Oranj	Sigma Aldrich, Almanya
Propidyum İyodür	Sigma Aldrich, ABD
Tris-Hcl	Sigma Aldrich, ABD
Tris-Base	Sigma Aldrich, ABD
Diyaliz Membran	Sigma Aldrich, ABD
Annexin V-FITC Apoptoz kiti	BD, ABD

Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar **Çizelge 5**'te verilmiştir.

Çizelge 5. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka/Model
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Shimadzu 20-A, Japonya
Akış Sitometri	BD FACSAria, ABD
Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	ezAFM, Nanomagnetics, Türkiye
Liyofilizatör	Scanvac Coolsafe, Danimarka
Mini Santrifüj	Eppendorf, Almanya
Diferansiyel Taramalı Kalorimetri	Shimadzu DSC-60, Japonya
Taramalı Elektron Mikroskobu(SEM)	Zeiss Ultra Plus FE-SEM, Almanya
Döner Buharlaştırıcı	Buchi(R-205), İsviçre
Partikül büyüklüğü, dağılımı ve zeta potansiyeli ölçüm cihazı	Malvern Zetasizer NanoZS, İngiltere
Sonikatör	Sonics Vibracell, ABD
Laminar Kabin	Heal Force-Çin
Vorteks	IKA, ABD
Hassas Terazı	Ohaus-İsviçre
İnverted Mikroskop	Leica-Almanya
CO ₂ inkübatörü	Hera Cell 240 Thermo Scientific-Almanya
Su Banyosu	Nüve BM 302- Türkiye
Floresan Mikroskop	Leica, Almanya
Buzdolabı	Arçelik , Türkiye
Etüv	Nüve- Türkiye
Otoklav	ALP-Japonya
Sterilizatör	Nüve FN 500-Türkiye
Derin Dondurucu	Arçelik No Frost-Türkiye
Azot Tankı	TRII Aır Liquid, Fransa
Buz Makinası	Simag, İtalya
Distile Su Cihazı	Nüve- Türkiye
Mikroplate Okuyucu	Biotek, ABD
Ultrasonik Banyo	Elma T470/H, Singen, Almanya
Manyetik Karıştırıcı	IKA, Almanya
Santrifüj	Hettich- Almanya
pH Metre	Thermo Scientific, Singapore
-86 °C Derin Dondurucu	New Brunswick Sci.,ABD

YÖNTEMLER

EV ve VS'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Analitik Yöntem Validasyonu

Doğrusallık

EV ve VS'nin HPLC yönteminde kullanılacak standart eğrilerin belirlenmesi amacıyla hareketli faz içerisinde stok çözeltileri hazırlanmıştır. 0.75-2.5 µg.mL⁻¹ aralığında seyreltmeler yapılarak elde edilen beş nokta için EV ve VS'nin konsantrasyonuna karşılık gelen alan değerleri bulunmuştur. Deneyler üçer kez tekrarlanarak kalibrasyon eşitlikleri oluşturulmuştur (Shabir, 2003).

Çizelge 6. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Çalışma Koşulları (USP 31, 2008)

Cihaz	Shimadzu-20 A
Kolon	4.6 mmx 25 cm, 5 µm C ₁₈ kolon
Fırın Sıcaklığı	25°C
Hareketli Faz	Metanol : Trietilamin Çözeltisi (pH=7.5) (70:30)
Dedektör	Diode Array
Çalışılan Dalga Boyu	297 nm
Akış Hızı	1 mL.dk ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	10 µL

Doğruluk

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile ulaşılan bulguların gerçek değerlere olan yakınlığının gösterilmesi amacıyla yapılan analitik yöntem validasyon parametrelerindedir (ICH, 1996).

Doğruluğun tespiti için EV ve VS'nin üç farklı konsantrasyonda (0.75, 1.5, 2.5 µg/ml) çözeltileri hazırlanarak HPLC yöntemi ile analizleri yapılmıştır. Elde edilen veriler kalibrasyon eşitliği ile hesaplanarak gerçek değerlere olan yakınlığı incelenmiştir. Deney üç kez tekrarlanmıştır.

Seçicilik

Yöntemin özgünlüğü, etkin madde dışındaki yardımcı maddelerin, safsızlıkların varlığında etken maddenin spesifik olarak analiz edilebilmesidir (Van Iterson, 2005). Bu ölçütlerin değerlendirilmesine yönelik olarak plasebo formül, hareketli faz ve salım ortamının etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kromatogramları alınmıştır.

Duyarlılık

Analitik yöntemin duyarlılığını incelemek üzere saptama sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) incelenmiştir (Niopas ve Daftsios, 2003; Van Zoonen ve ark., 1998).

Saptama Sınırı (Limit of Detection)

Saptama sınırı, miktar tayin yönteminde elde edilen kromatogramdaki sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon bulunarak EV ve VS'in saptanabilecek en düşük derişimi incelenmiştir (Ertaş ve Kayalı, 2005).

Saptama sınırı (LOD) değeri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{[3.3 \times SS]}{m}$$

Eşitlikte; SS: y eksenini kesim değerlerinin standart sapması, m: korelasyon denkleminin eğimidir (ICH, 1996).

Tayin Sınırı (Limit of Quantification)

Tayin sınırı için ise EV ve VS'in doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde tayininin yapılabileceği, sinyal gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon tespit edilmiştir (Van Iterson, 2005).

Tayin sınırı (LOQ) değeri ise aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlenmiştir.

$$LOQ = \frac{[10 \times SS]}{m}$$

Eşitlikte; SS: y eksenini kesim değerlerinin standart sapması, m: korelasyon denkleminin eğimidir (ICH, 1996).

PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Boş PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin hazırlanmasında çift emülsiyon ve nanoçöktürme olmak üzere farklı iki yöntem kullanılmıştır.

Çift Emülsiyon Yöntemi ile plasebo PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

50 mg PLGA-b-PEG, diklorometanda çözündürülerek % 50 amplitude'de 30 sn sonike edilmiştir. % 2 lik Poli (vinilalkol) (PVA) / % 0,1 Tween 80 çözeltisi PLGA-b-PEG çözeltisine eklenilerek tekrar 30 sn sonike edilmiştir. Elde edilen

karışım manyetik karıştırıcıdaki 25 ml % 0.5 PVA / % 0,1 Tween 80 çözeltisine eklenmiştir. Süspansiyon gece boyu karıştırıldıktan sonra +4°C de 4300 rcf'de 30 dk santrifüj edilerek 4 kez distile su ile yıkanmıştır. 24 h boyunca liyofilize edilmiştir.

Çift emülsiyon yöntemi ile boş PLGA-b-PEG nanopartiküllerin hazırlanması sırasında polimer derişimi, organik çözücü tipi, yüzey etkin madde tipi, sulu fazdaki derişim ve reaksiyon sıcaklığı değiştirilerek, bu parametrelerin partikül büyüklüğü, dağılımı ve morfolojisi üzerine etkisi incelenmiştir.

Nanoçöktürme Yöntemi ile plasebo PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

25 mg PLGA-b-PEG aseton içerisinde çözdürüldükten sonra sonikatörde % 20 amplitude de 30 sn sonike edilmiştir. 2:3 oranında aseton:su kullanılarak manyetik karıştırıcıdaki % 0.1 Pluronic F68 içerisine hazırlanan polimer çözeltisi eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda 45 dakika boyunca karıştırılmıştır. Döner buharlaştırıcı ile organik çözücü uzaklaştırılmış ve 25 dk boyunca 13.200 rpm'de santrifüj edilerek partiküller 3 kez yıkanmıştır (Şimşek ve ark., 2013).

Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan boş PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin karakterizasyonu yapılmıştır.

Nanoçöktürme Yöntemi ile Etkin Madde Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Hazırlanması

25 mg PLGA-b-PEG asetonda çözdürüldükten sonra belirli miktarda E-viniferin (EV) ve vinkristin sülfat (VS) hazırlanan bu organik faza eklenmiştir. Süspansiyon sonikatörde % 20 amplitude de 30 sn boyunca sonike edilmiştir. % 0.1 Pluronic F68 içerisine hazırlanan polimer çözeltisi eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda 45 dakika karıştırılmıştır. Döner buharlaştırıcıda organik çözücü uzaklaştırılmış ve 25 dk boyunca 13.200 rpm'de santrifüj edilerek partiküller 3 kez yıkanmıştır.

Hazırlanan EV-VS yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin karakterizasyonu yapılmıştır.

Floresan İşaretli PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin hazırlanması

Nanopartiküllerin hücre içine alım çalışmalarının gerçekleştirilmesi için nanopartiküllere floresan bir boya olan kumarin-6 yüklenmiştir. Yükleme işlemi polimer ve etkin maddenin olduğu faza 0.5 mg/ml kumarin-6 ilave edilerek

gerçekleştirilmiştir. Sonraki basamaklar nanoçöktürme yöntemi ile nanopartikül hazırlama işleminde olduğu gibi gerçekleştirilmiştir.

Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve polidisperslik indeksi değerlerinin ölçülmesi

Hazırlanan vinkristin sülfat ve ϵ -viniferin yüklü PLGA-b-PEG nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, polidisperslik indeksi ve zeta potansiyel analizleri, iletkenliği NaCl ile 50 μ S'e ayarlanmış distile sudaki dispersiyonlarının Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı ile analiz edilmesi sonucunda elde edilmiştir. Foton Korelasyon Spektroskopisi ya da Kuazi-Elastik Işık Saçılımı olarak da bilinen cihazın temel prensibi dinamik ışık saçılımı ile partiküllerin süspansiyon içinde Brownian hareketlerinin ölçümüdür. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25 $^{\circ}$ C ve ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır. Ölçümler 10 ölçümün ortalamasını alacak şekilde ayarlanan cihazda 3 kez tekrar edilmiştir.

Nanopartiküllerin Morfolojik Analizi

Nanopartiküllerin boyutu ve yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. Nanopartiküller iki taraflı karbon bant kullanılarak alüminyum stabın üzerine konulmuştur ve 40 mA akımda stabın üzeri altın ile kaplanarak 1-5kV voltajda mikroskop görüntüleri alınmıştır.

Hazırlanmış nanopartiküllerin yüzeylerinin topografik görüntüleri atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak elde edilmiştir. **Çizelge 7**'de AFM görüntü parametreleri belirtilmiştir.

Çizelge 7. AFM Görüntü Parametreleri

Mod	Dynamic
Çözünürlük (piksel)	512x512
Yazılım	ezAFM 3.34
Cantilever	Nanosensors PPP-NCLR
Titreşim Genliği	1.0 V _{RMS}
Serbest Titreşim Genliği	2.0 V _{RMS}
Mikroskop	ezAFM

İn Vitro Salım Çalışması

EV ve VS'ın PLGA-b-PEG nanopartiküllerinden salınım profili diyaliz tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Diyaliz torbası (MWCO:14000 Da) içerisine

yerleştirilen süspansiyon 6ml Tris-HCl tamponunda (pH:7,4) (http-4) 100 ± 2 rpm de 37 ± 0.5 °C de manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Önceden belirlenen zaman aralıklarında (5, 15 ve 30 dk., 1, 3, 4, 6, 12 ve 24 saat) 30 µl örnek alınarak % salınan madde miktarı HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Alınan örnek miktarı kadar Tris-HCl tampon salım ortamına ilave edilmiştir. Her bir zaman için 3 tekrarlı olacak şekilde yapılan *in vitro* salım çalışmalarından elde edilen profiller grafik ile gösterilmiştir. Benzer çalışma aynı miktarlarda saf etkin maddeler kullanılarak tekrarlanmış ve sonuçlar nanopartikül formülasyonu ile karşılaştırılmıştır (n=3) (Chen ve ark., 2012).

Termal Analiz

Saf etkin maddeler, polimer, süspansiyon formülasyonların termal analizleri diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC 60) ile standart alüminyum kaplar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Katı örnekler 2 mg ağırlığında tartılarak, sıvı örnek ise 25 µl hacim konularak analiz edilmiştir. Analiz koşullarında sıcaklık aralığı 30-300 °C, ısı artış hızı 10 °C, azot akışı hızı 50 ml/dk'dır.

Hücre kültürü

İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hattı (HepG2) (ATCC Katalog No:HB-8065), % 10 Fetal Bovine Serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin ve 3.7 g/L NaHCO₃ içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri içerisinde 37°C, % 5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. HepG2 hücreleri her üç günde bir tripsin/EDTA solüsyonu ile muamele edilerek 1:3 oranında alt kültürlerle ayrılarak pasajlanmıştır.

Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımının Kalitatif Tayini

HepG2 hücreleri 24 saat boyunca 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edildikten sonra, hücrelere kumarin-6 işaretli nanopartikül içeren medium süspansiyonu eklenmiştir. Daha sonra, hücreler 2 saat CO₂ inkübatöründe inkübasyona bırakılmışlardır. Hücre içine alınmayan kumarin işaretli nanopartiküllerin uzaklaştırılması için hücreler monolayer formunda iken 3 × PBS ile yıkanmıştır. Hücre içine alınan nanopartiküller floresan mikroskopta FITC filtresi yardımıyla 20× ve 40 × büyütmede görüntülenmişlerdir (Shao ve ark., 2009).

Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımının Kantitatif Tayini

HepG2 (8×10^4 / 200 µl) hücreleri 96 kuyucuklu plakalara ekilerek, % 80 konfluent olana dek 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, hücreler 3 kez Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) ile

yıkanmıştır. Hücreler 100 µl HBSS içerisinde kumarin 6 işaretli nanopartikül süspansiyonu içeren solüsyon ile 1, 2 veya 4 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Her inkübasyon süresinin bitiminde, hücre 3 kez soğuk HBSS tamponu ile yıkanarak, hücre içine alınmamış kumarin 6 işaretli nanopartiküller ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, % 0.5 Triton X-100 içeren 0.2 N NaOH (100 µl) liziz solüsyonu ile hücreler muamele edilerek hücre içeriğinin kumarin-6 miktarı ELISA mikroplate okuyucuda okunmuştur (Chen ve ark., 2012).

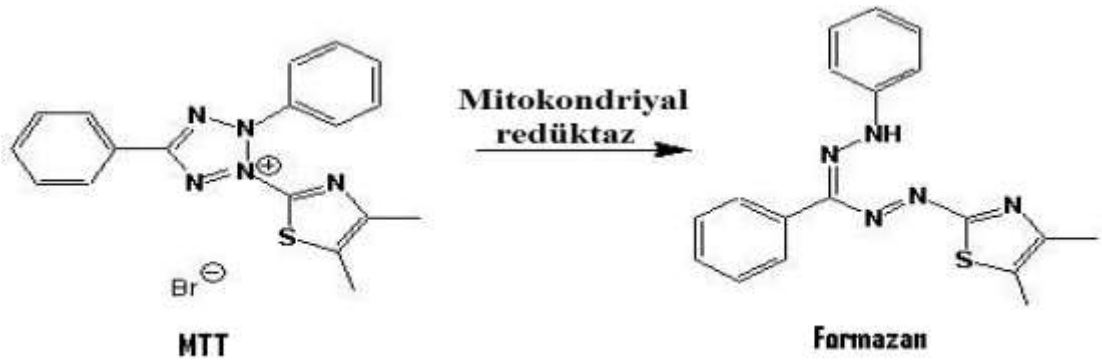
Hücre içine alım miktarının tespiti için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$\text{Hücre içine alım etkinliği (\%)} = \frac{I_{\text{örnek}} - I_{\text{negatif}}}{I_{\text{pozitif}} - I_{\text{negatif}}} \times 100$$

Eşitlikte $I_{\text{örnek}}$, kumarin-6 uygulanan hücre grubunun OD değeri; I_{negatif} , kumarin-6 ile muamele edilmeyen hücre grubunun OD değeri; I_{pozitif} , uygulanan kumarin-6'nın OD değerini ifade etmektedir.

Sitotoksiste Testi

Bu tez çalışması kapsamında sitotoksiste testi olarak MTT yöntemi tercih edilmiştir. MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) suda çözünebilen sarı bir tetrazolyum tuzudur. MTT yöntemi suda çözünebilir tetrazolyum tuzlarının mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi tarafından suda çözünmeyen koyu mavi/mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanmaktadır. Canlı hücre sayısı oluşan MTT formazan miktarı ile doğru orantılıdır ve kolorimetrik olarak ölçülmektedir (Stockert ve ark., 2012; Vega-Avila ve Pugsley, 2011).



Şekil 14. MTT Bileşiğinin Formazan Kristallerine Dönüşümü (Brescia ve Banks, 2009)

1×10^5 HepG2 hücresi 96 kuyucuklu plakalara ekilerek, 37°C 'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. Kombine e-viniferin ve vinkristin yüklü-nanopartikül ve serbest haldeki etkin madde formülasyonlarının farklı konsantrasyonları ile HepG2 hücreleri 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, 20 μl MTT (5 mg/ml) solüsyonu hücrelere eklenerek 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Solüsyon uzaklaştırılarak, canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan tuzu 200 μl DMSO eklenerek solüsyon formuna dönüştürülerek 10 dk çalkalayıcıda bırakılmıştır. Renk değişimi, ELx800 Bio-Tek mikropate okuyucuda 540 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Maddeler ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı % 100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları % olarak ifade edilmiştir. Deneyler üç bağımsız kuyucukta gerçekleştirilmiştir.

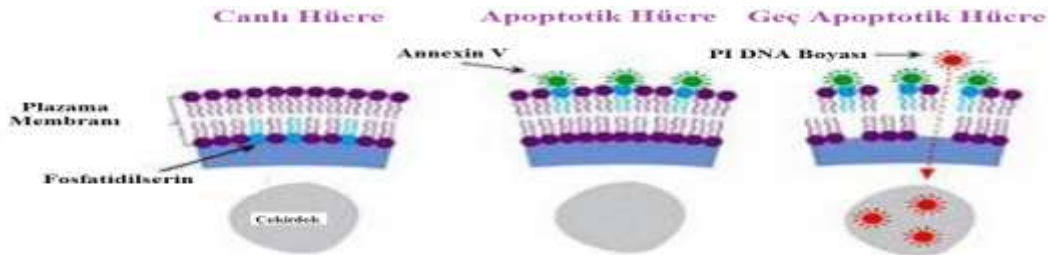
Yüzde canlılığın tespiti için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$\text{Yüzde canlılık (\%)} = \frac{I_{\text{örnek}} - I_{\text{negatif}}}{I_{\text{kontrol}} - I_{\text{negatif}}} \times 100$$

Eşitlikte $I_{\text{örnek}}$ örnek hücre grubunun OD değeri; I_{negatif} , mediumun OD değeri; I_{kontrol} , ilaç uygulanmayan kontrol hücre grubunun OD değerini ifade etmektedir.

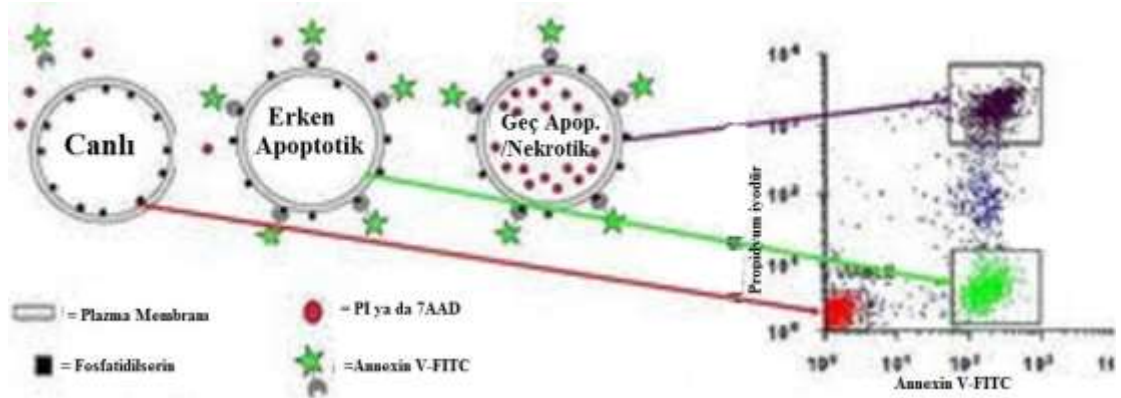
Apoptozun Değerlendirilmesi

Canlı hücrelerde hücre zarının iç yüzeyinde membran lipitlerinden olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Erken apoptozda membrane bütünlüğünün bozulmadan iç yüzeye yerleşmiş olan PS aminofosfolipit transferaz enzimiyle dış yüzeye transloke olur. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS'ye bağlanabilen bir proteindir ve FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması gerçekleştiği için ikinci boya olarak hücre çekirdeğini boyayan dolayısıyla parçalanmış hücre membranının göstergesi olacak propidyum iyodür eklenmektedir (Bratthorn ve ark., 1997; Gatti ve ark., 1998; Overbeeke ve ark., 1998; Tesarik ve ark., 1998; Zhang ve ark., 1997).



Şekil 15. Anneksin V-PI ile Erken Apoptozun Belirlenmesi (<http-5>).

Anneksin V-FITC kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidil serine bağlanma oranı flow sitometri ile kantitatif olarak belirlenebilmektedir. Canlı hücreler: FITC (-), PI (-); erken apoptotik hücreler FITC (+), PI (-); ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin FITC (+), PI (+) şeklinde boyanmaktadır (Kockx ve ark., 1998; Overbeeke ve ark., 1998; Tesarik ve ark., 1998).



Şekil 16. Apoptozun Akım Sitometrisi ile Analizi (<http-5>).

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için “BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II” kullanılmıştır. 2×10^5 HepG2 hücreleri kombine ϵ -viniferin ve vinkristin yüklü nanopartikül ve serbest etken madde formülasyonlarıyla 24 saat inkübe edilmiştir. Hücreler $2 \times$ tripsin-EDTA ile muamele edildikten sonra 1200 rpm’de santrifüj edilerek süpernatant kısım uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti ise 2 kez soğuk PBS ile yıkanmış ve sonra 100 μ l bağlanma solüsyonu ile resüspanse edilmiştir. Hücrelere 5 μ l Anneksin V-FITC ve 5 μ l PI ilave edilerek hücreler oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 15 dakika inkübasyona tabi tutulmuştur. 400 μ l bağlanma solüsyonu eklenen hücre çözeltisi akım sitometri tüplerine aktarıldıktan bir saat içinde analiz edilmiştir. Erken ve geç apoptotik hücre miktarı kontrol hücre grubuna (plasebo uygulanmış hücre grubu) göre hesaplanmıştır.

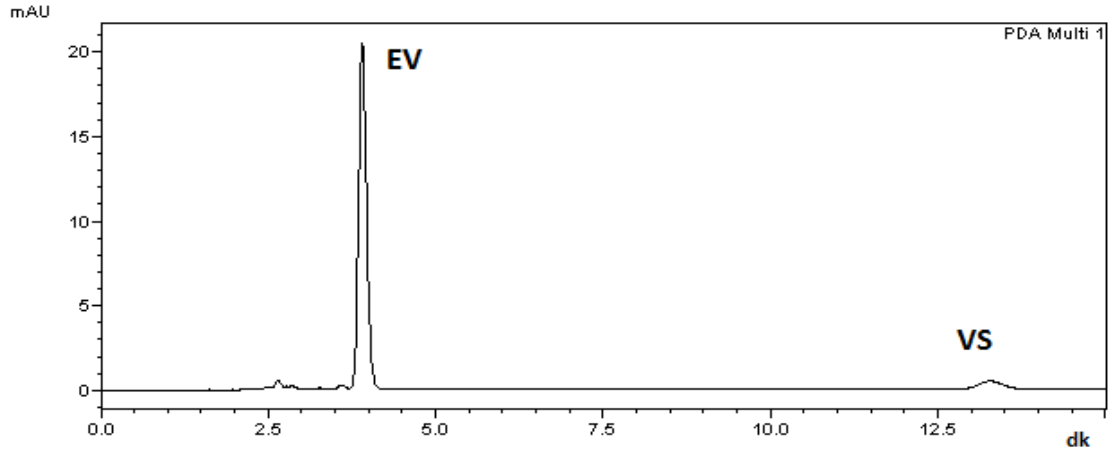
Akridin Oranj/Propidyum İyodür (AO/PI) Çift Boyama ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi

Hücrelerde meydana gelen apoptotik değişimlerin morfolojik olarak incelenmesi için, herbir kuyucuğa 8×10^4 HepG2 hücresi gelecek şekilde sayılarak 24 kuyulu plakalara ekim yapılmıştır. Daha sonra, kombine ϵ -viniferin ve vinkristin yüklü nanopartikül ve serbest etken madde formülasyonlarıyla 24 saat inkübe edilmiştir. Medium uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. 50 μ g/ml propidyum iyodür ve 100 μ g/ml akridin oranj 1:1 oranında karıştırılarak hücreler ile 10 dk inkübe edilmiştir. Boya kalıntıları PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra hücreler $40 \times$ objektif kullanılarak floresan mikroskopta görüntülenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

EV ve VS'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri

EV ve VS'in HPLC analizleri "Yöntemler" başlığı altında belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiş ve kromatogramlara ait bir örnek **Şekil 17**'de verilmiştir. Kromatogramda da görüldüğü gibi kullanılan analiz şartlarında EV ve VS pikleri düzgün bir şekilde elde edilmiştir. EV ve VS'a ait alıkonma zamanları sırasıyla 3.9 dk ve 13.28 dk'dır.



Şekil 17. EV ve VS'in HPLC ile miktar tayini kromatogramı

Doğrusallık

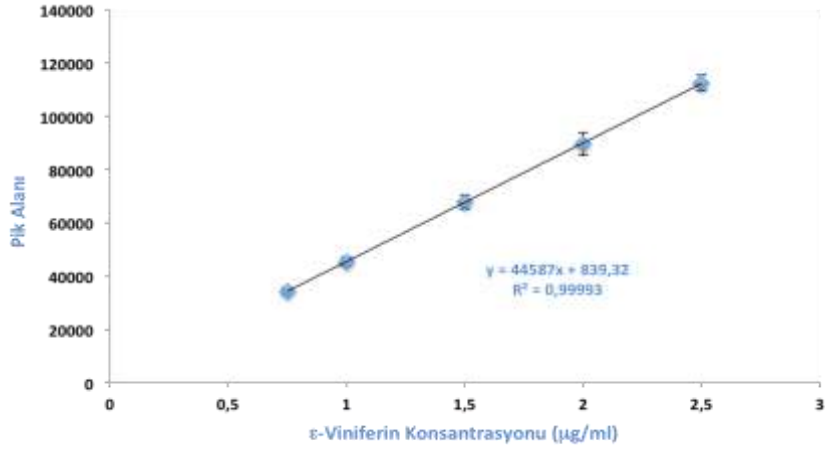
EV'in miktar tayininde kullanılacak yöntem için önceden belirlenen konsantrasyon aralığında artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artan EV pik alanı arasındaki ilişkinin doğrusal olup olmadığı değerlendirilmiştir.

EV'in hareketli fazda hazırlanan 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 µg/mL konsantrasyonlarına karşılık gelen pik alanları HPLC ile analiz edilmiş ve kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Kullanılan analitik yöntemin 0.75-2.5 µg/mL derişim aralığında doğrusallığı gösterilmiştir

EV'nin HPLC ile miktar tayinine ait doğrusal regresyon verileri **Çizelge 8**'de gösterilmekte olup, kalibrasyon doğrusu ve denklemi **Şekil 18**'de yer almaktadır.

VS'in miktar tayini için kullanılacak olan kalibrasyon doğru denklemi ve regresyon verileri de EV'e benzer şekilde elde edilmiştir. VS'in hareketli fazda hazırlanan 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 µg/mL konsantrasyonlarına karşılık gelen pik alanları HPLC ile hesaplanmış ve kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

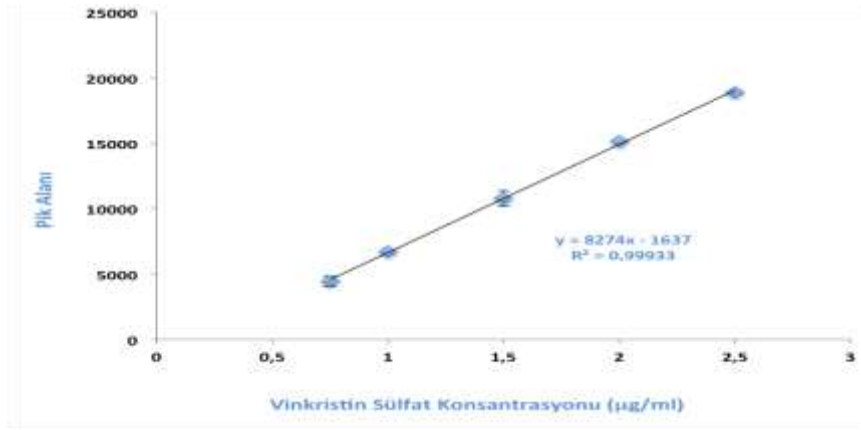
VS'in HPLC ile miktar tayinine ait doğrusal regresyon verileri **Çizelge 9**'da gösterilmekte olup, kalibrasyon doğrusu ve denklemi **Şekil 9**'de yer almaktadır.



Şekil 18. EV'e ait kalibrasyon doğrusu (n=3, ort.± SH)

Çizelge 8. EV'in HPLC ile doğrusallık çalışmasına ait regresyon verileri (n=3)

Parametre	Sonuç
Konsantrasyon Aralığı	0.75-2.5 µg/mL
Eğim	44587
Kesim Değeri	839.32
Korelasyon Katsayısı	0.99993



Şekil 19. VS'a ait kalibrasyon doğrusu (n=3, ort.± SH)

Çizelge 9. VS'ın HPLC ile doğrusallık çalışmasına ait regresyon verileri (n=3)

Parametre	Sonuç
Konsantrasyon Aralığı	0.75-2.5 µg/mL
Eğim	8274
Kesim Değeri	-1637
Korelasyon Katsayısı	0.99993

Doğruluk

Doğruluk kullanılan analitik yöntemin gerçek değerlere ne kadar yakın olduğunu gösterir (Shabir, 2003). Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunun tespiti için kalibrasyon doğrusunda yer alan üç farklı konsantrasyonda (0.75, 1.5, 2.5 µg/ml) ve her bir konsantrasyondan üç adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin pik alanları HPLC ile tespit edilerek gerçek değerlere olan yakınlık dereceleri hesaplanmıştır. EV için bu değerlerin % geri kazanım sonuçları **Çizelge 10**'da, VS için ise **Çizelge 11**'de verilmiştir.

Hesaplanan doğruluk değerinin, literatürlere göre tüm konsantrasyonlar için %98-102 arasında olması gerekmektedir (Shabir, 2003). Buna göre hem EV hem de VS için kullanılan analitik yöntem iyi geri kazanım sonuçları göstermiştir.

Çizelge 10. EV'in doğruluk çalışmasına ait sonuçlar (n=3, ort.± SH)

EV (µg/mL)	Geri Kazanım (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
0.75	0.7505±0.0291	100.07±3.8801
1.5	1.5046±0.0610	100.31±4.0683
2.5	2.5051±0.0683	100.20±2.7311

Çizelge 11. VS'm doğruluk çalışmasına ait sonuçlar (n=3, ort.± SH)

VS (µg/mL)	Geri Kazanım (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
0.75	0.7347±0.0498	97.96±6.6366
1.5	1.5020±0.0677	100.13±4.5110
2.5	2.4797±0.0105	99.19±0.4219

Duyarlılık

Saptama sınırı, analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Saptama sınırı (LOD) değeri aşağıdaki eşitlik yardımıyla hesaplanmıştır.

$$LOD = \frac{[3.3 \times SS]}{m}$$

Eşitlikte, SS: y eksenini kesim değerlerinin standart sapması, m: korelasyon denkleminin eğimidir (ICH, 1996).

Tayin sınırı (LOQ) değeri ise analizi yapılan maddelerin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının belirlenebildiği miktar tayini alt sınır değeridir. LOQ değeri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$LOQ = \frac{[10 \times SS]}{m}$$

Eşitlikte, SS: y eksenini kesim değerlerinin standart sapması, m: korelasyon denkleminin eğimidir (ICH, 1996).

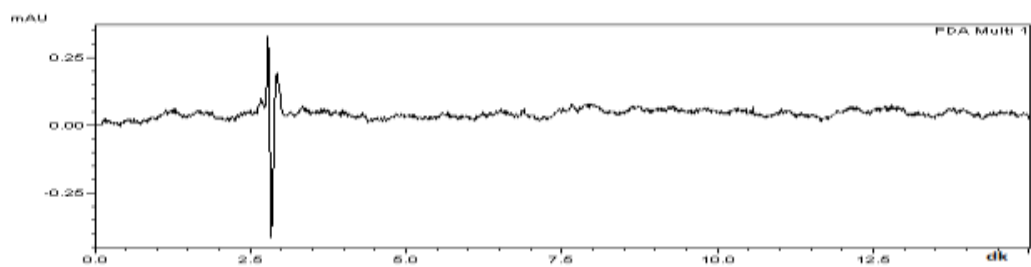
Buna göre EV için saptama sınırı 0.19 µg/mL, tayin sınırı 0.59 µg/mL; VS için saptama sınırı 0.43 µg/mL, tayin sınırı 1.31 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

VS'in LOQ değeri hariç bulunan sonuçlar çalışma aralığının altında olduğu için uygundur. VS'in LOQ değeri (1.31 µg/mL) çalışma aralığı alt sınırından yüksek olmakla birlikte, elde edilen 0.75-2.5 µg/mL konsantrasyon aralığındaki doğrusallık ($r^2=0.99993$) ve 1 µg/mL konsantrasyondaki doğruluk (%100.80) değerleri nedeniyle olumsuzluk yaratmamaktadır.

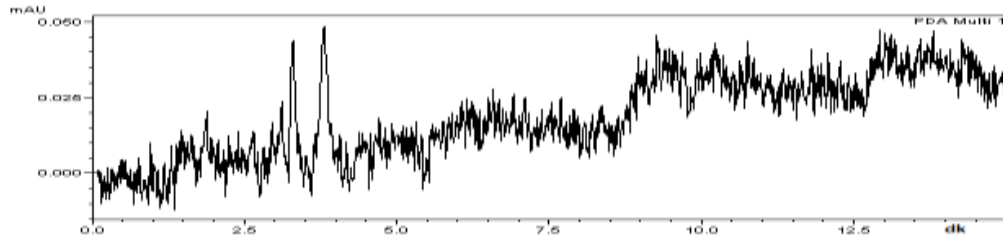
Seçicilik

Seçicilik, kullanılan yöntemin formülasyon ya da analiz yapılan ortamlarda bulunan diğer maddeler varlığında, analizi yapılacak maddeleri diğer maddelerden ayırt edebilme yeteneğini ve konsantrasyonunun doğru olarak belirlenebileceğini gösteren önemli analitik parametrelerdendir. Yöntemin seçiciliğini belirlemek amacıyla; EV ve VS'in hareketli fazdaki çözeltisi ve hareketli faz HPLC ile analiz edilmiştir. Nanopartiküller üzerinde yapılan çalışmalara yönelik olarak, matris girişimini araştırmak için plasebo formül ile; *in vitro* salım çalışmalarına yönelik olarak da *in vitro* salım ortamı (Tris-HCl tampon çözeltisi) ile analizler yapılmıştır (Şekil 20, Şekil 21, Şekil 22).

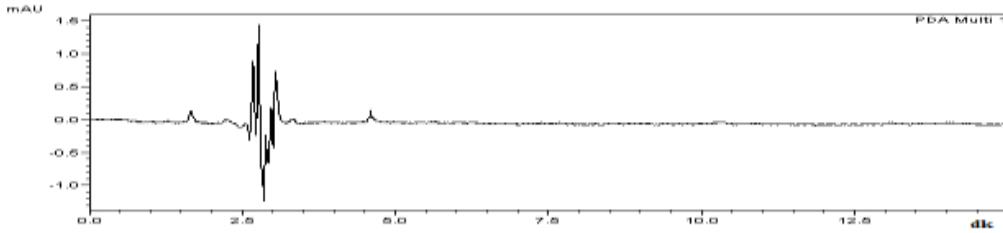
Seçicilik araştırması için yapılan analizlerde etkin madde içermeyen örneklerde etkin maddelere ait alıkonma zamanlarında pik görülmemiş ve yöntemin seçici olduğu görülmüştür.



Şekil 20. Hareketli Faz İçerisindeki Plasebo Formülasyona Ait Kromatogram



Şekil 21. Hareketli Faza Ait Kromatogram



Şekil 22. İn Vitro Salım Ortamına Ait Kromatogram

PLGA-b-PEG Nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli ve morfolojik analizleri

Tez çalışması kapsamında öncelikle etkin madde yüklü olmayan PLGA-b-PEG nanopartikülleri çift emülsiyon ve nanoçöktürme yöntemleriyle hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin karakterizasyonunda ilaç yükleme, ilaç salım ve stabilitesini etkilediği için partikül büyüklüğü ve dağılımı önemlidir.

Çift emülsiyon yöntemiyle hazırlanan plasebo formülasyonda birinci emülsiyonda % 2 ikinci emülsiyonda % 0.5 PVA kullanılmıştır. Chen ve ark., (2012) VS yüklü folik asit modifiye PLGA-PEG nanopartiküllerinin hazırlanmasında % 1'lik PVA çözeltisi kullanmışlardır ve PVA içeriğinin partikül büyüklüğü üzerinde önemli etkisi olduğunu belirtmişlerdir. % 0.4'ün altındaki PVA çözeltisi partikül boyutunu artırırken (>350nm), %0.4-%1.0 aralığındaki PVA içeriği ise PVA içeriğinin artmasıyla partikül boyutunun arttığını göstermişlerdir. Ayrıca PVA konsantrasyonu daha da artırıldığında partikül büyüklüğü de artmaya devam etmektedir. Bunun nedeni emülsiyon viskozitesinin artmasından kaynaklı olabilir.

Çalışmamızda çift emülsiyon yöntemiyle hazırlanan plasebo formülasyonun partikül büyüklüğünün 275.7 ± 7.14 nm , polidispersite indeksinin 0.212 ± 0.038 , zeta potansiyelinin -15.07 ± 0.43 mV olduğu belirlenmiştir (Şekil 25, Şekil 26).

Hazırlanan nanopartiküllerin SEM ile yapılan analizlerinde küresel şekil gözlenemediği için (Şekil 23) yapılan literatür taramasındaki optimum PLGA-PEG nanopartikülü hazırlama koşulları kullanılmıştır. Wen ve ark., (2011) partikül boyutu ve ilaç yükleme kapasitesini etkileyen birçok faktörü incelemişlerdir. Çift emülsiyon yöntemi ile VS yüklü PLGA-PEG nanopartikülleri ile yaptıkları optimizasyon çalışmasında en iyi koşulların kopolimer: 10mg/ml; iç

su fazı/yağ fazı: 3:10; dış su fazı/yağ fazı: 8:1; emülsifiyer:PVA(%0.5); ilk ultrasonifikasyon 30 s, ikinci ultrasonifikasyon 1 dk; ultrasonifikasyon gücü %20; evaporasyon metodu 37 °C’de döner buharlaştırıcı olduğu gösterilmiştir. Tez çalışması kapsamında bu şartlarda hazırladığımız nanopartiküllerin SEM analizinde küresel şekil yine gözlenememiştir.

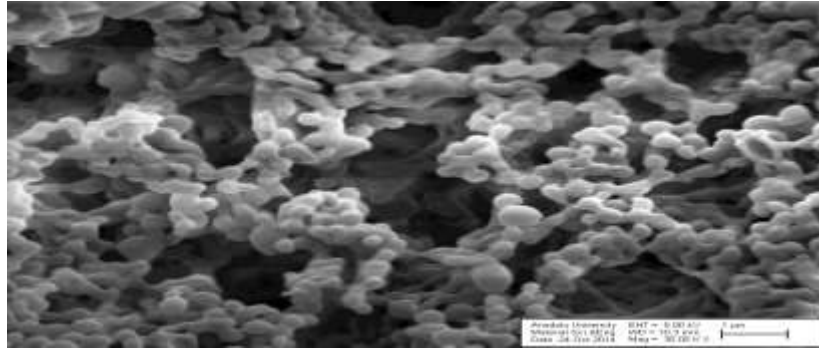
Kullanılan yüzey aktif maddenin tipi ve oranı partikül büyüklüğünü ve morfolojisini etkilemektedir. Literatürde yüzey aktif madde olarak Tween 80’nin kullanıldığı nanopartiküllerde daha küçük boyut elde edilmesine karşın (Wang ve ark.,2003) laboratuvarımızda bu prosedür uygulandığında partikülün morfolojisinin küresel şekil almasına ve uygun zeta potansiyeli değerine katkı sağladığı ancak yaklaşık 2 ile 6 mikron arasında olan partikül boyutunda azalmaya neden olmadığı görülmüştür (**Şekil 24**).

Çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanan plasebo formülasyonlarda hem küresel hem de nanometre büyüklüğünde uygun partiküller elde edilemediği için nanoçöktürme yöntemine geçilmiştir (Şimşek ve ark.,2013)

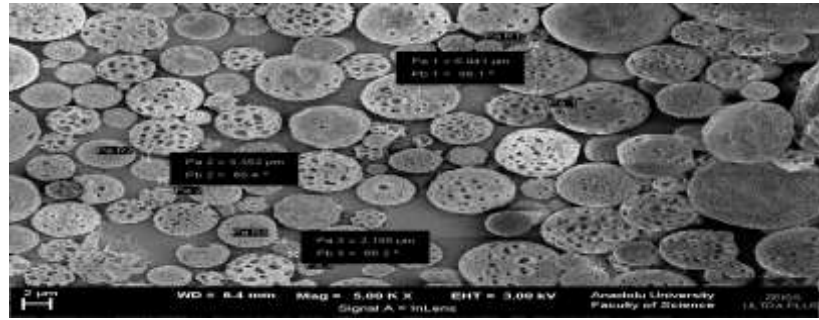
Nanoçöktürme yöntemiyle plasebo ve EV-VS yüklü nanopartiküller hazırlanmış ve zeta potansiyel, partikül büyüklüğü ve dağılımları incelenmiştir. Plasebo nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü 92.64 ± 0.37 nm , polidispersite indeksi 0.27 ± 0.01 , zeta potansiyeli -35.23 ± 0.49 mV olduğu, EV-VS yüklü nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 113 ± 0.43 nm , polidispersite indeksi 0.323 ± 0.01 , zeta potansiyeli -35.03 ± 1.0 mV olduğu belirlenmiştir (**Şekil 29, Şekil 30, Şekil 31, Şekil 32**). Etkin madde yüklü nanopartiküllerin plasebo nanopartiküllere göre daha yüksek partikül boyutu ve polidispersite indeksleri olduğu gözlenmiştir. Yükleme sırasında yüzeye adsorbe olan ve nanopartikül içerisine hapsolan ilacın partikül boyutunda artışa neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Esmaeili ve ark., 2008). Partikül büyüklüğünün hücreye taşınım ve hedeflendirme için uygun olduğu hücre içine alım çalışmasıyla desteklenmiştir.

Zeta potansiyeli nanopartikülün kararlılığı ile oldukça ilgilidir. Nanosüspansiyonlarda yüksek yüzey potansiyeli partiküller arasındaki kohezyonu azaltır dolayısıyla yüksek kararlılıkla sonuçlanır (Singh ve Lillard 2009). Zeta potansiyeli ± 30 mV aralığında olan nanopartiküller yüzey yükleri agregasyonu engelledikleri için kararlı süspansiyonlardır. Ayrıca zeta potansiyeli yüklü etkin maddenin nanopartikülün yüzeyine mi yoksa merkezine mi yüklendiği konusunda da fikir verir (Singh ve Lillard, 2009). Hazırlanan plasebo (-35.23 ± 0.49 mV) ve EV-VS yüklü nanopartiküllerin (-35.03 ± 1.0 mV) zeta potansiyel değerlerinin literatürle uyumlu olduğu gösterilmiştir.

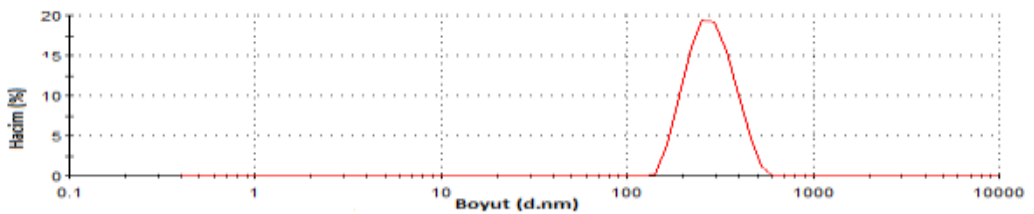
Morfolojik analizleri atomik kuvvet mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir. Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan plasebo ve EV-VS yüklü nanopartiküller küresel şekilli, düzgün yüzeyli olduğu gösterilmiştir (Şekil 27, Şekil 28). Liang ve ark. (2011)'nın yaptığı bir çalışmada folat-modifiye PLGA-PEG nanopartiküllerinin SEM analizinde küresel morfolojiye ve pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu gösterilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin morfolojik olarak literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.



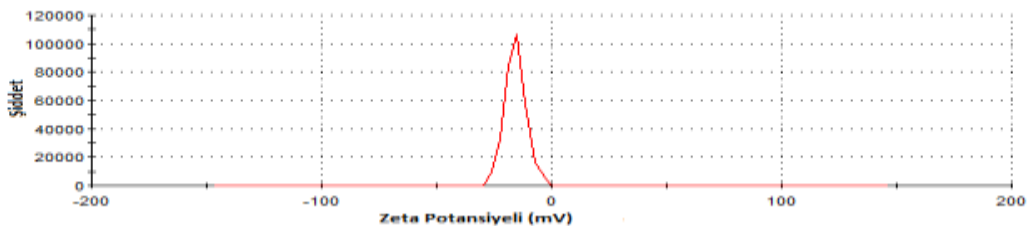
Şekil 23. ÇE yöntemi ve PVA kullanılarak hazırlanan plasebo PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin SEM görüntüsü



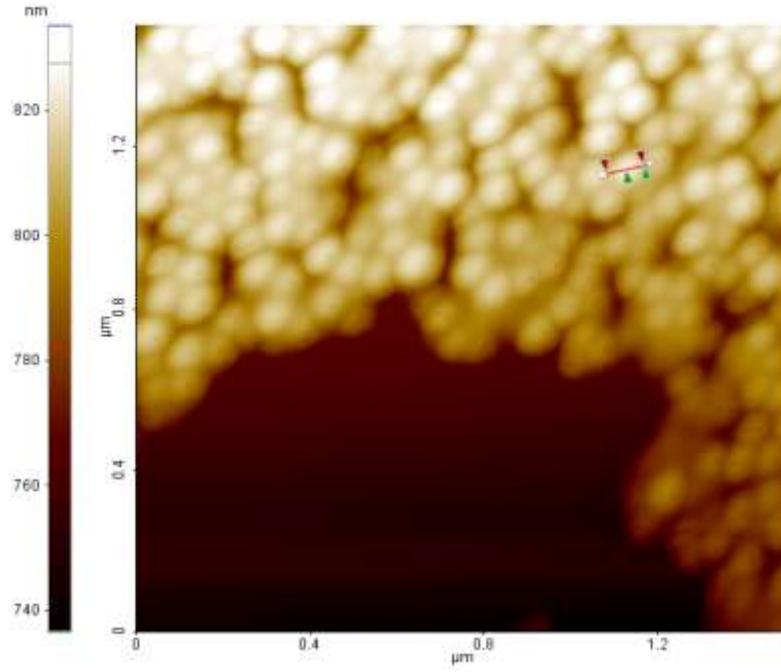
Şekil 24. ÇE yöntemi ve Tween 80 kullanılarak hazırlanan plasebo PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin SEM görüntüsü



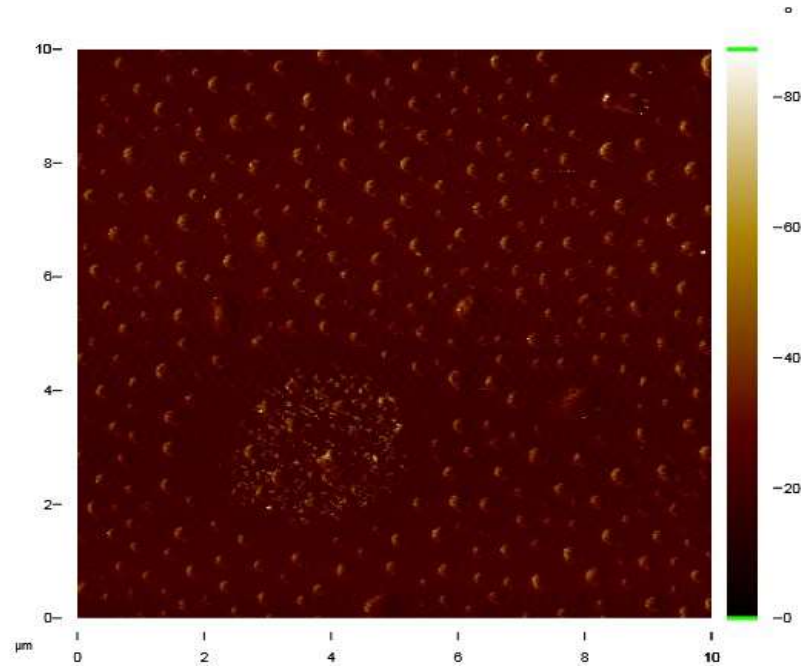
Şekil 25. ÇE yöntemi ile hazırlanan plasebo PLGA-b-PEG nanopartikül formülasyonunun partikül büyüklüğü ve dağılımı



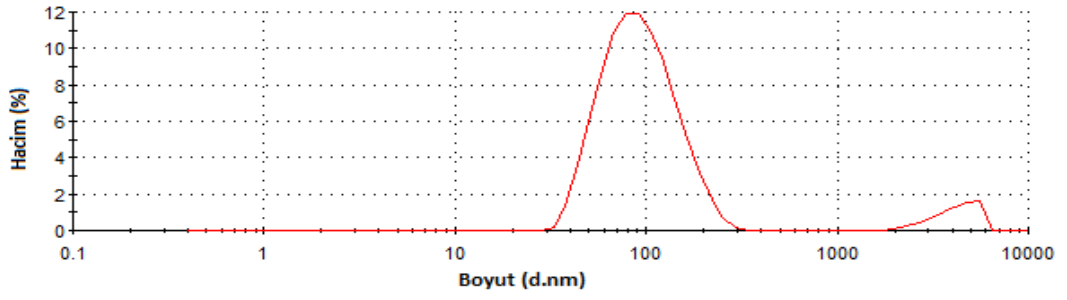
Şekil 26. ÇE yöntemi ile hazırlanan plasebo PLGA-b-PEG nanopartikül formülasyonunun zeta potansiyeli



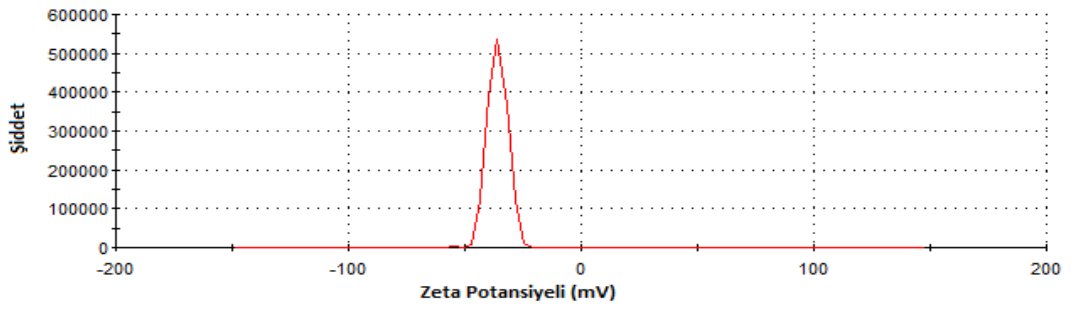
Şekil 27. NÇ yöntemi ile sentezlenen plasebo PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin AFM görüntüsü



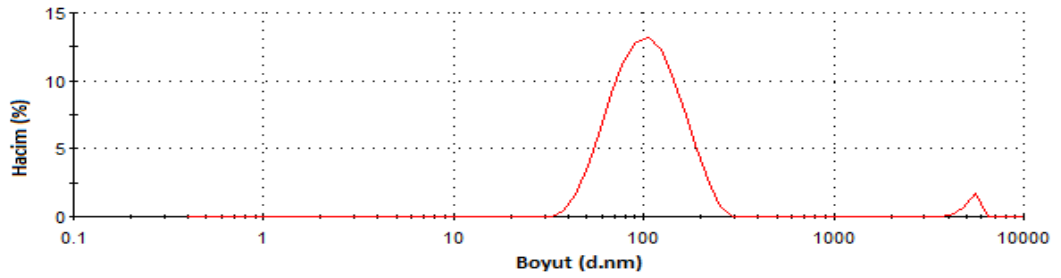
Şekil 28. NÇ yöntemi ile sentezlenen EV-VS yüklü PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin AFM görüntüsü



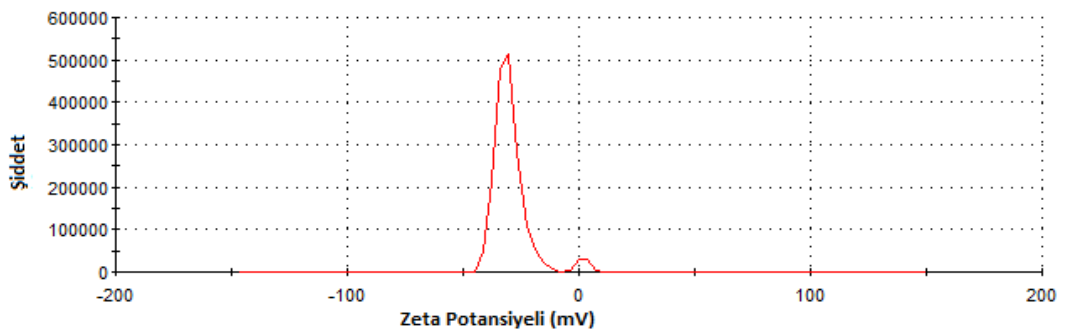
Şekil 29. NÇ yöntemi ile hazırlanan placebo PLGA-b-PEG nanopartikül formülasyonunun partikül büyüklüğü, dağılımı



Şekil 30. NÇ yöntemi ile hazırlanan placebo PLGA-b-PEG nanopartikül formülasyonunun zeta potansiyeli



Şekil 31. NÇ yöntemi ile hazırlanan EV-VS yüklü PLGA-b-PEG Nanopartikül formülasyonunun partikül büyüklüğü dağılımı



Şekil 32. NÇ yöntemi ile hazırlanan EV-VS yüklü PLGA-b-PEG Nanopartikül formülasyonunun zeta potansiyeli

PLGA-b-PEG Nanopartiküllerden *İn Vitro* Etkin Madde Salım Çalışmaları

Polimer matrisi ilacın degradasyonunu önler ve nanopartiküllerden ilacın salınımını yönetebilir. İlaç-polimer oranı, molekül ağırlığı, polimerin kompozisyonu, ilaç salınım seviyesini ve süresini etkiler (Prabha ve Labhassetwar, 2004)

İn vitro salım çalışması pH 7,4 Tris HCl ortamında diyaliz torbası kullanılarak “Yöntemler” bölümünde açıklandığı şekilde yapılmıştır ve % salınan etkin madde miktarları HPLC analizleriyle elde edilmiştir. Salım çalışmalarının sonucunda elde edilen zamana karşı çözünme profilleri ise VS için **Şekil 33**'de EV için **Şekil 34**'de standart hata çubukları ile gösterilmiştir.

VS'in saf maddesi (SM) ile nanopartiküle (NP) yüklenmiş formuna ait salım profilleri karşılaştırıldığında, 3.saatin sonunda çözünen madde miktarlarında belirgin bir fark izlenmiştir (SM için % 59.42, NP için % 51.76). 3. Saat ile 24. saat aralığındaki tüm zamanlarda NP formundan çözünen VS miktarları SM'den daha düşüktür. Bu veriler NP formülasyonunun VS salınımı belirli bir oranda kontrol ettiğini göstermektedir. 24.saatte ise her iki forma ait çözünen miktarlar nispeten eşit seviyeye ulaşmıştır (SM için %79.13, NP için %77.49).

Ayrıca NP verilerindeki standart hatalar, SM verilerinden çok daha küçüktür. Bu sonuç, NP formunda dozlar arası *in vitro* salım değerlerinin benzer olması açısından biyoyararlanıma da yansıtılabilecek olumlu bir gelişmedir.

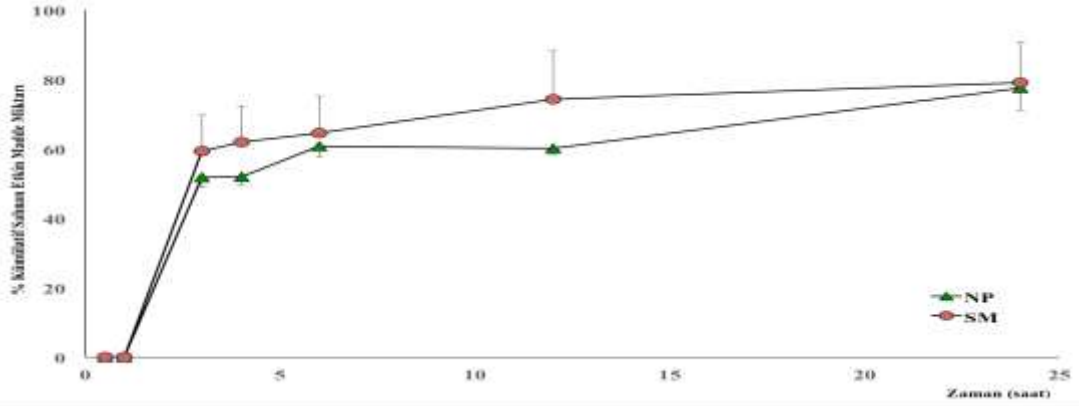
EV'in saf formu ile nanopartiküle yüklenmiş formuna ait salım profilleri karşılaştırıldığında ise NP'deki EV'in saf formundan daha yüksek oranda çözüldüğü görülmüştür. Her iki formunda 24 saat sonunda ulaştıkları kümülatif % salınan miktarları % 8.16 ve % 11.55 civarlarında düşük olarak tespit edilmiştir. EV'in yeterli salınım gözlenemediği bu profil için daha uzun zaman diliminde ihtiyaç vardır. VS için az miktarda da olsa izlenen salım kontrolü EV için gerçekleşmemiş, hatta salım hızı NP ile bir miktar artmıştır.

Chen ve ark.,(2012) tarafından Tris HCl tamponundaki serbest VS'in 4 saat içindeki salınımı % 85'in üstünde olurken, aynı çalışmada VS yüklü folik asit modifiye PLGA-PEG nanopartiküllerinin 8 saat sonundaki salınımının % 46.20 olduğu gösterilmiştir. İlerleyen zamanlardaki nanopartikül formülasyonunun sürdürülebilir bir salınım yaptığı ve 24 saat içinde toplam salımı da % 68.35 olduğu gösterilmiştir.

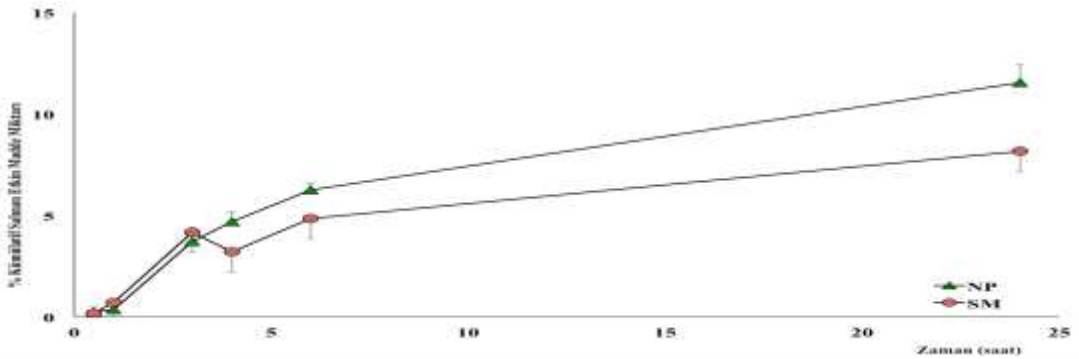
İlaç salınımı partikül büyüklüğünden etkilenmektedir. Küçük partiküller daha geniş yüzey alanına sahiptir dolayısıyla küçük partiküllerdeki çoğu ilaç partikül yüzeyine yakındır ve ilacın hızlı salınımına neden olur. Büyük partiküller ise

geniş gözeneklere sahiptir ve ilaç bu kısımlara hapsolür ve bu yüzden ilacın salınımı daha yavaş gerçekleşir (Redhead ve ark., 2001). Sonuçlar topluca değerlendirildiğinde NP formunun her iki etkin madde salınımı üzerine önemli etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu durumun nanopartikül büyüklüğünün oldukça küçük olmasından ve PLGA-b-PEG polimerinin hidrofilik karakterinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Chen ve ark.,(2012) bir hafta boyunca oda sıcaklığında ya da +4 °C'de saklanan VS yüklü folik asit modifiye PLGA-PEG nanopartiküllerinin liyofilize formundan yalnızca % 4-7 VS salınımı ile mükemmel bir kararlılık gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı sıcaklıkta liyofilize formunun süspansiyon formuna göre daha kararlı olduğunu da belirtmişlerdir. Süspansiyon formunun bir hafta boyunca 37 °C'de saklanması durumunda ise % 80'in üstünde VS salınımı olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden VS nanopartiküllerinin liyofilize formunun mükemmel kararlılığından dolayı liyofilize formu önerilmektedir.



Şekil 33. Saf VS ve PLGA-b-PEG nanopartiküllerine yüklenmiş olan VS'nin Tris HCl ortamdaki *in vitro* salım profilleri (NP: nanopartikül, SM: saf madde)

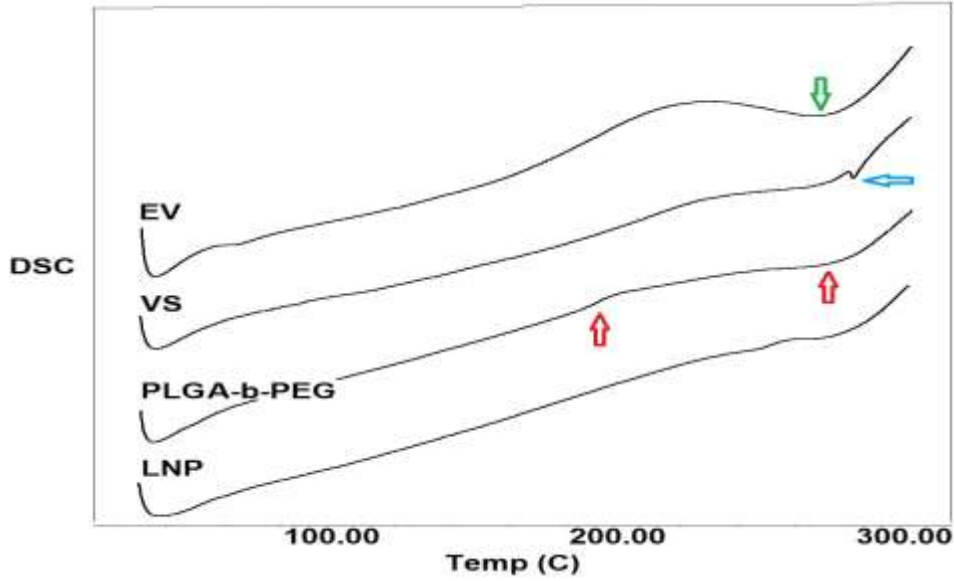


Şekil 34. Saf EV ve PLGA-b-PEG nanopartikülüne yüklenmiş olan EV'nin Tris HCl ortamdaki *in vitro* salım profilleri (NP: nanopartikül, SM: saf madde)

Termal Analiz

DSC maddelerin fiziksel yapıları hakkında bilgi vermektedir. Bu nedenle, formülasyon halindeki karışımlarda maddelerde meydana gelebilecek değişimleri izlemek için DSC analizleri yapılmaktadır.

Saf bileşenlerin ve nanopartikül formülasyonunun liyofilize formunun DSC termogramları **Şekil 35**'de yer almaktadır. EV'nin erime sıcaklığının çok yüksek (1129.33°C) olması nedeniyle, çalışma aralığında sadece dehidrasyona ait geniş ve güçlü bir endotermik pik görülmüştür. VS termogramında maddenin kristalinitesini ispatlayan literatür ile uyumlu, 280°C'de keskin bir erime piki mevcuttur. PLGA-b-PEG iki camsı geçiş sıcaklığı ile amorf özellikte tespit edilmiştir. Liyofilize formülasyonda VS'a ait erime pikinin kaybolmuş olması yapının amorf formda olduğunu göstermiştir. Bu bulgu literatürde sıkça izlenen bir durumdur. Formülasyonda polimorfizm ve/veya dekompozisyon ile ilişkili bir veri tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar bileşenlerin ve hazırlama yönteminin uygunluğunu, kararlılık açısından problem olmadığını göstermektedir.



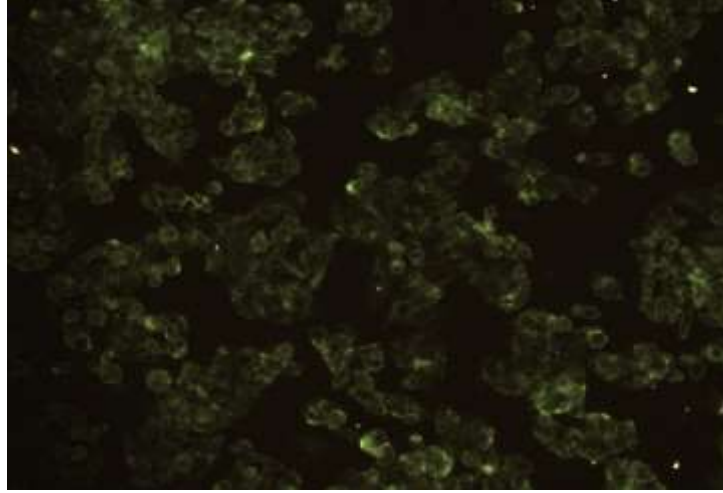
Şekil 35. Saf bileşenler ve liyofilize nanopartiküllere ait DSC termogramları

Nanopartiküllerin Hücre İçine Alımı

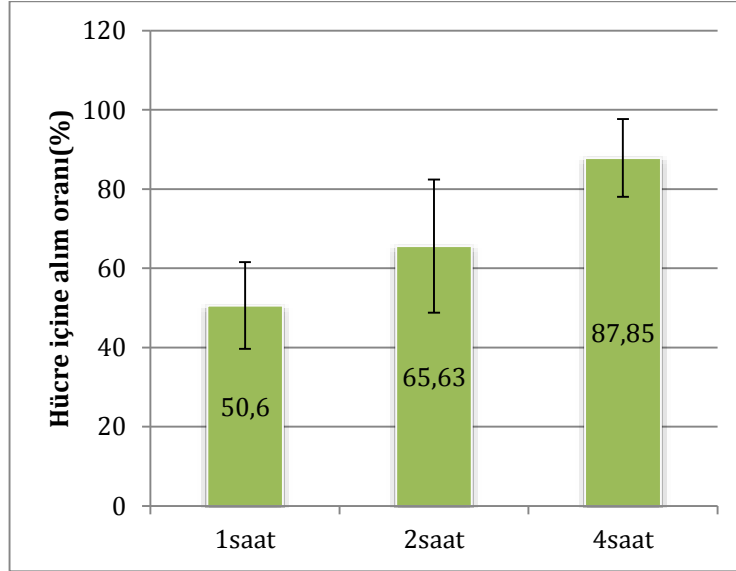
Nanopartiküllerin HepG2 hücreleri içerisine alımı floresan mikroskopta FITC filtresi ile 10× ve 40× büyütmede gerçekleştirilmiştir. Floresan probe olarak kumarin-6 kullanılmıştır. Yapılan araştırmalarda kumarin-6'nın zayıf hidrofilik özelliğinden dolayı, PLGA-b-PEG nanopartiküllerine yükleme etkinliğinin (EE:%97) yüksek olduğu düşünülmektedir. Kumarin-6'nın PLGA-b-PEG nanopartiküllerinden salınımı ise 24 saat içinde yaklaşık % 5 gibi oldukça yavaş gerçekleşmektedir. Bu PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin hücre içine alım çalışmalarında kumarin-6'nın kullanımının uygun olduğunu göstermektedir (Davda ve Labhasetwar, 2002; Win ve Feng, 2005).

HepG2 hücreleri ile 2 saat muamele edilen kumarin işaretli PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin hücre içine alımı **Şekil 36**'da gösterilmiştir. Güçlü floresan etki, nanopartiküllerin hücre içine alındığını göstermektedir. Floresan ışımaya miktarının ELISA mikropate okuyucu ile belirlenmesi ise nanopartiküllerin hücre içine alım oranını kantitatif olarak desteklemektedir. Kumarin-6 işaretli PLGA-b-PEG nanopartikülleri hücre içine alım oranları zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Özellikle 4 saat hücre-nanopartikül inkübasyonuna sonrasında, % 87.85 oranında bir alım gerçekleşmiştir. **Şekil 37**'de görüldüğü üzere, kumarin-6 işaretli nanopartiküller ile HepG2 hücrelerinin 1, 2 ve 4 saat muamele sonrasında tespit edilen hücre içine alım oranları sırasıyla; % 50.6, % 65.63 ve % 87.85 olarak bulunmuştur.

Chen ve ark. (2012) tarafından VS yüklü kumarin-6 işaretli PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin MCF-7 hücreleri ile 1 saat muamelesinden sonra hücre içine alım oranları incelendiğinde, PLGA-b-PEG-folat nanopartiküllerinin % 64.58, PLGA-PEG-R₇ nanopartiküllerinin % 71.01, R₇ ve folat modifiye PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin ise % 83.67 oranında hücre içine alımının olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar tez çalışmasında belirtilen hücre içine alım oranlarını desteklemektedir.



Şekil 36. Floresan mikroskop ile kumarin-6 işaretli PLGA-b-PEG nanopartiküllerinin HepG2 hücreleri içerisinde alınımının kalitatif olarak belirlenmesi (10X büyütme)



Şekil 37. Kumarin-6 İşaretli PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin HepG2 Hücreleri İçine Alım Oranlarının Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Kombine EV ve VS Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartiküllerinin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Özdemir ve ark., (2014) HepG2 hücreleri üzerinde kombine EV-VS uygulamasının sinerjik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. HepG2 hücreleri üzerinde sinerjik etkisi olan kombine EV-VS PLGA-b-PEG taşıyıcı sistemine yüklenerek hazırlanmış ve sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre HepG2 hücreleri 24 saat boyunca $10\mu\text{M}$ EV/ $1.94\mu\text{M}$ VS; $5\mu\text{M}$ EV/ $0.82\mu\text{M}$ VS; $1.25\mu\text{M}$ EV/ $0.205\mu\text{M}$ VS; $0.10\mu\text{M}$ EV/ $0.016\mu\text{M}$ VS konsantrasyonlarında serbest ve nanopartikül formülasyonları ile muamelesinin ardından elde edilen yüzde canlılık

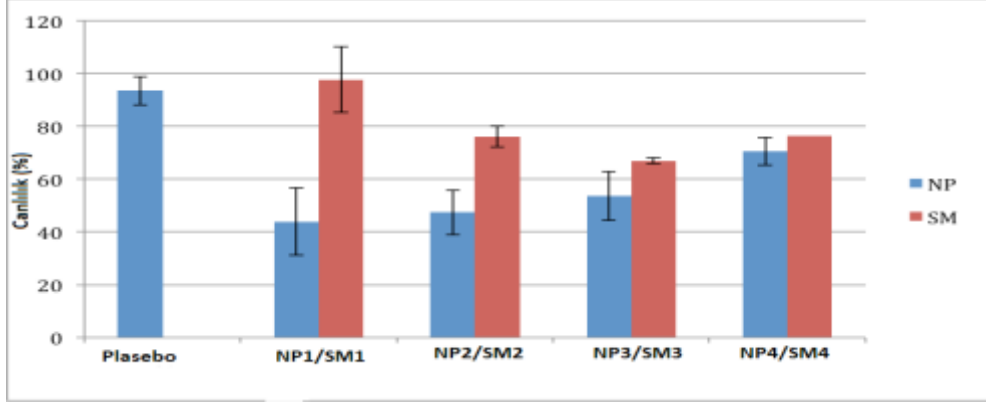
değerleri **Şekil 38**'de gösterilmiştir. 10µM EV/ 1.94µM VS konsantrasyonda serbest etkin madde uygulanan hücrelerde, hücre popülasyonunun % 76.13'ü canlı iken aynı konsantrasyonda nanopartikül formülasyonu uygulanan hücrelerde %43.23'ü canlıdır. 5µM EV/0.82µM VS konsantrasyonda serbest etkin madde uygulanan hücrelerde, hücre popülasyonunun % 67.02'si canlı iken aynı konsantrasyonda nanopartikül formülasyonu uygulanan hücrelerde %47.37'si canlıdır. Plasebo formülün sitotoksik bir etkisinin olmadığı da gösterilmiştir (**Şekil 38**).

A20 hücreleri üzerinde yapılan 24 saatlik sitotoksisite sonuçlarına göre doksorubisin yüklü PLGA-PEG nanopartikülleri serbest doksorubisine göre daha etkili olduğu bulunmuştur. 1µM doksorubisin yüklü PLGA-PEG nanopartikülleri hücre popülasyonunu % 60'nın ölümüne neden olurken, serbest doksorubisin % 40'luk bir ölüm oranına neden olmuştur. Serbest doksorubisinin IC₅₀ değeri yaklaşık 2.6 µM iken doksorubisin yüklü PLGA-PEG nanopartiküllerinin IC₅₀ değeri 1.8 µM olarak bulunmuştur (Park ve ark., 2009).

Liang ve ark. (2011)'nin HEC-1A kanser hücreleri ile 48 saat boyunca muamele edilen paklitaksel yüklü PLGA-PEG nanopartiküllerinin IC₅₀ değeri 8.81 ± 0.10 µg/ml iken serbest paklitakselin IC₅₀ değeri 13.24 ± 1.59 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Chen ve ark.,(2012)'nin MCF-7 hücreleri ile yaptıkları MTT sitotoksisite analizinde sırasıyla serbest vinkristinin, VS yüklü PLGA-mPEG, PLGA-PEG-folat, PLGA-PEG-R₇, R₇ ve folat modifiye PLGA-PEG nanopartiküllerinin IC₅₀ değeri 10.24 ± 1.52, 3.99 ± 0.23, 2.76 ± 0.22, 2.40 ± 0.19 ve 2.07 ± 0.13 nM olarak tespit edilmiştir.

Bu çalışmada da, aynı konsantrasyondaki EV-VS yüklü nanopartikül formülasyonunun serbest maddelerden daha sitotoksik olduğu gösterilmiştir. Bu farkın EV ve VS'nin hücre içine alımından kaynaklandığı düşünülmektedir. Sonuçlara göre, PLGA-b-PEG'in iyi bir ilaç taşıyıcı sistem olduğu görülmektedir. Yukarıda bahsedilen literatür verileriyle de bu desteklenmektedir.



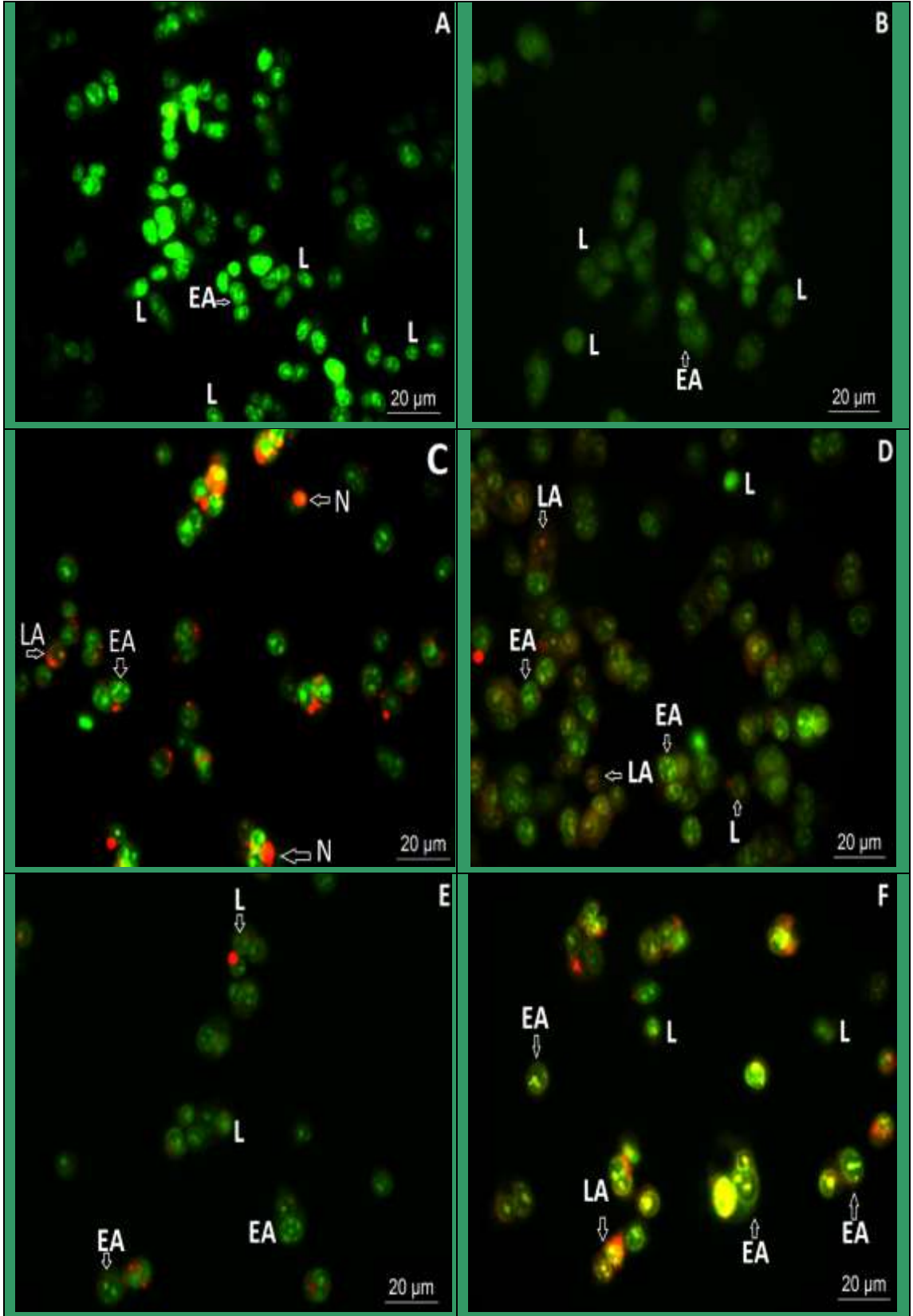
Şekil 38. Kombine EV-VS Yüklü PLGA-b-PEG Nanopartikül Formülasyonunun ve Serbest Etkin Maddelerin MTT Analiz Sonuçları (NP1/SM1: 10 μ M EV/1.94 μ M VS; NP2/SM2: 5 μ M EV/0.82 μ M VS; NP3/SM3: 1.25 μ M EV/0.205 μ M VS; NP4/SM4: 0.10 μ M EV/0.016 μ M VS)

Akridin Oranj/Propidyum İyodür (AO/PI) Çift Boyama ile Apoptotik Etkinin İncelenmesi

Apoptozun neden olduğu morfolojik değişimlerin belirlenmesinde, Akridin Oranj/Propidyum İyodür (AO/PI) çift boyama yapılmıştır. Plasebo, serbest ve kombine EV ve VS yüklü nanopartikül formülasyonunun farklı konsantrasyonları ile (5 μ M EV/0.62 μ M VS; 10 μ M EV/1.25 μ M VS) HepG2 hücreleri 24 saat muamele edilmiştir. **Şekil 39**'da gösterildiği gibi, homojen dağılım gösteren yeşil renkteki hücreler canlı (L), yoğunlaşmış ya da fragmante kromatine sahip yeşil renkli hücreler erken apoptotik (EA), fragmante kromatine sahip kırmızı ya da turuncu renkteki hücreler geç apoptotik (LA), normal çekirdeğe sahip kırmızı ya da turuncu renkteki hücreler nekroz (N) olarak değerlendirilmiştir.

Şekil 39-A'da görüldüğü üzere maddesiz kontrol HepG2 hücreleri yüksek canlılık oranına sahiptir.

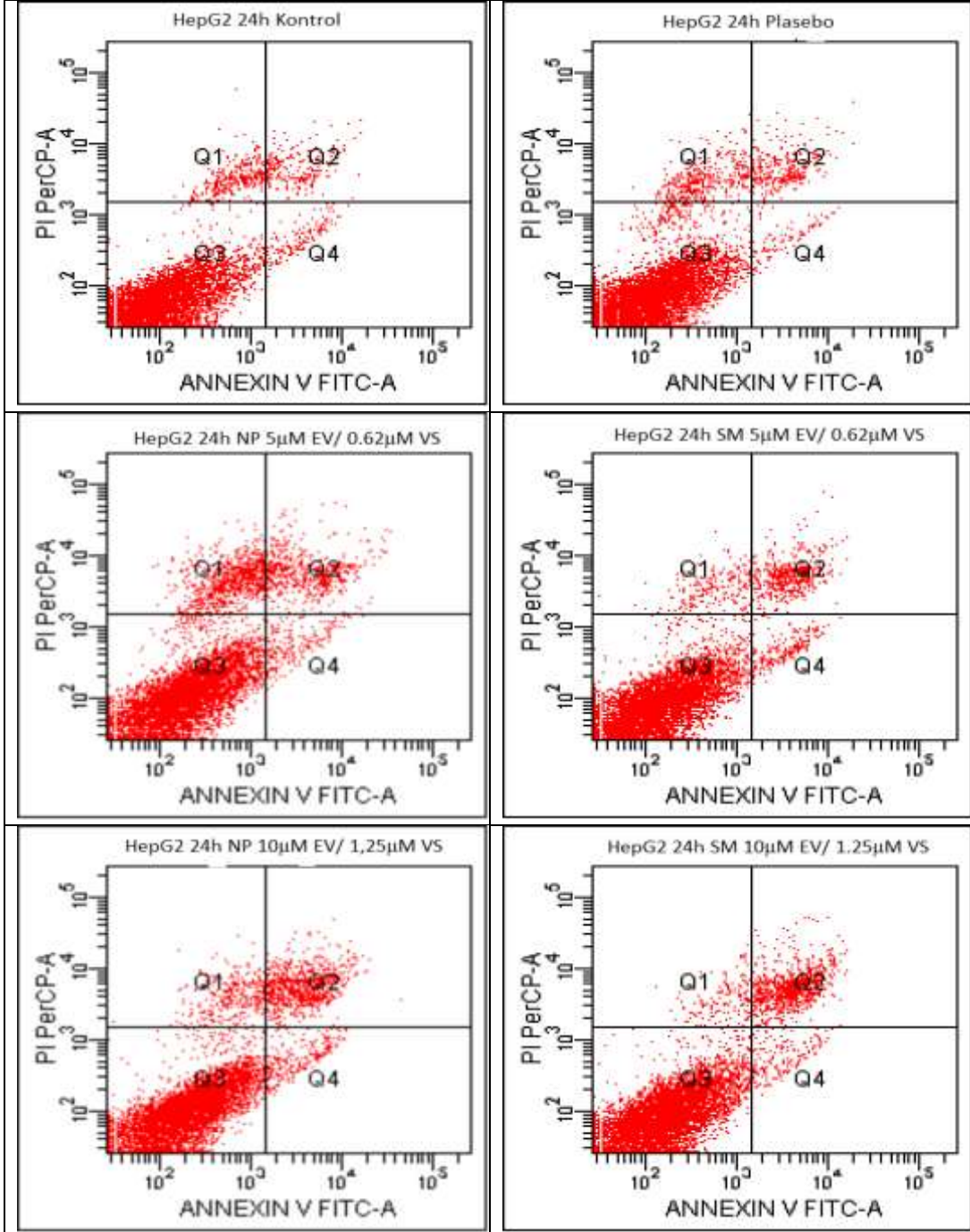
MTT testiyle benzer şekilde plasebo formülün sitotoksik bir etkisinin olmadığı ve hücre canlılığını etkilemediği hücrelerin morfolojisinde apoptotik bir değişimin olmadığı AO/PI boyama ile de gösterilmiştir. 5 μ M EV/0.62 μ M VS ile 10 μ M EV/1.25 μ M VS konsantrasyonlarında serbest etkin madde ve nanopartikül formülasyonları uygulanan hücre gruplarında erken ve geç apoptotik hücreler gözlenmektedir. Fakat aynı konsantrasyondaki serbest ve nanopartikül formülasyonlarının apoptotik morfoloji üzerinde önemli bir değişiklik oluşturmadığı görülmektedir.



Şekil 39. SM ve NP'nin etkisiyle HepG2 hücrelerinin morfolojilerinde gözlenen apoptotik değişimler. (A: Kontrol; B: Plasebo, C: 5 μ M EV/0.62 μ M VS (SM), D: 5 μ M EV/0.62 μ M VS (NP), E: 10 μ M EV/1.25 μ M VS (SM), F: 10 μ M EV/1.25 μ M VS (NP))

Kombine EV/VS Nanopartikül Uygulamasının HepG2 hücrelerinde Fosfotidilserin Lokalizasyonu Üzerine Etkisi

Plasebo, serbest veya nanopartikül formülasyonları farklı konsantrasyonları ($5\mu\text{M}$ EV/ $0.62\mu\text{M}$ VS; $10\mu\text{M}$ EV/ $1.25\mu\text{M}$ VS) ile HepG2 hücreleri 37°C 'de 24 saat inkübe edildikten sonra, hücreler tripsinizasyon işlemine tabi tutularak akım sitometride Anneksin V oranı ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 40'da gösterilmiştir.



Şekil 40. HepG2 hücrelerinin 24 saatlik SM ve NP ile inkübasyonu sonrasındaki apoptoz oranını

Canlı hücre, apoptotik hücre ve nekrotik hücre oranlarının sayısal verileri **Çizelge 12'**de gösterilmiştir.

Çizelge 12. HepG2 hücrelerinin 24 saatlik SM ve NP ile inkübasyonu sonrasındaki apoptoz oranı ve yüzde dağılımı

	Kontrol	Plasebo	NP 5 μ M EV/0.62 μ M VS	SM 5 μ M EV/0.62 μ M VS	NP 10 μ M EV/1.25 μ M VS	SM 10 μ M EV/1.25 μ M VS
Q1	3.3	4.3	9.2	2.3	3.9	2.0
Q2	2.3	9.4	6.0	5.2	9.4	9.6
Q3	92.5	83.8	82.1	89.9	83.5	85.9
Q4	1.9	2.6	2.6	2.6	3.2	2.6

Şekil 40 ve **Çizelge 12'**de görüldüğü gibi HepG2 hücreleri üzerinde apoptoz değerlendirildiğinde negatif kontrol (%92.5), serbest etkin madde 5 μ M EV/0.62 μ M VS konsantrasyonda (%89.9), nanopartikül formülasyonu 5 μ M EV/0.62 μ M VS konsantrasyonda (%82.1), serbest etkin madde 10 μ M EV/1.25 μ M VS konsantrasyonda (%85.9), nanopartikül formülasyonu 10 μ M EV/1.25 μ M VS konsantrasyonda (%83.5) oranında hücre canlılığı gözlemlenmiştir. Kombine EV/Vs yüklü nanopartikül ile 24 saat muamele edilen HepG2 hücrelerinde, erken apoptotik hücre oranı kontrole ve serbest madde uygulamasına göre daha yüksek bulunmuştur.

Liang ve ark.(2011)'nin HEC-1A kanser hücreleri ile 48 saat boyunca 2 μ g/ml serbest paklitaksel ve paklitaksel yüklü PLGA-PEG nanopartiküllerinin sırasıyla apoptoz değerleri %19 ve % 23.97 bulunmuştur.

Chen ve ark.,(2012)'nin flow sitometri ile MCF-7 hücreleri üzerinde apoptoz değerlendirildiğinde 10 nM konsantrasyonda negative kontrol (% 95.63), serbest vinkristin (% 77.81), PLGA-PEG-folat (% 72.45), PLGA-PEG-R₇ (% 68.42), R₇ ve folat modifiye PLGA-PEG (% 63.78) oranında hücre canlılığı gözlenmiştir. Serbest vinkristin (% 21.65), PLGA-PEG-folat (% 26.84), PLGA-PEG-R₇ (% 30.66), R₇ ve folat modifiye PLGA-PEG (% 34.89) oranında apoptotik hücre olduğu gösterilmiştir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında pasif hedeflendirme ile İnsan Hepatoselüler Karsinoma Hücre Hattı (HepG2) tedavisine yönelik olarak ϵ -viniferin (EV)-vinkristin sülfat (VS) yüklü poli (laktik-ko-glikolik asit)-blok-poli(etilen glikol) (PLGA-b-PEG) nanopartikülleri hazırlanarak karakterize edilmiştir. Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan etkin madde yüklü partiküllerin büyüklüğü 113 ± 0.43 nm, poli dispersite indeksi 0.323 ± 0.01 ve -35.03 ± 1.0 mV zeta potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir. Nanopartiküllerin küresel oldukları AFM analizi ile gösterilmiştir. Liyofilize formunun süspansiyon formuna göre daha kararlı olmasından dolayı ileriki çalışmalar için liyofilize formunun hazırlanması önerilmektedir.

Floresan görüntüleme kumarin-6 işaretli nanopartiküller HepG2 hücreleri tarafından ilk 2 saat içerisinde hücre içine alınarak güçlü floresan ışımaya verdiği görülmüştür. Mikroplate okuyucu ile hücre içine alım oranının 4 saatin sonunda % 87 olduğu kantitatif olarak da desteklenmiştir.

Sitotoksikite çalışması ile nanopartikül formülasyonunun serbest etkin maddeden daha sitotoksik olduğu gösterilmiştir. $10 \mu\text{M}$ EV/ $1.94 \mu\text{M}$ VS konsantrasyonda serbest etkin madde uygulanan hücrelerde, hücre popülasyonunun % 76.13'ü canlı iken aynı konsantrasyonda nanopartikül formülasyonu uygulanan hücrelerde %43.23'ü canlıdır.

Akridin oranj/Propidyum iyodür çift boyama ile apoptotik hücrelerin morfolojisinde meydana gelen değişimler gösterilmiştir. HepG2 hücrelerinin 24 saatlik serbest ve nanopartikül formülasyonu ile inkübasyonu sonrasındaki apoptoz oranı ve yüzde dağılımı akım sitometri ile ölçülmüştür.

Sonuç olarak PLGA-b-PEG hücre içine alım oranının yüksekliği ve yüksek ilaç yükleme kapasitesinden dolayı uygun bir ilaç taşıyıcı sistemdir. Kombine EV-VS uygulamasının HepG2 hücreleri üzerinde sinerjik etkisi olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu tez çalışması ile bu sinerjik etkinin EV-VS'in ilaç taşıyıcı sisteme yüklenmesiyle daha da arttırılabileceği belirtilmiştir. Bu sonuçların ilerdeki *in vivo* çalışmalarla desteklenerek kanser tedavisinde ve kanser hastalarının yaşam kalitelerinin arttırılması yönünde fayda sağlaması öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

Aftabrouchard, D., Dorlker, E., Preparation methods for biodegradable microparticles loaded with water-soluble drugs, *STP Pharma. Sci.*, 2, 365–380 (1992).

Alayautdin, R.N., Petrov, V.E., Langer, K., Berthold, A., Kharkevich, D.A., Kreuter, J., Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles, *Pharm. Res.*, 14, 325 (1997).

Allen, T.M., Liposomes: Opportunities in drug delivery, *Drugs*, 54(4), 14-24 (1997).

Allemann, E., Gurny, R., Doekler, E., Drug-loaded nanoparticles- preparation methods and drug targeting issues, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 39, 173–191 (1993).

Alleman, E., Brasseur, N., Benrezzak, O., Rousseau, J., Kudrevich, S.V., Boyle RW., Leroux JC., Gurny R., Van Lier JE., PEG-coated poly-(lactic acid) nanoparticles for the delivery of hexadecafluoro zinc phthalocyanine to EMT-6 mouse mammary tumours, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 47, 382-387 (1995).

Alkan, H., Lipozomlar-II.İlaç taşıyıcısı olarak hazırlanmaları, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8, 197-222 (1983).

Alonso, M., Nanoparticle drug carrier technology, *Microparticulate Systems for the delivery of proteins and vaccines*, Eds.: S.Cohen and H. Bernstein, Marcel Dekker, Inc New York, 203-241 (1996).

Amalfitano, C., Evidente, A., Surico, G., Teğli, S., Bertelli, E., Mugnai, L., Phenols and stilbene polyphenols in the wood of esca-diseased grapevines, *Phytopathol. Mediterr.*, 39, 178-183 (2000).

Aravalli, N.R., Steer, C.J. ve Cressman, E.N.K., Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 48, 2047–2063 (2008).

Arbo's, P, Wirth, M, Arangoa, M.A, Gabor, F, Irache, J.M., Gantrez RAN as a new polymer for the preparation of ligand-nanoparticle conjugates, *J. Control Release*, 83, 321–330 (2002).

Astete, C.E, Sabliov, C.M., Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles, *J. Biomater Sci. Polym. Ed.*, 17, 247–289 (2006).

Athanasidou, K.A., Niederauer, G.G., and Agrawal, C.M., Sterilization, toxicity,

biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers, *Biomaterials*, 17(2), 93-102 (1996).

Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A.G., Ithakissios, D.S., PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties, *J. Control. Release* 79, 123–135 (2002).

Avgoustakis, K., Pegylated poly (lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr. Drug Deliv.*, 1(4), 321-33 (2004).

Bai, Y., Mao, Q.Q., Qin, J., Zheng, X.Y., Wang, Y.B., Yang, K., Shen, H.F., Xie L.P., Resveratrol induces apoptosis and cell cycle arrest of human T24 bladder cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Cancer Sci.*, 101, 488–493 (2010).

Banarjee, A., Önyüksel, H., Peptide delivery using phospholipid micelles, *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine and Nanobiotechnology* 4, 562-574, (2012).

Barichello, JM, Morishita, M, Takayama, K, Nagai, T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 25, 471 – 6 (1999).

Berenblum I: *Frontiers of Biology.*, In: *Carcinogenesis as a Biological Problem.* Amsterdam: North-Holland Pub. Co. New York, 212-224 (1974).

Bodmeier, R, Chen, H., Indomethacin polymeric nanosuspensions prepared by microfluidization, *J. Control Release*, 12, 223 – 233 (1990).

Bratton, D.L, Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey J.M., Guthrie, L.A., Henson, P M, Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip- flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase, *J. Biol. Chem.*, 272, 26159–26165 (1997).

Brescia, P., Banks, P., BioTek Instruments, Inc., Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer, (2009).

Brigger, I, Dubernet, C, Couvreur, P., Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54, 631-651 (2002).

Burns, J.H., Vincristine sulfate. In: Florey K, editor. *Analytical Profiles of Drug Substances.* New York: Academic Press, 463 – 480 (1972)

Butterworth, B.E., Popp, J.A., Conolly, R.B., Goldsworthy TL. Chemically induced cell proliferation in carcinogenesis. In: Vainio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ, eds. *Mechanisms of Carcinogenesis in Risk Identification*. Lyon: International Agency for Research of Cancer, 279–305 (1992).

Chen, C.J., Yu, W., Fu, Y.C., Wang, X., Li, J.L., Wang, W., Resveratrol protects cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis through the SIRT1-FoxO1 pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378, 389–393 (2009).

Chen, C.J., Yu, W., Wang, W., Red wine may be used in the therapy of myocarditis, *J. Cell Biochem.*, 111, 808–810 (2010).

Chen J., Li S., Shen Qi., Folic acid and cell-penetrating peptide conjugated PLGA–PEG bifunctional nanoparticles for vincristine sulfate delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 47, 430-443 (2012).

Chen, Z.H., Hurh, Y.J., Na, H.K., Kim, J.H., Chun, Y.J., Kim, D.H., Kang, K.S., Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., Shin, D.M., Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clinical Cancer Research*, 14(5), (2008).

Cho, M.H., Surh, Y.J., Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells, *Carcinogenesis*, 25, 2005–2013 (2004).

Cho, S.J., Lee, S.S., Kim, Y.J., Park, B.D., Choi, J.S., Liu, L., Hama, Y.M., Kim, B.M. ve Lee, S.K., Xylocyline, a novel Cdk inhibitor, is an effective inducer of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo, *Cancer Letters*, 287, 196–206 (2010).

Corn, P.G., El-Deiry, W.S., Derangement of growth and differentiation control in onkogenesis. *Bioessays* 1, 83-90 (2002).

Dagar, A., Kuzmis, A., Rubinstein, I., Sekosan, M., Önyüksel, H., VIP-targeted cytotoxic nanomedicine for breast cancer, *Drug delivery and Translational research* 2, 454-462 (2012).

Danhier, F, Ansorena, E, Azeitao, J, et al., PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *J. Control Release*, 161, 505-522 (2012).

Danhier, F., Feron O., Preat V., To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 148, 135-146 (2010).

Davda, J., Labhasetwar, V., Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int. J. Pharm.*, 233, 51–59 (2002).

Derakhshandeh, K., Erfan, M., Dadashzadeh, S., Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: factorial design, characterization and release kinetics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66, 34–41 (2007).

Devereux, T.R, Risinger, JI, Barrett, J.C., Mutations and altered expression of the human cancer genes: What they tell us about causes. IARC Scientific Publications, 146, 19-42 (1999).

Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H., Atyabi, F., Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 877-895 (2011).

Elenbaas, L, Spirio F, Koerner, M.D, Fleming, DB, Zimonjic, JL, Donaher, NC, Popescu, WC., Human breast cancer cells generated by onkogenic transformation of primary mammary epithelial cells, *Genes Dev.*, 15, 50–65 (2001).

El-Shabouri, M.H., Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A, *Int. J. Pharm.*, 249, 101-108 (2002).

Ertaş, Ö.S., Kayalı, A., Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış 'An Overview On Analytical Method Validation', *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 34 (1), 41-57 (2005).

Esmaeili, F, Ghahremani, MH, Ostad, SN, Atyabi, F, Seyedabadi, M, Malekshahi, MR, Amini, M, Dinarvand, R., Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate, *J. Drug Target*, 16(5), 415–423 (2008).

Faraji, A.H., Wipf, P., Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 2950–2962 (2009).

Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., Benita, S., Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement, *International Journal of Pharmaceutics*, 55 (1), R1- R4 (1989).

Fonseca, C., Simoes, S., Gaspar, R., Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity, *J. Control. Release* 83, 273–286 (2002).

Fuertges, F., Abuchowski, A., The clinical efficacy of poly (ethylene glycol)-modified proteins. *Journal of Controlled Release*, 11, 139 (1990).

Gabizon, A.A., Stealth liposomes and tumor targeting: One step further in the quest for the magic bullet, *Clinical Cancer Research*, 7, 223-225, (2001).

Ganachaud, F, Katz, JL., Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. *Chem. Phys. Chem.*, 6, 209 –216 (2005).

Gatti, R, Belletti, S, Orlandini, G, Bussolati O, Dall'asta V, Gazzola G C; Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 46, 895–900 (1998).

Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, 1-9, (2008).

Giddinga, C.E.M., Kellieb, S.J., Kampsa, WA., Graafa, SSN., Vincristine revisited ,*Crit Rev Oncol Hematol*. Feb;29(3), 267-87 (1999).

Greenwald, R.B., Choe, YH, McGuire, J, Conover, C.D., Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 217–250 (2003).

Gref, R, Minamitake, Y, Peracchia, MT, Trubetskoy, V, Torchilin, V, Langer, R Biodegradable long-circulating poly-meric nanospheres. *Science* 263, 1600–1603 (1994).

Gurny, R, Peppas, NA, Harrington, DD, Banker, G.S., Development of biodegradable and injectable lattices for controlled release of potent drugs, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 7, 1 – 25 (1981).

Hans, M.L., Lowman, AM., Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6, 319-327 (2002).

Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, JW., Thurston G., Roberge S., Jain RK., McDonald DM., Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness *American Journal of Pathology*, 156, 1363-1380, (2000).

Herold, DA., Keil, K., Bruns de., *Biochem. Pharmacol.*, 38, 73 – 76 (1989).

Hinds, KD., Biomaterials for Delivery and Targeting of Proteins and Nucleic Acids, CRC, Boca Raton, FL, (2005).

Hobbs, SK., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, WG., Griffith, L., Torchilin, VP., Jain, RK., Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment, Proceedings of National Academy of Sciences USA, 95, 4607-4612 (1998).

http-1 Solubility enhancement of hydrophobic drugs via drug-loaded micelles using biodegradable PEG- polyester diblock copolymers, <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/plga-drug-delivery.html#sthash.ks60HOXX.dpuf%20> , (20.07.2015).

http-2 Vincristine sulfate, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/v8388?lang=en®ion=TR> (20.07.2015).

http-3 Oncovin, <https://www.adlershop.ch/p13600/oncovin-liquid-inj-loes-1-mg-ml-i-v-durchstf-1-ml> (20.07.2015).

http 4 Trizma buffers, <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4800/4709.pdf> (19.07.2015)

http-5 Apoptosis, <http://www.flow-cytometry.us/index.php?page=apoptosis> (23.07.2015).

ICH Topic Q2B, Validation of analytical procedures: Methodology, The European Agency for the evaluation of medicinal product, CPMP/ICH/281/95, Step 4, Consensus guideline, 6 November 1996.

Irache, JM, Huici, M, Konecny, M, Espuelas, S, Campanero, MA, Arbos, P. Bioadhesive properties of gantrez nanoparticles. Molecules, 10, 126 – 145 (2005).

Jain, R., The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide)(PLGA) devices. Biomaterials, 21(23), 2475-2490 (2000).

Jaiswal, J, Gupta, SK, Kreuter, J., Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process, J. Control Release, 96, 169 – 78 (2004).

Jang, J.H., Surh, Y.J., Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells, Mutat. Res., 496, 181–

190 (2001).

Jemal, A, Siegel, R, Ward, E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, CA Cancer J. Clin., 58, 71–96 (2008)

Kang, L., Heng, W., Yuan, A., Baolin, L., Fang, H., Resveratrol modulates adipokine expression and improves insulin sensitivity in adipocytes: relative to inhibition of inflammatory responses, *Biochimie* 92, 789–796 (2010).

Keller, M., Nanomedicinal delivery approaches for therapeutic siRNA, *International Journal of Pharmaceutics*, 379, 210-211 (2009).

Knop, K, Hoogenboom, R, Fischer, D, Schubert, U.S., Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as Wellas potential alternatives. *Angew Chem Int Ed* 49, 6288–6308 (2010).

Kockx, MM, Muhring, J, Knaapen MWM, de Meyer G.R.Y., RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 152, 885 (1998).

Kolb, J.P., Billard, C., Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells. *Leuk. Res.* 28, 851–861 (2004).

Konan, YN, Gurny, R., Alle'mann E. State of the art in the delivery of photosensibilizers for photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol. B.*, 66, 89 – 106 (2002).

Koo, O.M., Rubinstein I., Önyüksel H., Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a convise review, *Nanomedicine*, Sep (1),193-212 (2005).

Koosha, F., Muller, R.H., Davis, SS, Davies, M.C., The surface chemical structure of poly(h-hydroxybutyrate) microparticles produced by solvent evaporation process. *J Control Release*, 9, 149 – 57 (1989).

Koosha, F, Muller, R.H., Washington, C., Production of polyhydrox- ybutyrate (PHB) nanoparticles for drug targeting. *J Pharm Pharmacol*, 39, 136 (1987).

Kreuter, J.; Ramge, P.; Petrov, V. E.; Hamm, S.; Gelperina, S. E.; Engelhardt, B.; Alyautdin, R. N.; von Briesen, H.; Begley, D. J. *Pharm. Res.*, 20, 409 (2003).

Kumari, A, Yadav, SK, Yadav, SC., Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75, 1-18 (2010).

Landrault, N., Larronde, F., Delaunay, J.C., Castagnino, C., Vercauteren, J., Merillon, J.M., Gasc, F., Cros, G., Teissedre, P.L., Levels of stilbene oligomers

and astilbin in French varietal wines and in grapes during noble rot development. *J. Agric. Food.Chem.*, 50, 2046–2052 (2002).

Landry, FB, Bazile, DV, Spenlehauer, G, Veillard, M, Kreuter, J., Influence of coating agents on the degradation of poly(d,l-lactic acid) nanoparticles in model digestive fluids (USP XXII). *STP Pharma Sci.*, 6, 195 – 202 (1996).

Lemarchand, C, Gref, R, Passirani, C, Garcion, E., Petri, B, Muller, R., Influence of polysaccharide coating on the interactions of nano- particles with biological systems. *Biomaterials*, 27, 108 – 118 (2006).

Li, S, McCarthy, SP., Influence of crystallinity and stereochemistry on the enzymatic degradation of poly (lactide)s. *Macromolecules* 32, 4454–4456 (1999).

Li, SD., Huang, L., Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles, *Molecular Pharmaceutics*, 5, 496-504 (2008).

Liang, C., Yang, Y., Ling, Y., Huang, Y., Li, T., Li, X., Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA-PEG nanoparticles for endometrial carcinoma, *Bioorganic&Medicinal Chemistry* 19, 4057-4066, (2011)

Lim, B.S., Banerjee, A., Önyüksel, H., Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers, *Journal of controlled Release*, 163, 34-45 (2012).

Locatelli, E., Franchini, M.C., Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. *J. Nanopart. Res.*, 14, 1316 (2012).

Lu, W, Zhang, Y, Tan, Y-Z, Hu, K-L, Jiang, X-G, Fu, S-K. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery. *J Control Release*, 107, 428 – 448 (2005).

Mainardes, RM, Evangelista, RC. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *Int. J. Pharm.*, 290, 137 – 44(2005).

Manish, G., Vimukta, S., Targeted drug delivery system:A review, *Research Journal of Chemical Scieces*, 1(2), (2011).

Mazauric, J.P., Salmon, J.M., Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5647–5653 (2005).

Moghimi, SM., Hunter, AC., Murray JC., Long circulating and target specific

nanoparticles: Theory to practice *Pharmacological Reviews*, 53(2), 283-318,(2001).

Molpeceres, J, Guzman M, Aberturas MR, Chacon M, Berges L. Application of central composite designs to the preparation of polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement. *J. Pharm. Sci.*, 85, 206 – 213 (1996).

Morachis, JM., Mahmoud, E.A., Almutairi, A., Physical and chemical strategies for therapeutic delivery by using polymeric nanoparticles” *Pharmacological Reviews*, 64, 505-519 (2012).

Mora-Huertasa, C.E., Fessia, H., Elaissari, A., Polimer-based nanocapsules for drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113-142 (2010).

Munoz, N, Bosch, X. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. In: *Neoplasms of the Liver*, Okuda, K, Ishak, KG (Eds), Springer (1989).

Muthu, MS., Nanoparticles based on PLGA and its co- polymer: an overview. *Asian J. Pharm.* 3, 266–277 (2009).

Narang, AS., Varia S., Role of tumor vascular architecture in drug delivery, *Advanced drug delivery reviews*, 63,640-58 (2011).

Né mati, F, Dubernet C, Fessi H, Verdie`re AC, Poupon MF, Puisieux F, et al. Reversion of multidrug resistance using nanoparticles in vitro: influence of the nature of the polymer. *Int. J. Pharm.* 138, 237 – 246 (1996).

Neuss, N, Gorman, M, Boaz, HE, et al. Vinca alkaloids XI structures of leurocristine (LCR) and vincalkebblastine (VLB). *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 1509 – 1510 (1962).

Niopas, I. and A.C. Daftsios, Determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: validation and application to pharmacokinetic studies, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 32(6), 1213-1218 (2003).

Nowell P., The clonal evolution of tümör cell populations. *Science* 194, 23–28 (1976).

Okuda, K., Hepatocellular carcinoma, *Journal of Hepatology*, 32, 225– 231 (2000).

Okuda, K. Epidemiology of primary liver cancer. In: *Primary Liver Cancer in Japan*, Tobe, T (Ed), Springer-Verlag (1992).

Oshima, Y., Namao, K., Kamijou, A., Matsuoka, S., Nakano, M., Terao, K., Ohizumi, Y., Powerful hepatoprotective and hepatotoxic plant oligostilbenes, isolated from the Oriental medicinal plant *Vitis coignetiae* (Vitaceae). *Experientia* 51, 63–66 (1995).

Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger C, Hanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays, *Apoptosis*, 3, 115 (1998).

Önyüksel H., Banerjee A., Phospholipid-based nanomicelles in cancer nanomedicine, nanomedicine in Health and Disease, Eds Hunter RJ., Preedy VR., CRS Press, Chapter 16, 314-335 (2011).

Özdemir, F., Akalın, G., Şen, M, Önder, NI, Işcan, A, Kutlu, HM, Incesu, Z. Towards novel anti-tumor strategies for hepatic cancer: ϵ -viniferine in combination with vincristine displays pharmacodynamic synergy at lower doses in HepG2 cells, *OMICS A Journal of Integrative Biology* 18(5), 2014.

Park, J., Fong, PM., Lu, J., Russell, K., Booth, C., Saltzman, WM., Fahmy, TM., PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin, *Nanomedicine*, 5(4), 410-418, (2009)

Park, T.G., Degradation of poly(D, L-lactic acid) micro- spheres: effect of molecular weight, *J. Control Release*, 30, 538–546 (1994).

Perez, C, Sa´nchez A., Putnam, D, Ting, D, Langer, R, Alonso, MJ. Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA, *J. Control Release*, 75, 211 – 24 (2001).

Pillai, O., Panchagnula, R., Polimers in drug delivery, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5 (4), 447-51(2001).

Piver, B., Berthou, F., Dreano, Y., Lucas, D., Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by ϵ -viniferin, the dimer of resveratrol: comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages. *Life Sci.* 73, 1199–1213 (2003).

Prabha, S., Labhasetwar, V. Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression. *Pharm. Res.* 21, 354 (2004).

Prabha, S, Zhou, W-Z, Panyam, J, Labhasetwar, V. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection studies with fractionated nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 244, 105 – 15 (2002).

Privat, C., Telo, J.O.P., Bernardes-Genisson, V; Vieira, A., Souchard, J.P., Nepveu, F.O., Antioxidant Properties of trans- ϵ -Viniferin As Compared to Stilbene Derivatives in Aqueous and Nonaqueous Media, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (5), 1213–1217 (2002).

Prokop, A., Davidson, J.M., Nanovehicular intracellular delivery systems, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97, 3518-3590 (2008).

Quintanar-Guerrero, D, Alle'mann, E, Fessi, H, Doelker, E., Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 24, 1113 – 1128 (1998).

Rao, J.P., Geckelera, K.E., Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, 36, 887-913 (2011).

Redhead, H.M., Davis, S.S., Illum, L., Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation, *J. Controlled Release* 70, 353–363 (2001).

Reis, P.C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2, 8–21 (2006).

Rosler, A., Vandermeulen, G.W.M., Klok, H.A., Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers, *Advanced Drug delivery reviews*, 53, 95-108 (2001).

Rubinstein, I., Önyüksel, H., Intracellular delivery of VIP-grafted sterically stabilized phospholipid mixed nanomicelles in human breast cancer cells. *Chemico Biological Interactions*, 171,190-194 (2008).

Sahana, D.K., Mittal, G., Bhardwaj, V., Kumar, M.N., PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug, *J. Pharm. Sci.*, 97 (4), 1530–1542 (2008).

Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W., Szekeres, T., Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad ? *Mutat. Res.*, 658, 68–94 (2008).

Sánchez, A, Vila Jato, J.L, Alonso, M.J. Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled release of cyclosporine, *Int. J.*

Pharm., 99, 263 – 273 (1993).

Saxena, V, Sadoqi, M, Shao, J., Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro release. *Int. J. Pharm.*, 278, 293 – 301 (2004).

Schmidt, C., Lamprecht, A., Nanocarriers in drug delivery-design, manufacture and physicochemical properties, in nanotherapeutics drug delivery concepts in nanoscience, a. lamprecht, editor., pan stanford publishing (2009).

Shabir, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization, *J. Chromatogr. A*, 987, 57-66 (2003).

Shao, J., Li, X., Lu, X., Jiang, C., Hu, J., Li, Q., You, Y., Fu, Z., Enhanced growth inhibition effect of Resveratrol incorporated into biodegradable nanoparticles against glioma cells is mediated by the induction of intracellular reactive oxygen species levels , *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 72 , 40-47 (2009).

Siegel, R, Naishadham, D, Jemal, A., Cancer statistics for Hispanics/Latinos. *CA Cancer J. Clin.*, 62, 283–298 (2012).

Singh, R., Lillard, J.W., Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and Molecular Pathology*, 86, 215-223 (2009).

Soppimatha, KS, Aminabhabia, TM, Kulkarni, AR, Rudzinski, WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*, 70, 1 – 20 (2001).

Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W. ve Villanueva, A., MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets, *Acta histochemica*, 114(8), 785–796 (2012).

Şimşek S., Eroğlu H., Kurum H., Ulubayram K., Brain targeting of Atorvastatin loaded amphiphilic PLGA-b-PEG nanoparticles *Journal of Microencapsulation*, 30(1), 10–20 (2013).

Tabata, J, Ikada, Y., Protein pre-coating of polylactide microspheres containing a lipophilic immunopotentiator for enhancement of macrophage phagocytosis and activation, *Pharm. Res.*,6, 296 – 301 (1989).

Tesarik, J, Greco, E., Cohen-Bacrie, P, Mendoza, C., Germ cell apoptosis in men

with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 757(1998).

Tice, TR, Gilley, RM., Preparation of injectable controlled-release microcapsules by solvent-evaporation process, *J. Control Release*, 2,343 – 52 (1985).

Tobio, M., Sanchez, A., Vila, A., et al The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18, 315-323 (2000).

Ueda, H., Kreuter, J., Optimization of the preparation of loperamide- loaded poly (l-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification solvent evaporation. *J., Microencapsul*,14, 593 – 605 (1997).

Ueda, M., Iwara, A., Kreuter, J., Influence of the preparation methods on the drug release behavior of loperamide-loaded nanoparticles. *J Microencapsul*, 15, 361 – 72 (1998).

USP 31(The United States Pharmacopeia), 26.Basim (NF 26), 2488-2490, (2008).

Van, Iterson, R.A., A Guide to Validation in HPLC, Drenthe College Emmen Holland (2005).

Van, Zoonen, P., H.A. van 't Klooster, R. Hoogerbrugge, S.M. Gort, and H.J. van de Wiel, Validation of analytical methods and laboratory procedures for chemical measurements. *Arh Hig Rada Toksikol.*, 49(4), 355-370 (1998).

Vang, O., Ahmad, N., Baile, C.A., Baur, J.A., Brown, K., Csiszar, A., Das, D.K., Delmas, D., Gottfried, C., Lin1, H.-Y., Ma, Q.-Y., Mukhopadhyay, P., Nalini, N., Pezzuto, J.M., Richard, T., Shukla, Y., Surh, Y.-J., Szekeres, T., Szkudelski, T., Walle, T., Wu, J.M., What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS ONE* 6, 1–11 (2011).

Vargas, A., Pegaz, B., Debeve, E., Konan-Kouakou Y., Lange, N., Ballini, J-P, et al. Improved photodynamic activity of porphyrin loaded into nanoparticles: an in vivo evaluation using chick embryos. *Int. J. Pharm.*, 286, 131 –145 (2004).

Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-Alphandary, H., Couvreur, P., Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55, 519 – 48 (2003).

Vega-Avila, E. ve Pugsley, M.K., An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells, *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 54, 10–4 (2011).

- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J.-C., Merillon, J.-M., Teissedre, P.-L., Determination of stilbenes (δ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. *J. Agric. Food. Chem.* 53, 5664–5669 (2005).
- Vukovic, L., Khatib, F.A., Drake, S.P., Madriaga, A., Bradenburg, K.S., Kral, P., Önyüksel, H., Structure and dynamics of highly PEG-ylated sterically stabilized micelles in aqueous media, *Journal of American Chemical Society*, 133, 13481-13488 (2011).
- Wang, X.W., Hussain, S.P., Huo, T., Wu, C.G., Forgues, M. ve Hofseth, L.J., Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma, *Toxicology*, 181, 43–47 (2002).
- Wang, Z., Liu, W., Xu H., Yang, X., Preparation and in vitro Studies of Stealth PEGylated PLGA Nanoparticles as Carriers for arsenic Trioxide. *Chin.J.Chem.Eng.*, 15(6), 795-801 (2007).
- Wehrle, P., Magenheimer, B., Benita, S., Influence of process parameters on the PLA nanoparticle size distribution, evaluated by means of factorial design. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 41, 19 – 26 (1995).
- Wen, J., Guo, T., Zhu, H., Xiao, Y., Zhang, X., Chen, G., Chen, Y., Preparation and Optimization of PEG-PLGA Loaded with Vincristine Sulfate and its In vitro Release. *Bioequivalence & Bioavailability*, 3, 211-214 (2011).
- Wibowo, A.; Ahmat, N.; Hamzah, A.S.; Sufian, A.S., Ismail, N. H.; Ahmad, R.; Jaafar, F. M.; Takayama, H., Malaysianol A, a new trimer resveratrol oligomer from the stem bark of *Dryobalanops aromatic*, *Fitoterapia* 82 (4), 676–681 (2011).
- Williams, G.M., DNA reactive and epigenetic carcinogens. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 44, 457– 64 (1992).
- Williams, G.M., Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*, 14:166 (1- 2):3-10 (2001).
- Win, K.Y., Feng, S.S., Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 26, 2713–2722 (2005).
- Yoo, HS, Oh, JE, Lee, KH, Park, TG. Biodegradable nanoparticles containing PLGA conjugate for sustained release. *Pharm. Res.*, 16, 1114 – 1118(1999).

Zambaux, M.F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., Vigneron, C., Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles, *J. Control. Release*, 60 (2–3) 179–188 (1999).

Zghonda, N., Yoshida, S., Araki, M., Kusunoki, M., Mliki, A., Ghorbel, A., Miyazaki, H., Greater effectiveness of epsilon-viniferin in red wine than its monomer resveratrol for inhibiting vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 1259–1267 (2011).

Zhang, G, Gurtu, V., Kain, S.R., Yan, G., Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechniques*, 23, 525–531 (1997).

Zırh-Gürsoy, A., *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını*, İstanbul, Bölüm 1, 13 (2014).