

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK

OKZALİPLATİNİN DENDRİMERİK
FORMÜLASYONUNUN İN-VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hakan NAZLI

Referans no: 10289139

EDİRNE – 2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK

OKZALİPLATİNİN DENDRİMERİK
FORMÜLASYONUNUN İN-VİTRO OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hakan NAZLI

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2016/165

Tez No:

EDİRNE – 2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

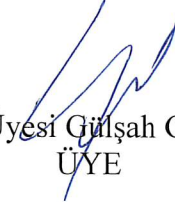
O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Hakan NAZLI tarafından tez başlığı **“Okzaliptinin Dendrimerik Formülasyonunun İn-Vitro Olarak Değerlendirilmesi”** olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 26/08/2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **“Yüksek Lisans Tezi”** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR
JÜRİ BAŞKANI




Doç. Dr. Lokman AYZ
ÜYE


Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmalarımda değerli katkıları olan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK'e, çalışma sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Esra TATAR'a, NMR spektrumlarının çekilmesindeki yardımlarından dolayı için Hakan GEDİK ve Deva İlaç A.Ş.'ye, partikül boyutu, zeta potansiyel ölçümleri ve liyofilizasyon işlemlerindeki desteklerinden dolayı Kübra KESMEZ ve Farma-tek İlaç A.Ş.'ye, laboratuvardaki arkadaşlığından ötürü Önder SARP'a, tez projesine verdikleri destekten dolayı TÜBAP'a, tüm hayatım boyunca beni destekleyen aileme, sevgili eşime ve uyuyarak beni destekleyen biricik kızıma sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
OKZALİPLATİN	3
KOLOREKTAL KANSER	13
DENDRİMERLER.....	22
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	33
BULGULAR	52
TARTIŞMA.....	80
SONUÇLAR.....	95
ÖZET.....	98
SUMMARY	100
KAYNAKLAR.....	102
ŞEKİLLER LİSTESİ	119
ÖZGEÇMİŞ	124

SİMGE VE KISALTMALAR

% BSS	: % Bağıl standart sapma
5-FU	: 5-Florourasil
AUC	: Area under curve (Eğri altı alan)
DACH	: Diaminocyclohexane (Diaminosikloheksan)
DCC	: N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (N,N'-Disikloheksilkarbodiimit)
DMAP	: 4-(Dimetilamino)piridin
DMF	: N,N-dimetilformamit
DMSO-d6	: Döteryumlanmış dimetil sülfoksit
EGF	: Epidermal growth factor (Epidermal büyüme faktörü)
EPR	: Enhanced permeability and retention (Artan geçirgenlik ve alıkonma)
FAP	: Familial adenomatous polyposis (Ailesel adenomatöz polipozis)
FDA	: Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
FK-3.5	: PAMAM G3.5 dendrimerlerin fiziksel kompleksi
FK-4.5	: PAMAM G4.5 dendrimerlerin fiziksel kompleksi
FOLFOX	: Folinik asit / 5-Florourasil / Okzaliplatin
FT-IR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
FUFA	: 5-Florourasil / Folinik asit
GX	: X. nesil (jenerasyon) dendrimer
HNPCC	: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Herediter nonpolipozik kolorektal kanser)
HPLC	: High performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)

- IC₅₀** : Half maximal inhibitory concentration
(%50 büyüme inhibisyonu sağlayan konsantrasyon)
- ICH** : International Conference of Harmonization
(Uluslararası Uyumlulaştırma Konferansı)
- KK-3.5** : PAMAM G3.5 dendrimerlerin kimyasal konjugatı
- KK-4.5** : PAMAM G4.5 dendrimerlerin kimyasal konjugatı
- LOD** : Limit of Detection (Tespit limiti)
- LOQ** : Limit of Quantification (Tayin limiti)
- MMP** : Matriks metalloproteinaz
- MTT** : 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
- NMR** : Nükleer manyetik rezonans
- PAMAM** : Poliamidoamin
- PDI** : Polidispersite indeksi
- PPI** : Polipropilenimin
- PTFE** : Politetrafloroetilen (teflon)
- UV-Vis** : Mor ötesi-görünür bölge

GİRİŞ VE AMAÇ

Okzaliplatin, sisplatin ve karboplatin kansere karşı kullanılan platinin koordinasyon kompleksi bileşiklerdir (1). Okzaliplatin üçüncü nesil bir platin bileşiği olup sisplatin ve karboplatin kullanımında görülen hücrel direncin önüne geçilmek için tasarlanmıştır (2). Okzaliplatin DNA ile çapraz bağlı kompleksler oluşturup DNA replikasyonunu engelleyerek etki gösterir (3). Okzaliplatinin ileri evre kolorektal kanserde standart 5-florourasil (5-FU) / lökoverin (FUFA) terapisinden etkili olduğu kanıtlanmış olup ayrıca sisplatin ve karboplatin tedavisinin başarısız kaldığı durumlarda da yüksek bir potansiyel gösterdiği saptanmıştır. Bunlar dışında tekrarlayan over kanseri, non-Hodgkin lenfoma, antrasiklinlere dirençli meme kanseri gibi çeşitli kanserlerde de klinik etkinliği gösterilmiştir (4).

Tüm bu etkinliğine rağmen kullanımını kısıtlayan çeşitli toksisiteler görülmüştür. Okzaliplatin tedavisine bağlı olarak iki farklı toksisite tipi belirlenmiştir. Bunlardan ilki birkaç infüzyonun ardından görülen kas krampları ve spazmlar ile karakterize geçici akut sendromdur. İkincisi, hastanın normal hayatını etkileyen duyu bozuklukları, ekstremitelerde görülen parastezi, kas koordinasyon bozuklukları gibi doz kısıtlayıcı nöropatilerdir (5). Okzaliplatinin neden olduğu bu nörotoksisite ve nöropatilerin nedeni hiperoksidabiliteye ve dorsal kök ganglionunun zarar görmesi sonucu periferik sinirlerde aksonal bozuklukların oluşmasına bağlıdır (6).

Okzaliplatin gibi antikanser ilaçların taşıyıcı bazlı sistemlerle verilmesi, ilaç etkinliğini artırması, yan etkileri azaltması ve hücrel direncin gelişmesini önlemesi nedeniyle dikkat çekmektedir (7). Daha önce yapılan çalışmalarda farklı farmasötik

şekillerde ve farklı etkin maddeler ile kombine şekilde hazırlandıklarında platin türevi sitotoksik ilaçların yan etkilerinde değişiklikler olduğu gösterilmiştir (8). Lipozomal cisplatin (Lipoplatin) ve lipozomal okzaliplatin (Lipoxal) klinik deneme aşamasına gelen ve umut vadeden partiküler taşıyıcı sistemlerden bazılarıdır. Lipozomlar dışında miseller, nanokapsül ve mikrokapsül yapıları, karbon nanotüpler, polimerik konjugatlar ve dendrimerler de taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilir (4).

Dendrimerler nano boyutlu, dallanmış yapıda, sentetik polimerlerden oluşan biyolojik yapıyı taklit eden, tanılama ve tedavi alanında umut vadeden özelliklere sahip olan üç boyutlu moleküllerdir (9). Klasik polimerlerin aksine, merkezi çekirdek etrafında uzun ya da spiral şeklinde dallanmalar gösteren, düşük polidispersiteye sahip üç boyutlu bir yapıya sahiptirler. Çekirdekteki fonksiyonel gruplar üzerine dallanma yoluyla oluşan bu moleküllere, çekirdek yapısının veya dış yüzeye eklenen fonksiyonel grupların değiştirilmesi ile arzu edilen şekil ve özellik verilebilmektedir. Dendrimerlerin istenilen şekilde tasarlanabilmeleri onlara tıp alanında geniş bir uygulama alanı sağlamıştır (10,11).

Bu tez çalışmasında okzaliplatin türevi çeşitli dendrimerik farmasötik formülasyonların hazırlanması, hazırlanan formülasyonların karakterizasyonlarının yapılması ayrıca HT-29 hücre hattında *in vitro* etkinlik çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

OKZALİPLATİN

Platin türevi bileşiklerin anti-proliferatif özellikleri ilk olarak 1960'larda gözlemlendi. Kanser kemoterapisinde kullanılan ilk platin bileşiği olan sisplatin, 1978 yılında kullanıma sunulmuş ve en başarılı kanser ilaçları arasına girmiştir. Rutin kulanımdaki başarısına rağmen, sisplatinle birinci basamak tedaviye yanıt vermeyen veya direnç görülen hastalarda başarısı oldukça düşük kalmıştır. Sisplatin geliştirme çabası içinde birçok farklı platin analogu sentezlenmiştir (12). Örneğin, karboplatin tedavide kullanılan ikinci nesil bir platin bileşiğidir. Karboplatinin kullanımı ile elde edilen ana klinik başarı, sisplatin ile karşılaştırıldığında görülen nefrotoksisitenin azalmasıdır. Ancak ortaya çıkan miyelotoksisite ve karboplatinin de sisplatin kaynaklı direncin üstesinden gelememesi (çapraz direnç) arayışların devam etmesine neden olmuştur (13). Çalışmaların devamında sentezlenen analoglardan biri olan okzaliplatin ilk olarak 1970'lerin sonlarında sisplatinin amin gruplarına bir diaminosikloheksan (DACH) halkası bağlanmasıyla elde edilmiştir (12).

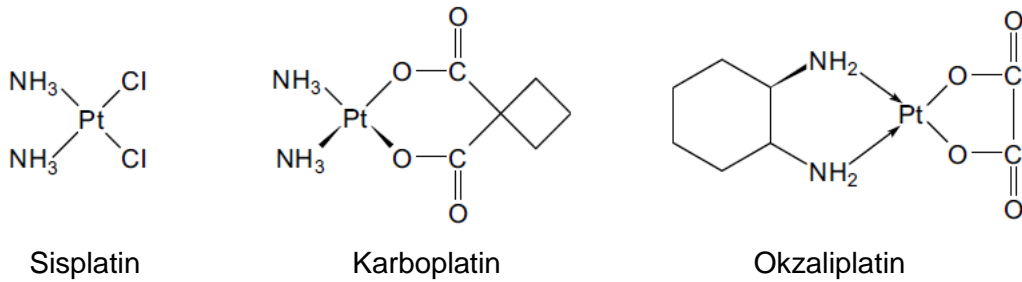
Okzaliplatin, sisplatin ve karboplatin benzeri bir platin (II) analogudur. Metastatik kolorektal kanserlerde kullanılmak üzere ilk olarak 1999 şubatında yeni ilaç başvurusu (NDA) Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kabul edilmiştir (14). DACH-platin türevi olan okzaliplatin diğer platin türevlerine benzer etki mekanizmasına sahiptir. Ancak antitümör aktivitesi sisplatin ve karboplatin gibi diğer platin türevlerinden farklılık gösterir. Örneğin, okzaliplatinin sisplatinine dirençli kolon karsinomu hücre hatlarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir (15,16).

Sisplatin, karboplatin ve okzaliplatin dünya çapında kabul görmüş ve kullanılmakta olan platin bileşikleridir. Bunlar dışında dünyanın çeşitli ülkelerinde bölgesel onay almış nedaplatin (Japonya), lobaplatin (Çin), heptaplatin (Güney Kore) ve halen geliştirilmekte olan ve faz çalışmaları devam eden pikoplatin, satraplatin (Pt^{+4}) gibi platin türevleri de mevcuttur. Özellikle dördüncü kuşak platin bileşikleri olarak da adlandırılan oktahedral yapılu platin (IV) bileşikleri, daha az reaktif olmaları ve oral uygulamaya platin (II) türevlerinden daha uygun olmaları nedeniyle ilgi çekmektedirler (4).

Kimyasal ve Fiziksel Özellikler

Dünya çapında klinik kullanımda olan platin bileşikleri (sisplatin, karboplatin, okzaliplatin), aynı zamanda klasik platin kompleksleri olarak da adlandırılırlar. Bunlar +2 oksidasyon durumunda (Pt^{+2}), cis-yapılandırılmış, yüklenmemiş, kare düzlemsel kompleksler olup Şekil 1'de gösterilmişlerdir. Bunları tarif eden genel formül, cis-[A_2PtX_2]'dir. Burada A_2 , azot donörü iki monodentat veya bir bidentat ligandı, X_2 ise iki monodentat veya bir bidentat anyonik ligandları temsil eder. A_2 kısmının değişimi yapısal olarak farklı DNA-ilaç komplekslerinin oluşumu ile sonuçlanır ve bu durum oluşan komplekslerin antikanser aktivitesini değiştirir. X_2 grubu ise oluşan komplekslerin vücuttaki dağılımını ve böylece yan etkilerini etkiler (4).

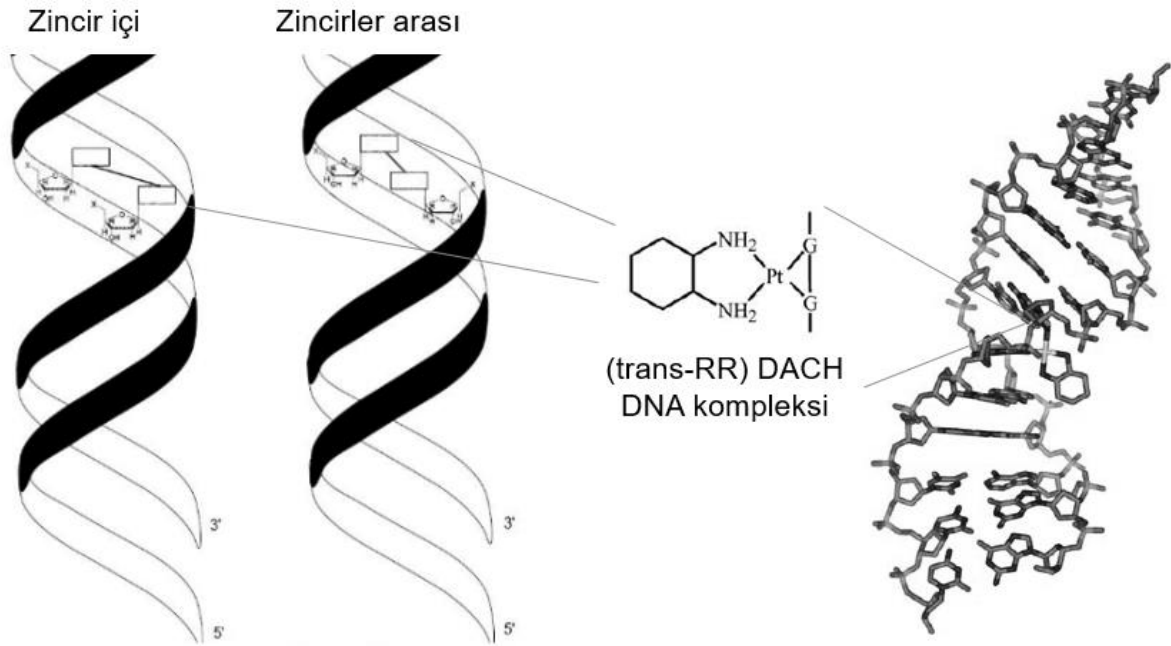
Okzaliplatin ($C_8H_{14}N_2O_4Pt$), sisplatin ve karboplatine karşı görülen hücrel direncin üstesinden gelmek için tasarlanmıştır. Kimyasal isimlendirilmesi (*cis*-[(1*R*,2*R*)-1,2-sikloheksandiamin-*N,N*9] okzalato (2-)-*O,O*9] platin olan okzaliplatinin kimyasal yapısı, azot atomlarına sikloheksan halkasının bağlanmasıyla sisplatin veya karboplatininkinden farklılık göstermektedir. Okzaliplatin molekül ağırlığı 397,3 g/mol olan beyaz/beyazımsı kristal yapılu bir tozdur. Suda az (20°C'de 6-7g/L), metanolde çok az çözünür (20°C'de 0,125g/L), etanol veya asetonda ise neredeyse hiç çözünmez (17). pKa değeri 6,1'dir (18).



Şekil 1. Klasik platin kompleksleri (17)

Etki Mekanizması

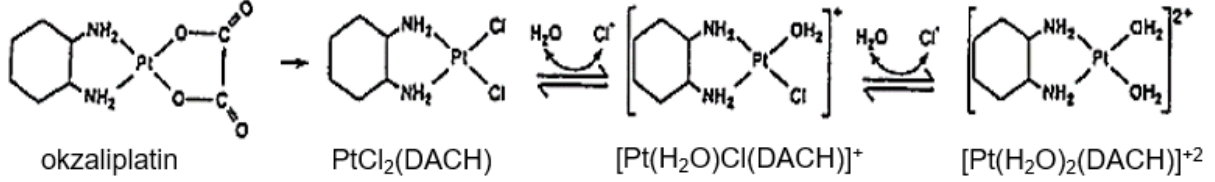
Okzaliplatinin kesin etki mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte platin bileşiklerinin sitotoksitesinin DNA sentezinin inhibisyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sitotoksiteden sorumlu ana lezyonlar, aktif platin bileşikleri ve spesifik baz sekansları arasında oluşan zincir içi (intrastrand) çapraz bağlantılardır. Bu çapraz bağlantılar özellikle bitişik iki guanin bazı veya bitişik guanin-adenin bazıları arasındadır. Zincirler arası (interstrand) çapraz bağlantılar da oluşabilir, ancak bunlar toplam platin-DNA komplekslerinin %5'inden azını oluştururlar (19). DNA ve okzaliplatin arasında oluşan çapraz bağlantıların yaklaşık %60-65'i zincir içi guanin-guanin, %25-30'u zincir içi adenin-guanin bağlantılarıdır (20). Oluşabilen çapraz bağlantılar Şekil 2'de gösterilmişlerdir. Ek olarak apoptoz yolağının aktivasyonu da açıklanan bu etki mekanizmasına katkıda bulunabilir (19).



Şekil 2. Zincir içi ve zincirler arası oluşan çapraz bağlantılar (20,21)

Okzaliplatin fizyolojik ortamda HCO_3^- (bikarbonat) ve H_2PO_4^- (dihidrojen fosfat) anyonları ile etkileşerek aktif platin bileşiğine dönüşür. Aktive olmuş platin bileşiği hücre içine girdiğinde, bir klorür iyonu bu bileşikten ayrılarak tek sulu bir klor kompleksinin (monoakuamonokloro kompleksi) oluşmasına neden olur. Bu kompleks DNA üzerindeki N-7 pozisyonundaki guanin ile hızlı bir şekilde reaksiyona girer. Monokloro kompleksinden bir klorun daha ayrılmasıyla çift sulu kompleks oluşur.

Okzaliplatinin çift sulu kompleksin oluşumu Şekil 3'te gösterilmiştir. Bu olayla geçici olarak oluşan ve DNA ile tek noktadan bağlı komplekslerin daha stabil iki noktadan bağlı komplekslere dönüşümü gerçekleşir (2).



Şekil 3. Okzaliplatinin aktif platin bileşiklerine dönüşüm süreci (2,22)

DNA ile etkileşme bölgeleri sisplatin, karboplatin ve okzaliplatin için aynı olsa da etkileşme kinetiği platin grubunu taşıyan ligandların kimyasına büyük oranda bağlıdır. Okzaliplatinin DNA ile bağlanması *in vitro* olarak yaklaşık 15 dakika sürmektedir. Bu süre sisplatinin bağlanma süresine göre daha uzundur. Bu durumun nedeninin DACH kompleksinin N-Pt-N bağı olduğu düşünülmektedir (13). Bu bağ hareketlilik açısından sisplatin ve karboplatinin komplekslerinin bağına göre daha kısıtlı bir yapıya sahiptir (2). Okzaliplatinin oluşturduğu DACH-Pt kompleksi, hem sisplatinin hem de karboplatinin oluşturduğu cis-diamino-Pt kompleksinden daha hacimli bir hidrofobik bölge oluşturur. Bunun sonucunda okzaliplatin cis-diamino-Pt kompleksinden daha yüksek sitotoksosite ile sonuçlanan, daha etkin bir DNA sentez inhibisyonuna neden olur (13). Ek olarak bu hacimli kompleksler çeşitli konformasyonel sorunlar da yaratarak DNA tamirinden sorumlu yanlış eşleşme tamir (mismatch repair) proteinlerinin bölgeye bağlanıp, DNA tamir mekanizmasının başlatılmasına engel olurlar (2).

Okzaliplatine Karşı Direnç Gelişimi

Okzaliplatine karşı gelişen direnç, okzaliplatinin hücrel etkileşimleri ile açıklanabilmektedir. Okzaliplatin direncine neden olan çeşitli mekanizmalar Tablo 1'de özetlenmiştir. Şekil 4'te ise hücrel etkileşim bölgeleri ve olası direnç mekanizmaları gösterilmiştir (23).

Tablo 1. Okzalipatin direncine neden olan çeşitli mekanizmalar (24)

Hücre sel transport mekanizmasının değişmesi ile	ATP7A/B miktarının artması
	OCT2 miktarının artması
	Na ⁺ /K ⁺ ATPaz miktarının artması
	ABC taşıyıcılarının (MDR) miktarının artması
Detoksifikasyon yolağı ile	Hücre içi GSH miktarının artması
DNA tamir mekanizması yolağı ile	DNA eksizyon tamir proteinlerinin (ERCC1, ERCC2 (XPD) ve ERCC4 (XPF) miktarının artması
	DNA polimerazların (β, η, ζ, REV1) miktarının artması
	Survivin gibi endojen apoptoz inhibitörlerinin miktarının artması
Hücre ölüm mekanizmasının değişmesi ile	Proapoptotik proteinlerin miktarının (Bax) azalması veya antiapoptotik proteinlerin miktarının artması (Bcl-2)
	p53 tümör baskılayıcı proteinin mutasyonu veya miktarının azalması
	miR-153, -203, -143 gibi miRNA'ların miktarının artması
Epigenetik değişiklikler ile	SRBC geni metilasyonuna (SRBC inaktivasyonu) bağlı olarak BRCA1 gibi proteinlerin miktarının artması

ATP7A ve ATP7B: P-tipi ATPaz A ve B.

OCT: Organik katyon taşıyıcıları.

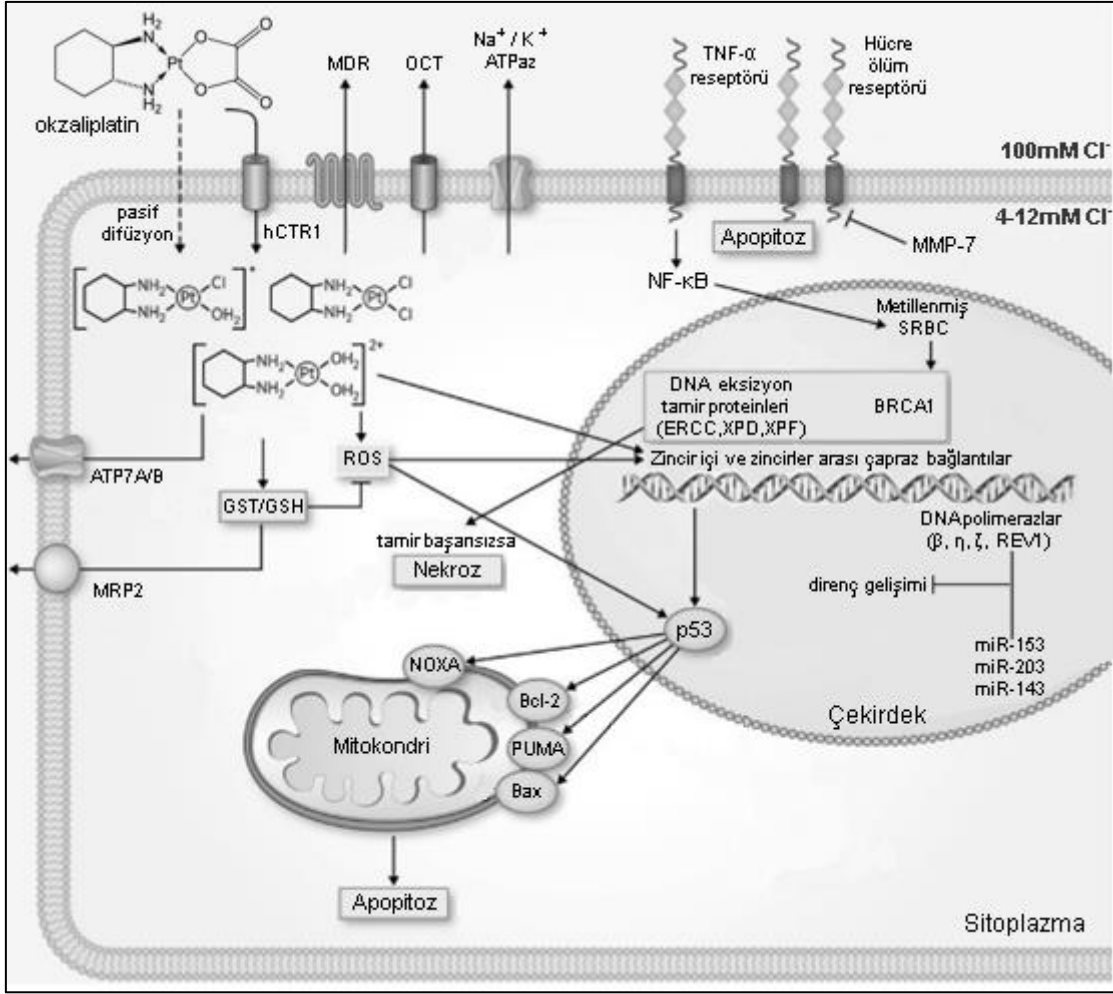
MDR ve MRP: Çoklu ilaç direncine neden olan dışa atım pompaları.

GSH: Glutatyon.

ERCC1-2-4: excision repair cross-complementing group 1-2-4.

hCTR1: Bakır taşıyıcı kanallar.

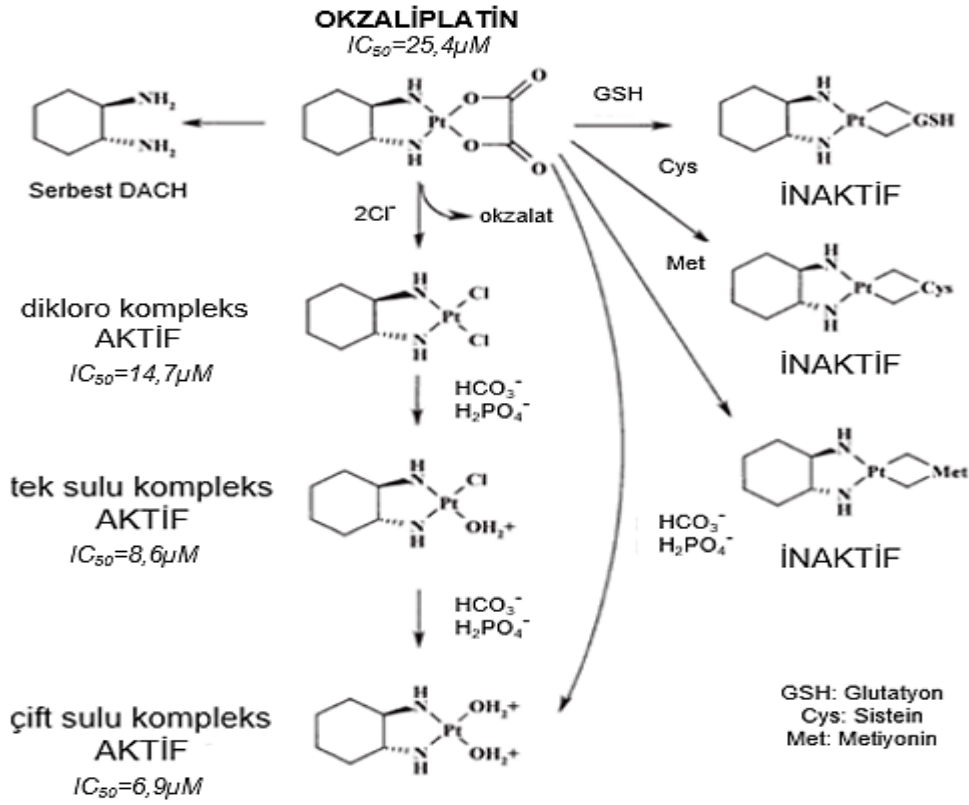
BRCA: meme kanseri duyarlılık geni.



Şekil 4. Okzaliplatinin hüresel etkileşimleri ve olası direnç mekanizmaları (24)

Biyotransformasyon ve Farmakokinetik Özellikler

Okzaliplatin, çeşitli reaktif platin ara maddeleri oluşturmak için hızlıca nonenzimatik biyotransformasyona uğrar. Oluşan ara maddeler plazma proteinlerine ve eritrositlere hızlı ve yaygın olarak bağlanır (19). Biyotransformasyon sonucu oluşan aktif ve inaktif metabolitler Şekil 5'te gösterilmektedir.



Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonlar (IC_{50}) HT-29 hücre hattı için *in vitro* verilerdir.

Şekil 5. Okzaliplatinin aktif ve inaktif metabolitleri (13,23)

Okzaliplatin uygulamasından sonra plazmadaki bağlanmamış platinin farmakokinetiği, başlangıçta kısa α ve β dağılım fazı ve uzun bir terminal γ eliminasyon fazı ile karakterize edilir. Eliminasyonda ana yol üriner atılım (%53,8 \pm 9,1) olup, platinin çok az miktarı ise (%2,1 \pm 1,9) feçesle atılır. Rutin kullanım dozları olan 2 haftada bir 85mg/m² veya 3 haftada bir 130mg/m² dozlarda uygulandığında plazmada herhangi bir platin birikimi gözlenmemiştir. Okzaliplatin 20-180mg/m² doz aralığında doza bağımlı bir farmakokinetik gösterir. İnsan karaciğer mikrozomal ekstraktları ile yapılan okzaliplatin metabolizmasını araştırmaya yönelik çalışmalar, okzaliplatinin *in vitro* olarak CYP450 için bir substrat olmadığını göstermiştir (23).

Kan plazmasının ultrafiltratından elde edilen pik konsantrasyonu (C_{max}), eğri altı alan (AUC), üç eliminasyon fazı için yarılanma ömürler ($t_{1/2}$), sanal dağılım hacmi (V_d), klirens (Cl) gibi okzaliplatinin kritik farmakokinetik parametreleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Okzaliplatinin kritik farmakokinetik parametreleri (23)

Farmakokinetik		Uygulanan Doz	
Parametre ve Birim		85mg/m ²	130mg/m ²
C_{max}	(µg/mL)	0,681 ± 0,077	1,21 ± 0,1
AUC₍₀₋₄₈₎	(µg.sa/mL)	4,190 ± 0,647	8,20 ± 2,4
AUC_(0-∞)	(µg.sa/mL)	4,250 ± 1,180	11,90 ± 4,6
t_{1/2-α}	(sa)	0,43	0,28
t_{1/2-β}	(sa)	16,8	16,3
t_{1/2-γ}	(sa)	391	273
Vd	(L)	349 ± 132	812 ± 369
Cl	(L/sa)	18,5 ± 4,71	10,1 ± 3,07

Kullanılan Kanserler ve Uygulama Şekli

Okzaliplatinin klinikteki kullanımında odak noktası metastatik kolorektal kanserdir. Bununla birlikte, ileri over kanserinin tedavisi için birinci ve ikinci basamak tedavi olarak okzaliplatinin kullanılabilirliği klinik çalışmalar ile araştırılmaktadır. Ayrıca bu ilacın, non-Hodgkin lenfoma, meme kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun kanseri, mezotelyoma ve skuamöz hücreli karsinom gibi diğer malignitelerdeki aktivitesi de araştırılmaktadır (19). Okzaliplatin klinikte kolorektal kanserlerde 5-FU ve kalsiyum folinat (lökoverinin kalsiyum tuzu) ile birlikte kombine olarak kullanılır. 5-FU bir pirimidin antagonisti olup ve okzaliplatinle birlikte sinerjist bir etki elde etmek için kullanılır. Kalsiyum folinat ise 5-FU ile kullanıldığında antineoplastik aktivitenin güçlendiği görülmüştür (25).

Uygulama sırasında 0,2-0,7mg/mL arasında bir konsantrasyona ulaşmak için 250-500mL %5'lik dekstroz çözeltisi ile seyreltme yapılmalıdır. Seyreltme çözeltisi olarak %0,9'luk NaCl veya diğer elektrolit çözeltileri kullanılmamalıdır. Seyreltilmiş çözelti 2-6 saatte intravenöz infüzyon şeklinde hastaya verilir. Okzaliplatin temelli örnek bir kemoterapi rejimi olan FOLFOX4 Şekil 6'da gösterilmiştir (16).

**Şekil 6. FOLFOX4 kemoterapi rejimi (16)**

Yan Etkiler

Okzaliplatin kullanımına bağlı olarak görülen klinik toksisite diğer platin grubu ilaçlardan farklılık gösterir. Diğer platin türevi ilaçlarda görülen nefrotoksisite ve hematotoksisite okzaliplatinde minimum düzeydedir (16). Okzaliplatin, vakaların %90'ında hızlı bir şekilde, geri dönüşümlü akut bir nöropatiye neden olur. Nörotoksisite, aslında platin içeren tüm antineoplastik ajanlara özgü bir yan etkidir. Üçüncü nesil platin bileşiklerinden okzaliplatinde bu etki genellikle tolere edilebilirken, örneğin, tetraplatin şiddetli nörotoksik etkileri nedeniyle piyasadan çekilmek zorunda kalmıştır. Karboplatin alan hastalarda belirgin bir nörotoksisite genellikle gözlenmez, fakat bunun nedeni karboplatinin hematolojik toksisitesinin dozu sınırlayıcı etki göstermesindedir (5).

Akut nöropatiler infüzyon sırasında veya infüzyon sonrasında kısa sürede ortaya çıkan el, ayak ve peroral bölgede parestezi ve dizestezi ile karakterizedir. Bununla beraber daha az sıklıkla olsa da kümülatif distal nöropatiye de sebep olabilir. Duyusal ataksi, fonksiyonel bozukluklar, çene ağrısı, göz ağrısı, ptozis, bacak krampları ve görüşün veya sesin değişimi gibi olaylar görülebilir (6). Kümülatif okzaliplatine bağlı görülen nöropatiler dört veya daha fazla siklus boyunca toplam 540mg/m² veya daha fazla doz alan tüm hastaları etkiler. Geri dönüşümlü nöropatiler hastaların %82'sinde 4-6 ay içinde gerilerken, %41'inde 6-8 ay içinde tamamen iyileşme görülür (26). Okzaliplatinin neden olduğu duyuşal-motor nöropatinin sebebi ana olarak hiperekziteyeye bağlıdır (6).

Okzaliplatine bağlı periferik nöropati ilacın duyuşal, motor nöronlardaki veya kaslardaki etkisinin bir sonucu iken, kümülatif kronik distal nörotoksisite dorsal kök gangliyonlarındaki nöronların hasarına bağlıdır (27).

Okzaliplatin tedavisi sırasında nöropatik yan etkilerden korumak için hastalara ek olarak amifostin (sitoprotektif), α-lipoik asit (antioksidan), glutatyon (antioksidan), kalsiyum-magnezyum iyonları (okzalat şelatörü), karbamazepin, okskarbazepin, topiramet, gabapentin (antiepileptik) gibi ilaçlar nöroprotektif özelliklerinden faydalanmak için verilmiş ve klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ancak bu konudaki tartışmalar halen devam etmektedir (27).

Görülen diğer yan etkiler çeşitli hematolojik yan etkiler, gastrointestinal rahatsızlıklar ve çeşitli allerjilerdir. Hematolojik yan etkiler seyrek olarak görülen şiddeti düşük anemi, trombositopeni, nötropenidir. Şiddetli olmadıklarından bunlar çoğu

zaman yönetilebilir olgulardır. Bulantı ve kusma diğer çoğu kemoterapötik ajanda da sıklıkla görülen gastrointestinal yan etkilerdir. Okzaliplatine bağlı olarak görülen bulantı ve kusma hafif-orta şiddettedir ve tedavi öncesi premedikasyon olarak verilen 5-hidroksitriptamin (5HT₃) reseptör antagonistleri ile kolaylıkla üstesinden gelinebilmektedir. Okzaliplatine karşı oluşabilecek alerjik reaksiyonlar, tıpkı bulantı ve kusmada olduğu gibi premedikasyon olarak verilen antihistaminikler ve glukokortikoidler ile önlenabilirler. 5-FU ile birlikte kullanıldıklarında bile olsa, alopesi görülme olasılığının düşük olması ise hastaların yaşam kalitesi için önemli bir avantajdır (5).

Türkiye Piyasasındaki Müstahzarları

2019 yılı itibariyle Türkiye’de okzaliplatin etkin maddesi içeren 32 ruhsatlı müstahzar bulunmaktadır. Bunlar 50mg/10mL, 100mg/20mL, 150mg/30mL, 200mg/40mL olacak şekilde konsantre çözelti içeren veya 50mg ve 100mg liyofilize toz içeren flakonlar halinde satışa sunulmuşlardır (28).

Tablo 3. Okzaliplatinin Türkiye piyasasındaki müstahzarları (28)

Müstahzar İsmi	Üretici	Orjinal / Jenerik
Curatinox	TEVA	Jenerik
Eloxatin	Sanofi	Orjinal
Linoxa	Mustafa Nevzat	Jenerik
Oxaliplatin Hospira	ORNA	Jenerik
Oxalidem	DEM İlaç	Jenerik
Oxalpin	DEVA	Jenerik
Oxatu	ONKO	Jenerik
Oxebewe	Sandoz	Jenerik
Platoxatin	DEM İlaç	Jenerik
Ploxal	KOÇAK	Jenerik

KOLOREKTAL KANSER

Kolorektal kanser, hem edinilmiş genetik hem de epigenetik değişikliklerin birikmesinden kaynaklanan, normal kalın barsak epitelinin invaziv adenokarsinoma dönüşmesiyle sonuçlanan bir hastalıktır (29). Görülen vakaların çoğunluğu rasgele olarak, mevcut olan adenomatöz polip olarak adlandırılan lezyonlardan gelişir. Kolonda lokalize kanserlerin %54'ü Dukes sınıflandırmasına göre A veya B sınıfındadır. Geri kalan %46'sı lenf nodlarına veya uzak organlara metastaz gösterir ve C veya D sınıfı olarak değerlendirilir. Dukes sınıflandırmasına göre A veya B sınıfındaki hastaların %75-90 gibi yüksek bir kısmı uzun süreli sağ kalım oranına sahiptir. Bu oran lenf nodu yayılımı olan C sınıfındaki hastalarda %40-50 arasındadır. Metastazik hastalığa sahip olan D sınıfı hastalar ortalama olarak sadece 1 sene hayatta kalabilirler. Bu gruptaki hastaların sadece %4 gibi düşük bir kısmı 5 yıl hayatta kalabilmektedir (30).

Metastatik kolorektal kanserde setuksimab ve panitumumab gibi biyolojik ajanlarla kombine edilen floropirimidin artı okzaliptatin veya irinotekan bazlı çoklu kemoterapi tedavide altın standarttır (31).

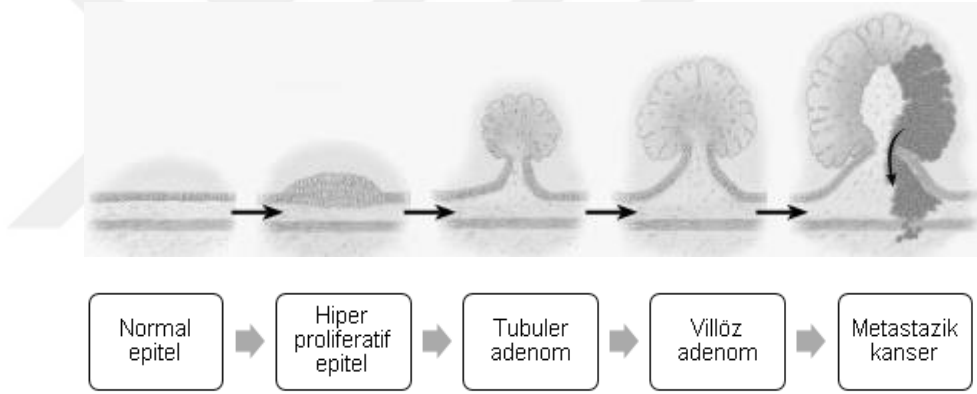
Epidemiyoloji

Kolorektal kanser dünya çapında en sık görülen dördüncü kanser tipi olup, kanserden ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır (31,32). Dünyanın farklı yerlerinde kolorektal kanserin görülme yaygınlığı farklılık göstermektedir. Örneğin kuzey Amerika, kuzey, güney ve batı Avrupa ülkeleri, Avustralya ve Yeni Zelanda'yı kapsayan gelişmiş ülkelerde görülen tüm kanser vakalarının %12,6'sını oluştururken, dünyanın geri kalan bölgelerinde aynı oran yaklaşık %7,8'dir. Kolorektal kanser kadın ve erkekleri eşit oranda etkilemektedir (32). Bazı epidemiyolojik çalışmalar, sigara içmek, aşırı alkol tüketimi, yağ oranı yüksek veya lif oranı düşük gıdalarla beslenmenin kolon kanserine yakalanma riskini artırdığı göstermiştir (33). Hastalığın görülme sıklığı etnik ve ırksal farklılıklardan çok çevresel etkenlere bağlılık göstermektedir. Örneğin yapılan bir çalışmada Amerika'ya göç etmiş Japonlar'da kolorektal kanser görülme sıklığının Japonya'da yaşayanlardan 3-4 kat fazla olduğu görülmüştür. Bu durum beslenme alışkanlıklarının ve günlük yaşam rutinlerinin hastalığın görülmesinde kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir (32).

Patogenez

Kolorektal kanserin patogenezi çok karmaşık ve çeşitlidir. Bazıları diyet ve yaşam tarzıyla ilgili olan birçok faktörden etkilenirken, diğerleri genetik yatkınlıkla ilişkilidir. Crohn hastalığı veya ülseratif kolit gibi kronik enflamatuvar barsak hastalıklarının olması diğer bir risk faktörüdür (33,34).

Kolorektal kanserlerin çoğu önceden var olan adenomatöz poliplerde veya adenomlarda ortaya çıkar (Şekil 7). Bu lezyonlar oldukça yaygın olup, semptomsuz popülasyonlarda gerçek insidansı belirtmek zordur. Ancak otopsi çalışmalarında Avrupa ve ABD'de yaklaşık %35, Asya ve Afrika'da ise %10-15 oranında görüldüğünü göstermiştir. Adenomlar histolojik yapılarına göre tubuler, tubulovillöz veya villöz olarak sınıflandırılır. En yüksek malignite riski villöz adenomlarda görülmektedir. Adenomatöz poliplerin yaklaşık olarak %5'i 5-10 yıl içerisinde malign bir yapıya dönüşmektedir (35).



Şekil 7. Kolorektal kanserin oluşum evreleri (36)

Kalıtsal Yatkınlık

Kolorektal kanserde iki ana kalıtsal yatkınlık durumu vardır. Bunlar ailevi adenomatöz polipozis (FAP) ve aynı zamanda Lynch sendromu olarak da bilinen kalıtsal non-polipozik kolorektal kanserdir (HNPCC). FAP HNPCC'den daha seyrek görülür. Görülen vakaların çoğunluğunu oluşturan diğer klinik vakalar ise sporadik (düzensiz) kolorektal kanser olarak isimlendirilir (37).

- a) Adenomatöz polipozis (FAP):** FAP, bireyin kolonunda 20 ila 30'lu yaşları boyunca çoklu adenomatöz poliplerin oluşması sonucu görülen otozomal dominant bir hastalıktır. Oluşan polipler histolojik olarak sporadik kolorektal kanserlerle aynı yapıya sahiptir. Tekil olarak her birinin ayrı ayrı malign

transformasyon riski az olsa da, bazı hastalarda binlerce adete ulaşabilen polipler kolorektal kanser ihtimalinin 40'lı yaşlara gelindiğinde neredeyse %100 olacağı anlamına gelir (35).

b) Kalıtsal non-polipozik kolorektal kanseri (HNPCC): HNPCC, FAP'ta görülenin aksine polipozisten yoksun olarak kolorektal kansere otozomal dominant yatkınlık anlamına gelir. HNPCC'nin kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %6'sını oluşturduğu düşünülmektedir. HNPCC'nin klinik özellikleri diğer tümörlerle (endometriyum, over, hepatobiliyer sistem, deri) oldukça ilişkilidir. Örneğin, hastaların %50-80'inde endometriyal kanser görülür. HNPCC tipi kolon kanserleri için prognoz sporadik kolon kanserinden genellikle daha iyidir (35).

c) Sporadik (düzensiz) kolorektal kanser: Sporadik kolorektal kanserin, bir hücrenin tam malign transformasyona maruz kalması için onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesi dahil olmak üzere dört veya beş hücrenel kusurun bir araya gelmesi ile oluştuğu düşünülmektedir (35).

Kolorektal Kanserde Moleküler Yolaklar

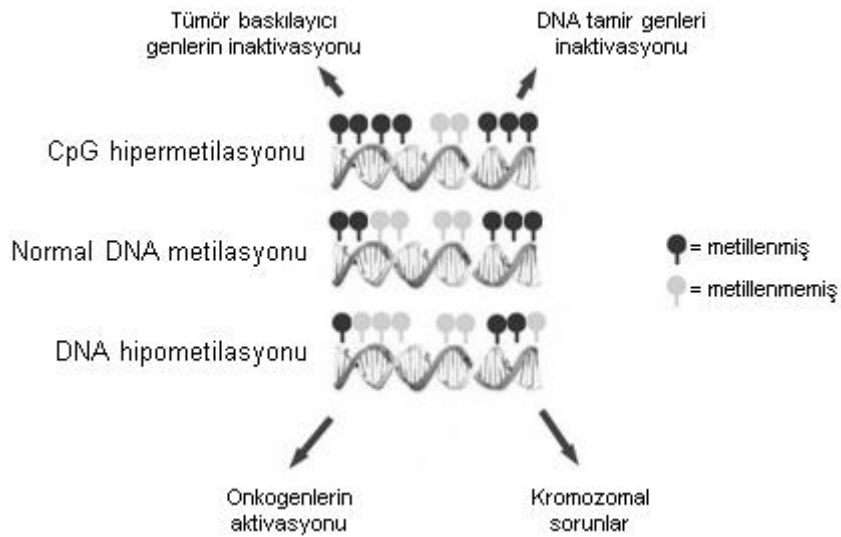
Tümörler eskiden çeşitli klinik veya patolojik özelliklerine göre sınıflandırılırlardı. Ancak günümüzde imkanlar tümörlerin moleküler özelliklerine göre sınıflandırılmasını mümkün kılmaktadır. Moleküler yolakların aydınlatılması, tümörün oluşma mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağladığından oldukça önemlidir (38). Kolorektal kanserlerin büyük çoğunluğu kromozomal veya mikrosatelit sorunları, DNA metilasyon anormalitesi, histon modifikasyonları, p53, *KRAS* ve β -katenin gibi hücrenel moleküllerin mutasyonu gibi genetik ve epigenetik anormalliklere sahiptir (39).

a) Kromozomal sorunlar: Kromozomal sorunlar en yaygın görülen ve bunun sonucu olarak en iyi karakterize edilmiş kolorektal kanser yolağıdır. Mitozu kontrol eden protein veya genlerde bir mutasyon oluşması sonucunda kromozomal dengesizlikler meydana gelir (33). Mutasyonlar sonucunda tümör baskılayıcı genlerin miktarında azalma ve onkogenlerin sayısında

artış meydana gelir (38). FAP'ta görülen tümör baskılayıcı bir gen olan APC geninin mutasyonu buna bir örnek olarak gösterilebilir (33).

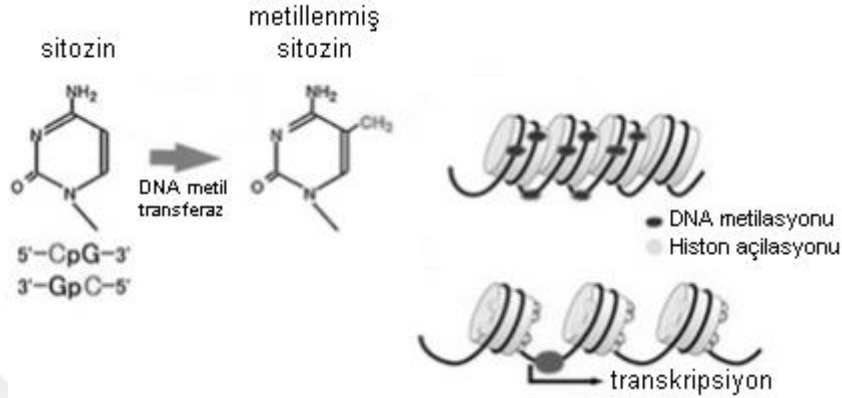
b) Mikrosatelit sorunları: Mikrosatelit dengesizliği, mikrosatelit denilen kısa nükleotit tekrar dizilerinin uzunluklarının değişmesine verilen isimdir. Bu durum çeşitli tümör baskılayıcı genlerin kodlanmasında mutasyonlara neden olur (38). Mikrosatelit sorunlarının arkasında yatan neden DNA yanlış eşleşme tamir sistemindeki (mismatch repair system) sorunlardır. Sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %15'inde ve HNPCC'lerin ise %95'inden fazlasında mikrosatelit sorunları görülmektedir (33).

c) Anormal DNA metilasyonu: DNA metilasyonu, bir metil grubunun DNA metiltransferazlar tarafından sitozinin 5' pozisyonuna enzimatik olarak eklenmesini ifade eder. Sitozin-guanin dinükleotitleri (CpG) CpG adaları haricinde normal memeli hücrelerinde metillenmiş halde bulunur. CpG adaları, genlerin %60-70'inin promotor bölgesiyle örtüşür ve metilasyondan korunma eğilimindedir (29). Kolon kanser hücrelerinde DNA genelinde bir hipometilasyon bunun yanında CpG adalarında ise hipermetilasyon görülür. DNA'da görülen bu metilasyon anomalisi tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına neden olup kanser oluşumuna olanak sağlar (39). Kolorektal kanserlerin yaklaşık %20'sinde anormal DNA metilasyonu görülür (29). Anormal DNA metilasyonu tipleri Şekil 8'de gösterilmiştir.



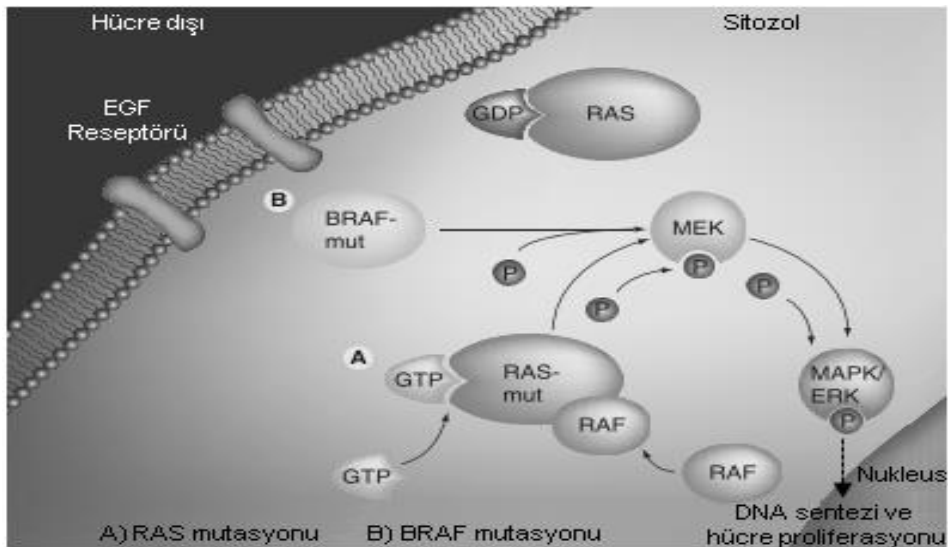
Şekil 8. Anormal DNA metilasyon tipleri (40)

d) **Histon modifikasyonu:** Histon proteinleri DNA paketleme üniteleri ve transkripsiyon regülatörleri olarak işlev görür. Histonlardaki fosforilasyon, asetilasyon, metilasyon gibi kimyasal değişiklikler (Şekil 9) genlerin ifade edilmesini etkiler. Anormal DNA metilasyonu ile birlikte histon modifikasyonları tümör baskılayıcı genlerin susturulmasında rol oynar (39).



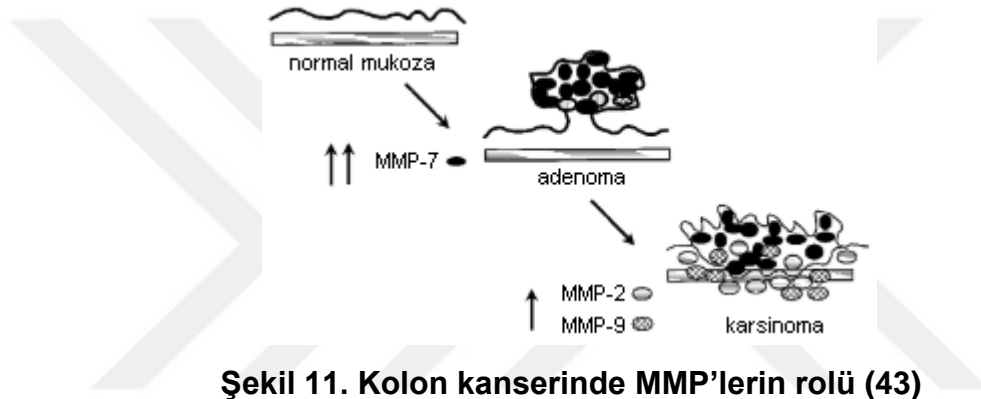
Şekil 9. Metillenmiş ve asetillenmiş histon yapısı (40)

e) **Diğer hücresel molekül mutasyonları:** *KRAS* hücre sinyalizasyonunda anahtar olarak işlev gören bir gen olup, normal olarak çalıştığında, hücre çoğalmasını kontrol eder. Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolunu etkinleştirmek için *BRAF*a sinyal gönderir (Şekil 10) (29). Kolorektal kanserlerin yaklaşık olarak %36'sında *KRAS*, %10'unda ise *BRAF* genlerinde mutasyon görülür (41). Mutasyonlar MAPK sinyal yolağının anormal şekilde aktive olmasına ve hücre proliferasyonuna neden olur, apoptozu baskılar (29).



Şekil 10. Hücre sinyalizasyonunda *KRAS* ve *BRAF* yolları (42)

Kolorektal kanserde içerinde p53'ünde bulunduğu birçok genin silinmesi veya susturulmasına ek olarak matriks metalloproteinazlardaki (MMP) değişiklikler de poliplerin oluşmasına katkı sağlar. MMP'ler genellikle proteoglikanları ve matriks glikoproteinlerini yıkarak ekstraselüler matriksin yeniden biçimlendirilmesini sağlarlar. Bu olay doku büyümesi için son derece normal bir durumken, kanser oluşum sürecinde ekstraselüler matriksin kontrolsüz yıkımı kanser hücresi için avantaj sağlar. Bu nedenle, MMP'lerin aşırı sentezi, kanser hücresinin çoğalıp metastaz yapabildiği sürecin bir parçası olabilir (şekil 11). MMP-2 (jelatinaz-A), MMP-7 (matrilisin) ve MMP-9 (jelatinaz-B) kolorektal kanserlerle en ilişkili MMP'lerdir (43).



şekil 11. Kolon kanserinde MMP'lerin rolü (43)

Özellikle kronik enflamatuar barsak hastalıklarında yapısal olarak aktive olmuş NF-κB yolağının bu hastalarda kolorektal kanserin de görülme riskini artırdığı gösterilmiştir. NF-κB aktivasyonu anti-apoptotik proteinlerin miktarının artmasına neden olarak hücresel dönüşümü tetikleyebilir, proliferasyona aracılık edebilir veya malign hücrelerin ortadan kaldırılmasını önleyebilir (44).

Erken Tanılama ve Korunma Yöntemleri

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi kolon kanserinde de hastalık gerçekleştiğinde ne kadar erken bir patolojik aşamada tespit edilirse iyileşme olasılığı o kadar artmaktadır. Erken tanı için yapılan taramalar çerçevesinde periyodik olarak feçeste gizli kan aranması, esnek sigmoidoskopi, kolonoskopi gibi testler yapılmalıdır. Yapılan alışmalar, rutin tarama testleri yapılan insanlarda kolon kanserinden ölüm oranlarının %15-33 daha düşük olduğunu göstermiştir (36).

Diyetle alınan besinler barsak mikrobiyotası tarafından metabolize edilerek kolon kanserine karşı koruyucu veya onu tetikleyici zararlı metabolitlere dnşrlenir. Lif

içeriği düşük, yağ ve şeker oranı yüksek beslenmenin hem barsak mikrobiyotasının çeşitliliğini düşürdüğü hem de tehlikeli metabolitlerin oluşmasına neden olduğuna dair kanıtların sayısı giderek artmaktadır. Bu durum kolon kanseri riskinin artmasına neden olmaktadır (34). Beslenme alışkanlıklarının ve günlük yaşam rutinlerinin değiştirilmesi kolon kanserine karşı alınabilecek ilk ve en basit önlemlerdir (32).

Kolorektal kansere bağlı ölüm oranının düşürülmesine alternatif bir yaklaşım ise, neoplazmların kalın bağırsakta gelişmesini engelleyebilecek çeşitli oral ajanların uzun süreli kullanımınıdır. Bu amaçla kullanılabilen ilaçlar ve olası etki mekanizmaları Tablo 4'te özetlenmiştir (36).

Tablo 4. Kalın barsakta neoplazm oluşumunu engelleyebilen ilaçlar (36)

İlaçlar	Etki Mekanizması
Non-steroidal antiinflamatuar ilaçlar	Kolon kanseri hücrelerinde artış gösteren siklooksijenaz (COX) enzimlerini inhibe eder
Folik asit	Hücre içi folat miktarını yükseltir
Kalsiyum	Safra tuzlarına ve yağ asitlerine bağlanır
Östrojen	İkincil safra tuzu sentezini azaltır, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) üretimini azaltır, kolorektal epitele etki eder

Tedavi Seçenekleri

Yıllarca kolorektal kanserli hastalar için ana tedavi seçeneği 5-FU ve lökoverindi. Bu seçenek ancak %20 gibi düşük bir cevap oranını ve 6 aylık kısa bir sağ kalım süresini mümkün kılmaktaydı. 1990'lı yılların sonlarına doğru okzaliptatin ve irinotekanın kolon kanserinde aktiviteye sahip olduğu görüldü. Her ilacın 5-FU ile birlikte kullanılmasıyla sağkalım süresinin 24 aya kadar çıkması mümkün olmuştur (45). Metastatik kolorektal kanser tedavisi son yıllarda önemli değişiklikler geçirmiştir. Moleküler biyolojik yolların daha iyi anlaşılması sonucunda, modern biyolojik ilaçların da tedaviye girmesiyle hayatta kalma süresi 30 aya kadar artmıştır. Genel olarak birinci basamak tedavi seçimi, ilacın tolere edilebilirliğinin yanı sıra hastanın yaşına, eşlik eden diğer hastalıklara ve tercihlere bağlı olarak değişmektedir (46). Ayrıca hastanın sahip olduğu *KRAS*, *BRAF* gen mutasyonları, DNA yanlış eşleşme tamir sistemi hataları, anormal DNA metilasyonları gibi genetik ve epigenetik durumlar, uygulanacak tedavi şeklini belirlemede önemlidir (47).

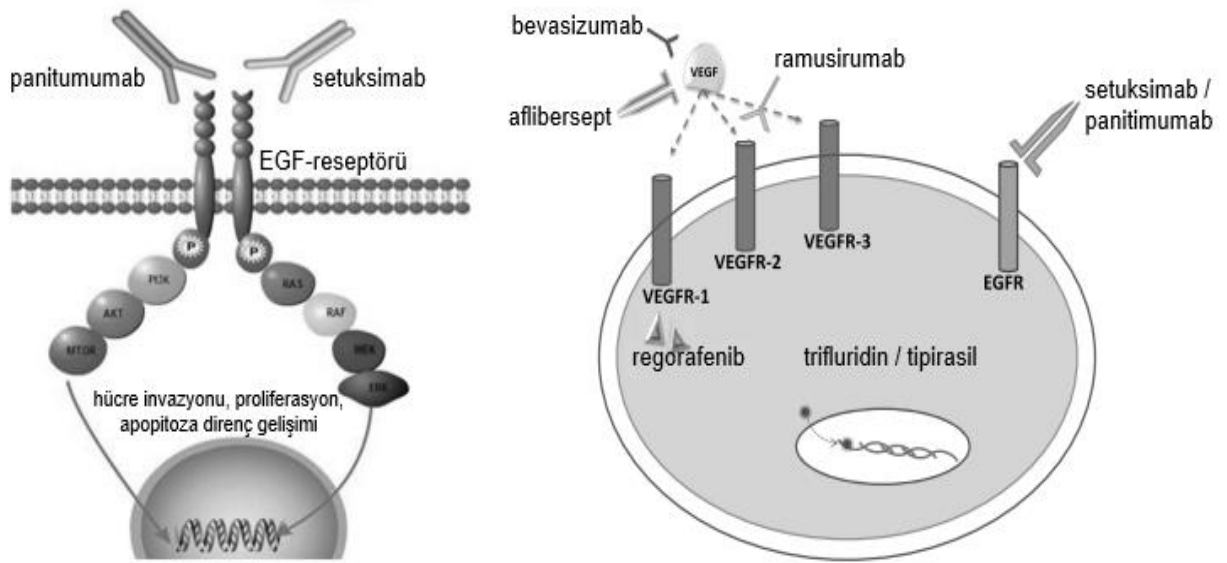
Gerektiğinde cerrahi müdahale ve radyoterapi ile birleştğinde kemoterapi, metastatik kolorektal kanser tedavisinin bel kemiği ve sağkalımı arttırmanın tek aracıdır. Tedavi, uzun yıllardır küçük bir iyileşme umuduyla, hastanın kalan yaşamının süresini, kalitesini arttırmayı hedeflemiş ve palyatif olarak kabul edilmiştir (48,49). Bununla birlikte, bu tümörlerin farklı anatomik konumları, farklı terapötik yaklaşımları zorunlu kılar. Örneğin rektal bölgedeki kanserlerde, daha karmaşık bir ameliyat prosedürü vardır, MR sonuçlarına ve klinik aşamaya bağlı olarak daha farklı adjuvan kemo/radyoterapi kullanılması gerekir (50).

Kolorektal kanserlerde sıklıkla kullanılmakta olan ilaç etkin maddeleri, bunların etki mekanizmaları ve kullanılış yolları Tablo 5'te kısaca özetlenmiştir.

Tablo 5. Kolorektal kanserlerde kullanılan etkin maddeler (28,51,52)

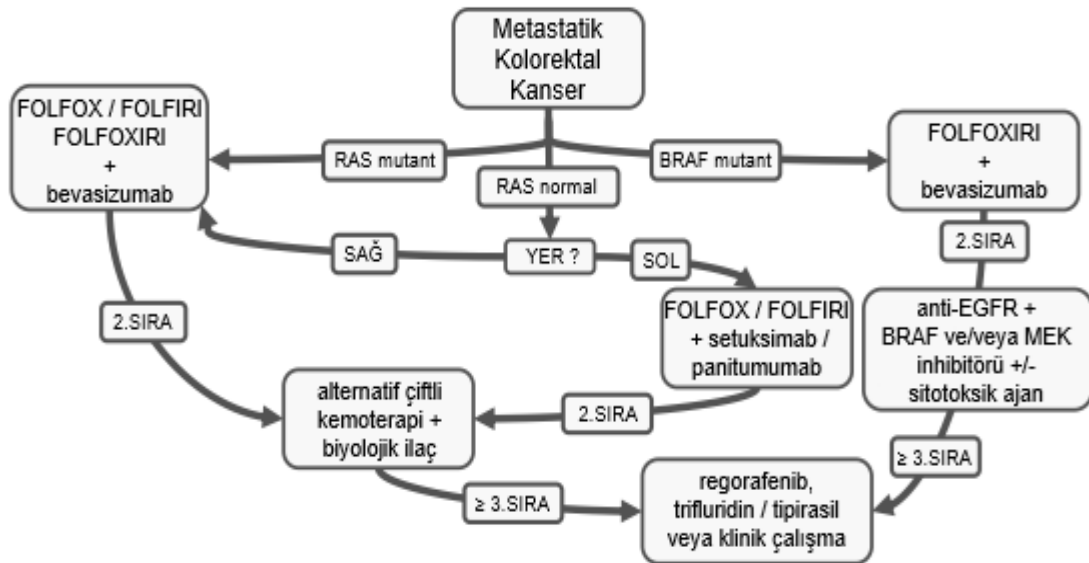
Etkin Madde	Etki Mekanizması	Kullanılış	FDA Onayı
5-FU	Timidilat sentaz inhibisyonu	I.V.	1962
Lökoverin	5-FU etkinliğini artırır	I.V.	1982
İrinotekan	DNA topoizomerez-I inhibisyonu	I.V.	1996
Kapesitabin	5-FU ön ilacı	Oral	1998
Okzaliplatin	DNA'da çapraz bağlanmalar	I.V.	2002
Bevasizumab	Anjiyogenez inhibisyonu	I.V.	2004
Setuksimab	EGF reseptör antagonisti	I.V.	2004
Panitimumab	EGF reseptör antagonisti	I.V.	2006
Regorafenib	Anjiyogenez inhibisyonu	Oral	2012
Aflibersept	Anjiyogenez inhibisyonu	I.V.	2012
Ramusirumab	Anjiyogenez inhibisyonu	I.V.	2015
Trifluridin/Tipirasil (TAS102)	Timidilat sentaz inhibitörü / Timidin fosforilaz inhibitörü	Oral	2015

Kolon kanseri tedavisinde kullanılan çeşitli monoklonal antikörlerin etki mekanizmaları Şekil 12'de gösterilmiştir.



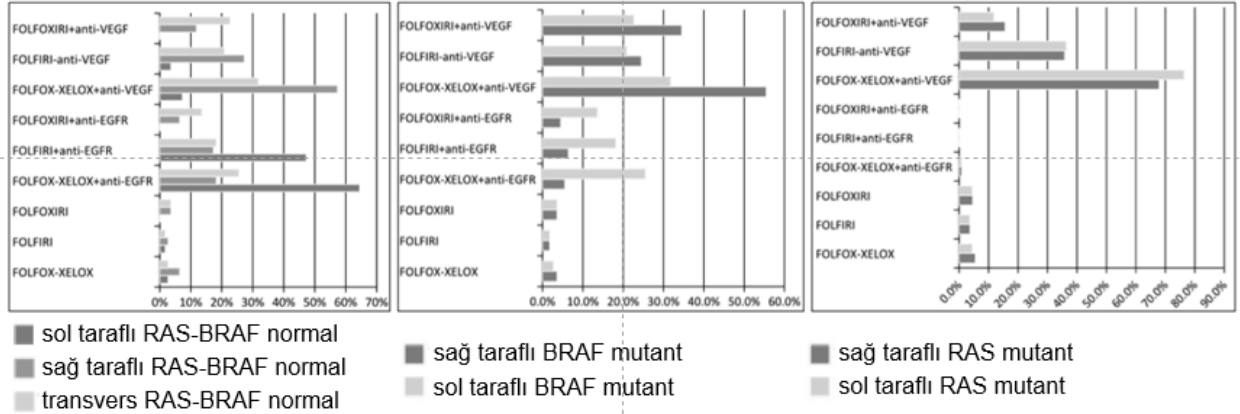
Şekil 12. Kolon kanserinde kullanılan monoklonal antikörler (51,52)

Kolorektal kanser tedavisi günümüzde birden fazla ilacın kullanıldığı kürler şeklinde yapılır. Bunlar Şekil 13'te kısaca özetlenmiştir. Eski sitotoksik ajanlar genellikle ikili ve üçlü kombinasyonlar halinde kullanılır. 5-FU/lökoverin ve okzaliplatin (FOLFOX), 5-FU/lökoverin ve irinotekan (FOLFIRI), kapesitabin ve okzaliplatin (CAPOX), 5-FU/lökoverin, okzaliplatin ve irinotekan (FOLFOXIRI) en sık kullanılan ikili veya üçlü kemoterapi rejimleridir. Bu ikili ve üçlü rejimlerin yanına çeşitli yeni nesil monoklonal antikörler eklenerek tedaviye alınan yanıt ve sağkalım süresi artırılmaya çalışılır (51,53,54).



Şekil 13. Kolorektal kanser tipine bağlı olarak tedavi yaklaşımları (55)

Ülkemizdeki medikal onkologlarla yapılan anket tipi bir çalışmada çeşitli tipteki kolon kanserlerinde ilk sıra tedavi olarak kullanılan ilaçlar Şekil 14'te gösterilmiştir (56).



Şekil 14. Ülkemizde medikal onkologlarca tercih edilen ilk sıra tedaviler (56)

Pembrolizumab, nivolumab, ipilimumab, atezolizumab, kobimetinib, trametinib, palbosiklib, vemurafenib, darafenib, entrektinib gibi çok sayıda farklı etkin maddenin kolorektal kanserdeki etkinliklerinin araştırıldığı, faz II veya faz III klinik araştırmalar dünya çapında devam etmektedir. İlerleyen yıllarda, bu hastalığın tedavisinde yeni ilaçların kullanıma girmesi şaşırtıcı olmayacaktır (57).

DENDRİMERLER

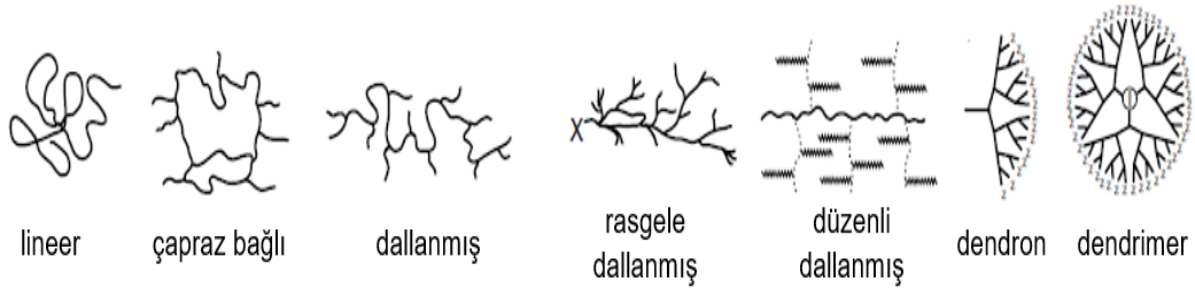
Tanım ve Özellikler

Dendrimerler, küçük bir molekül veya doğrusal bir polimer çekirdeği etrafına yerleştirilmiş, simetrik dallanma birimleri içeren monodispers makromoleküllerdir. Sentezleri sıkı şekilde kontrol altında tutularak, düzenli aralıklarla yerleştirilen çok sayıda iç ve dış fonksiyonel gruplara sahip, oldukça simetrik polimerlerdir (58).

Dendrimer kavramı Yunanca dendron (ağaç) ve meros (bölüm, birim) kelimelerinin bir araya gelmesiyle oluşmuş bir kavramdır. Bu tip moleküller kendilerini tekrar eden yapılarından ötürü daha önceden kaskat molekülleri olarak isimlendirilse de ağaç benzeri yapılarından dolayı dendrimer terimi geniş kitlelerce kabul görmüştür (59). Latince ağaç anlamına gelen arborol terimi de dendrimer kadar yaygın olmasa da kullanılmaktadır. Dendrimer tek bir kimyasal bileşiğin adı olmayıp molekülün yapısını belirtmektedir. Bununla birlikte dendrimerler sabit bir şekile sahip olmayıp,

şekilleri moleküle veya molekülün içinde bulunduğu ortama göre değişkenlik göstermektedir (60).

Bu çok dallı moleküller ilk olarak 1970'lerin sonu 1980'lerin başında Fritz Vögtle, Donald Tomalia ve George R. Newkome tarafından yaklaşık zamanlarda fakat birbirlerinden bağımsız olarak keşfedilmişlerdir (60). Dendrimerlerden önce polimerik yapıların makromoleküler mimarileri doğrusal, çapraz bağlı ve dallanmış olmak üzere üç farklı şekilde sınıflandırılmaktaydı (Şekil 15). Dendrimerler bu üç yapıdan tamamen farklı yeni bir mimariye sahip polimerlerdir (61).



Şekil 15. Çeşitli tipte polimerik yapılar (61)

Dendrimerlerin ve klasik lineer polimerlerin çeşitli özellikleri Tablo 6'da kıyaslanmıştır.

Tablo 6. Dendrimerlerin ve klasik düz zincirli polimerlerin özellikleri (62)

Özellik	Dendrimer	Lineer Polimer
Yapı	sıkı	gevşek
Şekil	küresel	düz
Mimari	düzenli	düzensiz
Sentez	kademeli	tek basamaklı
Kristal Yapısı	amorf	kristal / yarı kristal
Polar Çözünürlük	yüksek	düşük
Apolar Çözünürlük	yüksek	düşük
Sıkıştırılabilirlik	düşük	yüksek

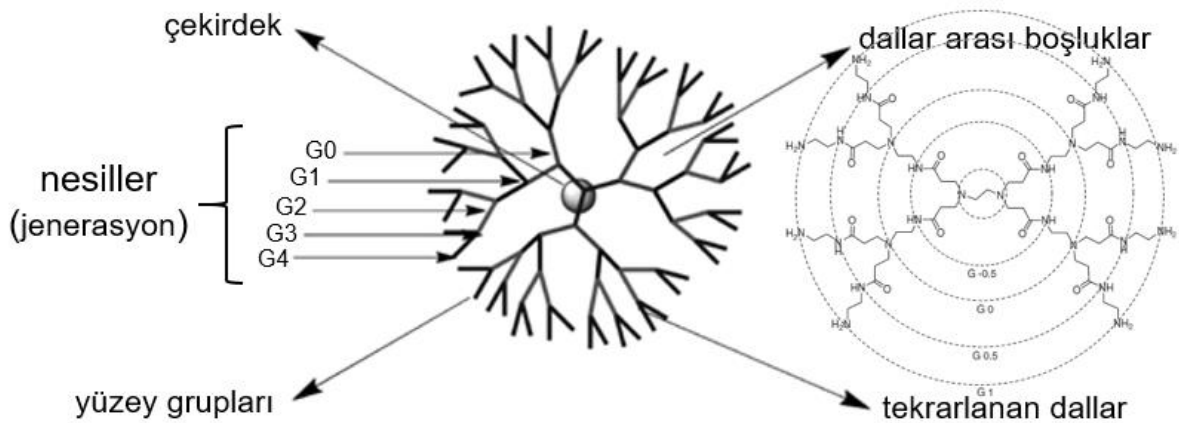
Dendrimerlerin klasik polimerlere göre çeşitli avantajları bulunmaktadır. Molekül ağırlıkları aralık olarak ifade edilen çoğu lineer polimerin aksine, dendrimerler tek bir molekül ağırlığında monodispers yapılardır. Benzer molekül ağırlıklı lineer polimerler

ile karşılaştırıldıklarında oldukça düşük içsel viskoziteye sahiptirler. Düz polimerler ile kıyaslandıklarında en önemli özelliklerinden biri de iç kısımda boşluklu alanlara dış kısımda ise daha sıkı bir kabuk yapısına sahip olmalarıdır (63,64).

Lineer polimerlerin aksine dendrimerlerin büyümesi matematiksel olarak sınırlıdır. Bir dendrimerin büyümesi sırasında, monomer birimlerinin sayısı üretimle katlanarak artarken, dendrimer için mevcut hacim sadece yarıçapının küpüyle orantılı olarak artar. Bu fiziksel sınırlamanın bir sonucu olarak, dendritik moleküller, nesil arttıkça daha küresel bir hal alırlar. Belirli bir noktaya geldiğinde ise “De Gennes” sıkı yapısı olarak bilinen sterik limite ulaşılır. Bu noktanın üzerinde dendrimer ancak düzensiz olarak ve yapısal hatalarla büyüeyebilirler (64).

Yapı

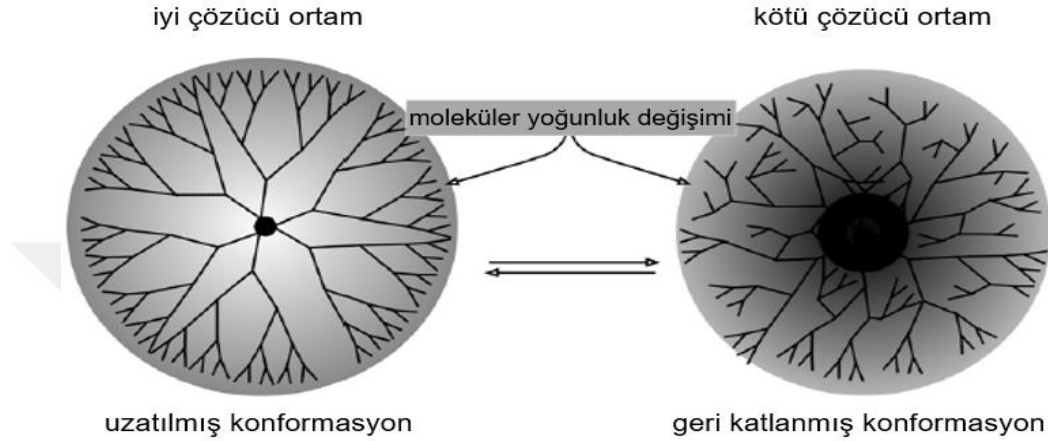
Birbirlerinden çok farklı yapı ve özelliklere sahip olsalar da tüm dendrimerler yapısal olarak bir çekirdeğe, birbirini tekrarlayarak devam eden iç katmanlara ve fonksiyonel yüzey gruplarına sahiptirler (62). Merkezi çekirdeğe kovalent olarak bağlanmış tekrarlanan birimler nesil (jenerasyon) olarak adlandırılan bir dizi radyal homojen katman oluşturur (65). Nesilleri arttıkça dendrimerlerin uç grupları üssel olarak artış gösterir. Bu artışa bağlı olarak dendrimerlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesinde uç gruplar baskın hale gelir (64). Dendrimerlerin genel yapısı Şekil 16’da gösterilmiştir.



Şekil 16. Dendrimerin temel yapıları (62)

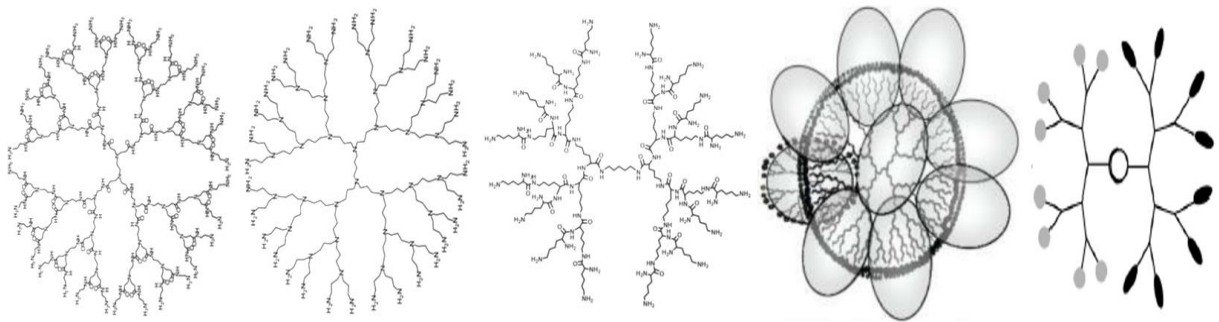
Dendrimerlerin yapısı kimyasal yapı dışında içinde bulunduğu ortamın pH, polarite, tuz konsantrasyonu, sıcaklık gibi özelliklerine bağlı olarak da değişkenlik gösterir. Normal olarak dendrimerlerin yüzey grupları iyi çözündükleri ortamlarda dışa

yönelmiş şekilde (uzatılmış konformasyon) bulunur. Bu durum dendrimerin az yoğun, boşluklu bir çekirdeğe ve yoğun uç bölgelerine sahip olmasına neden olur. İyi çözünmedikleri ortamda ise dendrimer dalları geriye doğru katlanır, yoğun bir çekirdek ve az yoğunluklu uç bölgeleri oluşur (66). Bu iki farklı konformasyon Şekil 17’de gösterilmiştir.



Şekil 17. Farklı çözünürlükteki ortamlarda dendrimerin konformasyonu (66)

Poliamidoamin (PAMAM), polipropilenimin (PPI), poli-L-lizin (PLL), tekto dendrimerler, amfifilik dendrimerler, parçalanabilir (biyobozunur) dendrimerler, asimetrik fiyonk tipi (janus tipi) dendrimerler, kiral dendrimerler, glukodendrimerler gibi çok farklı yapıya sahip dendrimerler mevcuttur. Bunlar mevcut dendrimerlerin sadece bir kısmını oluşturmakta olup çekirdek, tekrarlanan ünite ve yüzey gruplarının farklı yapılarla değiştirilmesiyle çok çeşitli dendrimerlerin sentezlenmesi mümkündür (61,65,67,68). Şekil 18’de soldan sağa PAMAM, PPI, PLL, tekto ve asimetrik tipte dendrimerler gösterilmektedir.

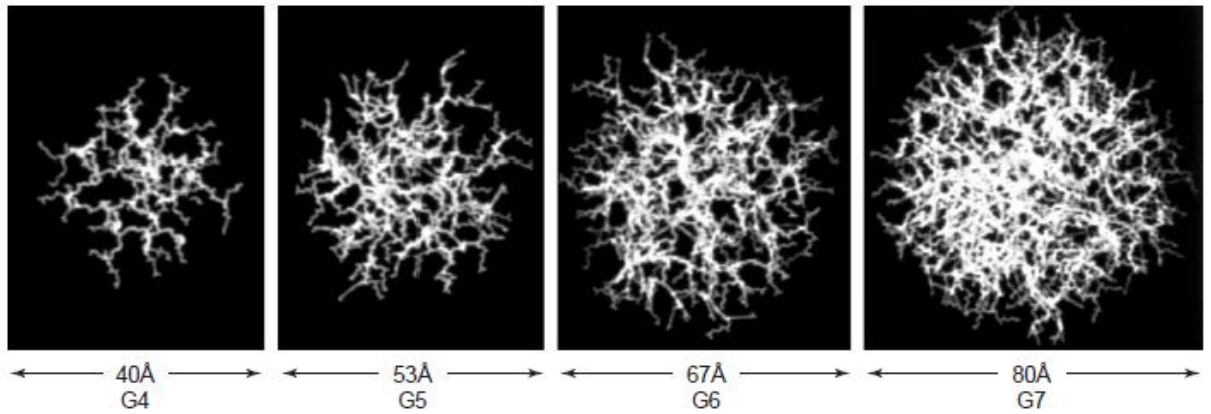


Şekil 18. Farklı yapıya sahip dendrimerle (61,65,67,68)

PAMAM ve PPI tipi dendrimerler 2^{n+1} yüzey grubuna $(2^{n+1})-2$ adet tersiyer iç amin grubuna sahiptirler (69). Yüzey gruplarının sayısı artan her nesille ikiye katlanırken, dendrimerlerin boyutları da yaklaşık olarak 1nm artış gösterir (70). Artan nesillere göre PAMAM dendrimerlerin molekül ağırlıkları, yüzey amin grubu sayısı ve boyutları Tablo 7’de ve Şekil 19’da gösterilmiştir.

Tablo 7. Çeşitli PAMAM dendrimerlerin molekül ağırlığı ve NH₂ grubu sayısı (71)

Dendrimer Nesli	Molekül Ağırlığı	NH ₂ Grubu Sayısı
0	517	4
1	1.430	8
2	3.256	16
3	6.909	32
4	14.215	64
5	28.826	128
6	58.048	256
7	116.493	512
8	233.383	1024
9	467.126	2048
10	934.787	4096



Şekil 19. G4-G7 arası dendrimerlerin molekül yapıları ve boyutları (71)

Dendrimerlerin Sentezi

İlk sentezlenen dendrimerler PAMAM tipi dendrimerler olup iraksak (divergent) metot ile sentezlenmişlerdir. Daha sonra Hawker ve Fréchet tarafından alternatif bir

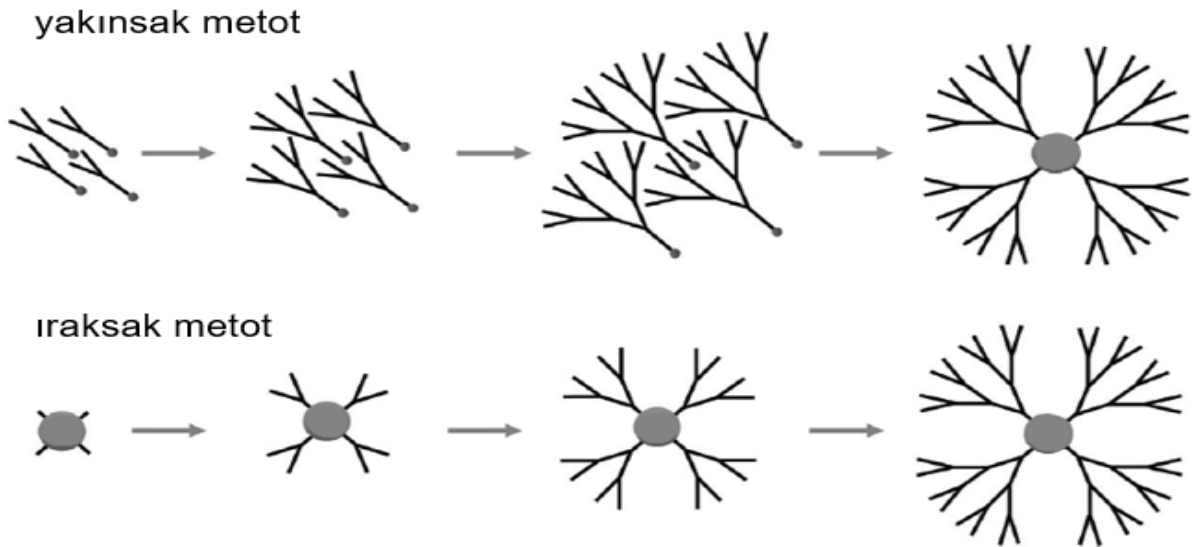
metot olarak yakınsak (convergent) metot geliştirilmiştir (62). Bu iki metot Şekil 20’de gösterilmiştir. Dendrimerlerin bunların dışında sentez yöntemleri bulunsa da (“click” ve “lego” kimyası gibi) günümüzde en sık kullanılan yöntemler bunlardır (60,61).

İraksak metot

İraksak metotta dendrimer çekirdek yapı üzerine dendrimer dallarını oluşturan tekrarlı ünitelerin eklenmesiyle sentezlenir (72). Bu yöntemle dendrimer sterik engelle karşılaşana kadar basamak basamak sentezlenebilir. Göreceli olarak kolay bir yöntem olmasına rağmen, bağlanma reaksiyonunun tam olarak tamamlanamaması bu metotta karşılaşılabilecek önemli bir sorundur (73). Bu durumda yapısal hatalar oluşacak ve bunlar her nesilde katlanarak devam edecektir. Yapısal olarak çok benzer oldukları için bu yan ürünleri ayırtırmak ise her zaman mümkün olmamaktadır. Özellikle yüksek nesilli dendrimerlerde bu yapısal hatalara daha sık rastlanmaktadır (59).

Yakınsak metot

Yakınsak metotta öncelikle tekrarlı üniteler birbirine bağlanarak dendrimerin ana yapıları (dendronlar) elde edilir. Daha sonra ortama dendrimerin çekirdeği eklenerek bütün yapılar bu çekirdek üzerinde bir araya getirilir (72). Bu metodun avantajı her reaksiyon basamağında dendronlar ayrı ayrı sentezlendiklerinden, hatalı olanların jel geçirgenlik kromatografisi gibi çeşitli saflaştırma yöntemleriyle ayrılmasının daha kolay olmasıdır (59).



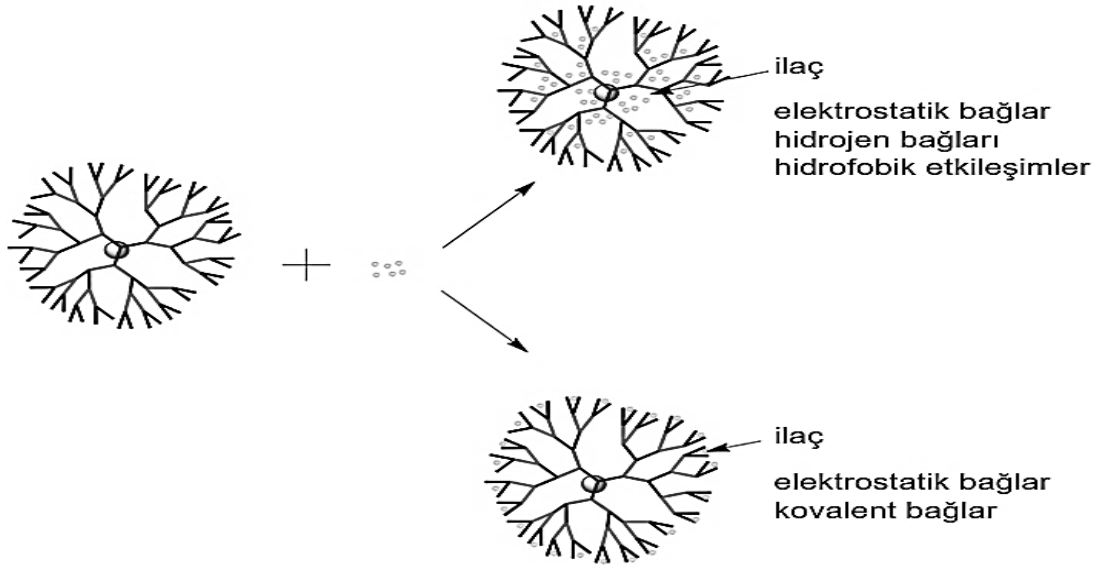
Şekil 20. Dendrimer sentez metotlarından yakınsak ve iraksak metot (74)

Dendrimer İlaç Etkileşimleri

Dendrimerler ilaçlarla çeşitli şekillerde etkileşebilirler. Bu etkileşimleri fiziksel ve kimyasal olarak sınıflandırmak mümkündür (Şekil 21).

Fiziksel etkileşimler etkin maddenin dendrimer dalları arasına veya uç gruplarına kovalent olmayan bağlarla bağlanmasıdır. Bu tipte fiziksel komplekslerin oluşumunda elektrostatik bağlar, hidrojen bağları veya hidrofobik etkileşimler rol oynar (62). Dendrimer komplekslerini konak-misafir etkileşimi (host-guest interaction) ile açıklamak mümkündür. Misafir molekülün biyolojik çevre ile etkileşimi konak dendrimer aracılığı ile gerçekleştirilir. Dendrimerin iç ve dış fonksiyonel gruplarının istenen şekilde tasarlanmasıyla konağın biyolojik çevre ile olan etkileşimi de düzenlenebilir. Konak-misafir etkileşimi misafir molekülün özelliklerini değiştirmek için kullanılabilir. Örneğin inorganik bir madde organikmiş gibi, katyonik bir madde anyonik veya nötralmiş gibi, lipofilik bir madde de hidrofilikmiş gibi özellik gösterebilir (58).

Kimyasal etkileşimlerde ise dendrimerin yüzey grupları ile ilaç molekülü arasında kovalent bağlar kurulur. İlaçların dendrimerler ile konjugasyonunda ester, amit, karbamat, peptit, açil hidrazon, sis-akonitil ve disülfid köprüleri gibi bağlantılar kullanılır. İlaç dendrimer konjugatlarının dayanıklılığı kullanılan bağlantı tipine göre değişkenlik gösterir (62,67). Terapötik ajanların kimyasal bağlar vasıtasıyla dendrimerlere konjugasyonu, kontrollü ilaç salımını mümkün kılarsa da, her ilaç molekülü kimyasal konjugasyon için uygun reaktif bölgelere sahip değildir. Dahası, aşırı ilaç konjugasyonu, artan polidispersite veya çözünürlük problemleri gibi etkin maddenin veya dendrimerin özelliklerinde istenmeyen değişikliklere neden olabilir (74).



Şekil 21. Dendrimer ve ilaçlar arasında kurulan çeşitli bağlar ve etkileşimler (62)

İlaçların hidrofobik veya elektrostatik etkileşimler yoluyla kompleksleştirilmesi, ilaçların kimyasal bütünlüğünü ve farmakolojik özelliklerini korurken, ilaçların kimyasal bağlar yoluyla dendrimerlerin yüzey gruplarına kovalent olarak bağlanması, ilaç salınımının daha etkin bir şekilde kontrol edilmesini sağlar. Bu nedenle kovalent konjugasyon pasif veya aktif ilaç hedeflemesi için daha uygundur (75).

Jansen ve ark. (76) PPI dendrimerlerde dendritik kutu (dendritic box) kavramını ortaya atmışlardır. Bu yapı sentez işlemi sırasında, dendrimer boşlukları içerisindeki konuk moleküllerin yoğun yüzey grupları ile çevrelenmesiyle elde edilir. Uzun süreli ısıtma, çözücü ekstraksiyonu veya sonikasyondan sonra bile dendrimer dışına çıkışın engellendiği görülmüştür. Benzer bir mantıkla dendrimerlerin yoğun yüzey gruplarının salımı engellediği bir başka yapı Esfand ve ark. (77) tarafından geliştirilen Dendrilock™'tir (69). Bu yapılar enkapsüle edilen maddenin güvenli şekilde değişmeden saklanmasını sağlamaktadırlar.

Dendrimerlerin Vücuttaki Dağılımları

Yüzey yükü, dendrimerlerin biyolojik dağılımını büyük ölçüde etkilemektedir. Biyolojik pH değerlerinde PAMAM dendrimerler primer amin uçlarının protonlanmasından dolayı genel olarak pozitif bir yüzey yüküne sahiptirler. Asetile edilmiş uca sahip ester uçlu dendrimerler ise nötrale yakın bir yüzey yüküne sahiptirler (58). Nötr, zayıf anyonik, amfifilik, zayıf hidrofobik dendrimerler daha uzun dolaşım süresine ve yarılanma ömrüne sahiptirler (78).

Dendrimer boyutunun (neslinin) artması genellikle dolaşım süresinin de artmasına neden olur. Boyutun 10nm üzerine çıkması veya uygun olmayan yüzey grupları (örneğin hidrofobik) dendrimerlerin mononükleer fagositik sistem tarafından tanınıp kandan uzaklaştırılmasına neden olur (79).

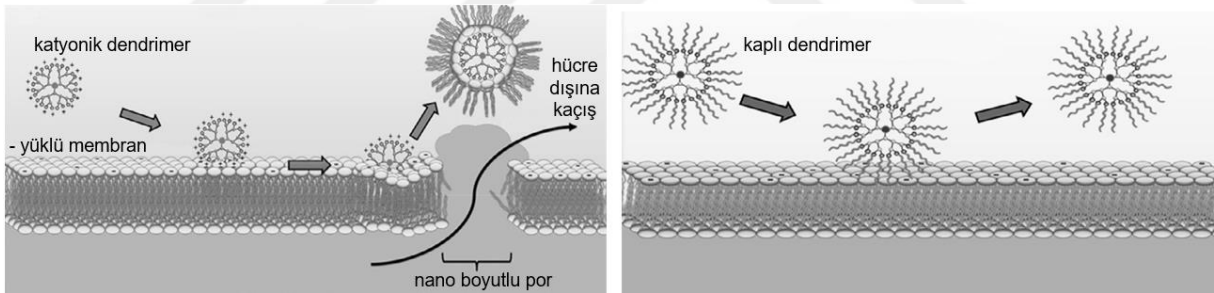
İntravenöz enjeksiyon sonrası amin sonlu, katyonik PAMAM dendrimerlerin neredeyse tamamı (%98) 1 saat içinde dolaşımdan uzaklaştırılır. Bu durum katyonik dendrimerlerin doğrudan ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmasını kısıtlayan bir özelliktir (65). Katyonik dendrimerlerin yüksek nesilli olanları karaciğer, dalak ve pankreasta toplanırken düşük nesilli olanlar böbreklerde toplanır (78,79).

Anyonik ve nötral dendrimerler karaciğer, böbrek, akciğer ve kanda dağılım gösterirler. Küçük yapıları olanlar hızla idrarla atılırken, daha büyük olanlar renal filtrasyondan kaçınarak daha uzun süre dolaşımda kalırlar (78). Karboksil yüzey gruplu

türevlerinde 1 saat içinde dolaşımdan uzaklaştırılma oranı %40 civarındadır (65). Hafif pozitif veya hafif negatif yüklü 10-100nm boyutundaki dendrimerler artan geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisiyle tümör dokularında birikirler (78).

Dendrimerlerin Toksisiteleri

Dendrimerlerin toksisitesini belirleyen temel özellik yüzey yüküdür. Yüzeyinde amin grubu bulunan katyonik dendrimerler, yüzeyinde karboksil grubu bulunan anyonik dendrimerler veya yüzeyinde hidroksil grubu bulunan nötral dendrimerler kıyaslandığında hücre içi alımlarının ve toksisitelerinin daha yüksek olduğu görülmüştür (80). Bunun sebebi katyonik yapılı uçların negatif yüklü hücre membranıyla etkileşime girmesi ve membranı destabilize etmesidir (Şekil 22) (81). Yarım nesilli karboksilli asit sonlanımlı PAMAM dendrimerlerde sitotoksosite gözardı edilebilecek düzeydedir (82). Katyonik, anyonik ve nötr dendrimerler arasında en az toksisite nötr yapılı dendrimerlerde görülmüştür. Yüksek nesilli dendrimerler düşük nesillilere göre daha toksiktir (83).



Şekil 22. Katyonik dendrimerlerin hücre membranları üzerindeki toksisitesi (84)

Modifiye edilmiş dendrimerlerin toksisite özelliklerinin modifiye edilmemiş dendrimerden farklı olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Katyonik dendrimerlerde görülen toksisite dendrimer uçlarının PEG veya lauril gibi gruplarla modifiye edilmesiyle belirgin oranda azalmıştır. Bu durum yüzeyde bulunan pozitif yük yoğunluğunun azalmasına bağlıdır (80).

Sitotoksitenin yanısıra dendrimerlerin hemolitik ve agregan aktiviteleri de yok sayılmamalıdır. PAMAM tipi katyonik dendrimerler 1mg/mL üzeri konsantrasyonlarda hemolitik aktivite göstermişlerdir. Hatta hemolitik olmayan 10µg/mL gibi dozlarda bile eritrosit morfolojisinde değişikliklere yol açtıkları, disk şeklinden küresel şekle dönüşüme neden oldukları gösterilmiştir. Anyonik özellikteki dendrimerlerde ise

2mg/mL gibi yüksek konsantrasyonlarda bile herhangi bir hemolitik aktivite veya eritrosit morfolojisinde bir değişim görülmemiştir (82,83).

Dendrimerlerin tekrarlanan dozlara bağlı toksisiteleri veya uzun süreli kullanımlarına bağlı kronik toksisiteleri hakkında řu aşamada kapsamlı veriler bulunmamaktadır ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Dendrimerlerin doku, organ veya sistemler üzerindeki toksisiteleri hakkında ise neredeyse hiç çalışma bulunmamaktadır. Dendrimerlerin vücuttaki dağılımları nedeniyle özellikle karaciğer, dalak ve böbreklerde toksisiteye neden olabilecekleri göz önünde bulundurulmalıdır (65).

PAMAM veya PPI gibi ilk geliştirilen dendrimerler hidrolize son derecede dayanıklı parçalanamayan özelliktedirler. Bu dendrimerlerin uzun süreli olarak vücutta birikmesi zamanla nanotoksositeye neden olabilir. Bu nedenle parçalanabilir veya biyobozunur özellikte dendrimerler geliştirilmiştir. Butip dendrimerlerin parçalanma ürünleri toksik olmamalı, vücutta birikmeyip kolayca uzaklaştırılabilir olmalıdır (65).

Dendrimerlerin Uygulama Alanları

Dendrimerler ilaçların iç boşluklara enkapsülasyonu ve yüzey grupları üzerine konjugasyonu ile ilaç taşıyıcı sistem olarak, gen transferinde DNA veya RNA transfeksiyon ajanı olarak, görüntüleme ajanı olarak, çeşitli biyosensörlerin yapımında, çözünürlük artırıcı olarak, fotodinamik terapide ve bor nötron yakalama terapisinde kullanılabilirler (60,85-87).

Dendrimerlerin monodispers bir dağılıma sahip olmaları, enkapsülasyon amaçlı kullanılacak iç boşluklara ve modifiye edilebilir çok sayıda yüzey gruplarına sahip olmaları, etkin madde çözünürlüğünü artırmaları ve modifikasyonlarla dolaşım süresini uzatabilmeleri onları kanser tedavisinde ideal taşıyıcı sistemler haline getirmektedir. Dendrimerler aynı zamanda makromoleküller oldukları için artan geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisiyle kanser dokularına pasif hedeflemede avantaj sağlarlar (85).

Çoğu kanser ilacı küçük ilaç molekülleri olmasına rağmen, ilaç dağılımı veya görüntüleme kısımlarını da içeren kompleks terapötikler çok daha büyük olma eğilimindedir. Kanserin erken aşamalarında endotel arası boşluklar daha kısıtlayıcı olduğundan bu durum özellikle kompleks yapıllı terapötikler için sorun oluşturur. Bu nedenle, çok fonksiyonlu olarak tasarlanmış terapötiklerin, kanser hücreleri ile etkileşime girebilmesi için endotelden çıkacak kadar küçük olmaları gerekir.

Dendrimerler sayılan bu özellikler açısından da oldukça uygun taşıyıcılardır (88). Ayrıca dendrimerler gastrointestinal sistem epitelleri gibi hücresel bariyerlerden geçebildikleri için farklı kanser ilaçlarının oral yoldan yüksek biyoyararlanımla uygulanabilmesine de olanak sağlarlar (89).

Tüm bu sayılan avantajlara rağmen dendrimerler henüz yaygın şekilde resmi otoritelerce kabul edilen bir farmasötik yardımcı madde olmaktan uzaktırlar. Herhangi bir resmi farmakopede kayıtlı monografları bulunmamaktadır. İlaç sanayisinde kullanılacak güvenli bir yardımcı madde olarak onaylanmadan önce mevcut biyodağılım ve toksisite çalışmalarının sayısının artırılması ve detaylandırılması gerekmektedir. Maliyetlerinin henüz yüksek olması ise resmi otoritelerce kabul görseler dahi yaygın şekilde kullanımlarını kısıtlayabilecek bir problemdir (90).

Piyasada Bulunan Dendrimer İçeren Ürünler

İçerisinde dendrimer bulunan çeşitli ticari ürünler Tablo 8’de listelenmiştir.

Tablo 8. Dendrimer içeren çeşitli ticari ürünler (62)

Ürün	Açıklama
VivaGel® Jel	Bakteriyel vajinozis tedavisi için mukoadezif jel
SuperFect®	Moleküler çalışmalarda transfeksiyon ajanı
PrioFect®	Moleküler çalışmalarda transfeksiyon ajanı
Stratus® CS	Kardiyak belirteçler için <i>in vitro</i> tanılama sistemi
Alert Ticket®	Şarbon hastalığına karşı tanılama sistemi
Starburst®	Ticari PAMAM dendrimerleri
Priostar®	Ticari PLL dendrimerleri

GEREÇ VE YÖNTEMLER

KULLANILAN KİMYASALLAR

PAMAM G3.5 dendrimer metanol çözeltisi (%10 a/a)	Sigma-Aldrich (412430)
PAMAM G4.5 dendrimer metanol çözeltisi (%5 a/a)	Sigma-Aldrich (470457)
4-(Dimetilamino)piridin (DMAP)	Sigma-Aldrich (8510550100)
N,N'-Disikloheksilkarbodiimit (DCC)	Sigma-Aldrich (D80002)
N,N-Dimetilformamit (DMF)	Sigma-Aldrich (227056)
Okzaliplatin	DEVA İlaç A.Ş.
Asetonitril (ACN)	Merck (100030)
Diklorometan (DCM)	Sigma-Aldrich (24233)
Hidroklorik asit	Sigma-Aldrich (30721)
Asetik asit	Sigma-Aldrich (27225)
o-Fosforik asit	Merck (100573)
Etil asetat	Sigma-Aldrich (27227)
Sodyum asetat	Merck (106268)
Disodyum hidrojen fosfat	Merck (104873)
Potasyum klorür	Merck (104936)
Sodyum hidroksit	Merck (106498)
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck (106345)
Etil alkol (%99,5)	Tekkim (TK200655)

KULLANILAN GEREÇ VE CİHAZLAR

Otomatik Pipet (0,5-10µL)	CAPP Bravo (Danimarka)
Otomatik Pipet (10-100µL)	CAPP Bravo (Danimarka)
Otomatik Pipet (100-1000µL)	CAPP Bravo (Danimarka)
Otomatik Pipet (1-10mL)	CAPP Bravo (Danimarka)
Manyetik Karıştırıcı	Daihan WiseStir MSH-20A (Kore)
Vorteks	Daihan VM-10 (Kore)
Analitik Terazı	Shimadzu AUW220D (Filipinler)
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	Thermo Surveyor (USA)
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601 (Avustralya)
Liyofilizatör	Christ Epsilon 2-4 LSCplus (Almanya)
Vakum Pompası	Rocker 400 (Tayvan)
Santrifüj	Gyrozen 406 (Kore)
Mikrosantrifüj	Daihan CF-10 (Kore)
Distile su cihazı	Elga Purelab Option-Q DV-25 (UK)
FT-IR Spektrometresi	Perkin Elmer (USA)
NMR Spektrometresi	Jeol JNM-ECZ400S (Japonya)
Etüv	Daihan WON-50 (Kore)
Partikül boyutu ve zeta potansiyel	Malvern ZetaSizer Nano-ZS (UK)
pH metre	Mettler Toledo pH/Ion S220 (Çin)
Kuvartz küvet	TQP-Q-401
Su banyosu	Daihan WB-22 (Kore)
Buzdolabı (+4°C)	Vestel (Türkiye)
Derin Dondurucu (-20°C)	Arçelik (Türkiye)
Ultrasonik su banyosu	Daihan WUC-D10H (Kore)
Diyaliz membran çalışma seti	Spectra/Por® SPEC132000 (USA)

YÖNTEMLER

Okzaliplatin Miktar Tayini İçin HPLC ve Spektrofotometrik Yöntem

HPLC sistemi olarak Thermo Surveyor kullanılmıştır. Sistem, mobil fazı kolona iten pompa ünitesi (Surveyor LC Pump), numuneyi otomatik alan ve kolona enjekte eden otosampler (Surveyor Autosampler) ve kolondan geçen maddenin uygun dalgaboyunda analizini yapan dedektör (Surveyor UV/Vis Detector) ünitelerinden oluşmaktadır. Kromatogramların çizilmesi ve piklerin analizi ChromQuest 4.2.34 programı ile yapılmıştır.

Spektrofotometrik miktar tayinininde Shimadzu UV-1601 spektrofotometre ve kuvarz küvetler kullanılmıştır.

Kullanılan HPLC metodunun özellikleri: Miktar tayininde kullanılmak üzere uyarlanan HPLC metodunun özellikleri Tablo 9'da gösterilmiştir (18,91).

Tablo 9. HPLC metodunun özellikleri

Kolon	C18 Waters Symmetry 4.6x250mm 5µm
Mobil Faz	Asetonitril:Su (H ₃ PO ₄ ile pH=3'e ayarlı) (10:90) (h/h)
Akış Hızı	0,8mL/dakika
Enjeksiyon Hacmi	50µL
Kolon Sıcaklığı	25°C
Kolon Basıncı	98-100bar
Dalga Boyu (λ)	255nm
Analiz Süresi	7 dakika
Alıkonma Süresi	5,4 - 5,5 dakika arası
Seyreltme Ortamı	Su
LOD-LOQ	0,1-0,3µg/mL

Kullanılan miktar tayini metotlarının validasyonu: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı'nın (ICH) Q2 (R1) kılavuzuna göre validasyonun amacı analitik işlemlerde işlemin kullanım amacına uygunluğunun kanıtlanmasıdır. Kılavuza göre, teşhiste, safsızlıkların tayini ve kontrolü için kullanılan limit testlerinde, ilaç veya bir örnek içindeki etkin maddelerin miktar tayinlerinde kullanılan metotların validasyonunun yapılmasının gerekmektedir. Bunun dışında etkin madde sentezinde,

bitmiş ürünün bileşiminde veya analitik metotta bir değişiklik olduğunda validasyon tekrar yapılmalıdır. Miktar tayininde kullanılan analitik metodun validasyonu ICH kılavuzunda açıklanan şekilde gerçekleştirilmiştir (92). Validasyon kapsamında özgünlük, doğrusallık, gün içi ve günler arası kesinlik, doğruluk, stabilite, sistem uygunluk testi, tespit sınırı (LOD) ve ölçüm sınırı (LOQ) çalışmaları yapılmıştır.

- a) Özgünlük (Spesifiklik): Yöntemin sadece istenen madde için sonuç verdiği ve diğer maddelerin analize girişim yapmadığının gösterilmesidir. HPLC'de kör (blank) çözelti enjeksiyonu yapıldığında, etkin madde pikinin görüldüğü zamanda pik görülmemelidir (92). PAMAM-G3.5 ve PAMAM-G4.5 dendrimer çözeltileri (100µg/mL), etkin madde içermeyen (blank) çözeltiler HPLC'ye verilmiş ve okzaliptin pikine girişim yapıp yapmadıkları incelenmiştir. Ayrıca spektrofotometre ile bu çözeltilerin 200-400nm dalga boyları arasında spektrumları kaydedilmiş, hangi dalga boylarında ne kadar absorbans verdikleri incelenmiştir.
- b) Doğrusallık: Belirlenen ölçüm aralığında doğrusal bir ilişkinin kurulabilmesi gerekmektedir. Doğrusallık çalışmaları standart çözeltiler, stok çözeltiden seyreltme yoluyla veya maddelerin belirlenen farklı miktarlarda tartılmasıyla hazırlanabilirler. Doğrusallığın gösterilmesi için en az 5 konsantrasyon noktası bulunmalıdır (92). Standart eğrinin determinasyon katsayısının (r^2) 0,999'dan büyük olması istenir (93). HPLC standart çözeltileri 1-10µg/mL ölçüm aralığında, 7 farklı konsantrasyonda (10µg/mL, 8 µg/mL, 6 µg/mL, 5µg/mL, 4µg/mL, 2µg/mL, 1µg/mL) hazırlanmış ve üç tekrarlı (n=3) olarak HPLC'ye verilmiştir. Spektrofotometre standartları ise 10-100µg/mL ölçüm aralığında, 7 farklı konsantrasyonda (100µg/mL, 80 µg/mL, 60 µg/mL, 50µg/mL, 40µg/mL, 20µg/mL, 10µg/mL) hazırlanmış ve üç tekrarlı (n=3) olarak spektrofotometrede okutulmuştur. Standartlar hazırlanırken önce 10mg katı okzaliptin 100mL distile suda çözülerek 10mg/100mL (100µg/mL) konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözeltiden Tablo 10'da özetlenen şekilde seri dilüsyon yapılarak standart çözeltiler hazırlanmıştır.

Tablo 10. Standart eğrinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler

HPLC Standartları	Hazırlanış	Spektrofotometre Standartları	Hazırlanış
10µg/mL	100µL stok + 900µL su	100µg/mL	10mL stok
8µg/mL	80µL stok + 920µL su	80µg/mL	8mL stok + 2mL su
6µg/mL	60µL stok + 940µL su	60µg/mL	6mL stok + 4mL su
5µg/mL	50µL stok + 950µL su	50µg/mL	5mL stok + 5mL su
4µg/mL	40µL stok + 960µL su	40µg/mL	4mL stok + 6mL su
2µg/mL	20µL stok + 980µL su	20µg/mL	2mL stok + 8mL su
1µg/mL	10µL stok + 990µL su	10µg/mL	1mL stok + 9mL su

c) Kesinlik: Kesinlik aynı çözeltilerin birden fazla ölçülmesiyle gösterilir. Kesinlik çalışmaları aynı gün içinde ve farklı günlerde tekrarlanabilir. Ölçümler arası % standart sapma, bağıl standart sapma ve güven aralığı belirtilmelidir. Bağıl standart sapma, standart sapmanın ortalamaya bölünüp yüzle çarpımı ile bulunur (92). Kesinliğin sağlanması için bağıl standart sapmanın %2 veya altında kalması istenir (93). HPLC metodu için 4µg/mL (%80), 5µg/mL (%100), 6µg/mL (%120), spektrofotometrik metot için ise 40µg/mL (%80), 50µg/mL (%100), 60µg/mL (%120) konsantrasyonda üçer çözeltiler hazırlanmış, ilgili cihazda üçer kez ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler arası bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Kesinlik çalışması günler arası kesinliğin valide edilmesi için birbirinden farklı günlerde üç kere tekrarlanmıştır.

d) Doğruluk: Konsantrasyonu bilinen örneklerin doğru şekilde ölçüldüğünün gösterilmesidir. Doğruluğun validasyonu minimum 3 farklı konsantrasyonda 3 tekrarlı (n=3) olarak yapılmalıdır. Bilinen konsantrasyona karşılık cihazdan alınan değer % geri kazanım olarak ifade edilir. Doğruluk, kesinlik, doğrusallık ve özgünlük kurulduktan sonra gösterilebilir (92). % geri kazanım değeri %100 ± 2 aralığında olmalıdır (93). HPLC metodu için 4µg/mL (%80), 5µg/mL (%100), 6µg/mL (%120), spektrofotometrik metot için ise 40µg/mL (%80), 50µg/mL (%100), 60µg/mL (%120) konsantrasyonda üçer çözeltiler doğruluğun validasyonu için hazırlanmış ve ölçüm sonucu % geri kazanılan okzaliplatin miktarları hesaplanmıştır.

- e) **Stabilite Çalışmaları:** Analiz süresi boyunca numune çözeltileri içerisinde analizi yapılacak maddenin stabil olarak kaldığının gösterilmesi için yapılır. HPLC metodu için 5µg/mL, spektrofotometrik metot için ise 50µg/mL konsantrasyonda çözelti hazırlanmış ve 0, 1, 3, 8 ve 24. saatte çözeltilerden örnekler alınarak miktar tayinleri yapılmış, saptanan miktarlar için % bağıl standart sapma hesaplanmıştır.
- f) **Sistem Uyumluluk Testi:** Sistem uygunluk testi birçok analitik prosedürün ayrılmaz bir parçası olup, belirli bir prosedür için kurulacak sistem uygunluğu test parametreleri, yöntemin türüne bağlıdır (56). Örneğin HPLC için alıkonma zamanı, pik alanı, teorik plaka sayısı, kuyruklanma (tailing) faktörü, bunların ortalaması ve bağıl standart sapması gibi değerler önemlidir. Alıkonma zamanı, pik alanı gibi değerlerin bağıl standart sapmasının ≤ %1, kuyruklanma (tailing) faktörünün ≤ 2, teorik plaka sayısının ≥ 2000 olması istenir (93).
- g) **LOD ve LOQ:** ICH Q2 (R1) kılavuzuna göre LOD ve LOQ farklı yaklaşımlarla saptanabilir. Bu metotta regresyon doğrusunun rezidüel standart sapmasının (σ), regresyon doğrusunun eğimine bölünüp 3,3 ile çarpılmasıyla LOD, 10 ile çarpılmasıyla ise LOQ matematiksel olarak hesaplanmıştır (Şekil 23) (92).

$$LoD = \frac{3,3\sigma}{\text{Kalibrasyon eğrisinin eğimi}} \quad LoQ = \frac{10\sigma}{\text{Kalibrasyon eğrisinin eğimi}}$$

Şekil 23. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) formülleri (92)

Okzaliplatinin Çözünürlük Verileri

Çalışma boyunca kullanılacak çeşitli organik çözücülerde, suda ve çeşitli pH'lardaki tampon çözeltilerde okzaliplatinin çözünürlüğü araştırılmıştır. Okzaliplatinin çözünürlük çalışmaları metanol, etanol, dimetilformamit (DMF), diklorometan (DCM) gibi organik çözücülerde, distile suda ve pH 2, 4, 6, 7, 8, 10, 12 olacak şekilde yedi tampon çözeltide gerçekleştirilmiştir.

Çözünürlüklerin belirlenmesi çalkalama (shake flask) metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Öncelikle cam flakonların içerisine aşırı (excess) oranda katı okzaliplatin eklenir. Daha sonra flakonların içerisine çözünürlük testinin yapılacağı

ortamdan 1mL eklenir. Her çözücü için bu şekilde üçer flakon hazırlanır. Flakonlar oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılır. Sürenin sonunda tüplere alınıp çözünmeyen katı okzaliplatinin çöktürülmesi için 10.000rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda üstte kalan sıvı alınıp 0,45µm'lik naylon veya PTFE membran filtreden süzülür. Gerekli olması durumunda seyreltme işlemi yapılarak miktar tayini yapılır (94).

Çeşitli pH'lardaki tampon çözeltiler Tablo 11'de özetlendiği şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 11. 100mL tampon çözelti hazırlanması için gereken maddeler

pH 2	HCl-KCl Tamponu	0,373g KCl + 0,107mL HCl
pH 4	Asetat Tamponu	0,238mL CH ₃ COOH + 0,074g CH ₃ COONa
pH 6	Fosfat Tamponu	0,681g KH ₂ PO ₄ + 0,022g NaOH
pH 7	Fosfat Tamponu	0,681g KH ₂ PO ₄ + 0,116g NaOH
pH 8	Fosfat Tamponu	0,681g KH ₂ PO ₄ + 0,184g NaOH
pH 10	Borat Tamponu	0,309g H ₃ BO ₃ + 0,373g KCl + 0,175g NaOH
pH 12	NaOH-KCl Tamponu	0,048g NaOH + 0,373g KCl

Dendrimerlerin Çözünürlüğe Etkisinin İncelenmesi

Çözünme ortamında dendrimer bulunmasının çözünürlüğe olan etkisinin incelenmesi için iki farklı tipte dendrimer ve bunların beş farklı konsantrasyonu kullanılarak çözünürlük çalışması gerçekleştirildi. Ortam olarak su, pH 4 asetat tamponu ve pH 7 fosfat tamponu kullanılmıştır. Literatürde bazik pH değerlerinin okzaliplatinde stabilite problemlerine neden olabileceği gösterildiğinden bazik bir tampon ortamı kullanılmamıştır (95,96). Çözünürlük çalışması daha önce anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş farklı olarak ortamlara 0,05µmol, 0,10µmol, 0,20µmol, 0,40µmol, 0,80µmol PAMAM-G3.5 veya PAMAM-G4.5 dendrimerler eklenmiştir. Çalışma sonunda okzaliplatinin miktarı uygun seyreltme yapılarak tayin edilmiştir.

Okzaliplatin-Dendrimer Formülasyonlarının Hazırlanması

Okzaliplatinin dendrimerik formülasyonları fiziksel kompleks ve kimyasal konjugat formülasyonları olmak üzere iki farklı yaklaşımla hazırlanmıştır. Anyonik yapıya sahip PAMAM-G3.5 ve PAMAM-G4.5 dendrimerler kullanılmıştır. Böylece

dendrimer nesli ve hazırlanış değişikliklerinin formülasyonlara olan etkilerini incelemek mümkün olmuştur. Formülasyonlara verilen kısaltmalar Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12. Tezde hazırlanan formülasyon tiplerinin kodlanması

Dendrimer Tipi	Hazırlanış Şekli	Kısaltma
PAMAM-G3.5	Fiziksel kompleks	FK-3.5
PAMAM-G4.5	Fiziksel kompleks	FK-4.5
PAMAM-G3.5	Kimyasal konjugasyon	KK-3.5
PAMAM-G4.5	Kimyasal konjugasyon	KK-4.5

Fiziksel kompleksleşme ile hazırlanacak dendrimerik okzaliptatin formülasyonlarının hemen salım yapma özelliğinde olmaları beklenirken, kimyasal konjugasyon ile hazırlanacak formülasyonların, etkin maddeyi daha uzun sürede ve daha yavaş olarak salması beklenmektedir.

Okzaliptatinin dendrimerik kompleksleri (FK-3.5 ve FK-4.5) birlikte çöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır. Dendrimerler çok sayıda (birincil ve tersiyer aminler) bağlanma noktasına sahip olduklarından, bir dendrimer molekülünün birçok ilaç molekülü ile etkileşime girebileceği varsayılmaktadır. Bu nedenle dendrimer oranının her zaman bir olduğu farklı ilaç:dendrimer (N:1) molar konsantrasyon oranlarında karışımlar hazırlanmıştır. N sayısı 1’den dendrimer neslinin olası bağlantı noktası sayısına kadar bir değer alabilmektedir (97).

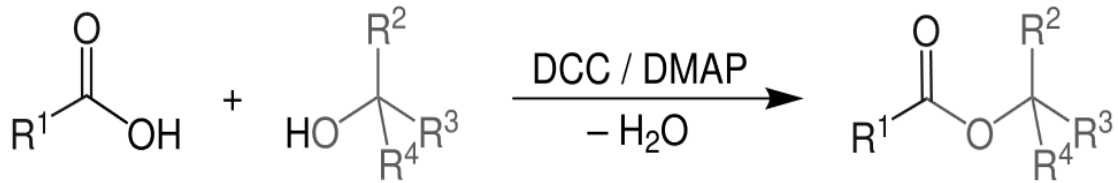
Tablo 13. Dendrimerlerin sahip oldukları olası ilaç etkileşim bölgesi sayıları (98)

Dendrimer Nesli	Yüzey Grupları	Tersiyer Amin Grubu
3	32 (-NH ₂)	30
3.5	64 (-COOH)	62
4	64 (-NH ₂)	62
4.5	128 (-COOH)	126

Tam nesil PAMAM dendrimerlerin yüzeyinde bulunan primer aminlerinin pKa değeri 7-9 arasında değişirken, dalların arasındaki tersiyer aminlerinin pKa değerleri ise 3-6 arasındadır. Bu nedenle farklı pH değerine sahip ortamlarda, dendrimerlerin fonksiyonel gruplarının iyonizasyon durumları değişkenlik gösterir (99). Yüksek

pH'larda PAMAM dendrimerlerin primer ve tersiyer aminleri protonlanmamış halde bulunurlar. Nötrale yakın pH'larda sadece primer aminler protonlanırken, düşük pH'larda ise hem primer hem de tersiyer aminler protonlanırlar (100). Yarım nesil dendrimerlerde bulunan karboksilli asit yüzey gruplarının pKa değeri ise yaklaşık olarak 4-5 arasındadır (101). Farklı ortam pH'larının etkin maddenin dendrimerlere fiziksel olarak tutunma özelliğini değiştirebileceği düşünüldüğünden, fiziksel dendrimer kompleks formülasyonları farklı oranlarda okzaliplatinin farklı ortamlarda eklenmesiyle hazırlanmıştır. G3.5 ve G4.5 dendrimerleri için üç farklı ortamda (distile su, pH 4 asetat tamponu ve pH 7 fosfat tamponu) ve beş farklı okzaliplatin:dendrimer mol oranında (25:1, 50:1, 75:1, 150:1, 250:1) formülasyon hazırlanmıştır. Yükleme ortamı olarak bazik bir tampon kullanılmamıştır, çünkü yüksek hidroksil iyonuna sahip ortamlar okzaliplatinde stabilite problemlerine neden olabilmektedir (95,96). En yüksek oran olarak 250:1 seçilmiş olmasının sebebi okzaliplatin bağlanabilecek tüm noktaların toplamının maksimum 254 olmasıdır (98). (G4.5 dendrimerde karboksilli 128 yüzey grubuna ve dalların arasındaki 126 tersiyer amin gruplarına okzaliplatin bağlanması durumunda)

Okzaliplatinin dendrimerik konjugatları (KK-3.5 ve KK-4.5) kimyasal reaksiyon ile hazırlanmıştır. Temel olarak yarım nesil dendrimerlerin yüzeyinde bulunan karboksil grupları ile okzaliplatinin modifiye edilmesi ile elde edilen hidroksil grupları arasında bir ester bağı kurulması amaçlanmıştır. Bu ester bağının kurulması Şekil 24'te gösterilen ve Wolfgang Steglich tarafından tanımlanan esterifikasyon reaksiyonları ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 24. Steglich esterifikasyon reaksiyonu (102)

Steglich esterifikasyonunda bağlayıcı ajan olarak N,N'-disikloheksilkarbodiimit (DCC), katalizör olarak 4-(dimetilamino)piridin (DMAP), reaksiyon ortamı olarak ise aprotik bir çözücü olan diklorometan (DCM) kullanılır (103). Dendrimerler ve okzaliplatin DCM içinde çözünmediğinden bu çalışmada reaksiyon ortamı olarak hem okzaliplatin ve dendrimerlerin hem de DCC ve DMAP'ın iyi şekilde çözündüğü bir başka aprotik çözücü olan N,N-dimetilformamit (DMF) kullanılmıştır (104,105).

a) **FK-3.5 formülasyonlarının hazırlanması:** FK-3.5 formülasyonlarının hazırlanabilmesi için önce 25mg okzaliplatin ayrı ayrı tartılarak 5'er mL'lik su, pH 4 ve pH 7 ortamlarında çözülmüştür. Böylece 5mg/mL konsantrasyonda okzaliplatinin üç farklı ortam içerisindeki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Sırasıyla 25:1, 50:1, 75:1, 150:1 ve 250:1 oranların hazırlanabilmesi için alınması gereken stok çözelti ve metanollü G3.5 dendrimer çözeltisi miktarları Tablo 14'te özetlenmiştir. Hesaplamalar yapılırken, okzaliplatin ve G3.5 dendrimerin molekül ağırlığı sırasıyla 397,286 g/mol ve 12927,69 g/mol, G3.5 dendrimerin %10'luk (a/a) çözeltisinin yoğunluğu üreticinin belirttiği şekilde 0,810g/mL olarak alınmış, μmol değerleri virgülden sonra 2 basamağa yuvarlanmıştır.

Tablo 14. FK-3.5 formülasyonları

Ortam	Eklenen Stok (mL)	Okzaliplatin		Dendrimer			Mol Oranı	Formülasyon Kodu
		(mg)	(μmol)	(mg)	(μmol)	(μL)		
Su	0,1	0,5	1,26	0,65	0,05	8	25	F1
Su	0,2	1	2,52	0,65	0,05	8	50	F2
Su	0,3	1,5	3,78	0,65	0,05	8	75	F3
Su	0,6	3	7,55	0,65	0,05	8	150	F4
Su	1	5	12,59	0,65	0,05	8	250	F5
pH 4	0,1	0,5	1,26	0,65	0,05	8	25	F6
pH 4	0,2	1	2,52	0,65	0,05	8	50	F7
pH 4	0,3	1,5	3,78	0,65	0,05	8	75	F8
pH 4	0,6	3	7,55	0,65	0,05	8	150	F9
pH 4	1	5	12,59	0,65	0,05	8	250	F10
pH 7	0,1	0,5	1,26	0,65	0,05	8	25	F11
pH 7	0,2	1	2,52	0,65	0,05	8	50	F12
pH 7	0,3	1,5	3,78	0,65	0,05	8	75	F13
pH 7	0,6	3	7,55	0,65	0,05	8	150	F14
pH 7	1	5	12,59	0,65	0,05	8	250	F15

Tabloda belirtilen miktardaki stok çözelti ve dendrimer çözeltisi cam bir flakona eklenip 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Sürenin sonunda çözücü ortam uçurular. Kalıntı susuz etanolde süspende edilir. Dendrimerlerin dalları arasına girip kompleksleşmeyen okzaliplatinin çöktürülmesi için 10.000rpm'de 5 dakika

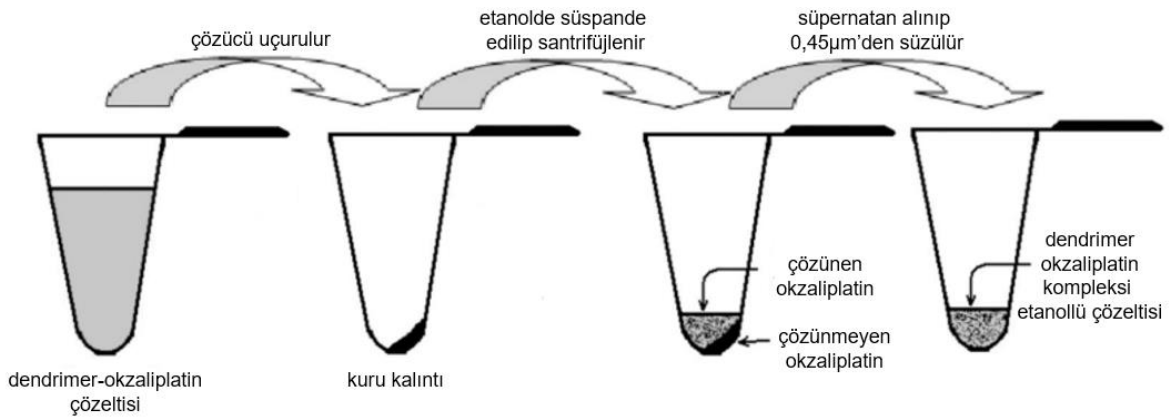
santrifüj edilir. Santrifüj sonunda üstte kalan sıvı alınıp 0,45µm'lik naylon veya PTFE membran filtreden süzülür (Şekil 24). Süzüntünün etanolünün uçurulup kalıntının suda çözülmesiyle sulu kompleks çözeltisi elde edilir. Ölçümler bu çözeltiyle yapılır.

b) FK-4.5 formülasyonlarının hazırlanması: FK-4.5 formülasyonlarının hazırlanabilmesi için önce 25mg okzaliplatin ayrı ayrı tartılarak 5'er mL'lik su, pH 4 ve pH 7 ortamlarında çözülmüştür. Böylece 5mg/mL konsantrasyonda okzaliplatinin üç farklı ortam içerisindeki stok çözeltisi hazırlanmıştır. Sırasıyla 25:1, 50:1, 75:1, 150:1 ve 250:1 oranların hazırlanabilmesi için alınması gereken stok çözelti ve metanollü G4.5 dendrimer çözeltisi miktarları Tablo 15'te özetlenmiştir. Hesaplamalar yapılırken, okzaliplatin ve G4.5 dendrimerin molekül ağırlığı sırasıyla 397,286 g/mol ve 26251,86 g/mol, G4.5 dendrimerin %5'lik (a/a) çözeltisinin yoğunluğu üreticinin belirttiği şekilde 0,791g/mL olarak alınmış, µmol değerleri virgülden sonra 2 basamağa yuvarlanmıştır.

Tablo 15. FK-4.5 formülasyonları

Ortam	Eklenen Stok (mL)	Okzaliplatin		Dendrimer			Mol Oranı	Formülasyon Kodu
		(mg)	(µmol)	(mg)	(µmol)	(µL)		
Su	0,1	0,5	1,26	1,32	0,05	33,5	25	F16
Su	0,2	1	2,52	1,32	0,05	33,5	50	F17
Su	0,3	1,5	3,78	1,32	0,05	33,5	75	F18
Su	0,6	3	7,55	1,32	0,05	33,5	150	F19
Su	1	5	12,59	1,32	0,05	33,5	250	F20
pH 4	0,1	0,5	1,26	1,32	0,05	33,5	25	F21
pH 4	0,2	1	2,52	1,32	0,05	33,5	50	F22
pH 4	0,3	1,5	3,78	1,32	0,05	33,5	75	F23
pH 4	0,6	3	7,55	1,32	0,05	33,5	150	F24
pH 4	1	5	12,59	1,32	0,05	33,5	250	F25
pH 7	0,1	0,5	1,26	1,32	0,05	33,5	25	F26
pH 7	0,2	1	2,52	1,32	0,05	33,5	50	F27
pH 7	0,3	1,5	3,78	1,32	0,05	33,5	75	F28
pH 7	0,6	3	7,55	1,32	0,05	33,5	150	F29
pH 7	1	5	12,59	1,32	0,05	33,5	250	F30

Tabloda belirtilen miktardaki stok çözelti ve dendrimer çözeltisi cam bir flakona eklenip 24 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılır. Sürenin sonunda çözücü ortam uçurulur. Kalıntı susuz etanolde süspande edilir. Dendrimerler ile kompleksleşmeyen okzaliplatinin çöktürülmesi için 10.000rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda üstte kalan sıvı alınıp 0,45µm'lik naylon veya PTFE membran filtreden süzülür (Şekil 25). Süzüntünün etanolünün uçurulup, kalıntının suda çözülmesiyle sulu kompleks çözeltisi elde edilir. Ölçümler bu çözeltiyle yapılır.

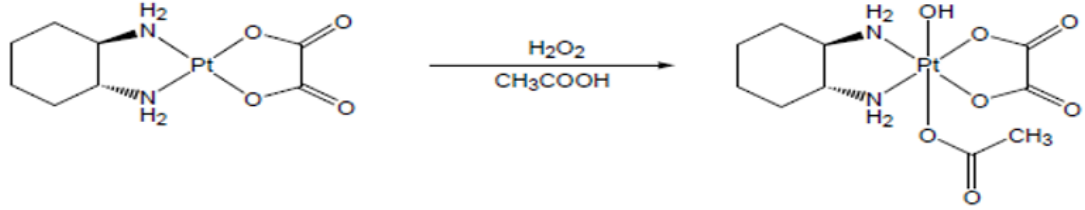


Şekil 25. FK-3.5 ve FK-4.5 formülasyonlarının hazırlanışı

c) KK-3.5 formülasyonunun hazırlanması: KK-3.5 formülasyonları iki basamaklı bir reaksiyonla sentezlenmiştir. İlk basamakta okzaliplatinin modifikasyonu Abramkin (106) ve Sommerfeld ve ark. (107) tarafından açıklanan yöntemle gerçekleştirilmiş, daha sonra ise bu bileşiğin G3.5 dendrimere bağlanması daha önce anlatıldığı üzere Steglich esterifikasyon reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir.

Okzaliplatinin modifikasyonu: 1,192g (3mmol) okzaliplatin üzerine 20mL asetik asit eklenir ve manyetik karıştırıcıda süspande edilir. Süspansiyon üzerine 250µL %30'luk H₂O₂ çözeltisi (perhidrol) ilave edilir. 30 dakika arayla sırasıyla 250µL ve 750µL olmak üzere 2 kez daha %30'luk H₂O₂ ilave edilir. 1,5 saat içinde süspansiyon sarımsı ve neredeyse berrak bir çözeltiliye dönüşür. Bu çözelti gece boyunca karıştırılır. Asetik asit uçurularak ortamdaki uzaklaştırılır ve yağlı kalıntı 40mL distile su ile bulanık bir karışım oluşturmak üzere tekrar süspande edilir. Eklenen su uçurularak ortamdaki uzaklaştırılır. Bu işlem (su eklenip uzaklaştırılması) ürün katı olana kadar 2 kere daha tekrarlanır. Elde edilen katı ürün bir miktar etil asetat (10-20mL) ile tekrar süspande edilir. Bu süspansiyona berrak çözelti oluşana ve daha fazla metanol eklenmesinin

çözeltinin görüntüsünü değiştirmediği görülene kadar metanol eklenir. Karışım 0,45µm'lik naylon membran filtreden süzülür. Çözücü karışımı ortamdaki uzaklaştırılır (106). Elde edilen hafif sarımsı ürün konjugatların hazırlanmasında kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilir. Okzaliplatinin modifikasyonuna ait kimyasal sentez reaksiyonu Şekil 26'da gösterilmiştir.

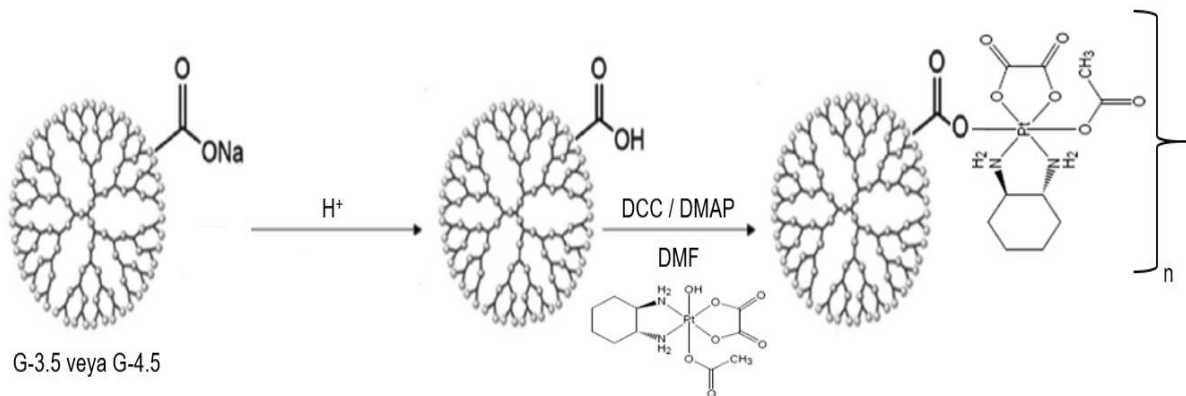


Şekil 26. Okzaliplatinin modifikasyon reaksiyonu (106)

Dendrimer konjugasyonu: G3.5 dendrimerin metanollü çözeltisinden (%10 a/a) 250µL (1,566µmol) alınır. Metanol vakum altında uçurulup kalıntı pH'sı 3 olan HCl çözeltisinde çözülerek karboksil uçları aktive edilir (108). Su uçurulduktan sonra kuruyan dendrimerler 6mL DMF içerisinde tekrar çözülür. Bu çözeltinin üzerine 60mg (126,8µmol) modifiye edilmiş okzaliplatin 26,2mg (126,8µmol) DCC ve 15,5mg (126,8µmol) DMAP eklenir. Karışım vakum altında 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılır. 24 saatin sonunda reaksiyon sırasında oluşan DCC'den kaynaklı çökeltiler (örneğin disikloheksilüre-DCU) 0,45µm'lik naylon membran filtreden süzülerek uzaklaştırılır. Çözücü ortam uçurulur. Kalan artık distile suda çözülerek gerekirse tekrar 0,45µm'lik naylon membran filtreden süzülür. Reaksiyondan arta kalan hidrofobik organik maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması için 25mL DCM ile 5 kez ekstraksiyon yapılır. Ekstraksiyon sonunda sulu kısım diyalizle saflaştırılıp liyofilize edilmek üzere ayrılır. Liyofilizasyon sulu çözeltinin -80°C'de 3 saat dondurulması, -40°C'de 0,01mbar basınçta 22 saat ve -20°C'de 0,001bar basınçta 3 saat bekletilmesiyle gerçekleştirilir. Elde edilen liyofilize konjugat karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere +4°C'de saklanır. Reaksiyona giren maddelerin dendrimerle mol oranı yaklaşık olarak 80:1'dir. Böylelikle G3.5 dendrimerin 64 yüzey grubunun hepsinin etkin madde ile bağlanmasına olanak sağlanmıştır. Sentez reaksiyonu Şekil 26'da gösterilmiştir.

d) KK-4.5 formülasyonunun hazırlanması: KK-4.5 formülasyonları da KK-3.5 formülasyonu gibi iki basamaklı bir reaksiyonla sentezlenmiştir. İlk basamakta okzaliptatinin modifikasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonra ise bu bileşiğin G4.5 dendrimere bağlanması gerçekleştirilmiştir. Okzaliptatinin modifikasyonu KK-3.5 formülasyonunun hazırlanması başlığında anlatıldığı üzere gerçekleştirilmiştir.

G4.5 dendrimerin metanollü çözeltisinden (%5 a/a) 500 μ L (0,753 μ mol) alınır. Metanol vakum altında uçurulup kalıntı pH'sı 3 olan HCl çözeltisinde çözülerek karboksil uçları aktive edilir (108). Su uçurulduktan sonra kuruyan dendrimerler 5mL DMF içerisinde tekrar çözülür. Bu çözeltinin üzerine 50mg (105,6 μ mol) modifiye edilmiş okzaliptatin 21,8mg (105,6 μ mol) DCC ve 12,9mg (105,6 μ mol) DMAP eklenir. Karışım vakum altında 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılır. 24 saatin sonunda reaksiyon sırasında oluşan DCC'den kaynaklı çökeltiler (örneğin disikloheksilüre-DCU) 0,45 μ m'lik naylon membran filtreden süzülerek uzaklaştırılır. Çözücü ortam uçurulur. Kalan artık distile suda çözülerek gerekirse tekrar 0,45 μ m'lik naylon membran filtreden süzülür. Reaksiyondan arta kalan hidrofobik organik maddelerin ortamdaki uzaklaştırılması için 25mL DCM ile 5 kez ekstraksiyon yapılır. Ekstraksiyon sonunda sulu kısım, diyalizle saflaştırılıp liyofilize edilmek üzere ayrılır. Liyofilizasyon sulu çözeltinin -80°C'de 3 saat dondurulması, -40°C'de 0,01mbar basınçta 22 saat ve -20°C'de 0,001bar basınçta 3 saat bekletilmesiyle gerçekleştirilir. Elde edilen liyofilize konjugat karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere +4°C'de saklanır. Reaksiyona giren maddelerin dendrimere mol oranı yaklaşık olarak 140:1'dir. Böylelikle G4.5 dendrimerin 128 yüzey grubunun hepsinin etkin madde ile bağlanmasına olanak sağlanmıştır. Sentez reaksiyonu Şekil 27'de gösterilmiştir.



Şekil 27. Modifiye okzaliptatinin dendrimer ile konjugasyon reaksiyonu

Okzaliplatin-Dendrimer Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Okzaliplatinin dendrimerik formülasyonlarının karakterizasyonunda kullanılan yöntemler Mor Ötesi-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi, ^1H ve ^{13}C Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisidir. Ayrıca dinamik ışık saçılımı esasına göre partikül boyutu ve dağılımı incelenmiş, formülasyonların yüzey yükleri hakkında bilgi sahibi olmak için zeta (ζ) potansiyel değerleri ölçülmüştür. FK-3.5 ve FK-4.5 formülasyonları için yükleme oranı ve yükleme etkinliği araştırılmış, KK-3.5 ve KK-4.5 formülasyonları için ise yaklaşık olarak mol başına konjuge olmuş okzaliplatin miktarları $^1\text{H-NMR}$ 'da integrasyonu yapılan karakteristik piklerin alanlarının oranlanmasıyla bulunmuştur.

a) Mor ötesi-görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis): UV-Vis spektroskopisi dendrimerlerin karakterizasyonu için önemli bir araç olup, spektrumda görülen karakteristik piklerdeki kaymalar, yüzey modifikasyonlarını veya kompleks oluşumlarını belirlemek için kullanılabilir (98,109). FK-3.5 ve FK-4.5 sulu çözeltilerinin 200-400nm dalgaboyları arasında spektrumları alınmış ve saf okzaliplatinin aynı dalgaboyları arasında alınmış spektrumu ile karşılaştırılmıştır. Saf okzaliplatin spektrumunda görülen piklerin kaybolması, şiddetinin azalması veya yerinin kayması kompleksleşmenin gerçekleştiğini düşündürmüştür.

b) Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi: FT-IR spektroskopisi, dendrimerin fonksiyonel grubunun, konjugasyonun ve ilaç dendrimer etkileşiminin belirlenmesi için kullanılan diğer bir yöntemdir. FT-IR spektroskopisi ile ilaç dendrimer etkileşiminin belirlenmesi dendrimer ve etkileşime giren ilacın spektrumlarının karşılaştırılması ile gerçekleştirilir (109). UV-Vis tekniğinde açıklanana benzer şekilde FK-3.5 ve FK-4.5 formülasyonlarında FT-IR spektrumundaki piklerde görülen değişimler kompleks oluşumlarını belirlemede kullanılmıştır. Bu değişiklikler pik yerinin kayması, pik şiddetinin değişmesi ve pik genişliğinin artması gibi değişikliklerdir (110). KK-3.5 ve KK-4.5 sentezinde ve okzaliplatin modifikasyonunda ise kaybolan veya yeni oluşan pikler kimyasal reaksiyonlar sırasında kırılan veya oluşan bağların gösterilmesini sağlamıştır. FT-IR spektrumları $4000-400\text{cm}^{-1}$ (Perkin Elmer) aralığında alınmıştır.

c) ¹H ve ¹³C Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi: NMR rutin analizlerde dendrimerleri karakterize etmek için en sık kullanılan tekniklerin başında gelmektedir. Yapıların aydınlatılmasında en sık kullanılan NMR tipi ¹H ve ¹³C NMR olmakla birlikte hetero atom içeren dendrimerlerde ³¹P NMR, ²⁹Si NMR, ¹⁹⁵Pt gibi farklı tip NMR kullanılması da faydalı olmaktadır (109,111). Elde edilen KK-3.5 ve KK-4.5 konjugatları ve modifiye edilen okzaliplatin yapılarının karakterizasyonu ¹H-NMR (400MHz) ve ¹³C-NMR (100MHz) ile yapılmıştır.

d) Partikül boyutu-dağılımı ve zeta (ζ) potansiyel ölçümleri: Seçilen formülasyonların partikül boyutu-dağılımı ve elektriksel yükleri hakkında bilgi edinmek amacıyla ortalama partikül boyutu (Z-average), polidispersite indeksi (PDI) ve zeta (ζ) potansiyel ölçümleri dinamik ışık saçılımı (DLS) prensibine göre çalışan Malvern Zetasizer Nano ZS cihazında yapılmıştır. Ölçümler 173^o açıda ve 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir tarama süresi 10 saniye, toplam tarama sayısı ise otomatik olarak seçilmiştir. Boyut ölçümlerinde standart tek kullanımlık küvetler, zeta potansiyel ölçümü için ise zeta potansiyel ölçüm hücreleri kullanılmıştır.

e) Yükleme oranı, yükleme etkinliği ve konjuge olmuş okzaliplatin miktarının saptanması: FK-3.5 ve FK-4.5 sulu çözeltilerinden hareketle dendrimerin dalları arasında tutularak enkapsüle edilmiş okzaliplatin miktarı bulunarak yükleme oranı ve yükleme etkinliği Şekil 28'deki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Yükleme Oranı} = \frac{\text{Dendrimer İçi Okzaliplatin (mg)}}{\text{Dendrimer (mg)} + \text{Dendrimer İçi Okzaliplatin (mg)}} \times 100$$

$$\% \text{ Yükleme Etkinliği} = \frac{\text{Dendrimer İçi Okzaliplatin (mg)}}{\text{Başlangıçta Ortama Eklenen Okzaliplatin (mg)}} \times 100$$

Şekil 28. % yükleme oranı ve % yükleme etkinliği formülleri

KK-3.5 ve KK-4.5 formülasyonlarında dendrimer uçlarına konjuge olmuş madde miktarı, ¹H NMR ile saptanmıştır. 1 mol dendrimer başına konjuge modifiye okzaliplatin miktarı, etkin maddeye ait olduğu bilinen proton pik alanının dendrimerine ait olduğu bilinen proton pik alanına oranlanmasıyla bulunmuştur.

Fiziksel Kompleks ve Kimyasal Konjugatlarda İn Vitro Salım Çalışmaları

Seçilen kompleks formülasyonlarında ve hazırlanan kimyasal konjugatlardan etkin madde çıkışının belirlenebilmesi için *in vitro* salım çalışmaları yapılmıştır. Salım çalışmaları diyaliz membran metoduna göre gerçekleştirilmiştir (112). Çalışmalarda 3,5-5kD por açıklığına sahip Spectra/Por® Biotech rejener selüloz (RC) membranlar kullanılmıştır. Seçilen bu por açıklığı yüksek molekül ağırlığına sahip olan G3.5 (12927,69g/mol) ve G4.5 (26251,86g/mol) dendrimerlerin membran içinde kalmasını sağlarken, formülasyonlardan salınan okzaliptin ve diğer düşük molekül ağırlığına sahip maddelerin membran dışına çıkışına olanak tanımaktadır.

Membran kullanılmadan önce üzerindeki koruyucunun giderilmesi için üreticinin belirttiği üzere 30 dakika distile suda bekletilmiş daha sonra çalışmanın yapılacağı ortama alınıp 30 dakika daha bekletilmiştir. Hesaplanan miktardaki formülasyon membran içerisine doldurulup membran sızdırmaz kısıkaçlar ile kapatılmıştır. Kapatılan membran 25mL ortam içerisine konulmuş, önceden belirlenen zaman noktalarında ortamdaki örnekler alınmış, alınan örnek miktarı kadar taze ortam çözeltisiyle tamamlama yapılmıştır. Alınan örnekler validasyonu yapılmış miktar tayini yöntemi ile analiz edilmiştir.

Çalışmalar biyolojik ortamı taklit etmek amacıyla 37°C'de gerçekleştirilmiştir. İn vitro salım çalışmaları kanı (pH 7.4 fosfat tamponu) ve tümörün asidik çevresini (pH 5.5 asetat tamponu) temsil etmesi için iki farklı pH'ya sahip ortamda gerçekleştirilmiştir (113,114). Yapılan tüm salım çalışmalarında sink koşul sağlanmıştır.

Zamana karşı yüzde çıkan madde miktarlarının elde edilmesiyle salım profilleri oluşturulmuştur. Farklı formülasyonlarının salım profillerinin kıyaslanması f_1 (fark faktörü) ve f_2 (benzerlik faktörü) değerlerinin hesaplanmasıyla yapılmıştır. f_1 değerinin 0-15 f_2 değerinin ise 50-100 arasında bulunması iki profilin benzer olduğunu göstermektedir (115,116). Fark ve benzerlik faktörlerinin hesaplanmasında Şekil 29'daki formüller kullanılmaktadır. (R_t =Referans ürün, T_t =Test edilen ürün)

$$f_1 = \frac{\sum |R_t - T_t|}{\sum R_t} \times 100$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\}$$

Şekil 29. Fark (f_1) ve benzerlik (f_2) faktörlerinin formülleri (116)

Dissolüsyon profilleri elde edildikten sonra kimyasal konjugatların hangi tip salım kinetiğine uyduğu araştırılmıştır. Kinetik modeller salım verilerinin matematiksel olarak ifadesini sağlayan eşitliklerdir. 0.derece, 1.derece, Higuchi, Hixson-Crowell, Weibull, Korsmeyer-Peppas, Baker-Lonsdale ve Hopfenberg gibi çok sayıda matematiksel model bulunmaktadır (117,118). Bu tez çalışması kapsamında dissolüsyon verilerine 0.derece, 1.derece, Higuchi, Hixson-Crowell ve Weibull kinetik modelleri uygulanmıştır. Uygulanan kinetik tiplerinin matematiksel ifadeleri Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 16. Çeşitli kinetik tipleri ve matematiksel olarak ifadeler (117,118)

Kinetik Tipi	Matematiksel İfade
0.derece	$Q_t = Q_0 + K t$
1.derece	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K t$
Higuchi	$Q_t = K t^{1/2}$
Hixson-Crowell	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K t$
Weibull	$\log [-\ln(1-(Q_t / Q_\infty))] = K \log t - \log a$

Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma Geliştirme Merkezi (TÜTAGEM) laboratuvarları tarafından yürütülmüştür.

Hücre kültürü çalışması kapsamında seçilen formülasyonun etkinliğinin serbest okzalipatinle kıyaslanması için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında HT-29 kolon kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler azot tankından alınarak %10 fetal sığır serumu ve %1'lik penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içerisinde ve 75 cm² lik yüzey alanına sahip flasklarda çoğaltılmıştır. İstenen konfluense (%70-80) gelene kadar 37°C'de ve %5 CO₂ atmosferinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince hücrelerin bulunduğu sıvı ortam iki günde bir yenilenmiştir. Daha sonra hücreler tripsinize edilerek kaldırılmış, sayılmış ve 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Ekimden 24 saat sonra ilaç uygulaması yapılmış, ilaç uygulanmasının ardından 48 saat sonra ise her kuyucuğa MTT çözeltisi eklenmiş 37°C'de, karanlıkta 4 saat bekletilmiştir. Canlı hücrelerin MTT'yi indirgeyerek oluşturduğu mor formazan kristalleri çözülüp ve çözeltilerin 570nm'deki absorbansları ölçülmüştür. Absorbans arttıkça

hücrelerin daha fazla formazan oluşturduğu ve canlı hücre sayısının arttığı gösterilmiştir (119).

Hücre grupları, uygulama yapılmamış hücreler (negatif kontrol), serbest ilaç uygulanmış hücreler (pozitif kontrol), etkin maddesiz boş dendrimer uygulanmış hücreler ve formülasyon uygulanmış hücreler (tedavi grubu) olmak üzere dört gruptur. Çalışma sekiz tekrarlı olarak (n=8) yürütülmüş, seri dilüsyon şeklinde on farklı konsantrasyonda uygulama yapılmıştır. Herhangi bir uygulama yapılmayan hücrelerdeki absorbans baz alınarak (bunların %100 canlı olduğu kabul edilerek) diğer gruplardaki % canlılık değerleri hesaplanmıştır. Hücrelerin yarısının canlılığını kaybetmesini sağlayan konsantrasyon (IC₅₀) değerleri GraphPad Prism 8.2.0 programı ile doğrusal olmayan (nonlinear) regresyon kullanılarak bulunmuştur.

İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism 8.2.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Test sonucunda $p > 0,05$ ise verilerin normal dağılım gösterdiği kabul edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık parametrik testlerden ANOVA (analysis of variance) ile saptanmıştır. Analiz sonucunda p değeri 0,01'den küçük olduğunda sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup gruplar arası kıyaslama Tukey testi ile yapılmıştır.

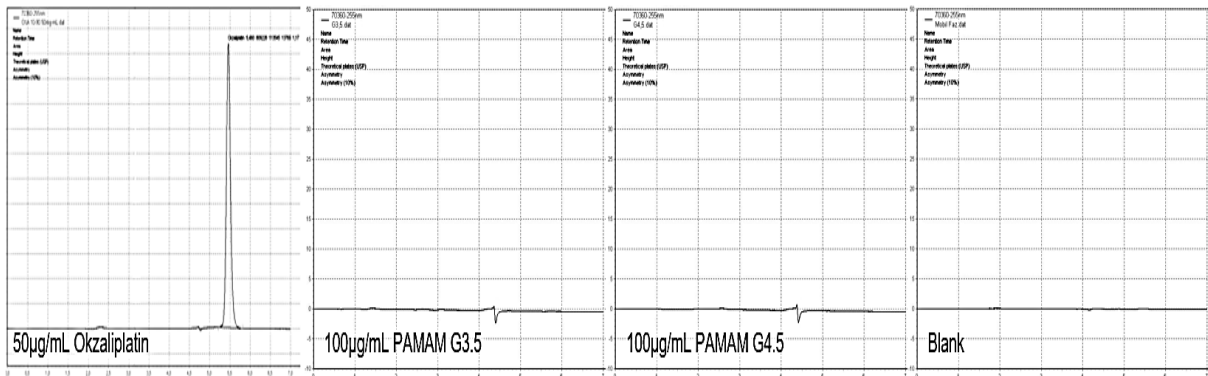
BULGULAR

OKZALİPLATİN MİKTAR TAYİNİ YÖNTEMLERİNİN VALİDASYONU

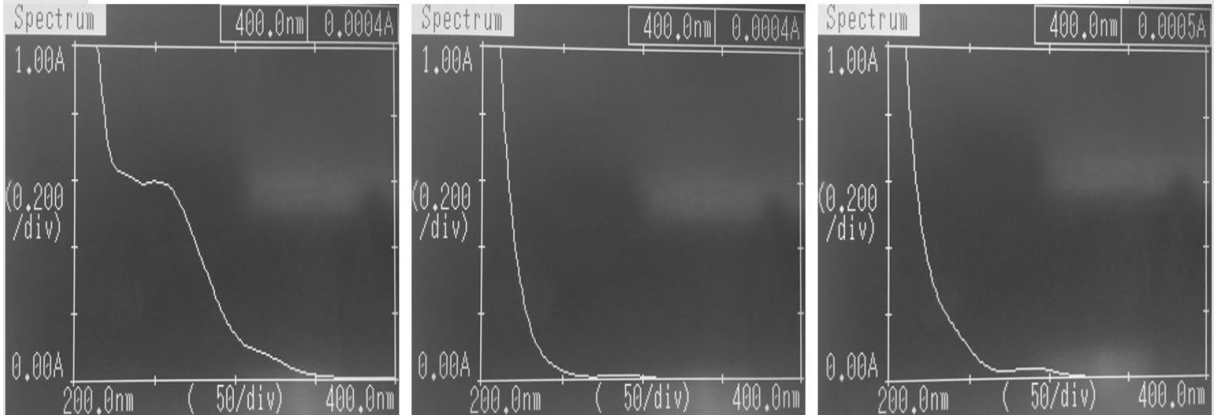
Etkin madde miktar tayini için kullanılan HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerin validasyonu ICH Q2 (R1) kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilmiş ve yöntemlerin okzaliplatin miktarını saptamak için kullanılmaya uygun olduğu bulunmuştur.

Seçicilik (Spesifiklik)

PAMAM-G3.5 ve PAMAM-G4.5 dendrimer çözeltileri ve etkin maddesiz olarak hazırlanan (blank) çözeltilerin kromatogramları Şekil 30'da gösterilmiştir. Kromatogramlardan da görüldüğü üzere dendrimerlerin ve etkin maddesiz çözeltilerin okzaliplatin pikine herhangi bir girişim yapmadıkları, dolayısıyla yöntemin okzaliplatine özgü olduğu bulunmuştur. Ayrıca 200-400nm dalgaboyları arasında spektrofotometreden alınan spektrumlarda da okzaliplatinin maksimum absorbands gösterdiği dalgaboyu olan 255nm'de PAMAM-G3.5 veya PAMAM-G4.5 dendrimerlerin ölçüme girişim yapacak bir absorbands vermedikleri Şekil 31'de gösterilmiştir.



Şekil 30. Okzaliplatin, G3.5, G4.5 dendrimer ve boş çözelti kromatogramları



Şekil 31. Okzaliplatin, G3.5 ve G4.5 dendrimer spektrumları

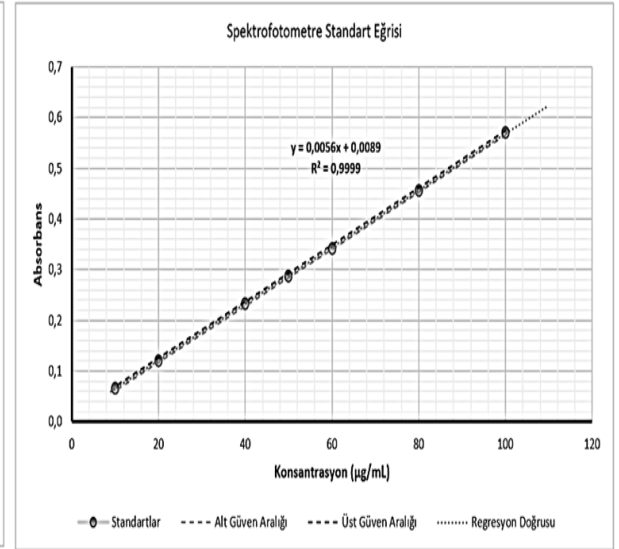
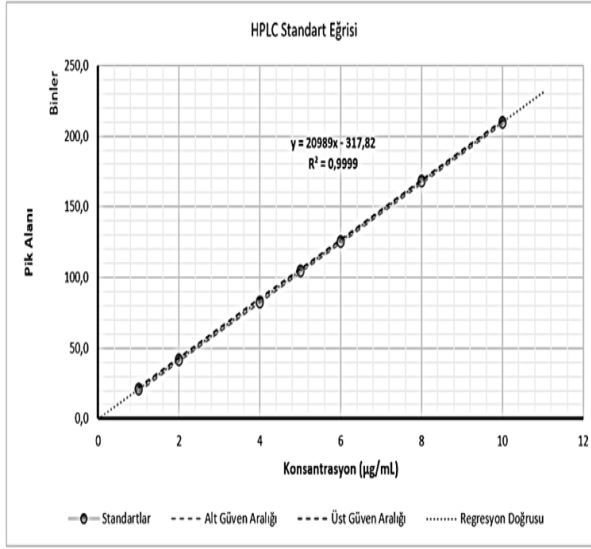
Doğrusallık

Yöntemler bölümünde anlatıldığı üzere hazırlanan standart çözeltiler HPLC ve spektrofotometrede ölçülmüş, her bir standart çözeltiliye karşılık gelen pik alanı ve absorban değerleri Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17. HPLC ve spektrofotometre doğrusallık verileri

HPLC Standartları	Pik Alanı	Spektrofotometre Standartları	Absorbans
10µg/mL	209.748	100µg/mL	0,571
8µg/mL	168.068	80µg/mL	0,456
6µg/mL	125.146	60µg/mL	0,342
5µg/mL	104.631	50µg/mL	0,288
4µg/mL	82.823	40µg/mL	0,234
2µg/mL	41.634	20µg/mL	0,121
1µg/mL	21.345	10µg/mL	0,066

Bu veriler Microsoft Office Excel 2016 programı yardımıyla işlenmiş, okzaliplatin standart eğrileri Şekil 32’de regresyon doğrularına ait bilgiler ise Şekil 33’te, gösterilmiştir. Buna göre HPLC için regresyon doğru denklemi $y=20989x-317,82$ olarak, determinasyon katsayısı (r^2) ise 0,9999 olarak, spektrofotometre için ise doğru denklemi $y=0,0056x+0,0089$ r^2 ise 0,9999 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak her iki yöntem belirtilen konsantrasyon aralıklarında doğrusallık göstermektedir.



Şekil 32. HPLC ve spektrofotometre standart eğrileri

Lineerite Verileri

Standart #	Konsantrasyon (µg/mL)	Alan (y)
Standart #1	10	209.748
Standart #2	8	168.068
Standart #3	6	125.146
Standart #4	5	104.631
Standart #5	4	82.823
Standart #6	2	41.634
Standart #7	1	21.345

Lineerite Verileri

Standart #	Konsantrasyon (µg/mL)	ABS (y)
Standart #1	100	0,571
Standart #2	80	0,456
Standart #3	60	0,342
Standart #4	50	0,288
Standart #5	40	0,234
Standart #6	20	0,121
Standart #7	10	0,066

Regresyon İstatistikleri

Nokta Sayısı:	7
Serbestlik Derecesi:	5
Rezidüel Standart Sapma:	564,92
R :	1,0000
R ² :	0,9999

Regresyon İstatistikleri

Nokta Sayısı:	7
Serbestlik Derecesi:	5
Rezidüel Standart Sapma:	0,00
R :	1,0000
R ² :	0,9999

Regresyon Doğrusu Bilgileri

Regresyon Doğrusu Eğimi:	20.989,44
Eğimlerin Standart Hatası:	72,42
Regresyon Doğrusu Kesim Noktası:	-317,82
Kesimlerin Standart Hatası:	429,29

Regresyon Doğrusu Bilgileri

Regresyon Doğrusu Eğimi:	0,0056
Eğimlerin Standart Hatası:	0,00002
Regresyon Doğrusu Kesim Noktası:	0,0089
Kesimlerin Standart Hatası:	0,0014

LoD =	0,0001 mg/mL 0,1 µg/mL
LoQ =	0,0003 mg/mL 0,3 µg/mL

LoD =	0,0011 mg/mL 1,1 µg/mL
LoQ =	0,0033 mg/mL 3,3 µg/mL

Şekil 33. Regresyon doğrularına ait bilgiler

LOD ve LOQ

Microsoft Office Excel 2016 programı yardımıyla her iki yöntem için de regresyon doğrusunun rezidüel standart sapması (σ) ve regresyon doğrusunun eğimi bulunmuştur. LOD ve LOQ yöntemler kısmında anlatılan formüller ile hesaplanmıştır. Buna göre HPLC ve spektrofotometrik yöntem için LOD değeri sırasıyla 0,1 μ g/mL ve 1,1 μ g/mL LOQ değeri ise sırasıyla 0,3 μ g/mL ve 3,3 μ g/mL olarak bulunmuştur.

Kesinlik

Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları yöntemler bölümünde anlatıldığı üzere yapılmıştır. Üç ayrı günde, her konsantrasyonda hesaplanan % bağıl standart sapma değeri %2'nin altında kaldığı için metot gün içi ve günler arası kesinlik açısından valide edilmiştir. Her iki yöntem için birinci, ikinci ve üçüncü güne ait kesinlik verileri sırasıyla Tablo 18'den Tablo 23'e kadar olan tablolarda verilmiştir.

Tablo 18. HPLC yöntemi 1. güne ait kesinlik verileri

Teorik Derişim	Alan	Ortalama Alan	Standart Sapma	Standart Hata	% Bağıl Standart Sapma	Güven Aralığı (%95)
6 μ g/mL (%120)	126.651	126.052	1490,7	860,6	1,18	± 3703,3
	127.150					
	124.455					
5 μ g/mL (%100)	104.371	103.951	398,5	230,1	0,38	± 990,1
	103.578					
	103.905					
4 μ g/mL (%80)	83.131	82.696	376,5	217,4	0,46	± 935,3
	82.474					
	82.484					

Tablo 19. HPLC yöntemi 2. güne ait kesinlik verileri

Teorik Derişim	Alan	Ortalama Alan	Standart Sapma	Standart Hata	% Bağıl Standart Sapma	Güven Aralığı (%95)
6 μ g/mL (%120)	122.479	121.532	824,2	475,8	0,68	± 2047,5
	121.140					
	120.977					
5 μ g/mL (%100)	99.202	99.306	128,9	74,4	0,13	± 320,2
	99.265					
	99.450					
4 μ g/mL (%80)	78.447	78.300	222,3	128,3	0,28	± 522,2
	78.408					
	78.044					

Tablo 20. HPLC yöntemi 3. güne ait kesinlik verileri

Teorik Derişim	Alan	Ortalama Alan	Standart Sapma	Standart Hata	% Bağıl Standart Sapma	Güven Aralığı (%95)
6µg/mL (%120)	119.244	119.132	223,5	129,0	0,19	± 555,3
	119.278					
	118.875					
5µg/mL (%100)	99.774	99.417	419,5	242,2	0,42	± 1042,1
	99.522					
	98.955					
4µg/mL (%80)	79.053	79.540	505,4	291,8	0,64	± 1255,7
	80.062					
	79.504					

Tablo 21. Spektrofotometrik yöntem 1. güne ait kesinlik verileri

Teorik Derişim	Abs	Ortalama Abs	Standart Sapma	Standart Hata	% Bağıl Standart Sapma	Güven Aralığı (%95)
60µg/mL (%120)	0,336	0,332	0,003	0,002	0,97	± 0,008
	0,330					
	0,331					
50µg/mL (%100)	0,281	0,281	0,002	0,001	0,54	± 0,004
	0,280					
	0,283					
40µg/mL (%80)	0,227	0,224	0,003	0,002	1,34	± 0,007
	0,224					
	0,221					

Tablo 22. Spektrofotometrik yöntem 2. güne ait kesinlik verileri

Teorik Derişim	Abs	Ortalama Abs	Standart Sapma	Standart Hata	% Bağıl Standart Sapma	Güven Aralığı (%95)
60µg/mL (%120)	0,341	0,341	0,002	0,001	0,45	± 0,004
	0,340					
	0,343					
50µg/mL (%100)	0,287	0,287	0,003	0,001	0,88	± 0,006
	0,290					
	0,285					
40µg/mL (%80)	0,229	0,226	0,003	0,002	1,17	± 0,007
	0,225					
	0,224					

Tablo 23. Spektrofotometrik yöntem 3. güne ait kesinlik verileri

Teorik Derişim	Abs	Ortalama Abs	Standart Sapma	Standart Hata	% Bağıl Standart Sapma	Güven Aralığı (%95)
60µg/mL (%120)	0,339	0,338	0,003	0,002	0,78	± 0,007
	0,340					
	0,335					
50µg/mL (%100)	0,285	0,286	0,003	0,002	1,07	± 0,008
	0,289					
	0,283					
40µg/mL (%80)	0,229	0,228	0,001	0,001	0,51	± 0,003
	0,227					
	0,229					

Doğruluk

Doğruluk çalışmaları yöntemler bölümünde anlatıldığı üzere yapılmıştır. Her iki yöntem için üçer ayrı konsantrasyon için hesaplanan % geri kazanım değeri %100 ± 2 aralığında kaldığı için metot doğruluk açısından valide edilmiştir. Doğruluk çalışmasından elde edilen veriler Tablo 24 ve Tablo 25'te verilmiştir.

Tablo 24. HPLC yöntemi doğruluk verileri

Teorik Derişim	Alan	Pratik Derişim (µg/mL)	Ortalama Derişim (µg/mL)	% Geri Elde	Standart Sapma	% Bağıl Standart Sapma
6µg/mL (%120)	123.353	5,892	5,955	99,3	0,081	1,353
	124.098	5,928				
	126.590	6,046				
5µg/mL (%100)	104.400	4,989	4,963	99,3	0,023	0,460
	103.587	4,950				
	103.560	4,949				
4µg/mL (%80)	83.141	3,976	3,977	99,4	0,006	0,154
	83.308	3,984				
	83.052	3,972				

Tablo 25. Spektrofotometrik yöntem doğruluk verileri

Teorik Derişim	Abs	Pratik Derişim (µg/mL)	Ortalama Derişim (µg/mL)	% Geri Elde	Standart Sapma	% Bağlı Standart Sapma
60µg/mL (%120)	0,320	59,106	59,827	99,7	0,650	1,087
	0,325	60,008				
	0,327	60,368				
50µg/mL (%100)	0,270	50,089	50,510	101,0	0,454	0,899
	0,275	50,991				
	0,272	50,450				
40µg/mL (%80)	0,215	39,268	39,629	99,1	0,477	1,204
	0,210	40,170				
	0,211	39,449				

Stabilite Çalışmaları

Stabilite çalışmalarının sonuçları Tablo 26 ve Tablo 27’de gösterilmiştir. HPLC’de pik alanları, spektrofotometrede ise absorbans değerleri kullanılarak okzaliplatin konsantrasyonundaki değişiklikler incelenmiştir. Ayrıca HPLC’de bozunma ürünlerinden kaynaklanabilecek farklı bir pik oluşumunun olup olmadığı kontrol edilmiş, yeni bir pik oluşumu gözlenmemiştir. 24 saatin sonunda konsantrasyonlar arası bağlı standart sapma %2’yi geçmediği için okzaliplatinin su içerisindeki çözeltisinin analiz boyunca stabil kaldığı tespit edilmiştir.

Tablo 26. HPLC için stabilite verileri

Zaman Aralığı	Örnek (µg/mL)	Ortalama	Standart Sapma	% Bağlı Standart Sapma
0.saat	5,000	4,930	0,063	1,28
1.saat	4,965			
3.saat	4,950			
8.saat	4,892			
24.saat	4,841			

Tablo 27. Spektrofotometre için stabilite verileri

Zaman Aralığı	Örnek (µg/mL)	Ortalama	Standart Sapma	% Bağlı Standart Sapma
0.saat	50,258	49,972	0,164	0,328
1.saat	49,949			
3.saat	49,909			
8.saat	49,847			
24.saat	49,899			

Sistem Uyumluluk Testi

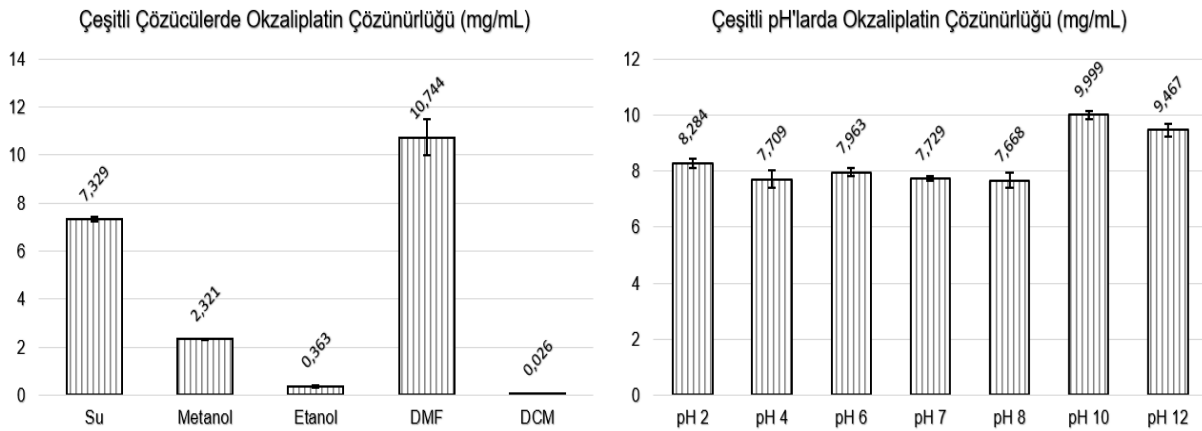
HPLC metodu için sistem uyumluluk testi sonuçları Tablo 28’de gösterilmiştir. Teorik plaka sayısı 2000 değerinden büyük, pik kuyruklanma (tailing) faktörü 2’den küçük olduğundan HPLC metodu sistem uygunluk testinden geçmiştir.

Tablo 28. HPLC metodu için sistem uyumluluk testi verileri

#	Alıkonma Zamanı	Yükseklik	Alan	Pik Genişliği	USP Teorik Plaka Sayısı	USP Tailing Faktörü
1	5,43	15.776	103.560	0,60	15.901	1,04
2	5,43	15.848	104.400	0,54	15.991	1,04
3	5,43	15.836	103.587	0,47	15.968	1,04
4	5,40	15.065	104.371	0,69	14.265	1,02
5	5,40	14.424	103.905	0,50	13.107	1,03
6	5,40	14.629	103.578	0,70	13.601	1,03
Ortalama	5,41	15.263	103.900	0,58	14.806	1,03
Std. Sapma	0,012	645	397	0,10	1310	0,01
% BSS	0,23	4,22	0,38	16,61	8,85	0,79

OKZALİPLATİNİN ÇÖZÜNÜRLÜK VERİLERİ

Okzaliplatinin çeşitli çözücülerde, tampon çözeltilerde çözünürlüğü incelenmiş elde edilen sonuçlar Şekil 34’te gösterilmiştir.



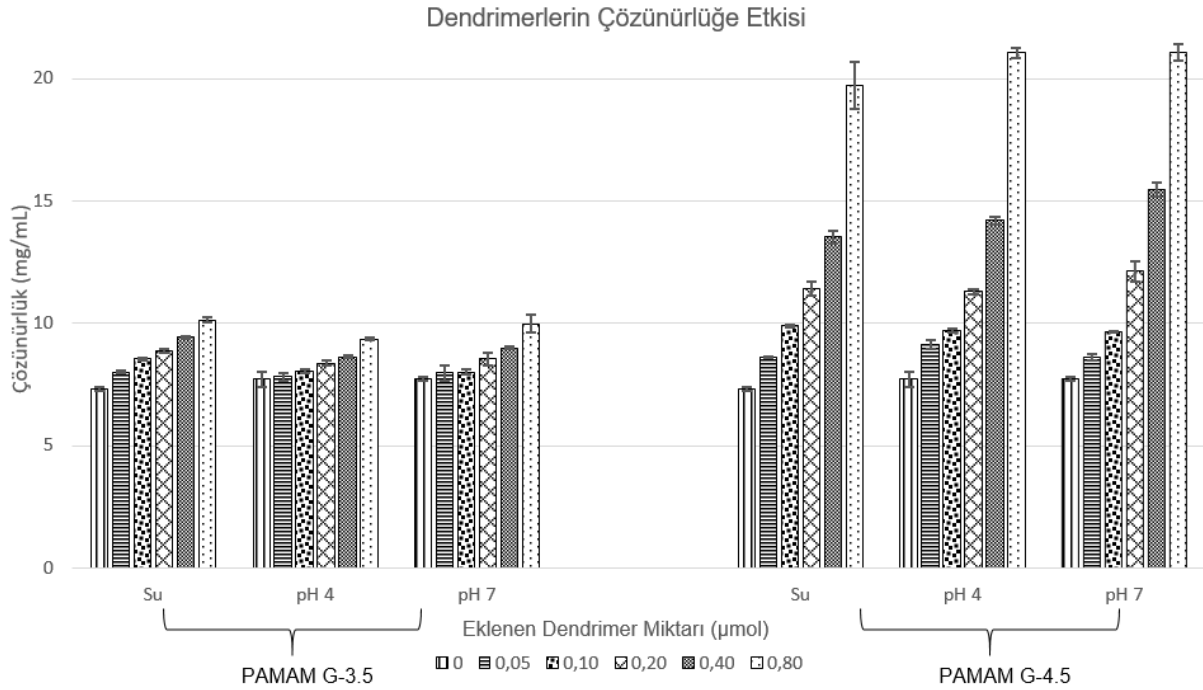
Şekil 34. Okzaliplatinin çeşitli çözücü ve tamponlardaki çözünürlükleri

DENDRİMERLERİN ÇÖZÜNÜRLÜĞE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

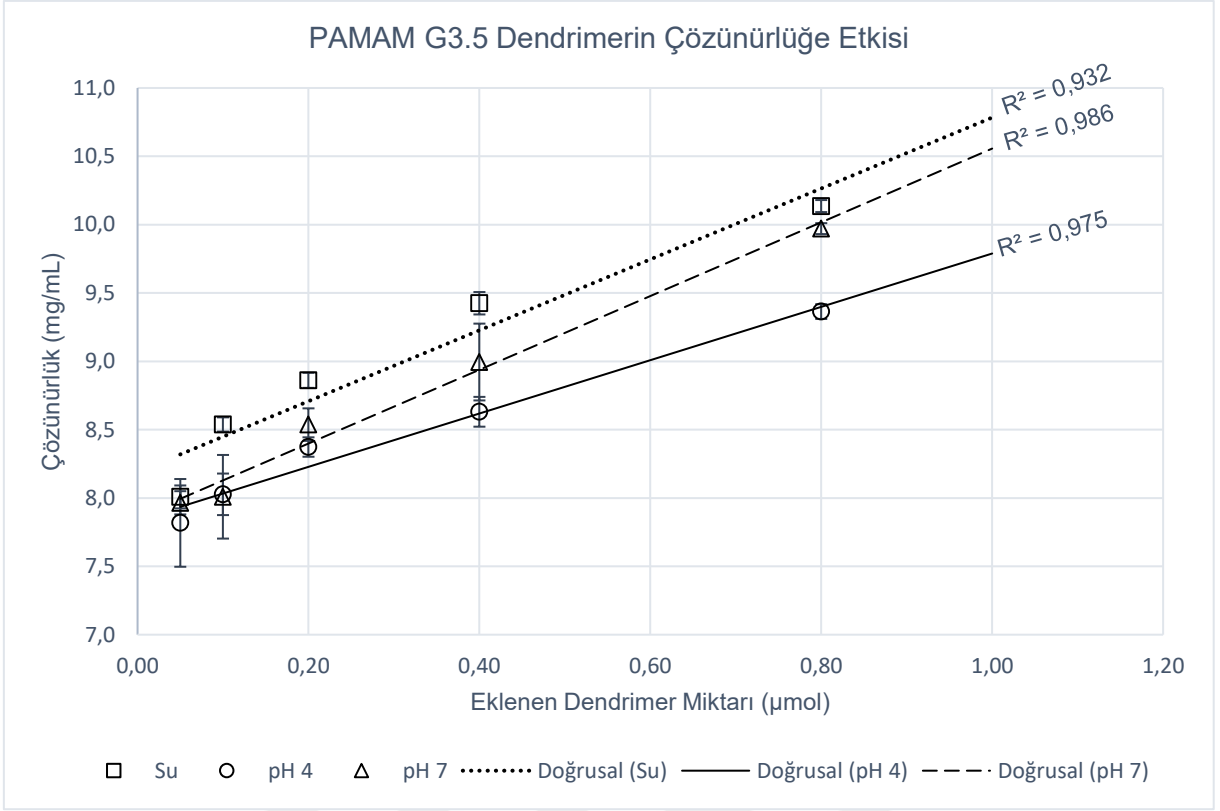
Çeşitli ortamlara farklı miktarlarda dendrimer eklenmesinin okzaliptin çözünürlüğüne olan etkisi incelenmiş, sonuçlar Tablo 29 ve Şekil 35, 36 ve 37'de gösterilmiştir.

Tablo 29. Dendrimer konsantrasyonunun çözünürlüğe olan etkisi

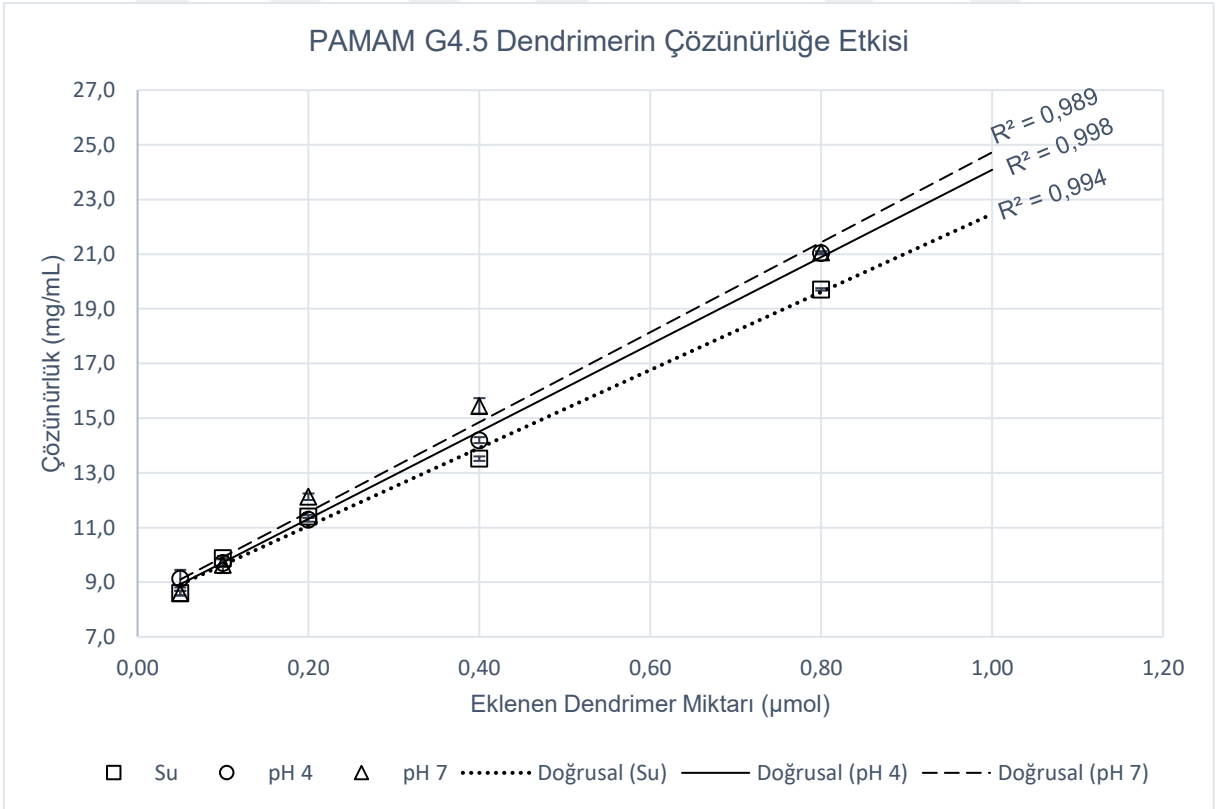
Dendrimer Cinsi	Ortam	Eklenen Dendrimer Miktarı (µmol)					
		0	0,05	0,10	0,20	0,40	0,80
PAMAM G3.5	Su	7,329 ±0,08	8,008 ±0,05	8,538 ±0,06	8,861 ±0,08	9,425 ±0,04	10,136 ±0,12
	pH 4	7,709 ±0,32	7,818 ±0,15	8,027 ±0,07	8,373 ±0,11	8,631 ±0,05	9,364 ±0,04
	pH 7	7,729 ±0,09	7,965 ±0,31	8,009 ±0,12	8,537 ±0,28	8,995 ±0,04	9,971 ±0,37
PAMAM G4.5	Su	7,329 ±0,08	8,607 ±0,02	9,887 ±0,05	11,408 ±0,30	13,519 ±0,26	19,711 ±0,97
	pH 4	7,709 ±0,32	9,129 ±0,19	9,705 ±0,10	11,284 ±0,10	14,197 ±0,15	21,047 ±0,21
	pH 7	7,729 ±0,09	8,591 ±0,13	9,639 ±0,02	12,125 ±0,43	15,450 ±0,28	21,063 ±0,32



Şekil 35. Dendrimer konsantrasyonunun çözünürlüğe olan etkisi



Şekil 36. PAMAM G3.5 konsantrasyonunun çözünürlüğe olan etkisi



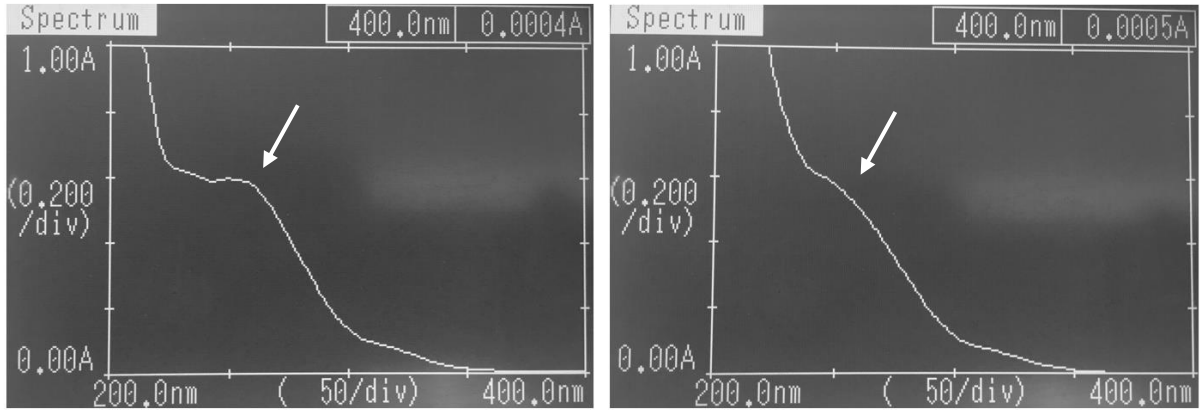
Şekil 37. PAMAM G4.5 konsantrasyonunun çözünürlüğe olan etkisi

OKZALİPLATİN-DENDRİMER FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI

Okzaliplatinin dendrimerik kompleks ve konjugat formülasyonları hazırlanmış, karakterizasyonları Mor Ötesi-Görünür Bölge (UV-Vis) Spektroskopisi, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi, Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$), partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri ile yapılmıştır. Ayrıca hazırlanan komplekslerin yükleme oranı ve yükleme etkinliği sonuçları ilgili başlıklarda verilmiştir.

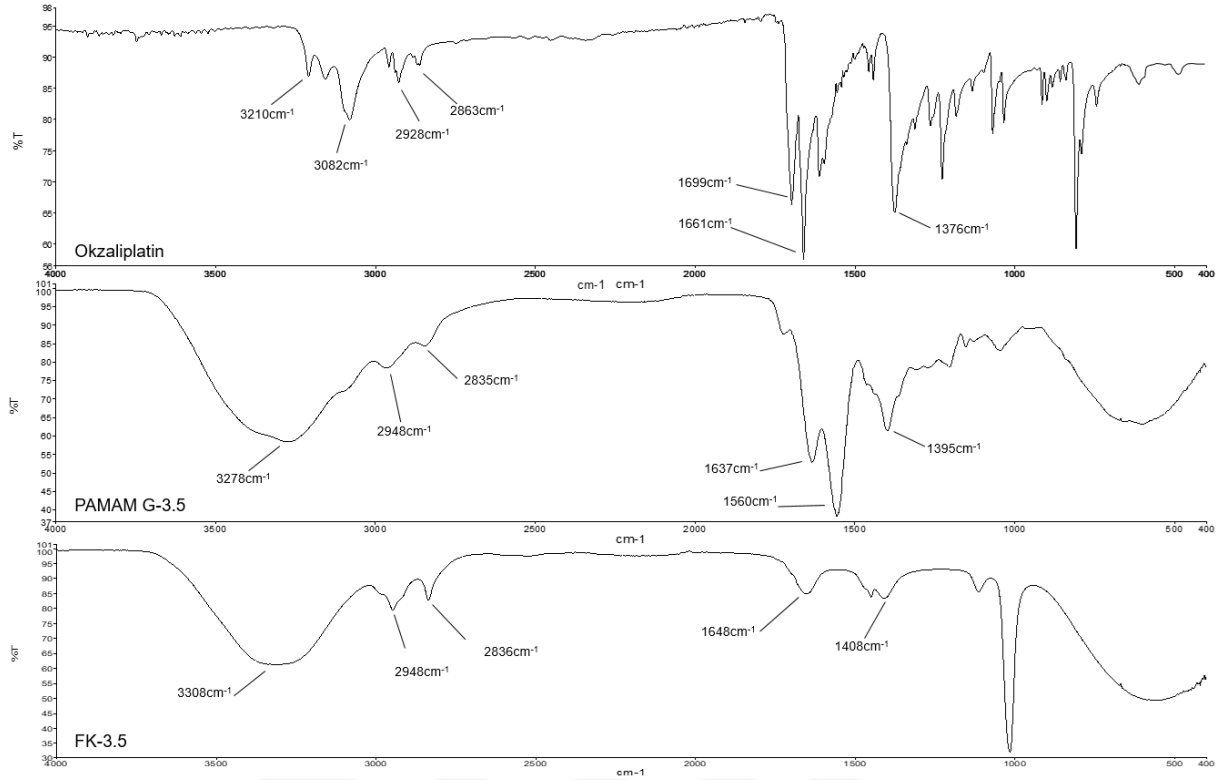
FK-3.5 Formülasyonlarının Karakterizasyonu

i) Mor ötesi-görünür bölge (UV-Vis) spektroskopisi: Okzaliplatinin ve FK-3.5 formülasyonlarından F6 formülasyonunun 200-400nm dalgaboyu aralığındaki spektrumu alınmıştır. Spektrumda görülen pikin kaybolması, pik yerinin kayması veya şiddetinin azalması gibi değişiklikler kompleksin gerçekleştiğine dair kanıt oluşturmaktadır. Şekil 38'de görüleceği üzere 255nm'de görülen okzaliplatin pikinin F6 formülasyonunda baskılanmış olması okzaliplatinin dendrimer dalları arasında tutularak kompleks oluşturduğunu düşündürmektedir.



Şekil 38. FK-3.5 formülasyonu UV spektrumu

ii) Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi: FK-3.5 formülasyonları temsil etmesi açısından F6 formülasyonuna ait FT-IR spektrumları Şekil 39'da görülmektedir. FT-IR spektrumunda 3308cm^{-1} 'de O-H gerilmesi, 2948cm^{-1} asimetrik C-H gerilmesi, 2836cm^{-1} simetrik C-H gerilmesi, 1648cm^{-1} C=O gerilmesi, 1408cm^{-1} 'de C-O gerilmesi pikleri görülmektedir.

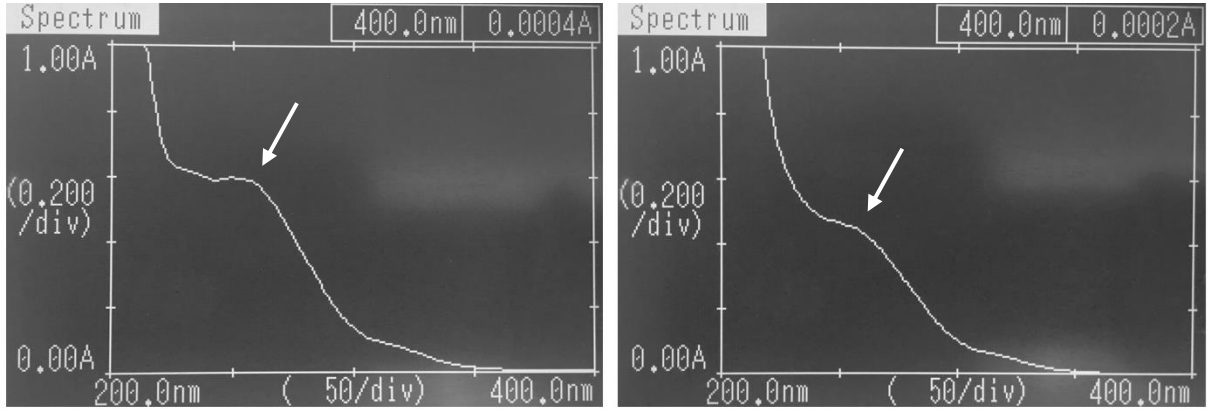


Şekil 39. Okzalipatin, PAMAM G3.5 ve FK-3.5 FT-IR spektrumları

PAMAM G3.5 dendrimerlerin özellikle O-H ve C=O piklerinde görülen kaymalar okzalipatin ile dendrimer arasında fiziksel bir etkileşim kurulduğunu ve kompleks oluşumunu düşündürmektedir.

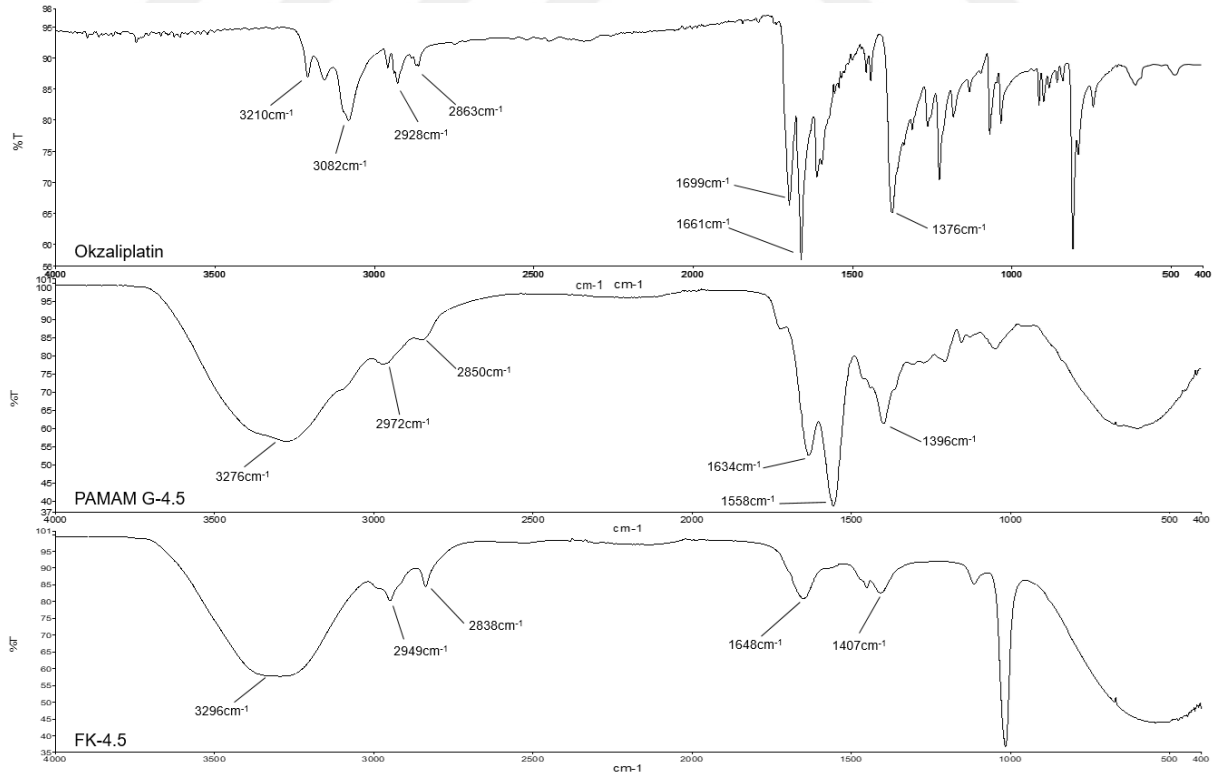
FK-4.5 Formülasyonlarının Karakterizasyonu

i) Mor ötesi-görünür bölge (UV-Vis) spektroskopisi: Okzalipatinin ve FK-4.5 formülasyonlarından F21 formülasyonunun 200-400nm dalgaboyu aralığındaki spektrumu alınmıştır. Spektrumda görülen pikin kaybolması, pik yerinin kayması veya şiddetinin azalması gibi değişiklikler kompleksin gerçekleştiğine dair kanıt oluşturmaktadır. Şekil 40'da görüleceği üzere 255nm'de görülen okzalipatin pikinin F21 formülasyonunda şiddetinin azalmış ve baskılanmış olması okzalipatinin dendrimer dalları arasında tutularak kompleks oluşturduğunu düşündürmektedir.



Şekil 40. FK-4.5 formülasyonu UV spektrumu

ii) **Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi:** FK-4.5 formülasyonları temsil etmesi açısından F21 formülasyonuna ait FT-IR spektrumları Şekil 41'de görülmektedir. FT-IR spektrumunda 3296cm^{-1} 'de O-H gerilmesi, 2949cm^{-1} asimetrik C-H gerilmesi, 2838cm^{-1} simetrik C-H gerilmesi, 1648cm^{-1} C=O gerilmesi, 1407cm^{-1} 'de C-O gerilmesi pikleri görülmektedir.



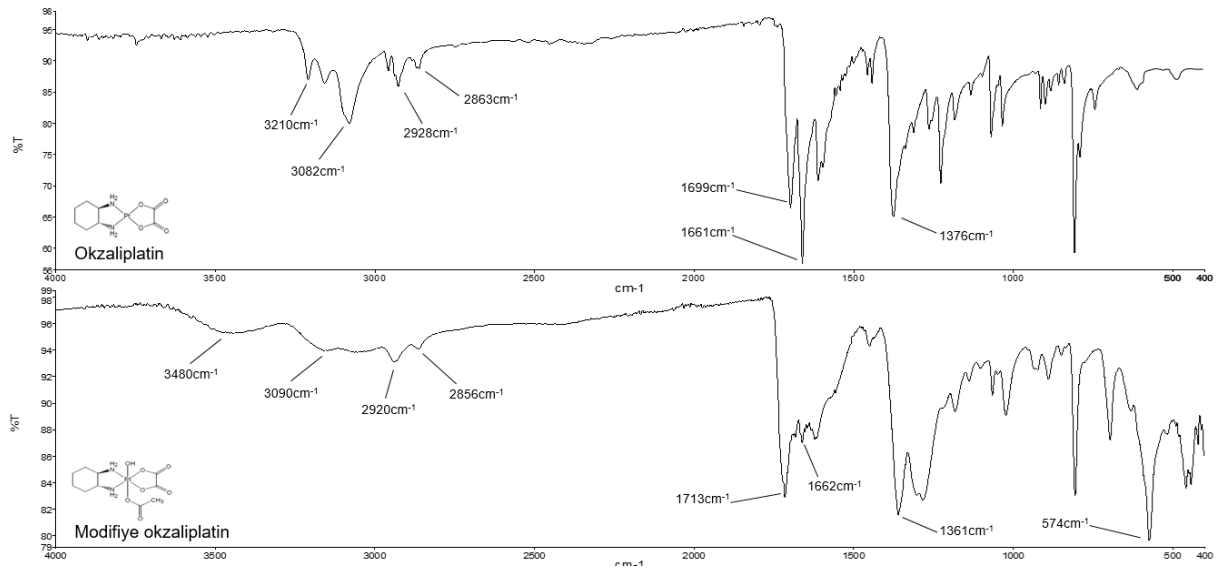
Şekil 41. Okzalipatin, PAMAM G4.5 ve FK-4.5 FT-IR spektrumları

PAMAM G4.5 dendrimerlerin özellikle O-H ve C=O piklerinde görülen kaymalar okzaliplatin ile dendrimer arasında fiziksel bir etkileşim kurulduğunu ve kompleks oluşumunu düşündürmektedir.

Modifiye Okzaliplatinin Karakterizasyonu

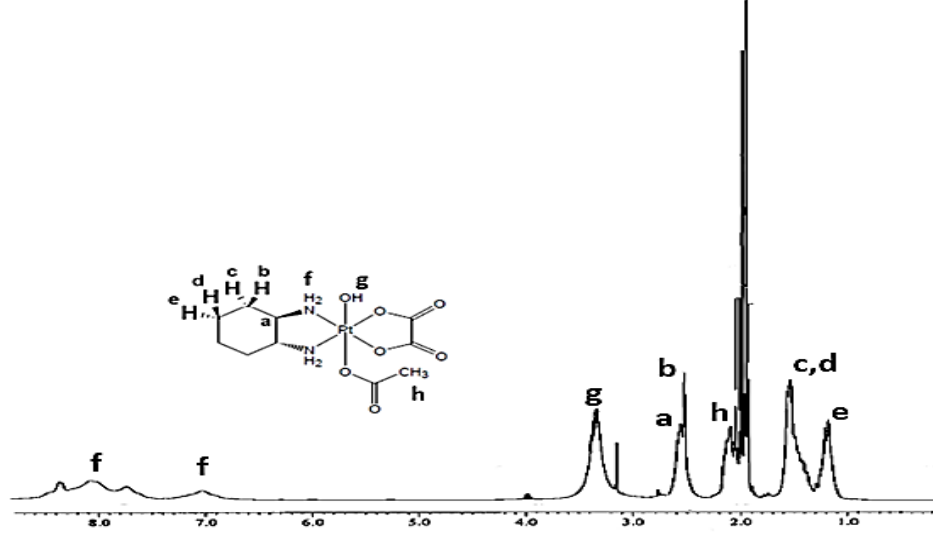
KK-3,5 ve KK-4,5 formülasyonları hazırlanmadan önce okzaliplatine kimyasal modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Kimyasal sentez verimi %98,2 olmuştur. İstenilen bileşiğin sentezlendiğinin gösterilmesi için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

i) Fourier dönüştümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi: Saf okzaliplatinin ve yöntemler bölümünde anlatıldığı üzere sentezlenen modifiye edilmiş okzaliplatinin FT-IR sonuçları Şekil 42’de gösterilmiştir. Saf okzaliplatin FT-IR spektrumunda 3210 cm^{-1} ve 3082 cm^{-1} ’de N-H gerilmesi, 2928 cm^{-1} asimetric C-H gerilmesi, 2863 cm^{-1} simetric C-H gerilmesi, 1699 cm^{-1} ve 1661 cm^{-1} ’de C=O gerilmesi, 1376 cm^{-1} ’de C-O gerilmesi pikleri görülmektedir (110,120-123). Modifiye edilmiş okzaliplatin FT-IR spektrumunda ise 3480 cm^{-1} ’de O-H gerilmesi, 3090 cm^{-1} ’de N-H gerilmesi, 2920 cm^{-1} asimetric C-H gerilmesi, 2856 cm^{-1} simetric C-H gerilmesi, 1713 cm^{-1} ve 1662 cm^{-1} ’de C=O gerilmesi, 1361 cm^{-1} ’de C-O gerilmesi pikleri görülmektedir. Ayrıca parmak izi bölgesinde 574 cm^{-1} ’de Pt-O gerilmesi piki görülmüştür (124-126). Sentezlenen bileşikte O-H ve Pt-O gerilmesi piklerinin görülmüş olması istenen bileşiğin sentezlendiğini düşündürmüştü, daha ileri karakterizasyon için bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumları alınmıştır.



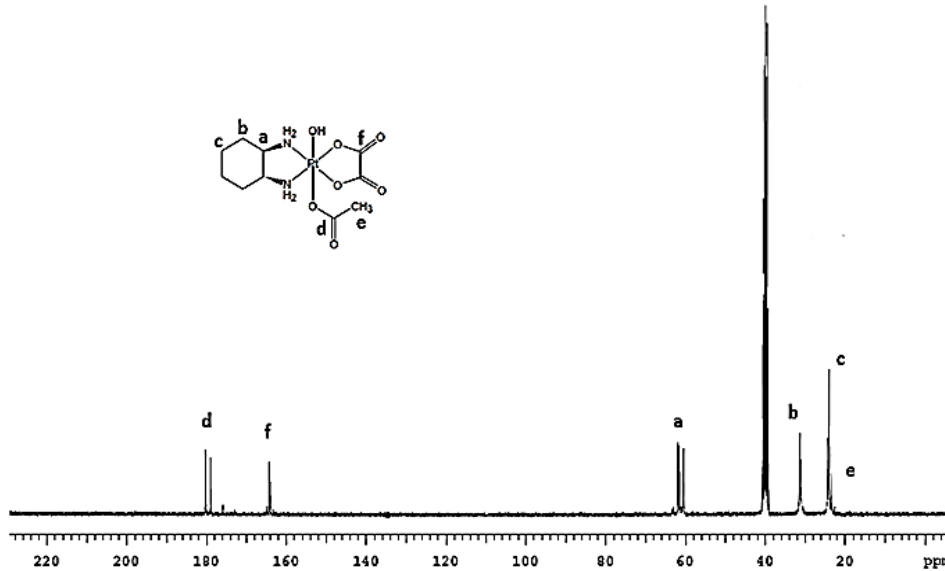
Şekil 42. Okzaliplatin ve modifiye okzaliplatin FT-IR spektrumları

ii) ¹H-NMR spektroskopisi: ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 8.63 (1H, NH₂), 8.33 (1H, NH₂), 7.98 (1H, NH₂), 7.24 (1H, NH₂), 3.43 (1H, OH), 2.61-2.57 (4H, sikloheksan), 2.13 (3H, CH₃), 1.55 (4H, sikloheksan), 1.21-1.18 (2H, sikloheksan) (106,120,125,127).



Şekil 43. Modifiye okzaliplatin ¹H-NMR spektrumu

iii) ¹³C-NMR spektroskopisi: ¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 180.29-179.02 (1C, asetat), 164.38-163.95 (2C, okzalat), 61.93-60.59 (2C, sikloheksan), 31.39-31.24 (2C, sikloheksan), 24.44-24.14 (2C, sikloheksan), 24.00-23.50 (1C, CH₃) (106,128).



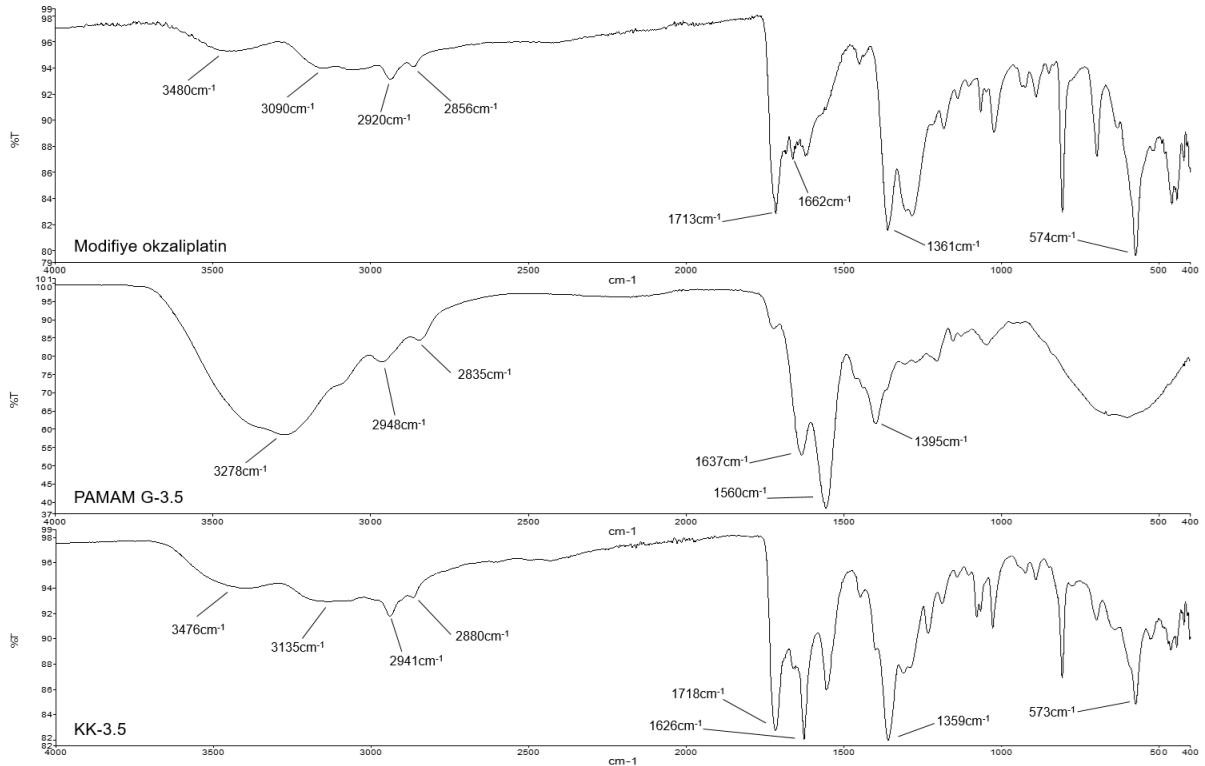
Şekil 44. Modifiye okzaliplatin ¹³C-NMR spektrumu

¹H-NMR ve ¹³C-NMR sonuçlarına göre okzaliplatinde istenilen modifikasyon gerçekleştirilmiştir.

KK-3.5 Formülasyonunun Karakterizasyonu

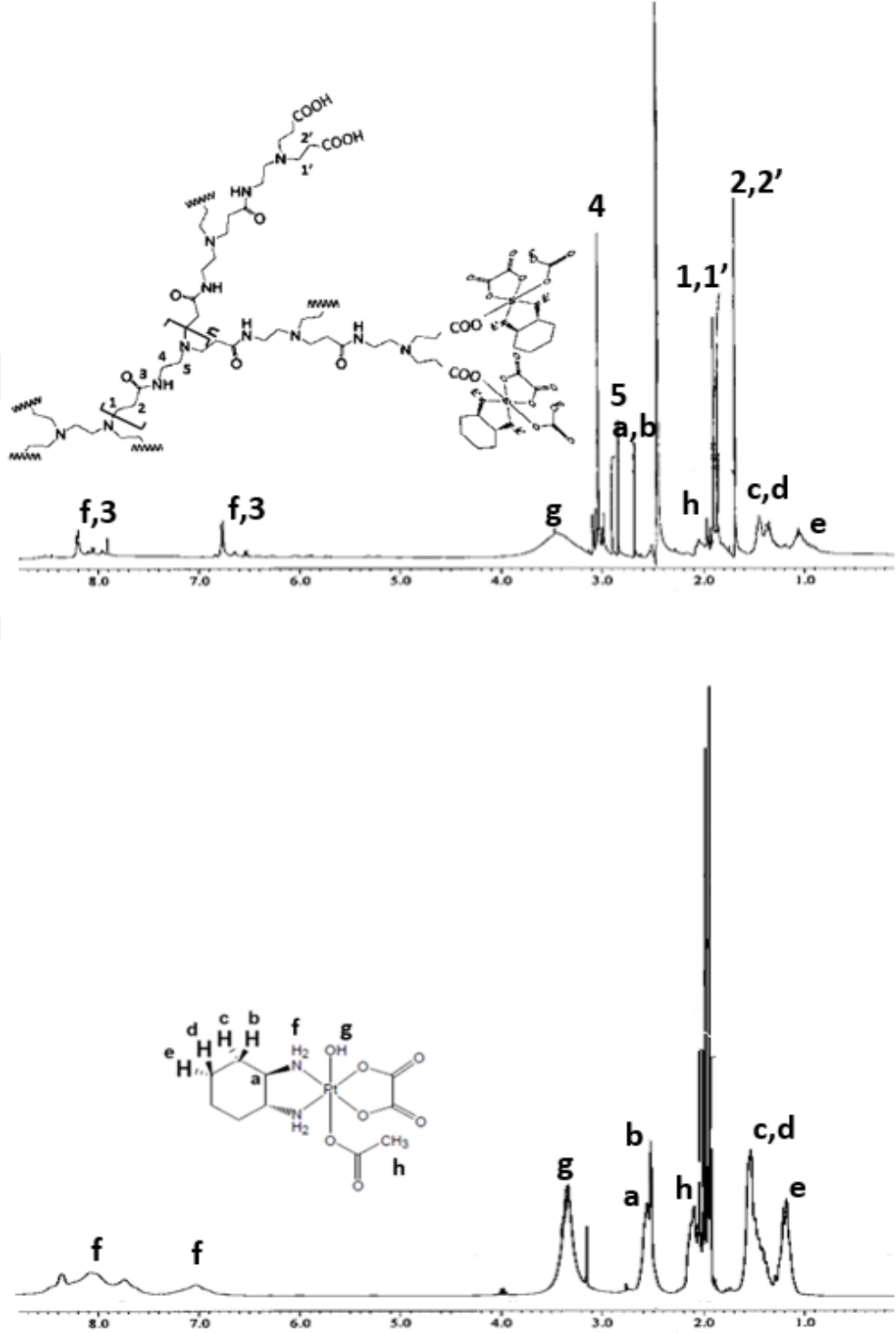
Steglich esterifikasyon reaksiyonu kullanılarak, G3.5 dendrimer ile modifiye okzaliptin ester bağlarıyla bağlanmıştır. Reaksiyon verimi %50,3 olmuştur. İstenilen bileşiğin sentezlendiğinin gösterilmesi için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

i) Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi: Modifiye edilmiş okzaliptin, PAMAM-G3.5 dendrimer ve KK-3.5 formülasyonuna ait FT-IR spektrumları Şekil 45'te görülmektedir. KK-3.5 formülasyonunun FT-IR spekturumu, modifiye okzaliptin ve G3.5 dendrimerde görülen fonksiyonel grupların konjugat yapısında da bulunduğunu göstermiştir. KK-3.5 etkin madde ile konjuge olmayan serbest dendrimer uçlarından dolayı hem dendrimere ait, hem de konjuge olduğu modifiye okzaliptin fonksiyonel gruplarına ait piklere sahiptir. FT-IR spektrumunda 3476cm^{-1} 'de O-H gerilmesi, 3135cm^{-1} 'de N-H gerilmesi, 2941cm^{-1} asimetrik C-H gerilmesi, 2880cm^{-1} simetrik C-H gerilmesi, 1718cm^{-1} C=O gerilmesi (amit I bandı), 1626cm^{-1} 'de N-H bükülmesi (amit II bandı), 1359cm^{-1} 'de C-O gerilmesi pikleri görülmektedir. Ayrıca parmak izi bölgesi 573cm^{-1} 'de Pt-O gerilmesi piki görülmüştür (125,129). Beklenen fonksiyonel gruplar görülmüş, ileri karakterizasyon için $^1\text{H-NMR}$ spekturumu alınmıştır.



Şekil 45. Modifiye okzaliptin, PAMAM G3.5 ve KK-3.5 FT-IR spektrumları

ii) $^1\text{H-NMR}$ spektroskopisi: KK-3.5 formülasyonunun $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d₆) sonuçları Şekil 46'da verilmiştir. Üstte konjugatın alta ise modifiye okzaliptinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları görülmektedir (130).

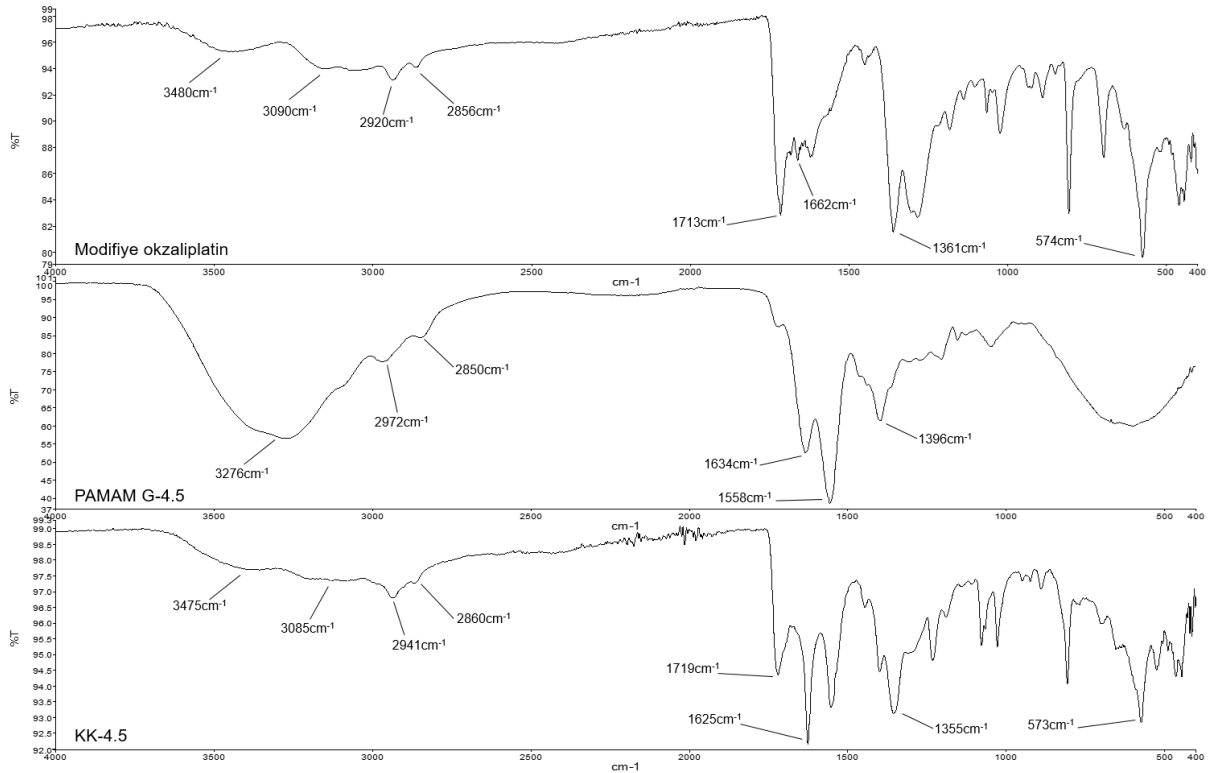


Şekil 46. KK-3.5 ve modifiye okzaliptin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları

KK-4.5 Formülasyonunun Karakterizasyonu

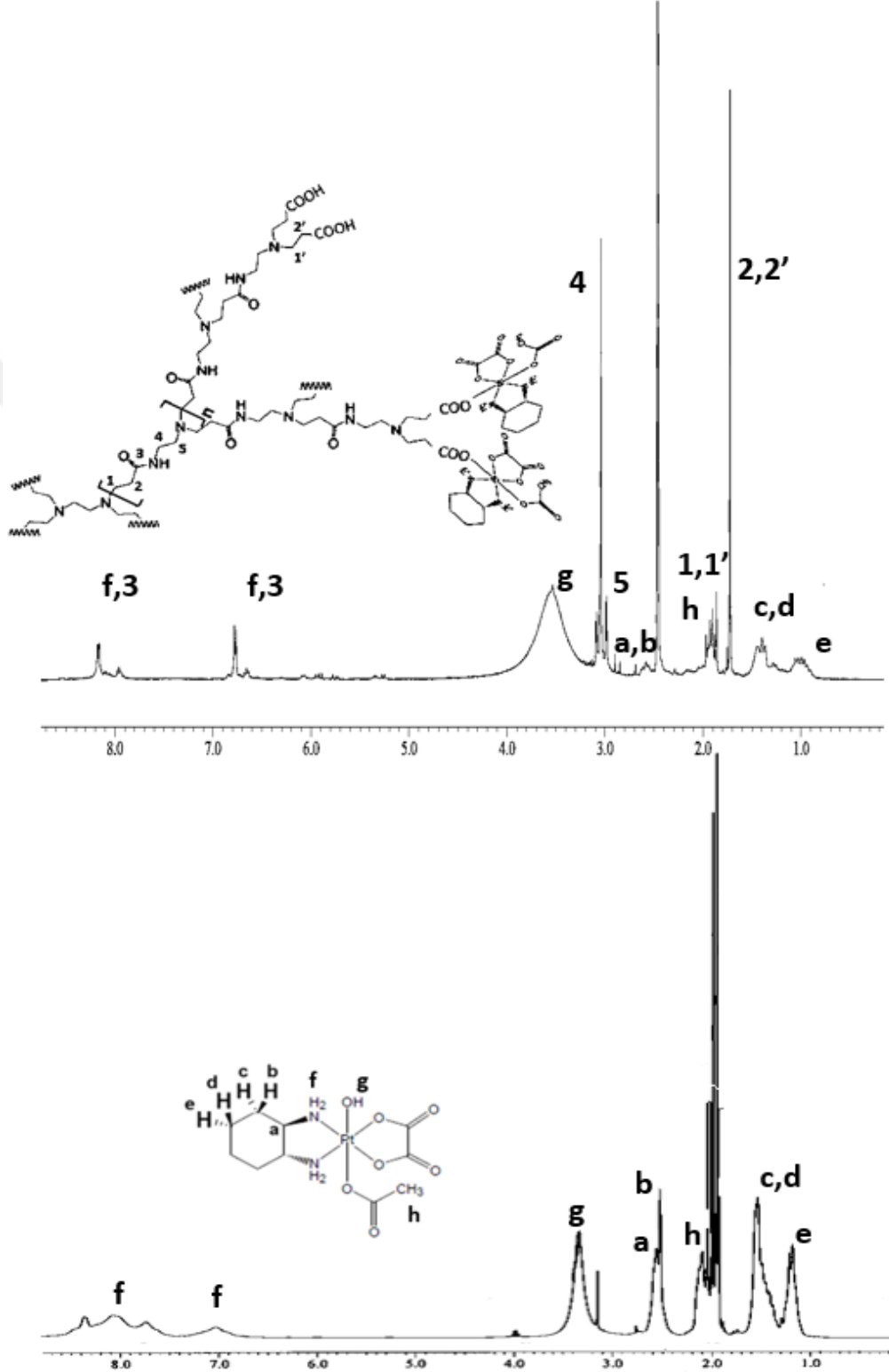
Steglich esterifikasyon reaksiyonu kullanılarak, G4.5 dendrimer ile modifiye okzaliptatin ester bağlarıyla bağlanmıştır. Reaksiyon verimi %46,6 olmuştur. İstenilen bileşiğin sentezlendiğinin gösterilmesi için karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

i) Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi: Modifiye edilmiş okzaliptatin, PAMAM-G4.5 dendrimer ve KK-4.5 formülasyonuna ait FT-IR spektrumları Şekil 47'de görülmektedir. KK-4.5 formülasyonunun FT-IR spekturumu, modifiye okzaliptatin ve G4.5 dendrimerde görülen fonksiyonel grupların konjugat yapısında da bulunduğunu göstermiştir. KK-4.5 etkin madde ile konjuge olmayan serbest dendrimer uçlarından dolayı hem dendrimere ait, hem de konjuge olduğu modifiye okzaliptatin fonksiyonel gruplarına ait piklere sahiptir. FT-IR spektrumunda 3475cm^{-1} 'de O-H gerilmesi, 3085cm^{-1} 'de N-H gerilmesi, 2941cm^{-1} asimetrik C-H gerilmesi, 2860cm^{-1} simetrik C-H gerilmesi, 1719cm^{-1} C=O gerilmesi (amit I bandı), 1625cm^{-1} 'de N-H bükülmesi (amit II bandı), 1355cm^{-1} 'de C-O gerilmesi pikleri görülmektedir. Ayrıca parmak izi bölgesi 573cm^{-1} 'de Pt-O gerilmesi piki görülmüştür (125,129,131). Beklenen fonksiyonel gruplar görülmüş, ileri karakterizasyon için ^1H -NMR spekturumu alınmıştır.



Şekil 47. Modifiye okzaliptatin, PAMAM G4.5 ve KK-4.5 FT-IR spektrumları

ii) $^1\text{H-NMR}$ spektroskopisi: KK-4.5 formülasyonunun $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d₆) sonuçları Şekil 48'de verilmiştir. Üstte konjugatın alta ise modifiye okzaliptinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları görülmektedir.



Şekil 48. KK-4.5 ve modifiye okzaliptinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumları

Partikül Boyutu-Dağılımı ve Zeta (ζ) Potansiyel Ölçümleri

G3.5 ve G4.5 PAMAM dendrimerlerin metanol ve su içerisindeki, kimyasal konjugat formülasyonlarının ise su içerisindeki partikül boyutu ve polidispersite indeksi (PDI) verileri Tablo 30'da verilmiştir.

Tablo 30. Dendrimerlerin ortalama boyut ve polidispersite indeksi verileri

Dendrimer	Ortalama Boyut (nm)	Polidispersite İndeksi
PAMAM G3.5 (metanol içinde)	8,24 \pm 0,45	0,215
PAMAM G4.5 (metanol içinde)	7,75 \pm 0,19	0,234
PAMAM G3.5 (su içinde)	199,93 \pm 30,71	0,434
PAMAM G4.5 (su içinde)	257,90 \pm 2,98	0,550
KK-3.5 (su içinde)	179,30 \pm 77,30	0,377
KK-4.5 (su içinde)	155,93 \pm 13,59	0,340

G3.5 ve G4.5 PAMAM dendrimerlerin ve kimyasal konjugat formülasyonlarının su içerisindeki zeta potansiyel değerleri Tablo 31'de verilmiştir.

Tablo 31. Dendrimerlerin zeta (ζ) potansiyel verileri

Dendrimer	Zeta (ζ) potansiyel (mV)
PAMAM G3.5	-26,40 \pm 5,51
PAMAM G4.5	-26,50 \pm 0,20
KK-3.5	8,48 \pm 2,53
KK-4.5	15,47 \pm 4,51

Yükleme Oranı ve Etkinliği, Konjuge Okzaliplatin Miktarı

Fiziksel kompleks formülasyonları için % yükleme oranı, % yükleme etkinliği ve bir mol dendrimere karşılık yüklenen okzaliplatinin mol değerleri Tablo 32 ve Şekil 49'da kimyasal konjugatlar için ise dendrimere konjuge olan modifiye okzaliplatin miktarları Tablo 32'de gösterilmiştir.

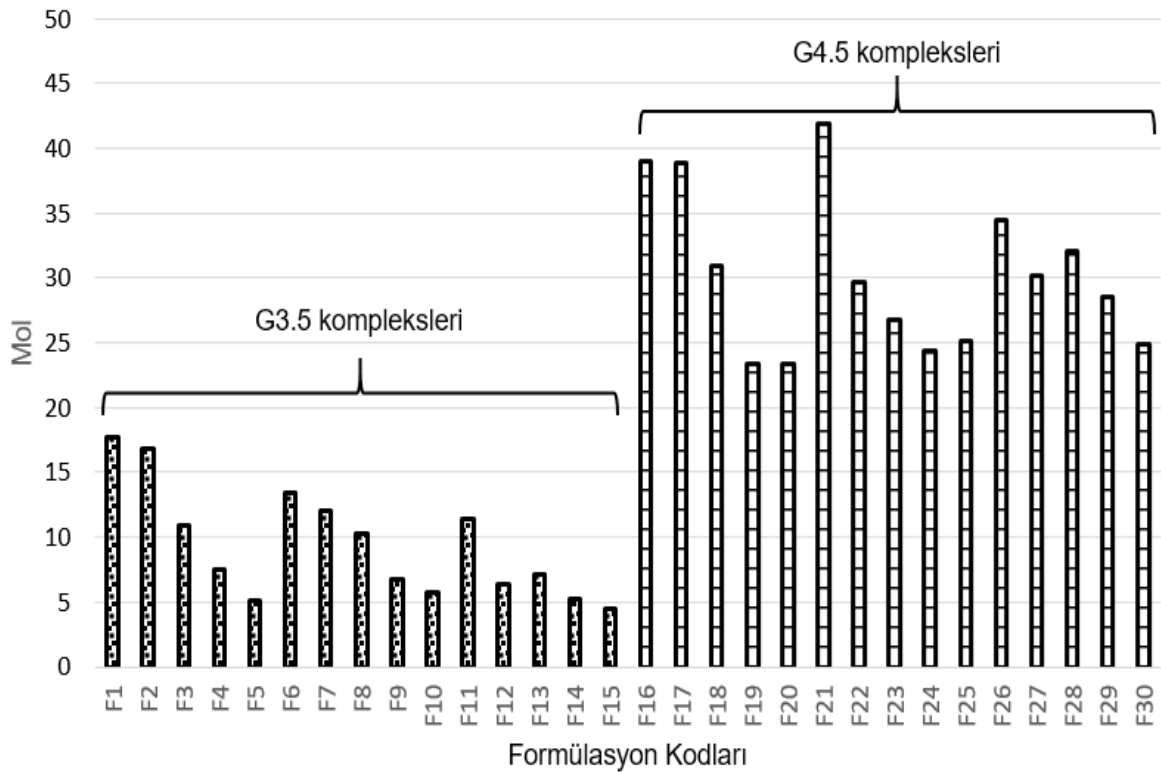
Tablo 32. Dendrimer formülasyonlarına yüklenme özellikleri

Formülasyon Kodu	% Yükleme Oranı	% Yükleme Etkinliği	Mol Oranı
F1	% 35,2	% 7,3	17,8
F2	% 34,0	% 13,0	16,9
F3	% 25,0	% 16,0	10,9
F4	% 18,8	% 20,7	7,6
F5	% 13,6	% 25,6	5,1
F6	% 29,2	% 3,4	13,5
F7	% 26,8	% 5,9	12,0
F8	% 24,0	% 9,7	10,4
F9	% 17,2	% 12,3	6,8
F10	% 14,8	% 18,8	5,7
F11	% 25,8	% 4,7	11,4
F12	% 16,2	% 5,2	6,3
F13	% 18,0	% 10,9	7,2
F14	% 14,0	% 15,2	5,3
F15	% 12,1	% 22,8	4,5
F16	% 37,1	% 14,8	39,0
F17	% 37,0	% 25,4	38,9
F18	% 31,9	% 34,3	30,9
F19	% 26,2	% 42,6	23,4
F20	% 26,2	% 57,0	23,4
F21	% 38,8	% 15,0	41,9
F22	% 31,0	% 19,7	29,7
F23	% 28,8	% 30,0	26,8

Tablo 32. (Devam) Dendrimer okzaliptin komplekslerinin yüklenme özellikleri

Formülasyon Kodu	% Yükleme Oranı	% Yükleme Etkinliği	Mol Oranı
F24	% 27,0	% 42,4	24,4
F25	% 27,5	% 57,6	25,1
F26	% 34,3	% 12,5	34,5
F27	% 31,4	% 19,7	30,2
F28	% 32,7	% 33,6	32,1
F29	% 30,2	% 45,9	28,6
F30	% 27,4	% 57,0	24,9
KK-3.5	-	-	37,9
KK-4.5	-	-	26,3

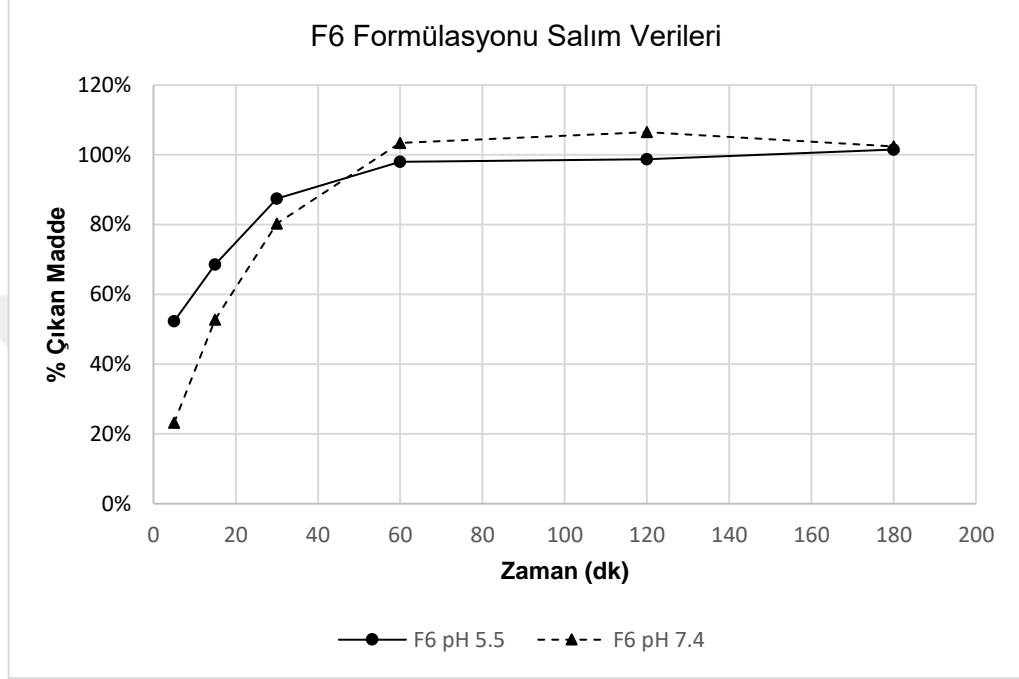
1 Mol Dendrimer ile Kompleksleşen Okzaliptin Miktarı



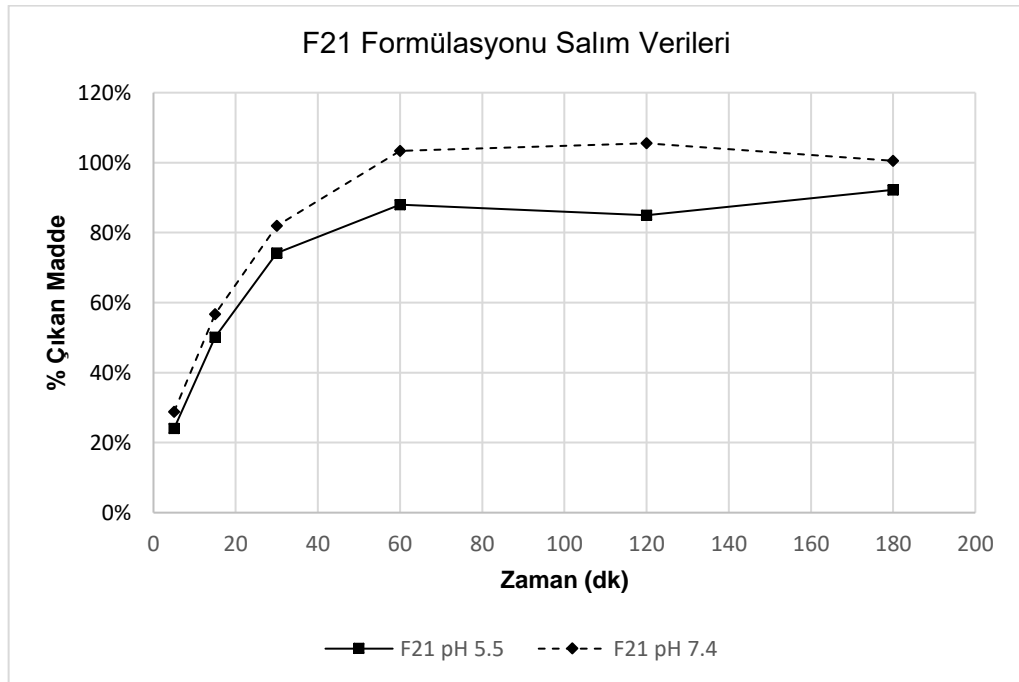
Şekil 49. 1 mol dendrimer ile kompleksleşen okzaliptin miktarı

Fiziksel Kompleks ve Kimyasal Konjugatlarda *İn Vitro* Salım Çalışmaları

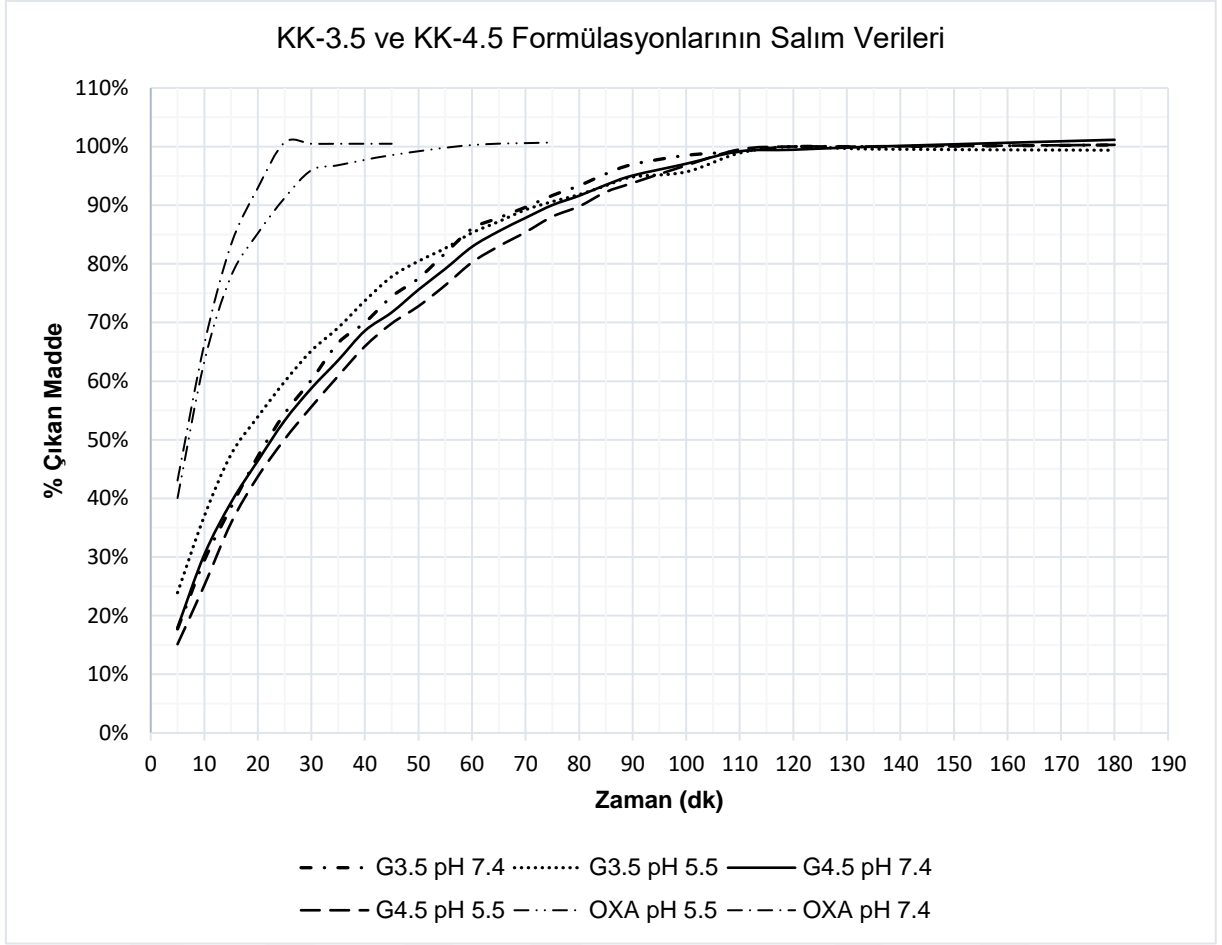
Seçilen fiziksel kompleks formülasyonları (F6 ve F21) ve kimyasal konjugatlarla pH 5.5 ve pH 7.4 olmak üzere iki farklı ortamda yapılan salım çalışması sonuçları Şekil 50, 51 ve 52'de gösterilmiştir.



Şekil 50. F6 formülasyonu *in vitro* salım verileri



Şekil 51. F21 formülasyonu *in vitro* salım verileri



Şekil 52. Kimyasal konjugat formülasyonlarının *in vitro* salım verileri

Fiziksel ve kimyasal konjugatların pH 5.5 ve pH 7.4 ortamlarındaki salım profilleri karşılaştırılmış f_1 fark faktörü ve f_2 benzerlik faktörü değerleri sırasıyla Tablo 33'ten Tablo 36'ya kadar gösterilmiştir. Salım profillerine çeşitli kinetik modeller uygulanmasıyla elde edilen veriler ise Tablo 37 ve Tablo 38'de gösterilmiştir.

Tablo 33. F6 ve F21 salım profillerinin f_1 değeri ile kıyaslanması

f_1 Fark Faktörü				
	F6 (pH 5.5)	F6 (pH 7.4)	F21 (pH 5.5)	F21 (pH 7.4)
F6 (pH 5.5)	-	18,75	22,82	15,04
F6 (pH 7.4)	18,75	-	9,60	4,38
F21 (pH 5.5)	22,82	9,60	-	14,59
F21 (pH 7.4)	15,04	4,38	14,59	-

Tablo 34. F6 ve F21 salım profillerinin f₂ değeri ile kıyaslanması

f₂ Benzerlik Faktörü				
	F6 (pH 5.5)	F6 (pH 7.4)	F21 (pH 5.5)	F21 (pH 7.4)
F6 (pH 5.5)	-	38,26	36,28	43,16
F6 (pH 7.4)	38,26	-	53,66	71,67
F21 (pH 5.5)	36,28	53,66	-	50,98
F21 (pH 7.4)	43,16	71,67	50,98	-

Tablo 35. Kimyasal konjugatların salım profillerinin f₁ değeri ile kıyaslanması

f₁ Fark Faktörü				
	G3.5 (pH 5.5)	G3.5 (pH 7.4)	G4.5 (pH 5.5)	G4.5 (pH 7.4)
G3.5 (pH 5.5)	-	7,16	13,87	9,09
G3.5 (pH 7.4)	7,16	-	7,41	2,86
G4.5 (pH 5.5)	13,87	7,41	-	5,54
G4.5 (pH 7.4)	9,09	2,86	5,54	-

Tablo 36. Kimyasal konjugatların salım profillerinin f₂ değeri ile kıyaslanması

f₂ Benzerlik Faktörü				
	G3.5 (pH 5.5)	G3.5 (pH 7.4)	G4.5 (pH 5.5)	G4.5 (pH 7.4)
G3.5 (pH 5.5)	-	64,00	52,27	61,02
G3.5 (pH 7.4)	64,00	-	67,01	83,27
G4.5 (pH 5.5)	52,27	67,01	-	74,32
G4.5 (pH 7.4)	61,02	83,27	74,32	-

Tablo 37. F6 ve F21 formülasyonlarına çeşitli kinetik modellerin uygulanması

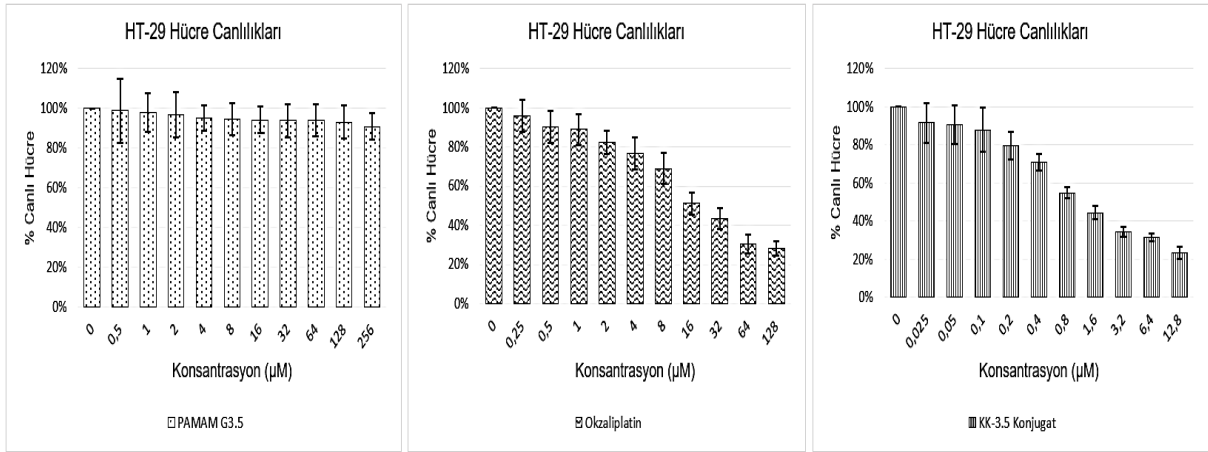
Formülasyon	Tampon	Kinetik Tipi	Parametreler	
			r^2	K
F6	pH 5.5	0.derece	0,605	0,225
		1.derece	0,862	0,033
		Higuchi	0,775	4,088
		Hixson-Crowell	0,976	0,043
		Weibull	0,965	0,614
F6	pH 7.4	0.derece	0,566	0,370
		1.derece	0,998	0,055
		Higuchi	0,747	6,813
		Hixson-Crowell	0,818	0,052
		Weibull	0,998	1,009
F21	pH 5.5	0.derece	0,571	0,294
		1.derece	0,747	0,011
		Higuchi	0,741	5,365
		Hixson-Crowell	0,945	0,029
		Weibull	0,915	0,604
F21	pH 7.4	0.derece	0,545	0,333
		1.derece	0,998	0,055
		Higuchi	0,728	6,161
		Hixson-Crowell	0,789	0,049
		Weibull	0,996	0,895

Tablo 38. Kimyasal konjugatlara çeşitli kinetik modellerin uygulanması

Formülasyon	Tampon	Kinetik Tipi	Parametreler	
			r^2	K
KK-3.5	pH 5.5	0.derece	0,718	0,414
		1.derece	0,939	0,032
		Higuchi	0,886	7,140
		Hixson-Crowell	0,931	0,165
		Weibull	0,982	0,866
KK-3.5	pH 7.4	0.derece	0,718	0,476
		1.derece	0,790	0,054
		Higuchi	0,885	8,203
		Hixson-Crowell	0,946	0,172
		Weibull	0,954	1,081
KK-4.5	pH 5.5	0.derece	0,767	0,506
		1.derece	0,876	0,038
		Higuchi	0,918	8,592
		Hixson-Crowell	0,949	0,173
		Weibull	0,973	1,028
KK-4.5	pH 7.4	0.derece	0,754	0,480
		1.derece	0,774	0,054
		Higuchi	0,909	8,184
		Hixson-Crowell	0,953	0,172
		Weibull	0,974	0,998

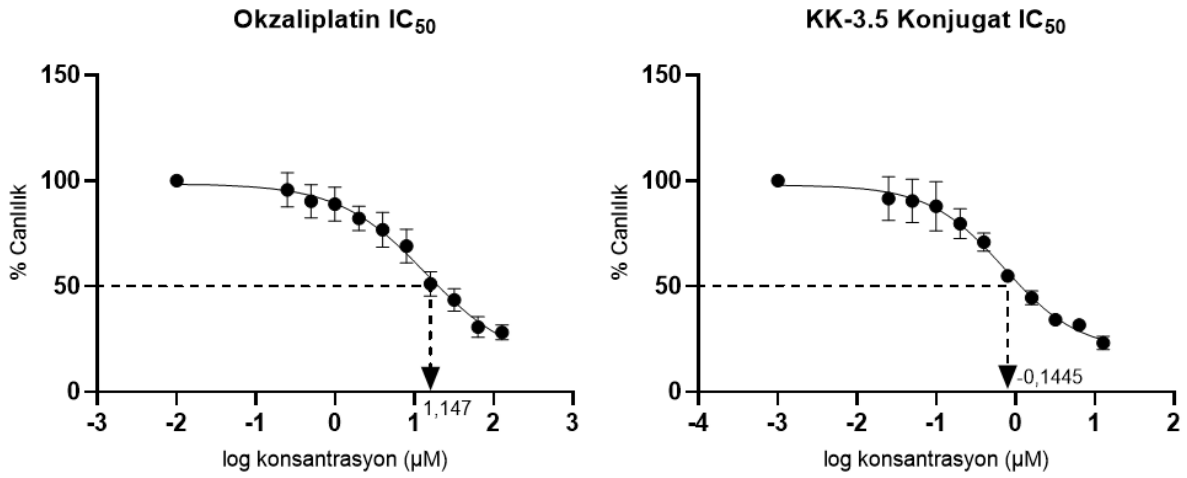
Hücre Kültürü Çalışmaları

HT-29 hücre hattında yapılan çalışma sonucunda PAMAM G3.5 dendrimer, okzalipatin ve KK-3.5 formülasyonunun %'de canlılık verileri Şekil 53'te verilmiştir.



Şekil 53. HT-29 hücre hattında konsantrasyonlara göre % canlılık verileri

Okzalipatin ve KK-3.5 formülasyonunun IC_{50} değerleri GraphPad Prism 8.2.0 programı ile doğrusal olmayan (nonlinear) regresyon kullanılarak bulunmuştur. Sonuçlar Şekil 54 ve Tablo 39'da gösterilmiştir.



Şekil 54. Okzalipatin ve KK-3.5 konjugatı log (IC_{50}) değerleri

Tablo 39. Hücre kültürü çalışması verileri

Madde	log (IC_{50})	IC_{50} (µM)	Hill Eğimi
Dendrimer	> 2,41	> 256	-
Okzalipatin	1,1470	14,03	-0,7905
KK-3.5	-0,1445	0,72	-0,9116

TARTIŞMA

HPLC VE SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEMLER

HPLC ve spektrofotometri konsantrasyonları bilinmeyen örneklerin miktarının tayininde sıklıkla kullanılan iki yöntemdir. Her iki yöntemin de kendine özgü avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Spektrofotometre ile miktar tayini çoğu zaman oldukça kolay ve hızlıyken, HPLC yöntemiyle daha düşük miktarda maddelerin tayin edilmesi mümkün olmaktadır. Nitekim her iki yöntem için yapılan validasyon çalışmalarının sonucunda bulunan ölçüm sınırı (LOQ) değerleri karşılaştırıldığında HPLC yöntemiyle 1/10 oranda daha seyreltik numunelerin miktarının ölçülebileceği görülmektedir. Tez çalışması boyunca farklı ölçüm hassasiyetine gerek duyulduğu durumlarda her iki yöntemin de kullanılabilmesi için (ICH) Q2 (R1) kılavuzunda belirtilen ilkelere göre metot validasyonları gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntem de validasyon şartlarını karşılamaktadır.

OKZALİPLATİNİN ÇÖZÜNÜRLÜK VERİLERİ

Okzaliplatinin çeşitli çözücülerdeki ve tamponlardaki çözünürlükleri incelenmiştir. Okzaliplatin klinikte sık kullanılan diğer platin türevleriyle kıyaslandığında daha yüksek su çözünürlüğüne sahiptir (113). Elde edilen çözünürlük verilerine göre okzaliplatinin suda 7,329mg/mL çözünürlüğe sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuç literatürde görülen 6-8mg/mL arası verilerle uyum göstermektedir (17,130). Amerikan farmakopesi (USP) değerlendirmesine göre metanolde az, etanolde ise çok az çözüldüğü görülmüştür. Steglich esterifikasyon reaksiyonları için en sık kullanılan çözücü ortam olan DCM'de ne okzaliplatin ne de dendrimerler pratik olarak

çözünmezler. Bu nedenle reaksiyon ortamı olarak dendrimerlerin ve okzaliplatinin daha iyi çözülebildiği DMF kullanılmıştır (105,132).

Farklı pH değerine sahip tamponlarda yapılan çalışma sonucunda okzaliplatinin bazik ortamlarda (pH10-12) daha yüksek çözünürlüğe sahip olduğu görülmüş, tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) ve Tukey testi kullanılarak bu yüksekliğin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu ($p < 0,01$) gösterilmiştir. pH10 ve pH12 dışında kalan tampon çözeltilerdeki çözünürlük değerleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Platin mineralleriyle yapılan bir çalışmada yüksek hidroksil konsantrasyonuyla çözülen platin minerali miktarının arttığı görülmüştür (133). Dolayısıyla çözünürlük verileri bu çalışmanın bulgularıyla örtüşmektedir.

Çözünürlük çalışmasında dikkat çeken bir durum ise pH2, pH10 ve pH12 tamponlarını içeren doygun okzaliplatin çözeltilerinin çalışma sonunda renklenmesidir. Özellikle klor iyonu içeren asidik veya bazik ortamlarda, okzaliplatinin Pt-O bağlarının tek taraflı koparak okzalato grubunun yerine klor bağlanmasıyla okzaliplatinden bir dönüşüm ürünü olan $[Pt(DACH)OxCl]^-$ oluşmaktadır (134). Sayılan tampon çözeltilerinin içerisinde bulunan klor iyonlarının bu dönüşüme neden olduğu ve çözelti renginin sararmasının buna bağlı olduğu düşünülmektedir.

DENDRİMERLERİN ÇÖZÜNÜRLÜĞE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dendrimer aracılı çözünürlük artışı çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar dendrimerin çekirdek ve yüzey gruplarının yapısı, konsantrasyonu, nesli, çözeltinin pH'sı, çözücü tipi, sıcaklık ve ortamdaki tuz konsantrasyonudur (62). Bu tez çalışması kapsamında aynı kimyasal yapıya sahip (PAMAM) iki farklı nesilde dendrimer kullanılarak bunların okzaliplatin çözünürlüğüne olan etkileri incelenmiştir.

G4-6 dendrimerler misel benzeri bir yapıda olup hidrofobik ilaçların enkapsüle edilebildiği iç kısımlara sahiptirler. G0-3 gibi düşük nesilli dendrimerler daha açık ve esnek bir yapıya sahip olduklarından, G7-10 gibi yüksek nesilli dendrimerler ise yüzey gruplarının yoğunluğuna bağlı sterik engeller nedeniyle daha düşük enkapsülasyon özelliğine sahiptirler (86). Literatürde değişik tipte ve nesillerde dendrimerlerin çeşitli etkin maddelerin çözünürlüklerini artırdığı gösterilmiştir.

Çözünürlüklerin istatistiksel incelenmesi varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testi ile GraphPad Prism 8.2.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Dendrimer nesli, dendrimer konsantrasyonu ve ortam pH'sının çözünürlüğe olan etkileri incelenmiştir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen veriler incelendiğinde açık bir şekilde dendrimer nesli ve dendrimer konsantrasyonu artışının okzaliptin çözünürlüğünü artırdığı görülmektedir. Bu çözünürlük artışının okzaliptin ile etkileşebilecek grup sayısının artmasına bağlamaktayız.

Farklı nesilde dendrimerlerin çözünürlüğe olan etkisi incelendiğinde, 0,05µmol G3.5 veya G4.5 dendrimer içeren su ve pH 7 ortamları haricindeki tüm ortamlarda G4.5 dendrimerlerin okzaliptin çözünürlüğünü daha fazla artırdığı görülmüştür ($p<0,01$).

Huang ve ark. (135) farklı tipte dendrimerler ile silibinin çözünürlüğünü artırmaya çalışmışlardır. Sonuçları çalışmamızla benzer şekilde olmuş ve silibin çözünürlüğü artan dendrimer nesli ile artış göstermiştir. Bu durumu dendrimer neslinin artmasıyla daha fazla ilacın dendrimerle etkileşim kurması olarak açıklamışlardır.

Filipowicz ve Wolowiec (136) riboflavinin çözünürlüğünü artırmak için G2, G2.5, G3, G3.5 ve G4 dendrimerleri kullanmışlar, ve en yüksek çözünürlük artışına G3.5 ve G4 dendrimerler ile ulaşıldığını belirtmişlerdir. Çözünürlük artışı dendrimer nesli ile artış gösterdiğinden sonuçlarımızın bu çalışmanın bulgularıyla da uyumlu olduğu görülmektedir.

Çalışmadan elde edilen bir diğer sonuç ise dendrimerlerin sağladığı çözünürlük artışının konsantrasyonla pozitif bir korelasyon içinde olmasıdır. Lineer regresyon verilerinden elde edilen r^2 değerleri de bu durumu göstermektedir. r^2 değerlerinin yüksek olması, dendrimer konsantrasyonu ve çözünürlük arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermiştir. Fakat bu lineer ilişkinin hangi konsantrasyona kadar devam edeceği bilinmemektedir. G3.5 dendrimerlerin su ortamında yapılan çalışması dışında elde edilen tüm eğrilerin Higuchi'nin A_L tipi çözünürlük eğrisiyle uyum sağladığını söylenebilir (98,137). Kulhari ve ark. (138) konsantrasyon ve çözünürlük arasındaki bu doğrusallığı dendrimerlerin küresel ve simetrik yapısıyla açıklamışlardır. G3.5 su ortamında yapılan çalışma ise Higuchi'nin A_N tipi çözünürlük eğrisine uyum sağlamaktadır. A_N tipi çözünme profiline yüksek konsantrasyonlarda dendrimerler ilaç kompleksinin agregasyonunun neden olduğu düşünülmektedir (139).

G3.5 dendrimerlerin pH 4 ve pH 7 ortamları içerisinde artan dendrimer miktarına bağlı olarak çözünürlük değişimi incelendiğinde ardışık basamaklar (0,05µmol-0,1µmol-0,2µmol-0,4µmol-0,8µmol) arasında genel olarak anlamlı bir artış görülmemiştir. Bu durumu bozan tek istisna 0,4µmol-0,8µmol eklenen çözeltiler arasındadır ($p<0,01$). Su ortamında ise ardışık her basamakta çözünürlükte anlamlı bir

artış görülmüştür. Bu farklılığın tamponlanmamış ortamda, artan dendrimer miktarıyla pH'ın artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı çalışma G4.5 dendrimerler ile tekrarlandığında ise daha farklı bir sonuca ulaşılmıştır. Su ve pH 4 ortamındaki 0,05µmol-0,1µmol dendrimer eklenmiş çözeltiler hariç olmak üzere tüm ardışık basamaklar arasında anlamlı bir çözünürlük artışı görülmüştür ($p < 0,01$).

Son olarak çözücü ortamın çözünürlük artışına olan etkisi incelenmiştir. G3.5 dendrimerlerin üç farklı ortamdaki çözünürlük artış dereceleri incelendiğinde ortamlar arasında büyük bir farklılık görülmemiştir. Çalışma G4.5 dendrimerler için tekrarlandığında sadece yüksek konsantrasyonlarda pH 4 ve pH 7 ortamlarında daha yüksek çözünürlük artışı görülmüştür.

Devarakonda ve ark. (97) farklı tipte PAMAM dendrimerlerin farklı ortamlarda niklozaminin çözünürlüğüne olan etkilerini incelemiştir. Amin sonlanımlı dendrimerlerde bizim çalışmamızla benzer şekilde artan dendrimer nesliyle artan çözünürlük verileri elde etmişlerdir. Ester sonlanımlı yarım nesilli dendrimerler ile yaptıkları çalışmada ise çözünürlükte herhangi bir artış gözlemediklerini belirtmişlerdir. Bu durumu ester sonlanımlı dendrimerlerin sadece dallar arası tersiyer amin gruplarına sahip oldukları, dolayısıyla su, pH 4, pH 7 ve pH 11 gibi ortamlarda dendrimerin ağırlıklı olarak noniyonize halde bulunması ve ilaçla etkileşememesiyle açıklamışlardır.

Tersiyer amin gruplarının pKa değerleri, amin sonlanımlı dendrimerlerin primer aminlerinin pKa değerlerinden daha düşüktür (98). Bu durum onların tam olarak protonlanabilmelerinin ancak çok daha düşük pH'larda mümkün olduğu anlamına gelir. Bu çalışmada kullanmış olduğumuz G3.5 ve G4.5 yarım nesilli dendrimerler olup yukarıda açıklanan sebeplerle ilaçla etkileşemeyecek noniyonize tersiyer amin gruplarına sahiptir. Devarakonda ve ark. (97) çözünürlükte artış gözlemlememesine rağmen kullandığımız dendrimerlerin çözünürlüğü artırmasını yüzey gruplarının farklı olmasına bağlamaktayız. Kullanmış olduğumuz PAMAM G3.5 ve G4.5 dendrimerler anyonik olup çok sayıda eksi yüklü yüzey gruplarına sahiptirler. Oysa ki ester sonlanımlı (-OCH₃) yüzey grupları yüksüzdür (140). Okzaliptatin platinin koordinasyon bileşiği olup eksi yükü etkileşebilir. Dolayısıyla çözünürlük artışının arkasındaki mekanizmada dendrimer-okzaliptatin arasında kurulan elektrostatik etkileşimlerin payı olduğu düşünülebilir. Çözünürlük artışında etkili olabilecek diğer bir olası etkileşim H bağlarıdır. Kullanılan dendrimerler H bağı oluşturmaya uygun tersiyer aminlere ve

yüzey gruplarına sahiptirler (137). Okzaliplatinin yapısındaki $-NH_2$, $C=O$ gibi gruplar üzerinden dendrimerler ile H bağı oluşturabileceği düşünülmektedir.

Genel anlamda su, pH 4 ve pH 7 ortamlarının çözünürlüğü artırmada formülasyonlar açısından belirgin bir etkiye sahip olmadıklarını söylemek mümkündür. Bunun nedeninin kullanılan dendrimerlerin iyonizasyon derecelerinin çalışılan ortamlarda ciddi bir farklılık göstermemesi olduğu düşünülmektedir.

Çözünürlük artışı sadece dendrimerin iyonizasyonuna bağlı olmayıp eğer var ise ilacın iyonize olabilen gruplarıyla da ilişkilidir. Gu ve ark. (141) dendrimerlerin tersiyer aminlerinin (pKa 3-6) tamamının, primer aminlerinin (pKa 7-9) ise büyük kısmının noniyonize halde bulunduğu pH 10 gibi yüksek bir pH'da zayıf asit yapılı puerarinin çözünürlüğünü artırmışlardır. Bu durum dendrimer büyük oranda noniyonize olmasına rağmen ilaç iyonize hale getirilerek de etkileşim kurulabileceğini göstermektedir.

Saf suda yapılan çözünürlük çalışmalarında PAMAM dendrimerlerin bazik yapıları nedeniyle dendrimer konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak ortam pH'sının artış gösterebileceği unutulmamalıdır (142).

FİZİKSEL KOMPLEKS FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI

Dendrimer okzaliplatin kompleksleri hazırlanırken bir molekül dendrimer başına 25 ila 250 molekül okzaliplatin ile karıştırılarak kompleks oluşturulmaya çalışılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan G3.5 dendrimerler teorik olarak yüzeyde 64 karboksil grubu, dallar içinde ise 62 adet tersiyer amin grubu olmak üzere topla 126 etkileşim noktasına sahipken G4.5 dendrimerlerde bu değerler sırasıyla 128, 124 ve 252'dir. 250:1 okzaliplatin:dendrimer oranına kadar okzaliplatin eklendiğinden neredeyse mümkün olan tüm olası etkileşim bölgelerinin okzaliplatinle etkileşmesi mümkün kılınmıştır (97).

Dendrimer ilaç fiziksel komplekslerini konak-konuk etkileşimi (host-guest interaction) ile açıklamak mümkün olup bunların oluşumunda temel olarak elektrostatik bağlar, hidrojen bağları veya hidrofobik etkileşimler rol oynar (58,62).

G3.5 ve G4.5 dendrimerler ile okzaliplatin moleküllerinin kompleks oluşturma mekanizması "Dendrimerlerin Çözünürlüğe Etkisinin İncelenmesi" başlığında detaylı olarak tartışılmıştır. Kısaca kullanılan dendrimerler çalışılan ortamlarda, dalları arasında çoğunlukla noniyonize tersiyer aminlere ve yüzeyde eksi yüklü karboksil

gruplarına sahiptir. Okzaliplatinin bir metal kompleksi olması sebebiyle bu eksi yüklü gruplarla etkileşmesi beklenmektedir. Katyonik yapıları bileşiklerin çalışılan ortamlarda dendrimer dalları arasındaki tersiyer aminlerle kompleks oluşturması düşük bir ihtimaldir (143). Okzaliplatinin çok da hidrofobik olmayan yapısı, oluşan kompleksleşmenin dendrimer boşlukları aracılığıyla değil de yüzey gruplarıyla kurulan iyonik etkileşimlerle gerçekleşme olasılığını yükselten bir diğer faktördür (144). Dendrimer ve okzaliplatin yapılarında -NH, -OH, C=O gibi grupların bulunması H bağı oluşumunu da mümkün kılmaktadır (130).

Fiziksel Komplekslerde UV-Vis ve FT-IR Spektrumları

Hazırlanan fiziksel komplekslerde dendrimer ile okzaliplatin kompleksleştiğinin gösterilmesi spektral yöntemlerle yapılmıştır. Etkin maddenin orijinal spektrumunda görülen değişiklikler kompleksleşme hakkında bilgi vermektedir. UV-Vis veya FT-IR spektrumunda etkin maddeye ait piklerin baskılanması, yerinin değişmesi veya tamamen kaybolması kompleksleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir. Bu yöntem literatürde de sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin Devarakonda ve ark. (98) furosemi, Igartua ve ark. (101) karbamazepini, Kolhatkar ve ark. (145) bir kamptotesin türevi olan SN-38 bileşimini, Yao ve ark. (146) puerarini, Kong ve ark. (147) 10-HCPT bileşimini, Patel ve ark. (148) ketoprofeni, Singh ve ark. (149) ramipril ve hidroklorotiyaziti, çeşitli yapıda dendrimer ilaç kompleksleri hazırlamış ve kompleks oluşumunu UV-Vis veya FT-IR spektrumları ile karakterize etmişlerdir.

Saf okzaliplatinin UV spektrumunda yaklaşık 255nm civarında görülen pik seçilen G3.5 ve G4.5 kompleksi için baskılanmış durumdadır. Bu durum kompleks oluşumunun gerçekleştiğini düşündürmüştür. Bunun yanısıra komplekslerin FT-IR spektrumları incelendiğinde 0-30cm⁻¹ arası kaymalar görülmüştür. Bu kaymalar dendrimer ilaç arası görülen hidrofilik etkileşimlere bağlanmıştır (150). Özellikle O-H gerilmesi ve C=O gerilmesi (amit I bandı) piklerindeki kaymalar ve N-H bükülmesi (amit II bandı) pikinin kaybolması ilaç dendrimer arasındaki etkileşimde H bağı oluşmasının rolü olduğunu düşündürmektedir (101).

KİMYASAL KONJUGAT FORMÜLASYONLARININ HAZIRLANMASI

Dendrimer ve okzaliplatinin kimyasal konjugasyonunun gerçekleştirilebilmesi için okzaliplatinde yapısal modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Yapısal değişiklikler yapılırken molekülün sitotoksik etkisini kaybetmesine neden olabilecek değişikliklerden kaçınılmış, vücut içerisinde çeşitli indirgenme-yükseltgenme reaksiyonlarıyla kolaylıkla sitotoksik platin türevlerine dönüşebilecek bir yapı tercih edilmiştir.

Okzaliplatinin yapısal modifikasyonları temel olarak iki şekilde gerçekleştirilebilmektedir. İlk yöntem okzalato grubunun bulunduğu halka üzerinde değişiklikler yapmaktır. Literatürlerde okzalato grubunu bulduran halka üzerindeki değişikliklerin genellikle çeşitli şeker yapılarını moleküle eklemeye kullanıldığı görülmüştür. Örneğin Li ve ark. (151) glukozu, Wu ve ark. (152) ise galaktozu okzalato grubunu taşıyan halkayı modifiye ederek eklemiştir. Diğer yöntem ise bu tez çalışmasında da kullanılmış olan yükseltgenme (oksidasyon) reaksiyonları ile okzaliplatini platin (IV) türevine çevirmektir. Platin (II) bileşiklerinin platin (IV) türevlerine çevrilmesiyle literatürde çok sayıda örnek vardır (106,126,153). Platin (IV) komplekslerinin önemli bir avantajı ön ilaç gibi davranmalarıdır. İndirgenmedikleri sürece inaktif haldeyken, hücre içine girdiklerinde Pt (II) komplekslerine indirgenirler ve onlar gibi etki gösterirler (154). Kanser hücrelerinin hipoksik ortamı, glutatyon gibi indirgeyici enzimler açısından zengin olması Pt (IV) komplekslerinin Pt (II) türevlerine dönüşümünü kolaylaştırmaktadır (155,156). Pt (IV) komplekslerinin indirgenme yetenekleri kompleksi oluşturan ligandlar ile yakından ilişkilidir. Chen ve ark. (157,158) modifikasyon sonucu elde edilen $[Pt(OH)(OAc)(Ox)]$ kompleksinin orta şiddette redüksiyon yeteneğine sahip olduğu bildirmişlerdir.

Yöntemler bölümünde anlatıldığı üzere okzaliplatin platin (IV) türevine çevrilmiş, molekülde oluşan hidroksil grubu daha sonra dendrimerlerin karboksil grupları ile esterleşmesini sağlamıştır. Hidroksil grubuna sahip moleküllerin karboksil sonlanımlı dendrimerler ile reaksiyona girebilmektedir. Yang ve ark. (159) venlafaksini G2.5 dendrimere ve Yavuz ve ark. (160) deksametazonu G3.5 ve G4.5 dendrimerlere DCC/DMAP aracılığıyla başarıyla konjuge etmişlerdir. Bu tez çalışmasında da modifiye edilmiş okzaliplatin G3.5 ve G4.5 dendrimerlere ester bağları ile kovalent olarak bağlanmıştır. Bağlanma doğrudan gerçekleştirilmiş olup herhangi bir ara bağlantı molekülü (linker) kullanılmamıştır.

Modifiye Okzaliplatinin Karakterizasyonu

FT-IR spektrumunda okzaliplatin ile karşılaştırıldığında 3480cm^{-1} 'de 574cm^{-1} 'de ortaya çıkan pikler sırasıyla O-H ve Pt-O gerilmesi pikleridir (124-126). Bu piklerin spektrumda görülmesi Pt-OH bağı kurulduğunu göstermektedir. Diğer yandan platine eklenen asetat grubuna ait bağ yapıları saf okzaliplatinde de bulunduğundan spektrumda başka bir değişikliğe neden olmamıştır.

$^1\text{H-NMR}$ spektrumunda yapısal olarak sahip olduğu konformasyon nedeniyle sikloheksanın aynı karbon atomu üzerinde bulunan protonlar farklı kimyasal kayma gösterirler. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda en düşük (upfield bölge) kimyasal kaymaya sahip pikler sikloheksanın heteroatomlara en uzak aksiyel yönelimli protonlarıdır. Sikloheksanın azota komşu karbonu üzerinde bulunan pikler ise sikloheksan protonları içerisindeki en yüksek (downfield bölge) kimyasal kaymaya sahip olanlardır (120,127,161). NH_2 gruplarının protonları ise yüksek kimyasal kaymaya sahip olmayla beraber dötöro atom değişimine bağlı olarak yayvan ve basık pikler halinde görülmektedir. Sikloheksan protonlarına benzer şekilde, aksiyel yönelime sahip azot üzerindeki protonlar ekvatoryal yönelime sahip olan azot üzerikelilerden daha düşük kimyasal kayma gösterirler (162). Spektrumda görülen en şiddetli pentet yapıli pik DMSO-d6 pikidir. Elde edilen spektrum literatürde bulunanlar ile kıyaslanmış ve uyumlu olduğu görülmüştür (106,120,125,126).

$^{13}\text{C-NMR}$ spekturumunda asetat ve okzalat gruplarına ait olan karbon atomları yüksek kimyasal kaymaya sahip bölgede izlenirken, sikloheksan ve metil grubunun karbon atomları düşük kimyasal kayma bölgesinde izlenir. Spektrumda en düşük kimyasal kaymaya sahip karbon metil grubu karbonudur. Sikloheksan karbonlarının kimyasal kaymaları azot atomuna yaklaştıkça artar (106,161). Spektrumda görülen en şiddetli heptet yapıli pik DMSO-d6 pikidir. Elde edilen spektrum literatürde bulunanlar ile kıyaslanmış ve uyumlu olduğu görülmüştür (106,128).

Kimyasal Konjugatlarda FT-IR ve NMR Spektrumları

Kimyasal konjugatların FT-IR spektrumlarında etkin madde ile konjuge olmayan serbest dendrimer uçlarından dolayı hem dendrimere ait, hem de konjuge olduğu modifiye okzaliplatin fonksiyonel gruplarına ait piklere sahip olması beklenmektedir. Elde edilen spektrumlarda bu durumun gerçekleştiği görülmüştür.

Dendrimerler çok sayıda birbirlerinin aynısı olan kimyasal gruplara sahiptirler (135,141). Bu gruplar $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda aynı miktarda kimyasal kayma gösterir, ve genellikle belli noktalardaki şiddetli pikler halinde görülürler. Örneğin amin sonlanımlı PAMAM dendrimerler 6 değişik tipte protona sahiptirler. Bunlardan dördü dallar arasında iç bölgede kalan metilen ($-\text{CH}_2$) gruplarıyken, ikisi dendrimerin en dış katmanında yüzey grubunun bağlandığı metilen gruplarıdır. Bu proton sinyallerinin bazıları spektrumda çakışır (144). DMSO- d_6 'da çözülerek alınan $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında dendrimerlerin metilen gruplarının sinyalleri 1,8-3ppm arasında görülmüştür. Metilen protonlarının en yüksek kimyasal kaymaya sahip olanı dendrimer dalları arasındaki amit azotuna bağlı metilenin protonlarıdır. Bahsedilen bu metilen grubu protonları G3.5 dendrimerlerde toplam 120 adet, G4.5 dendrimerlerde ise toplam 248 adettir. Konjugatların $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde konjugasyonun gerçekleştiği görülmüştür. Spektrumda görülen 2,5ppm civarında görülen pentet yapılı pik DMSO- d_6 'ya aittir.

PARTİKÜL BOYUTU-DAĞILIMI VE ZETA (ζ) POTANSİYEL ÖLÇÜMLERİ

Terapötik amaçla kullanılacak dendrimerlerin partikül boyutunun ve yükünün uygun olarak ayarlanması son derece önemlidir. Genellikle büyük partiküller dalak ve karaciğerde mononükleer fagositik sistem hücreleri tarafından kandan uzaklaştırılırlar. 10nm'den düşük boyutlular ise böbreklerden filtrasyon yoluyla kandan hızla uzaklaştırılırlar. Ek olarak yüksek derecede artı yüklü partiküller toksik etkilere sahipken, yüksek miktarlarda eksi yük taşıyanlar ise kandan hızla uzaklaştırılmaktadırlar (129).

Dendrimerlerin önce doğrudan temin edildikleri haldeki (metanol içerisinde) partikül boyutu ölçümleri yapılmıştır. Metanol içerisinde ölçümü yapılan dendrimerlerin partikül boyutları 7-8nm civarında çıkmıştır. Üreticiden G3.5 ve G4.5 dendrimerlerle ilgili olarak tam bir boyut bilgisi temin edilememiştir. Ancak üretici molekül ağırlığı G3.5 dendrimere yakın olan G4 nesilli dendrimerin boyutunu 4,5nm ve molekül ağırlığı G4.5 dendrimere yakın olan G5 nesilli dendrimerin boyutunu ise 5,4nm olarak belirtmektedir. Yaklaşık 3nm civarında olan bu farkın nedeninin ölçüm metodlarının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber PDI değerleri yaklaşık olarak 0,2 olarak bulunduğundan dağılımın dar bir aralığa toplandığını söylemek mümkündür.

Metanol uçurulup dendrimerler suda ęözölerek tekrar ölçüm yapılmış ve yapılan iki ölçüm arasında ęok büyük bir fark olduğu görölmüştür. Su ortamında ölçölen partiköl boyutları yaklaşık 30 kat artış göstermiştir. PDI değerleri de oldukça kötüleşmiş 0,5 civarlarına yükselmiştir. Metanolden suya geğişte gözlenen bu ciddi değişim su içerisinde dendrimerlerin agregatlar oluşturmaya başladığını düşündürmektedir. Benzer bir kıyaslama başka bir ęalıřmada da yapılmış ve aynı sonuç alınmıştır (163).

Ciolkowski ve ark. (164) farklı konsantrasyonda hidroksil sonlanımlı PAMAM dendrimerlerde partiköl boyutu ölçümü yapmışlardır. Dendrimer konsantrasyonundan bağımsız olarak 20nm ila 500nm arasında agregatlar tespit etmiş, bu kadar yüksek polidispersiteye sahip örneklere dinamik işık saçılımı (DLS) prensibine göre ölçüm yapmanın mümkün olamayacağını belirtmişlerdir.

Kang ve ark. (165) karboplatini su ortamında G3.5 dendrimerine yüklemişlerdir. Hazırladıkları bu formölasyonun partiköl boyutunu 258nm PDI değerini ise yaklaşık 0,1 olarak bildirmişlerdir. Vu ve ark. (129) ise aynı etkin maddeyi ve aynı nesil dendrimeri PEG ile konjuge ederek bir formölasyon hazırlanmışlardır. PEG ile konjugasyona rağmen partiköl boyutu artmamış, aksine 36nm civarına düşmüştür. Literatürde aynı dendrimerde yapılan benzer ilaç konjugasyonlarının ęok farklı partiköl boyutlarına neden olabildiği görölmüştür. Partiköl boyutunun belirlenmesinde ęözücü ortam koşullarının ve ilaç-dendrimer etkileşimlerinin önemli olduğu açıktır.

Hazırlanan konjugatların partiköl boyutu ölçölmüş, su içerisindeki ortalama partiköl boyutunun konjugasyon sonunda önkeline göre azaldığı görölmüştür. Bu azalma dendrimerin uç gruplarının bazılarında modifiye okzaliptin bağlanmasıyla dendrimerin daha kompakt bir konformasyona geğmesiyle açıklanabilir.

Zeta potansiyel ölçümlerinde G3.5 ve G4.5 dendrimerlerin zeta potansiyeli yaklaşık -26mV olarak bulunmuştur. Her iki dendrimer de anyonik yapılı karboksil sonlanımlı uç gruplarına sahip olduğundan bu beklenen bir durumdur. Konjugasyonun sonunda her iki dendrimerin de zeta potansiyelinin işaret değiştirdiği görölmüştür. Bu durum katyonik yapılı bir metal koordinasyon bileşiği olan modifiye okzaliptinin yüzeye konjugasyonunun geręekleřięini desteklemektedir.

Zeta potansiyelin -26mV'dan 10-15mV civarına geldiği düşünüldüğünde yük yoğunluğunun mutlak değer açısından düştüğü söylenebilir. Dendrimer uçlarındaki yük yoğunluğunun değişmesi dendrimerin boyutuna etki eder. Örneğin pH azaldıkça amin grupları arasındaki itme kuvvetinin artmasına bağlı olarak, katyonik dendrimerlerin

boyutlarında artış görülür (166). Yüzeydeki yük şiddetinin azalmasıyla, dendrimer uçlarının birbirine uyguladıkları itme kuvvetleri de azalmıştır (167). Bu durumun dendrimerin daha kompakt bir konformasyona geçişinin ve dolayısıyla boyutunun konjugasyon sonrası azalmasının ardında yatan neden olabileceği düşünülmüştür. Bununla beraber yük yoğunluğunun azalması, partiküller arası itme kuvvetlerinin de azalmasına neden olacağından agregasyon ihtimalinin artabileceği düşünülmektedir.

YÜKLEME ORANI VE ETKİNLİĞİ, KONJUGE OKZALİPLATİN MİKTARI

Hazırlanan dendrimer okzaliplatin komplekslerinin yükleme oranı ve etkinlikleri yöntemler bölümünde açıklanan formüllere göre hesaplanmıştır. Her bir ortamda en yüksek yükleme oranına 250:1 okzaliplatin:dendrimer oranında ulaşılmıştır. Ancak genel olarak bu oranın artışıyla yükleme oranı artışının doğrusal olarak devam etmediği görülmüştür. Okzaliplatin konsantrasyonu artmaya devam etse de bir noktadan sonra yükleme oranının sabit kalmaya başlamasının sebebi dendrimerle etkileşebilen maksimum ilaç limitine ulaşılmasıdır. Bu çalışmada 1 molekül dendrimer ile G3.5 dendrimer için maksimum 18 adet, G4.5 için ise maksimum 42 adet okzaliplatinin etkileştiği hesaplanmıştır. Bu etkileşimin sadece dendrimer uç grupları aracılığıyla gerçekleştiği varsayıldığında G3.5 dendrimerin uçlarının yaklaşık %28'inin G4.5 dendrimerin uçlarının ise %33'ünün okzaliplatin ile etkileştiği görülmüştür. Etkileşimin bir noktada sabitlenmesinin nedeninin dendrimer uç gruplarında molekül yoğunluğunun artması olduğu düşünülmektedir. Molekül yoğunluğunun artmasının çeşitli elektrostatik engellere neden olabileceği bu durumun da kompleksleşen ilaç molekülü sayısını sınırlayabileceği düşünülmektedir (168).

Genel olarak yükleme etkinliğinin artan dendrimer konsantrasyonuyla ve nesliyle arttığı görülmektedir. Bu bulguların G4.5 ve G5.5 dendrimerlere vardenafil yükleyen Tawfik ve ark. (169) yaptığı çalışmanın verileri ile de uyumlu olduğu görülmüştür. Yükleme etkinliği artışının okzaliplatinle etkileşebilecek yüzey grubu sayısının artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (169).

Nguyen ve ark. (170) sisplatinin G3.5 dendrimerle olan komplekslerini farklı yöntemlerle hazırlamışlardır. Basit karıştırma yöntemiyle hazırladıkları kompleksin %25,2 sonikatör kullanarak hazırlananın ise %27,8 yükleme oranına sahip olduğunu raporlamışlardır.

Yükleme ortamının dendrimer başına yüklenen okzaliptatin miktarına olan etkisi incelendiğinde belirgin bir farklılık görülmemiştir. Bu durumun nedeninin “Dendrimerlerin Çözünürlüğe Etkisinin İncelenmesi” başlığında da tartışıldığı üzere dendrimerlerin iyonizasyon derecelerinin ortamlar arasında bir farklılık göstermediğinin düşünülmesidir.

Dendrimerlere konjuge olan etkin madde miktarının belirlenmesinde matris destekli lazer desorpsiyonu-iyonizasyonu uçuş süresi kütle spektroskopisi (MALDI-TOF MS), pozitif iyon elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI-MS), jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ve ¹H-NMR gibi yöntemler kullanılabilir (171). G3.5 ve G4.5 kimyasal konjugatlarında dendrimer uçlarına konjuge olan ortalama modifiye okzaliptatin sayısı ¹H-NMR’dan elde edilen sonuçlara göre sırasıyla 37,9 ve 26,3 olarak bulunmuştur. Dendrimer nesli artmasına rağmen konjuge olan etkin madde sayısı artış göstermemiştir. Bu duruma dendrimer neslinin artmasıyla dendrimer uçları çevresinde oluşan moleküler yoğunluğun sebep olabileceği düşünülmüştür. Daha fazla sayıda etkin maddenin dendrimer uçlarına ulaşip reaksiyona girmesinin sterik engellerle önlenebileceği bilinmektedir (172).

Kirkpatrick ve ark. (167) G3.5, G4.5, G5.5 ve G6.5 dendrimerin yüzeyine konjugasyon yoluyla sisplatin bağlamışlardır. Sırasıyla bu dendrimer yüzeylerine bağlanan sisplatin miktarlarını 22, 37, 54 ve 94 olarak raporlamışlardır. Dendrimer nesli arttıkça konjuge olan sisplatin miktarının artış göstermesi sonuçlarımızla uyuşmamaktadır. Karşılaştığımızı düşündüğümüz sterik engel sorununu Kirkpatrick ve ekibinin yaşamama sebebinin, sisplatinin okzaliptatine göre daha küçük yapıli bir molekül olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Howell ve ark. (173,174) okzaliptatin benzeri bir yapı olan (DACH)Pt grubunu G4.5 dendrimer uçlarına konjuge etmişlerdir. ¹H-NMR’dan elde ettikleri sonuçlara göre dendrimer uçlarına farklı reaksiyon koşullarında 33 ila 40 (DACH)Pt ünitesinin bağlanmış olduğunu bildirmişlerdir.

Literatürde yapısında okzaliptatin bulunan ve dendrimerik olmayan çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler de bulunmaktadır. Örneğin Dutta ve Sahu (113) okzaliptatinin pektin bazlı manyetik nanotayıcılarını hazırlamış ve yükleme etkinliğini %55,2 olarak bulmuşlardır. Vivek ve ark (114). okzaliptatinin kitosan bazlı nanopartiküllerini hazırlamış ve %28,6 ile %91,4 aralığında değişen yükleme etkinliği bildirmişlerdir.

Lagarce ve ark. (175) ise okzaliplatin içeren PLGA mikroküreleri hazırlamış %75-90 arasında değişen yükleme etkinliği bildirmişlerdir.

FORMÜLASYONLARDA İN VİTRO SALIM ÇALIŞMALARI

İn vitro salım çalışmaları etkin maddelerin geçebileceği kadar büyük fakat dendrimerlerin geçemeyeceği kadar küçük olan 3,5-5kD por açıklığına sahip diyaliz membranlar ile yapılmıştır. Salım profilleri f_1 fark faktörü ve f_2 benzerlik faktörü ile kıyaslanmıştır.

Dendrimer başına en fazla okzaliplatin yüklenen F21 formülasyonu ve nesiller arası karşılaştırılabilirliğin sağlanması için bu formülasyonun G3.5 eşdeğeri olan F6 formülasyonu ile pH 5.5 ve 7.4 ortamlarında salım çalışması yapılmıştır. Salım profillerinin kıyaslanması profilin %85'ten sonrasında en fazla tek nokta alınarak yapılmış, f_1 değeri 0-15 arasında, f_2 değeri ise 50-100 arasında ise profiller benzer kabul edilmiştir (176).

Fiziksel komplekslerin salım profilleri kıyaslandığında F6 formülasyonunun pH 5.5'te diğerlerinden farklı olarak daha hızlı salım yaptığı görülmüştür. Diğer profiller arası anlamlı bir fark görülmemiştir. Kimyasal konjugat formülasyonlarının salım profilleri kıyaslandığında profillerin tamamının benzer olduğu görülmüştür.

Hem fiziksel kompleksler hem kimyasal konjugatlar okzaliplatin salımını geciktirmeyi başarmışlardır. Ancak bu gecikme süresi çok uzun olmamıştır. Maddelerin tamamının salınma süresi serbest okzaliplatin için ortalama 30 dakikayken, fiziksel komplekslerde ortalama 60 dakika, kimyasal konjugatlarda ise ortalama 120 dakikadır. Kompleks yapılar da gecikme süresinin uzun olmamasının nedeninin platin (II) bileşiklerinin PAMAM dendrimerle düşük bağlanma sabiteli ($10^4 - 10^5 M^{-1}$) kompleksler oluşturması olduğu düşünülmektedir (177). Kimyasal konjugatlarda salım süresinin daha da uzatılabilmesi adına kimyasal sentezde çeşitli değişikliklerin yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Doğrudan esterifikasyon yerine çeşitli özellikte ara bağlantı grupları (linker) veya ester yapılı bağlar yerine yapısal olarak daha stabil olan amit bağları kullanılarak salım süresinin artırabileceği düşünülmektedir (178,179).

Salım profilleri çeşitli kinetik modellerle incelenmiş ve genel olarak hem kompleks formülasyonlarının hem de konjugatların Weibull veya Hixson-Crowell tipi kinetiğe uyum sağladıkları görülmüştür.

Tüm bu elde edilen bilgiler ışığında ara bağlantılar asite duyarlı gruplar arasından seçilerek tümör çevresinde (pH 5.5) daha hızlı salım yapan fakat kanda (pH 7.4) daha yavaş salım yapan sistemler hazırlanabilir. Ayrıca hazırlanan dendrimerlerin birleşerek agregatlar oluşturmaya oldukça meyilli oldukları görülmüştür. Dendrimerlerin yüzeyine etkin maddenin yanısıra çeşitli elektrostatik gruplar konjuge edilmesiyle agregasyonun önüne geçilerek formülasyonda çeşitli geliştirmelerin yapılması mümkündür.

HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Kolon kanserini taklit eden farklı özelliklere sahip çok sayıda hücre hattı (HT-29, HCT-116, LoVo, SW480, DLD-1 gibi) mevcuttur. Bu tez çalışması kapsamında HT-29 insan kolon adenokarsinomu hücreleri seçilmiştir. HT-29 hücreleri adenomatöz polipozisten köken almışlardır (180,181). Sisplatine doğal olarak dirençlidirler (182). Mikrosatellit instabilitesi görülme ihtimali düşük olan bir hücre hattıdır (183). HT-29 hücreleri p53 mutant, *KRAS* yabani tip (wild type) ve *BRAF* mutant özelliğe sahiptirler (184,185). p53 tümör baskılayıcı bir protein olup, mutasyonları onkogenik strese cevap olarak verilen hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun desteklenmesi gibi normal p53 fonksiyonlarının kaybına neden olur. İnsanlarda görülen kanserlerin yarısından fazlasında p53 mutasyona uğrar (186). Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında kolon kanser hücre hatlarından mutant p53'e sahip HT-29 seçilmiştir. Mutant p53'e sahip olması nedeniyle HT-29 hücre hattına uygulanan maddelere bağlı olarak görülen ölümün p53'ten bağımsız olarak, hücre ölüm yollarının aktive olmasıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (187).

HT-29 hücre hattına G3.5 dendrimerler uygulandığında hücre hattına uygulanan en yüksek doz dahi hücre canlılığını %90'ın altına düşürememiştir. Bu nedenle G3.5 dendrimerin IC₅₀ değeri tam olarak saptanamamıştır. Elde edilen sonuçlara göre IC₅₀ değerinin 256µM'dan çok daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Anyonik dendrimerlerin toksisitelerinin düşük olduğu literatür verilerinde de bulunduğu için bu bulgu literatür ile uyumlu bulunmuştur (82).

Okzaliptatin uygulamasının yapıldığı hücrelerde dendrimerin aksine belirgin bir sitotoksik etki görülmüştür. Non-lineer regresyon ile IC₅₀ değeri 14,03µM olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değer diğer çalışmalarda bulunan değerler ile uyum içerisindedir (188).

G3.5 konjugatının uygulandığı hücrelerde görölen sitotoksik etkinin daha da arttığı görölmüş IC_{50} değeri $0,72\mu M$ olarak hesaplanmıştır.

İn vitro araştırmalar, makromoleküler yapılı platin ön ilaçlarının küçük moleküllü platin bileşikleri ile karşılaştırıldığında hücre içine alımının belirgin şekilde arttığını göstermektedir (189). Dendrimerik formölasyonun saf okzaliplatinden daha toksik olmasının ardında yatan sebebin, platinin hücre içine daha aktif bir şekilde alınması ve buna bağlı olarak daha fazla DNA-platin kompleksi oluşması olduğu düşünülmektedir.



SONUÇLAR

Bu çalışmanın temel amacı kanser tedavisinde kullanılmaya aday olabilecek okzaliptatin benzeri etkilere sahip çeşitli dendrimerik formülasyonların geliştirilmesi ve bunların özelliklerinin *in vitro* olarak incelenmesidir.

Dendrimerler çeşitli mekanizmalarla etkin maddelerin çözünürlüklerini artırabilmektedir. Bu çalışmada iki farklı nesilde dendrimer kullanılmış ve her ikisinin de okzaliptatin çözünürlüğünü artırıcı etki gösterdiği görülmüştür. Ayrıca bu etkinin dendrimer konsantrasyonları ile doğrusal şekilde arttığı bulunmuştur. Dendrimer nesilleri arasında kıyaslama yapıldığında G4.5 nesilli dendrimerlerin çözünürlüğü G3.5 nesilli olanlarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha fazla artırdığı görülmüştür.

Tez kapsamında birlikte çöktürme yöntemiyle dendrimer okzaliptatin fiziksel kompleksleri ve Steglich esterifikasyon reaksiyonları ile okzaliptatin türevi dendrimer konjugatları hazırlanmıştır. Çeşitli yöntemler kullanılarak hazırlanan formülasyonlar karakterize edilmişlerdir.

Fiziksel komplekslerin yükleme özellikleri incelenmiş ve dendrimer konsantrasyonu ve ortamın pH değerlerine göre farklılık gösterdiği görülmüştür. Genel olarak dendrimer konsantrasyonu arttıkça yükleme oranının arttığı, yükleme etkinliğinin azaldığı görülmüştür. G4.5 dendrimerlerin G3.5 dendrimerlere göre mol başına 2 ila 5 kat daha fazla okzaliptatin yükleyebildikleri görülmüştür.

Kimyasal konjugatlarda dendrimer uçlarına konjuge olmuş madde miktarı, ¹H-NMR ile saptanmıştır. 1 mol dendrimer başına G3.5 konjugatına 37,9 molekül G4.5 konjugatına ise 26,3 molekül bağlanmıştır.

Çalışmada kullanılan G3.5, G4.5 dendrimerlerin ve hazırlanan konjugat formülasyonlarının partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyel değerleri incelenmiştir. Metanol içerisinde ticari olarak satılan dendrimerler ile doğrudan ölçüm yapıldığında partikül boyutlarının küçük (<10nm) ve boyut dağılımlarının dar bir aralıkta olduğu (PDI<0,25) görülmüştür. Dendrimerler metanol uçurularak suda dağıtıldıklarında ise partikül boyutu belirgin şekilde yükselmiş (200-250nm), dağılım ise kötüleşmiştir (PDI>0,40). Kimyasal konjugatların su içerisindeki boyutları G3.5 için $179,30 \pm 77,30$ ve G4.5 için $155,93 \pm 13,59$ olarak bulunmuş, sırasıyla 0,377 ve 0,340 olmak üzere ortalama bir polidispersiteye (sırasıyla) sahip oldukları görülmüştür. Zeta potansiyel ölçümlerinde G3.5 ve G4.5 dendrimerler karboksil yapılı anyonik yüzey gruplarına sahip olduklarından eksi yüklü olarak bulunmuştur. Etkin maddenin dendrimerlere konjuge olmasıyla yüzey yükü eksiden artıya dönmüştür.

Karakterize edilen formülasyonlar ile pH 5.5 ve pH 7.4 olmak üzere iki farklı ortamda salım çalışması yapılmıştır. Salım çalışmaları diyaliz membran yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Salım çalışmalarına göre membran içerisine konulan maddelerin tamamının salım süresi serbest okzalipatin için ortalama 30 dakika, fiziksel komplekslerde ortalama 60 dakikada, kimyasal konjugatlarda ise ortalama 120 dakika sürmüştür. Saf okzalipatinin pH 7.4'te daha hızlı salınmaya meyilli olduğu görülmüştür. Salım profilleri f_1 fark faktörü ve f_2 benzerlik faktörü kullanılarak kıyaslanmıştır. Kimyasal konjugat formülasyonları kendi aralarında kıyaslandığında salım profilleri arasında anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür. Fiziksel kompleks formülasyonlarında ise F6 formülasyonunun pH 5.5 ortamda elde edilen salım profilinin diğerlerinden anlamlı olacak şekilde daha hızlı salım yaptığı görülmüştür. Salım profillerinin çeşitli salım kinetik modellerine olan uyumları incelenmiş ve genellikle en yüksek uyum sağlayan kinetiğin Weibull veya Hixson-Crowell olduğu görülmüştür.

Çalışma kapsamında son olarak seçilen KK-3.5 formülasyonu ile HT-29 kolon kanseri hücre hattında etkinlik çalışması yapılmıştır. KK-3.5 formülasyonuna ek olarak saf okzalipatin ve boş G3.5 dendrimerlerin de sitotoksiteleri incelenmiştir. Çalışmaya göre 48 saatin sonunda, saf G3.5 dendrimerlerin uygulandığı hücrelerin en yüksek dozda ($256\mu\text{M} = 3,321\text{mg/mL}$) bile %90'dan fazla canlılık gösterdiği görülmüştür. Bu durum G3.5 dendrimerlerin tek başlarına toksisitelerinin oldukça düşük olduğunu göstermektedir. Verilere nonlineer regresyon uygulanmasıyla saf okzalipatin ve KK-3.5 konjugatlarının IC_{50} değerleri sırasıyla $14,03\mu\text{M}$ ve $0,72\mu\text{M}$ olarak bulunmuştur.

Ayrıca Hill eğiminin KK-3.5 formülasyonunda daha küçük olması doz artışına daha hızlı yanıt alındığını göstermektedir.

Sonuç olarak tez kapsamında çeşitli dendrimerik formülasyonlar hazırlanmış ve bunların özellikleri incelenmiştir. Hazırlanan formülasyonlar yenilikçi olmakla birlikte geliştirilmeye son derece açıktır. Salım hızını yavaşlatmaya veya partikül boyutu dağılımını iyileştirmeye yönelik geliştirmeler yapılabilir. Fakat yapılabilecek bu olası değişikliklerin formülasyonun sitotoksisite özelliklerini de ciddi şekilde etkileyebileceği unutulmamalıdır.



ÖZET

Bu tez çalışması kapsamında okzaliplatinin yenilikçi dendrimerik formülasyonlarının hazırlanması ve *in vitro* özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

İlk olarak okzaliplatinin farklı çözücü ortamlarındaki çözünürlükleri incelenmiştir. Daha sonra, farklı konsantrasyonlarda PAMAM G3.5 ve PAMAM G4.5 dendrimerlerin çözünürlüğü artırma yetenekleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar okzaliplatin çözünürlüğünün artan dendrimer konsantrasyonu ile arttığını göstermiştir. Ayrıca artış PAMAM 4.5 dendrimerlerde çok daha belirgin olarak gözlenmiştir.

Formülasyonlar konak-konuk (host-guest) ilişkisine dayanan fiziksel kompleksler ve etkin madde dendrimer arasında kovalent bağ kurulmasıyla oluşan kimyasal konjugatlar şeklinde hazırlanmıştır.

Dendrimerler ilaçlarla fiziksel kompleks oluştururken, çözücü özellikleri dendrimer başına yüklenen ilaç miktarını etkileyebildiği için, kompleksler iki farklı tamponda (pH 4 ve pH 7) ve saf suda hazırlanmıştır. Hazırlanan her formülasyon yükleme oranı ve yükleme etkinliği açısından incelenmiştir. PAMAM G4.5 dendrimerlerin PAMAM G3.5 dendrimerlere göre 2-5 kat daha fazla okzaliplatin ile kompleks oluşturduğu görülmüştür. pH 4, pH 7 ve su ortamlarında kompleks oluşturan okzaliplatin sayısı arasında ise anlamlı bir fark görülmemiştir.

Kimyasal konjugatlar hazırlanırken, öncelikle dendrimeri okzaliplatine bağlamak için okzaliplatin modifiye edilerek platin (IV) türevi bir bileşiğe çevrilmiştir. Daha sonra bu bileşiğin hidroksil grupları ile dendrimerlerin karboksil grupları arasında Steglich esterifikasyon reaksiyonu ile ester bağları kurulmuştur. Kimyasal reaksiyonlardan

sonra elde edilen bileşikler FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR gibi çeşitli spektroskopik yöntemler kullanılarak karakterize edilmişlerdir.

Kompleks formülasyonlarına göre daha uzun süreli salım yaptığı için ve dendrimere bağlı toksisitesi daha düşük olduğu için PAMAM G3.5 konjugatı sitotoksosite testi için seçilmiştir. Test sonucunda PAMAM G3.5 konjugatının IC₅₀ değeri 0,72µM olarak bulunmuştur. Saf okzaliptatinin için bu değer 14,03µM'dır.

Sonuç olarak, iyileştirmelere açık, yenilikçi bir dendrimerik ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: okzaliptatin, dendrimer, PAMAM, kolon kanseri



IN VITRO EVALUATION OF DENDRIMERIC FORMULATION OF OXALIPLATIN

SUMMARY

The aim of this thesis is, preparing innovative dendrimeric formulations of oxaliplatin and investigating its *in vitro* properties.

Firstly, the solubility of oxaliplatin in various solvents determined. Then, solubility increasing capability of PAMAM G3.5 and PAMAM G4.5 dendrimers was investigated at different concentrations. The results showed that oxaliplatin solubility increased with increasing dendrimer concentration. In addition, the increase was more notable in PAMAM G4.5 dendrimers.

The formulations were prepared as physical complexes based on the host-guest relationship and chemical conjugates formed by covalent bonding between the active substance and dendrimer surface groups.

Since solvent properties can affect the amount of drug loaded per dendrimer, dendrimer-drug complexes are prepared in two different buffer solutions (pH 4 and pH 7) and in pure water. Each formulation was examined for loading capacity and loading efficiency. It was found that PAMAM G4.5 dendrimers can complex with 2-5 fold more oxaliplatin than PAMAM G3.5. There was no significant difference between the number of complexed oxaliplatin and different mediums (pH 4, pH 7 and water).

While preparing chemical conjugates, firstly oxaliplatin was modified to a platinum (IV) compound to connect dendrimer and oxaliplatin. Then, the ester bonds

were established by Steglich esterification reaction between the hydroxyl group of this compound and the carboxyl groups of the dendrimers. The compounds obtained after chemical reactions were characterized by various spectroscopic methods such as FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$.

Because of longer release time than complex formulations and lower toxicity due to dendrimer generation, PAMAM G3.5 conjugate was selected for the cytotoxicity test. The IC_{50} value of PAMAM G3.5 conjugate was found as $0,72\mu\text{M}$. For free oxaliplatin this value was $14,03\mu\text{M}$.

As a result, an innovative dendrimer based drug delivery system has been developed which has room for further improvement.

Keywords: oxaliplatin, dendrimer, PAMAM, colon cancer

KAYNAKLAR

1. Battigelli A, Menard-Moyon C, Da Ros T, Prato M, Bianco A. Endowing carbon nanotubes with biological and biomedical properties by chemical modifications. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(15):1899-920.
2. Raymond E, Chaney SG, Taamma A, Cvitkovic E. Oxaliplatin: A review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol* 1998;9(10):1053-71.
3. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 1998;25(2 Suppl 5):4-12.
4. Oberoi HS, Nukolova NV, Kabanov AV, Bronich TK. Nanocarriers for delivery of platinum anticancer drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(13-14):1667-85.
5. Cassidy J, Misset JL. Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management. *Semin Oncol* 2002;29(5 Suppl 15):11-20.
6. Pasetto LM, D'Andrea MR, Rossi E, Monfardini S. Oxaliplatin-related neurotoxicity: How and why? *Crit Rev Oncol Hemat* 2006;59(2):159-68.
7. van der Meel R, Vehmeijer LJ, Kok RJ, Storm G, van Gaal EV. Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(10):1284-98.
8. Yang C, Fu ZX. Liposomal delivery and polyethylene glycol-liposomal oxaliplatin for the treatment of colorectal cancer (Review). *Biomed Rep* 2014;2(3):335-9.

9. Liu X, Hao W, Lok CN, Wang YC, Zhang R, Wong KK. Dendrimer encapsulation enhances anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. *J Pediatr Surg* 2014;49(12):1846-51.
10. Kiick KL. Materials science. Polymer therapeutics. *Science* 2007;317(5842):1182-3.
11. Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S *et al.* A new class of polymers: Starburst-dendritic Macromolecules. *Polymer Journal* 1985;17(1):117-32.
12. Stordal B, Pavlakis N, Davey R. Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev* 2007;33(4):347-57.
13. Di Francesco AM, Ruggiero A, Riccardi R. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(11):1914-27.
14. Ibrahim A, Hirschfeld S, Cohen MH, Griebel DJ, Williams GA, Pazdur R. FDA drug approval summaries: Oxaliplatin. *Oncologist* 2004;9(1):8-12.
15. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR *et al.* Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007;25(12):1539-44.
16. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J *et al.* Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18(16):2938-47.
17. Levi F, Metzger G, Massari C, Milano G. Oxaliplatin - Pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. *Clin Pharmacokinet* 2000;38(1):1-21.
18. Matos BN, de Oliveira PM, Reis TA, Gratieri T, Cunha M, Gelfuso GM. Development and Validation of a Simple and Selective Analytical HPLC Method for the Quantification of Oxaliplatin. *J Chem-Ny* 2015.
19. Culy CR, Clemett D, Wiseman LR. Oxaliplatin - A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in metastatic colorectal cancer and its potential in other malignancies. *Drugs* 2000;60(4):895-924.
20. Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu YB. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hemat* 2005;53(1):3-11.

21. Bhattacharyya D, Ramachandran S, Sharma S, Pathmasiri W, King CL, Baskerville-Abraham I *et al.* Flanking bases influence the nature of DNA distortion by platinum 1,2-intrastrand (GG) cross-links. *Plos One* 2011;6(8):e23582.
22. Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 2002;1(3):227-35.
23. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: A critical review. *Clin Cancer Res* 2000;6(4):1205-18.
24. Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Gines A, Ruiz de Porras V, Moutinho C, Layos L *et al.* Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Mol Cancer Ther* 2015;14(8):1767-76.
25. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T *et al.* Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *New Engl J Med* 2004;350(23):2343-51.
26. Extra JM, Marty M, Brienza S, Misset JL. Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin. *Semin Oncol* 1998;25(2 Suppl 5):13-22.
27. Argyriou AA, Polychronopoulos P, Iconomou G, Chroni E, Kalofonos HP. A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage. *Cancer Treat Rev* 2008;34(4):368-77.
28. RX Media Pharma İnteraktif ilaç Bilgi Kaynağı (Bilgisayar Programı). Versiyon 1.94 İzmir (TUR): GEMAŞ GMM A.Ş.:2019.
29. Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastro Hepat* 2011;8(12):686-700.
30. Zucker S, Vacirca J. Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. *Cancer Metast Rev* 2004;23(1-2):101-17.
31. Moutinho C, Martinez-Cardus A, Santos C, Navarro-Perez V, Martinez-Balibrea E, Musulen E *et al.* Epigenetic inactivation of the BRCA1 interactor SRBC and resistance to oxaliplatin in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(1):djt322.
32. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer - Epidemiology. *Brit Med J* 2000;321(7264):805-8.

33. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F, Ricciardiello L. Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int J Mol Sci* 2013;14(8):16365-85.
34. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol* 2014;12(10):661-72.
35. Midgley R, Kerr D. Colorectal cancer. *Lancet* 1999;353(9150):391-9.
36. Janne PA, Mayer RJ. Primary care: Chemoprevention of colorectal cancer. *New Engl J Med* 2000;342(26):1960-8.
37. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B *et al.* Colorectal cancer. *Lancet* 2010;375(9719):1030-47.
38. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2008;10(1):13-27.
39. Kondo Y, Issa JPJ. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metast Rev* 2004;23(1-2):29-39.
40. Korey C. DNA Methylation: What is it, and what does it do to us? [Erişim tarihi: 15.06.2019]; Web Sitesi: <http://www.helicase.pbworks.com/w/page/17605615/DNA%20Methylation>
41. Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol* 2005;6(5):322-7.
42. Kim RY, Xu H, Myllykangas S, Ji H. Genetic-based biomarkers and next-generation sequencing: the future of personalized care in colorectal cancer. *Per Med* 2011;8(3):331-45.
43. Heslin MJ, Yan J, Johnson MR, Weiss H, Diasio RB, Urist MM. Role of matrix metalloproteinases in colorectal carcinogenesis. *Ann Surg* 2001;233(6):786-92.
44. Wang S, Liu Z, Wang L, Zhang X. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cell Mol Immunol* 2009;6(5):327-34.
45. Byrne M, Saif MW. Selecting treatment options in refractory metastatic colorectal cancer. *Oncotargets Ther* 2019;12:2271-8.

46. Holch J, Stintzing S, Heinemann V. Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: Standard of Care and Future Perspectives. *Visc Med* 2016;32(3):178-83.
47. Sinicrope FA, Okamoto K, Kasi PM, Kawakami H. Molecular Biomarkers in the Personalized Treatment of Colorectal Cancer. *Clin Gastroenterol H* 2016;14(5):651-8.
48. De Andrade JP, Warner SG, Fong Y. Treatment of metastatic colorectal cancer: innovations in surgical techniques. *J Surg Oncol* 2019;119(5):653-9.
49. McQuade RM, Stojanovska V, Bornstein JC, Nurgali K. Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches. *Curr Med Chem* 2017;24(15):1537-57.
50. Punt CJA, Koopman M, Vermeulen L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(4):235-46.
51. Sanz-Garcia E, Grasselli J, Argiles G, Elez ME, Tabernero J. Current and advancing treatments for metastatic colorectal cancer. *Expert Opin Biol Th* 2016;16(1):93-110.
52. Moriarity A, O'Sullivan J, Kennedy J, Mehigan B, McCormick P. Current targeted therapies in the treatment of advanced colorectal cancer: a review. *Ther Adv Med Oncol* 2016;8(4):276-93.
53. Pfeiffer P, Kohne CH, Qvortrup C. The changing face of treatment for metastatic colorectal cancer. *Expert Rev Anticanc* 2019;19(1):61-70.
54. Modest DP, Pant S, Sartore-Bianchi A. Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2019;109:70-83.
55. Loree JM, Kopetz S. Recent developments in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol* 2017;9(8):551-64.
56. Beypinar I, Araz M, Uysal M, Yalcin S. First-line treatment choices of Turkish medical oncologists in metastatic colorectal cancer: A survey study. *J Buon* 2019;24(1):68-76.
57. Martini G, Troiani T, Cardone C, Vitiello P, Sforza V, Ciardiello D *et al.* Present and future of metastatic colorectal cancer treatment: A review of new candidate targets. *World J Gastroentero* 2017;23(26):4675-88.

58. Khan MK, Nigavekar SS, Minc LD, Kariapper MS, Nair BM, Lesniak WG *et al.* In vivo biodistribution of dendrimers and dendrimer nanocomposites -- implications for cancer imaging and therapy. *Technol Cancer Res Treat* 2005;4(6):603-13.
59. Fischer M, Vogtle F. Dendrimers: From Design to Application-A Progress Report. *Angew Chem Int Ed Engl* 1999;38(7):884-905.
60. Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, Milani M, Nasrabadi HT, Joo SW *et al.* Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res Lett* 2014;9(1):247.
61. Kesharwani P, Jain K, Jain NK. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Progress in Polymer Science* 2014;39:268-307.
62. Choudhary S, Gupta L, Rani S, Dave K, Gupta U. Impact of Dendrimers on Solubility of Hydrophobic Drug Molecules. *Front Pharmacol* 2017;8:261.
63. Jang WD, Selim KMK, Leea CH, Kang IK. Bioinspired application of dendrimers: From bio-mimicry to biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 2009;34:1-23.
64. Grayson SM, Frechet JM. Convergent dendrons and dendrimers: from synthesis to applications. *Chem Rev* 2001;101(12):3819-68.
65. Cheng Y, Zhao L, Li Y, Xu T. Design of biocompatible dendrimers for cancer diagnosis and therapy: current status and future perspectives. *Chem Soc Rev* 2011;40(5):2673-703.
66. Dufes C, Uchegbu IF, Schatzlein AG. Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57(15):2177-202.
67. Gingras M, Raimundo JM, Chabre YM. Cleavable dendrimers. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007;46(7):1010-7.
68. Caminade AM, Laurent R, Delavaux-Nicota B, Majoral JP. Janus dendrimers: syntheses and properties. *New J. Chem.* 2012;36:217-26.
69. D'Emanuele A, Attwood D. Dendrimer-drug interactions. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57(15):2147-62.

70. Sadekar S, Ghandehari H. Transepithelial transport and toxicity of PAMAM dendrimers: implications for oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64(6):571-88.
71. Eichman JD, Bielinska AU, Kukowska-Latallo JF, Baker Jr JR. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharmaceutical Science & Technology Today* 2000;3(7):232-45.
72. Tomalia DA. Starburst/Cascade Dendrimers: Fundamental Building Blocks for a New Nanoscopic Chemistry Set. *Adv. Mater.* 1994;6(7/8):529-39.
73. Bugno J, Hsu HJ, Hong S. Recent advances in targeted drug delivery approaches using dendritic polymers. *Biomater Sci* 2015;3(7):1025-34.
74. Hsu HJ, Bugno J, Lee SR, Hong S. Dendrimer-based nanocarriers: a versatile platform for drug delivery. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2017;9(1).
75. Cheng Y, Xu T. The effect of dendrimers on the pharmacodynamic and pharmacokinetic behaviors of non-covalently or covalently attached drugs. *Eur J Med Chem* 2008;43(11):2291-7.
76. Jansen JF, de Brabander-van den Berg EM, Meijer EW. Encapsulation of guest molecules into a dendritic box. *Science* 1994;266(5188):1226-9.
77. Esfand R, Tomalia DA, Beezer AE, Mitchell JC, Hardy M, Orford C. Dendripore and dendrilock concepts new controlled delivery strategies. *Polym. Prepr.* 2000;41(2):1324-5.
78. Mignani S, Rodrigues J, Roy R, Shi X, Cena V, El Kazzouli S *et al.* Exploration of biomedical dendrimer space based on in-vivo physicochemical parameters: Key factor analysis (Part 2). *Drug Discov Today* 2019;24(5):1184-92.
79. Kannan RM, Nance E, Kannan S, Tomalia DA. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications. *J Intern Med* 2014;276(6):579-617.
80. McNerny DQ, Leroueil PR, Baker JR. Understanding specific and nonspecific toxicities: a requirement for the development of dendrimer-based pharmaceuticals. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* 2010;2(3):249-59.

81. Araujo RV, Santos SDS, Igne Ferreira E, Giarolla J. New Advances in General Biomedical Applications of PAMAM Dendrimers. *Molecules* 2018;23(11).
82. Jain K, Kesharwani P, Gupta U, Jain NK. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int J Pharm* 2010;394(1-2):122-42.
83. Duncan R, Izzo L. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57(15):2215-37.
84. Luong D, Kesharwani P, Deshmukh R, Mohd Amin MCI, Gupta U, Greish K *et al.* PEGylated PAMAM dendrimers: Enhancing efficacy and mitigating toxicity for effective anticancer drug and gene delivery. *Acta Biomater* 2016;43:14-29.
85. Sharma AK, Gothwal A, Kesharwani P, Alsaab H, Iyer AK, Gupta U. Dendrimer nanoarchitectures for cancer diagnosis and anticancer drug delivery. *Drug Discov Today* 2017;22(2):314-26.
86. Fox LJ, Richardson RM, Briscoe WH. PAMAM dendrimer - cell membrane interactions. *Adv Colloid Interface Sci* 2018;257:1-18.
87. Shcharbin D, Shakhbazau A, Bryszewska M. Poly(amidoamine) dendrimer complexes as a platform for gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2013;10(12):1687-98.
88. Baker JR, Jr. Dendrimer-based nanoparticles for cancer therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009:708-19.
89. Najlah M, D'Emanuele A. Crossing cellular barriers using dendrimer nanotechnologies. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6(5):522-7.
90. Otto DP, de Villiers MM. Poly(amidoamine) Dendrimers as a Pharmaceutical Excipient. Are We There yet? *J Pharm Sci* 2018;107(1):75-83.
91. Babu GS, Kumar KK, Kumar CM. Estimation of Oxaliplatin in Pharmaceutical Dosage Forms by High Performance Liquid Chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006;3(1a):41-4.
92. The International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1), 2005.
93. Shabir GA. Step-by-Step Analytical Methods Validation and Protocol in the Quality System Compliance Industry. Institute of Validation Technology 2004:1-14.

94. Higuchi T, Connors KA. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instr.* 1965;4:117-212.
95. André P, Cisternino S, Roy AL, Chiadmi F, Schlatter J, Agranat P *et al.* Stability of oxaliplatin in infusion bags containing 5% dextrose injection. *Am J Health-Syst Pharm* 2007;64:1950-4.
96. Schridde E, Merbach B, Gimme SP; United States Patent Application. Read-To-Use Oxaliplatin Solutions. US 20060063833A1. 23 March 2006.
97. Devarakonda B, Hill RA, Liebenberg W, Brits M, de Villiers MM. Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* 2005;304(1-2):193-209.
98. Devarakonda B, Otto DP, Judefeind AA, Hill RA, de Villiers MM. Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. *Int. J. Pharm.* 2007;345(1-2):142-53.
99. Shadrack DM, Mubofu EB, Nyandoro SS. Synthesis of Polyamidoamine Dendrimer for Encapsulating Tetramethylscutellarein for Potential Bioactivity Enhancement. *Int J Mol Sci* 2015;16(11):26363-77.
100. Maiti PK, Cagin T, Lin ST, Goddard WA. Effect of Solvent and pH on the Structure of PAMAM Dendrimers. *Macromolecules* 2005;38(3):979-91.
101. Igartua DE, Martinez CS, Temprana CF, Alonso SD, Prieto MJ. PAMAM dendrimers as a carbamazepine delivery system for neurodegenerative diseases: A biophysical and nanotoxicological characterization. *Int. J. Pharm.* 2018;544(1):191-202.
102. Wikipedia. Steglich esterification. [Erişim tarihi: 07.07.2019]; Web Sitesi: https://en.wikipedia.org/wiki/Steglich_esterification
103. Neises B, Steglich W. Esterification of Carboxylic Acids with Dicyclohexylcarbodiimide/4-Dimethylaminopyridine: tert-Butyl ethyl fumarate. *Organic Syntheses* 1990;7:93-4.
104. Albert JS, Hamilton AD, 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide–4-Dimethylaminopyridine, in *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*. John Wiley & Sons; 2001. p.1-2.

105. Uppuluri S, Dvorak PR, Tan NCB, Hagnauer G. The Properties of Dendritic Polymers II: Generation Dependence of the Physical Properties of Poly(amidoamine) Dendrimers. Army Research Laboratory 1999.
106. Abramkin S. Synthesis and Characterization of Novel Oxaliplatin Analogs (Dissertation). Vienna: University of Vienna; June 2012.
107. Sommerfeld NS, Hejl M, Klose MHM, Schreiber-Brynzak E, Bileck A, Meier SM *et al.* Low-Generation Polyamidoamine Dendrimers as Drug Carriers for Platinum(IV) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017;2017(12):1713-20.
108. Singh P. Terminal groups in Starburst dendrimers: activation and reactions with proteins. *Bioconj Chem* 1998;9(1):54-63.
109. Gautam SP, Gupta AK, Agrawal S, Sureka S. Spectroscopic Characterization of Dendrimers. *Int. J. Pharmacy Pharm. Sci.* 2012;4(2):77-80.
110. Ishii R, Mori H, Matsumura K, Hongo N, Kiyosue H, Matsumoto S *et al.* Molecular interactions between anticancer drugs and iodinated contrast media: An in vitro spectroscopic study. *Journal of Biomedical Science and Engineering* 2012;5:24-33.
111. Caminade AM, Laurent R, Majoral JP. Characterization of Dendrimers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005;57:2130-46.
112. D'Souza S. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics* 2014;2014:1-12.
113. Dutta RK, Sahu S. Development of oxaliplatin encapsulated in magnetic nanocarriers of pectin as a potential targeted drug delivery for cancer therapy. *Results Pharma Sci* 2012;2:38-45.
114. Vivek R, Thangam R, Nipunbabu V, Ponraj T, Kannan S. Oxaliplatin-chitosan nanoparticles induced intrinsic apoptotic signaling pathway: a "smart" drug delivery system to breast cancer cell therapy. *Int J Biol Macromol* 2014;65:289-97.
115. Costa P. An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing. *Int J Pharm* 2001;220(1-2):77-83.
116. Polli JE, Rekhi GS, Augsburger LL, Shah VP. Methods to Compare Dissolution Profiles and a Rationale for Wide Dissolution Specifications for Metoprolol Tartrate Tablets. *J. Pharm. Sci.* 1997;86(6):690-700.

117. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci* 2001;13(2):123-33.
118. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* 2010;67(3):217-23.
119. Yavuz B, Pehlivan SB, Vural I, Unlu N. In Vitro/In Vivo Evaluation of Dexamethasone--PAMAM Dendrimer Complexes for Retinal Drug Delivery. *J Pharm Sci* 2015;104(11):3814-23.
120. Zhang D, Zhang JQ, Jiang KM, Li K, Cong YW, Pu SP *et al.* Preparation, characterisation and antitumour activity of beta-, gamma- and HP-beta-cyclodextrin inclusion complexes of oxaliplatin. *Spectrochim Acta A* 2016;152:501-8.
121. Ullah K, Ali Khan S, Murtaza G, Sohail M, Azizullah, Manan A *et al.* Gelatin-based hydrogels as potential biomaterials for colonic delivery of oxaliplatin. *Int J Pharm* 2019;556:236-45.
122. Barkat K, Ahmad M, Minhas MU, Khalid I. Oxaliplatin-loaded crosslinked polymeric network of chondroitin sulfate-co-poly(methacrylic acid) for colorectal cancer: Its toxicological evaluation. *J. Appl. Polym. Sci* 2017;134:1-13.
123. Pereira ED, Cerruti R, Fernandes E, Peña L, Saez V, Pinto JC *et al.* Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. *Polímeros* 2016;26(2):137-43.
124. Khokhar AR, Al-Baker S, Siddik ZH. Synthesis and Antitumor Activity of 1,2-Diaminocyclohexane Platinum(IV) Complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 1994;54:39-47.
125. Liang C, Wang H, Zhang M, Cheng W, Li Z, Nie J *et al.* Self-controlled release of Oxaliplatin prodrug from d-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS) functionalized mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy. *J Colloid Interface Sci* 2018;525:1-10.
126. Xiao H, Li W, Qi R, Yan L, Wang R, Liu S *et al.* Co-delivery of daunomycin and oxaliplatin by biodegradable polymers for safer and more efficacious combination therapy. *J Control Release* 2012;163(3):304-14.
127. Li B, Meng Z, Li QQ, Huang XY, Kang ZY, Dong HJ *et al.* A pH responsive complexation-based drug delivery system for oxaliplatin. *Chem Sci* 2017;8(6):4458-64.

128. Barnard CF, Vollano JF, Chaloner PA, Dewa SZ. Studies on the Oral Anticancer Drug JM-216: Synthesis and Characterization of Isomers and Related Complexes. *Inorg Chem* 1996;35(11):3280-4.
129. Vu MT, Bach LG, Nguyen DC, Ho MN, Nguyen NH, Tran NQ *et al.* Modified Carboxyl-Terminated PAMAM Dendrimers as Great Cytocompatible Nano-Based Drug Delivery System. *Int J Mol Sci* 2019;20(8).
130. Nguyen DTD, Bach LG, Nguyen TH, Ho MH, Ho MN, Nguyen DH *et al.* Preparation and characterization of oxaliplatin drug delivery vehicle based on PEGylated half-generation PAMAM dendrimer. *Journal of Polymer Research* 2019;26:116-30.
131. Wu SY, Chou HY, Yuh CH, Mekuria SL, Kao YC, Tsai HC. Radiation-Sensitive Dendrimer-Based Drug Delivery System. *Adv Sci* 2018;5(2).
132. Uppuluri S, Dvornic PR, Klimash JW, Carver PI, Tan NCB. The Properties of Dendritic Polymers I: Generation 5 Poly(amidoamine) Dendrimers. Army Research Laboratory 1998.
133. Azaroual M, Romand B, Freyssinet P, Disnar JR. Solubility of platinum in aqueous solutions at 25°C and pHs 4 to 10 under oxidizing conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 2001;65(24):4453-66.
134. Alberto ME, Lucas MF, Pavelka M, Russo N. The degradation pathways in chloride medium of the third generation anticancer drug oxaliplatin. *J Phys Chem B* 2008;112(35):10765-8.
135. Huang X, Wu ZH, Gao W, Chen Q, Yu B. Polyamidoamine dendrimers as potential drug carriers for enhanced aqueous solubility and oral bioavailability of silybin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2011;37(4):419-27.
136. Filipowicz A, Wolowiec S. Solubility and in vitro transdermal diffusion of riboflavin assisted by PAMAM dendrimers. *Int. J. Pharm.* 2011;408(1-2):152-6.
137. Erturk AS, Gurbuz MU, Tulu M. The effect of PAMAM dendrimer concentration, generation size and surface functional group on the aqueous solubility of candesartan cilexetil. *Pharm. Dev. Technol.* 2017;22(1):111-21.
138. Kulhari H, Pooja D, Prajapati SK, Chauhan AS. Performance evaluation of PAMAM dendrimer based simvastatin formulations. *Int. J. Pharm.* 2011;405(1-2):203-9.

139. Chauhan AS, Jain NK, Diwan PV, Khopade AJ. Solubility enhancement of indomethacin with poly(amidoamine) dendrimers and targeting to inflammatory regions of arthritic rats. *J Drug Target* 2004;12(9-10):575-83.
140. Kaminskis LM, McLeod VM, Porter CJ, Boyd BJ. Association of chemotherapeutic drugs with dendrimer nanocarriers: an assessment of the merits of covalent conjugation compared to noncovalent encapsulation. *Mol Pharm* 2012;9(3):355-73.
141. Gu L, Wu ZH, Qi XL, He H, Ma XL, Chou XH *et al.* Polyamidomine dendrimers: an excellent drug carrier for improving the solubility and bioavailability of puerarin. *Pharm. Dev. Technol.* 2013;18(5):1051-7.
142. Buczkowski A, Sekowski S, Grala A, Palecz D, Milowska K, Urbaniak P *et al.* Interaction between PAMAM-NH₂ G₄ dendrimer and 5-fluorouracil in aqueous solution. *Int. J. Pharm.* 2011;408(1-2):266-70.
143. Jain NK, Gupta U. Application of dendrimer-drug complexation in the enhancement of drug solubility and bioavailability. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008;4(8):1035-52.
144. Hu J, Xu T, Cheng Y. NMR Insights into Dendrimer-Based Host-Guest Systems. *Chem. Rev.* 2012;112:3856-91.
145. Kolhatkar RB, Swaan P, Ghandehari H. Potential oral delivery of 7-Ethyl-10-hydroxy-camptothecin (SN-38) using poly(amidoamine) dendrimers. *Pharm. Res.* 2008;25(7):1723-9.
146. Yao WJ, Sun KX, Mu HJ, Liang N, Liu Y, Yao C *et al.* Preparation and characterization of puerarin-dendrimer complexes as an ocular drug delivery system. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2010;36(9):1027-35.
147. Kong XQ, Yu K, Yu M, Feng YP, Wang J, Li MJ *et al.* A novel multifunctional poly(amidoamine) dendrimeric delivery system with superior encapsulation capacity for targeted delivery of the chemotherapy drug 10-hydroxycamptothecin. *Int. J. Pharm.* 2014;465(1-2):378-87.
148. Patel PM, Patel R, Wadia D, Patel RM. Dendritic macromolecules as nano-scale drug carriers: Phase solubility, in vitro drug release, hemolysis and cytotoxicity study. *Asian J. Pharm. Sci.* 2015;10(4):306-13.
149. Singh MK, Pooja D, Kulhari H, Jain SK, Sistla R, Chauhan AS. Poly (amidoamine) dendrimer-mediated hybrid formulation for combination therapy of ramipril and hydrochlorothiazide. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2017;96:84-92.

150. Erturk AS, Gurbuz MU, Tulu M. New-generation Jeffamine (R) D230 core amine, TRIS and carboxyl-terminated PAMAM dendrimers: Synthesis, characterization and the solubility application for a model NSAID drug Ibuprofen. *Marmara Pharm J* 2017;21(2):385-99.
151. Li H, Gao X, Liu R, Wang Y, Zhang M, Fu Z *et al.* Glucose conjugated platinum(II) complex: antitumor superiority to oxaliplatin, combination effect and mechanism of action. *Eur J Med Chem* 2015;101:400-8.
152. Wu M, Li H, Liu R, Gao X, Zhang M, Liu P *et al.* Galactose conjugated platinum(II) complex targeting the Warburg effect for treatment of non-small cell lung cancer and colon cancer. *Eur J Med Chem* 2016;110:32-42.
153. Ali Khan SR, Huang S, Shamsuddin S, Inutsuka S, Whitmire KH, Siddik ZH *et al.* Synthesis, characterization and cytotoxicity of new platinum(IV) axial carboxylate complexes: crystal structure of potential antitumor agent [PtIV(trans-1R,2R-diaminocyclohexane)trans(acetate)2Cl2]. *Bioorg Med Chem* 2000;8(3):515-21.
154. Harper BW, Krause-Heuer AM, Grant MP, Manohar M, Garbutcheon-Singh KB, Aldrich-Wright JR. Advances in platinum chemotherapeutics. *Chemistry* 2010;16(24):7064-77.
155. Graf N, Lippard SJ. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;64(11):993-1004.
156. Ma J, Yang X, Hao W, Huang Z, Wang X, Wang PG. Mono-functionalized glycosylated platinum(IV) complexes possessed both pH and redox dual-responsive properties: Exhibited enhanced safety and preferentially accumulated in cancer cells in vitro and in vivo. *Eur J Med Chem* 2017;128:45-55.
157. Chen CK, Zhang JZ, Aitken JB, Hambley TW. Influence of equatorial and axial carboxylate ligands on the kinetic inertness of platinum(IV) complexes in the presence of ascorbate and cysteine and within DLD-1 cancer cells. *J Med Chem* 2013;56(21):8757-64.
158. Chen CKJ, Kappen P, Hambley TW. The reduction of cis-platinum(IV) complexes by ascorbate and in whole human blood models using (1)H NMR and XANES spectroscopy. *Metallomics* 2019;11(3):686-95.
159. Yang H, Lopina ST. Extended release of a novel antidepressant, venlafaxine, based on anionic polyamidoamine dendrimers and poly(ethylene glycol)-containing semi-interpenetrating networks. *J Biomed Mater Res A* 2005;72(1):107-14.

160. Yavuz B. In Vitro/In Vivo Evaluation of Dendrimeric Systems for Retinal Drug Delivery (Dissertation). Ankara: University of Hacettepe; 16.10.2014.
161. Nosova YN, Foteeva LS, Zenin IV, Fetisov TI, Kirsanov KI, Yakubovskaya MG *et al.* Enhancing the Cytotoxic Activity of Anticancer PtIV Complexes by Introduction of Lonidamine as an Axial Ligand. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017:1785-91.
162. Höfer D, Galanski M, Keppler BK. Synthesis, Characterization, and Time-Dependent NMR Spectroscopy Studies of (SP-4-2)-[(trans-1R,2R/1S,2S-15N2)-Cyclohexane-1,2-diamine][(13C2)oxalato]platinum(II). *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017:2347-54.
163. Gökçe BB. Dendritik Nanotaşıyıcı Sistemlerin Dermal Hedeflendirme Açısından Değerlendirilmesi (Dissertation). İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 27.12.2018.
164. Ciolkowski M, Rozanek M, Szewczyk M, Klajnert B, Bryszewska M. The influence of PAMAM-OH dendrimers on the activity of human erythrocytes ATPases. *Biochim Biophys Acta* 2011;1808(11):2714-23.
165. Kang SJ, Durairaj C, Kompella UB, O'Brien JM, Grossniklaus HE. Subconjunctival nanoparticle carboplatin in the treatment of murine retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2009;127(8):1043-7.
166. Tokarczyk K, Jachimska B. Characterization of G4 PAMAM dendrimer complexes with 5-fluorouracil and their interactions with bovine serum albumin. *Colloid Surface A* 2019;561:357-63.
167. Kirkpatrick GJ, Plumb JA, Sutcliffe OB, Flint DJ, Wheate NJ. Evaluation of anionic half generation 3.5-6.5 poly(amidoamine) dendrimers as delivery vehicles for the active component of the anticancer drug cisplatin. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2011;105(9):1115-22.
168. Shao NM, Su YZ, Hu JJ, Zhang JH, Zhang HF, Cheng YY. Comparison of generation 3 polyamidoamine dendrimer and generation 4 polypropylenimine dendrimer on drug loading, complex structure, release behavior, and cytotoxicity. *Int. J. Nanomed.* 2011;6:3361-72.
169. Tawfik MA, Tadros MI, Mohamed MI. Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers as potential release modulators and oral bioavailability enhancers of vardenafil hydrochloride. *Pharm Dev Technol* 2019;24(3):293-302.

170. Nguyen H, Nguyen NH, Tran NQ, Nguyen CK. Improved Method for Preparing Cisplatin-Dendrimer Nanocomplex and Its Behavior Against NCI-H460 Lung Cancer Cell. *J Nanosci Nanotechnol* 2015;15(6):4106-10.
171. Nguyen TBT, Nguyen TTC, Tran HC, Nguyen CK, Tran NQ. ¹H NMR Spectroscopy as an Effective Method for Predicting Molecular Weight of Polyaminoamine Dendrimers and Their Derivatives. 2015;20(1):57-68.
172. Gupta L, Sharma AK, Gothwal A, Khan MS, Khinchi MP, Qayum A *et al.* Dendrimer encapsulated and conjugated delivery of berberine: A novel approach mitigating toxicity and improving in vivo pharmacokinetics. *Int. J. Pharm.* 2017;528(1-2):88-99.
173. Howell BA, Polymer/Dendrimer Supported Organoplatinum Drug, in *In Polymeric Delivery of Therapeutics*, Morgan S, Editor Washington DC: 2010. p.161-79.
174. Howell BA, Fan D, Rakesh L. Thermal decomposition of a generation 4.5 PAMAM dendrimer platinum drug conjugate. *J Therm Anal Calorim* 2006;85(1):17-20.
175. Lagarce F, Cruaud O, Deuschel C, Bayssas M, Griffon-Etienne G, Benoit J. Oxaliplatin loaded PLAGA microspheres: design of specific release profiles. *Int J Pharm* 2002;242(1-2):243-6.
176. Diaz DA, Colgan ST, Langer CS, Bandi NT, Likar MD, Van Alstine L. Dissolution Similarity Requirements: How Similar or Dissimilar Are the Global Regulatory Expectations? *AAPS J* 2016;18(1):15-22.
177. Pisani MJ, Wheate NJ, Keene FR, Aldrich-Wright JR, Collins JG. Anionic PAMAM dendrimers as drug delivery vehicles for transition metal-based anticancer drugs. *J Inorg Biochem* 2009;103(3):373-80.
178. Kurtoglu YE, Mishra MK, Kannan S, Kannan RM. Drug release characteristics of PAMAM dendrimer-drug conjugates with different linkers. *Int J Pharm* 2010;384(1-2):189-94.
179. Li MH, Choi SK, Thomas TP, Desai A, Lee KH, Kotlyar A *et al.* Dendrimer-based multivalent methotrexates as dual acting nanoconjugates for cancer cell targeting. *Eur J Med Chem* 2012;47(1):560-72.
180. Xu JM, Azzariti A, Severino M, Lu B, Colucci G, Paradiso A. Characterization of sequence-dependent synergy between ZD1839 ("Iressa") and oxaliplatin. *Biochem Pharmacol* 2003;66(4):551-63.

181. Xu JM, Azzariti A, Colucci G, Paradiso A. The effect of gefitinib (Iressa, ZD1839) in combination with oxaliplatin is schedule-dependent in colon cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003;52(6):442-8.
182. Hector S, Bolanowska-Higdon W, Zdanowicz J, Hitt S, Pendyala L. In vitro studies on the mechanisms of oxaliplatin resistance. *Cancer Chemoth Pharm* 2001;48(5):398-406.
183. Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, Meuth M. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(14):6319-23.
184. Nautiyal J, Kanwar SS, Yu Y, Majumdar AP. Combination of dasatinib and curcumin eliminates chemo-resistant colon cancer cells. *J Mol Signal* 2011;6:7.
185. Yamaguchi T, Kakefuda R, Tajima N, Sowa Y, Sakai T. Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2011;39(1):23-31.
186. Muller PA, Trinidad AG, Timpson P, Morton JP, Zanivan S, van den Berghe PV *et al.* Mutant p53 enhances MET trafficking and signalling to drive cell scattering and invasion. *Oncogene* 2013;32(10):1252-65.
187. Kosakowska-Cholody T, Cholody W, Hariprakash H, Meyer C, Michejda C. Gene expression profiles in HCT116 and HT29 cells exposed to RTA 502 lead to insights into the mechanism of action. *American Association for Cancer Research* 2007;67(9).
188. Wu L, Man C, Wang H, Lu X, Ma Q, Cai Y *et al.* PEGylated multi-walled carbon nanotubes for encapsulation and sustained release of oxaliplatin. *Pharm Res* 2013;30(2):412-23.
189. Henke H, Kryeziu K, Banfic J, Theiner S, Korner W, Bruggemann O *et al.* Macromolecular Pt(IV) Prodrugs from Poly(organo)phosphazenes. *Macromol Biosci* 2016;16(8):1239-49.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Klasik platin kompleksleri	4
Şekil 2. Zincir içi ve zincirler arası oluşan çapraz bağlantılar	5
Şekil 3. Okzaliplatinin aktif platin bileşiklerine dönüşüm süreci.....	6
Şekil 4. Okzaliplatinin hücre sel etkileşimleri ve olası direnç mekanizmaları	8
Şekil 5. Okzaliplatinin aktif ve inaktif metabolitleri.....	9
Şekil 6. FOLFOX4 kemoterapi rejimi	10
Şekil 7. Kolorektal kanserin oluşum evreleri	14
Şekil 8. Anormal DNA metilasyon tipleri	16
Şekil 9. Metillenmiş ve asetillenmiş histon yapısı.....	17
Şekil 10. Hücre sinyalizasyonunda <i>KRAS</i> ve <i>BRAF</i> yolakları.....	17
Şekil 11. Kolon kanserinde MMP'lerin rolü	18
Şekil 12. Kolon kanserinde kullanılan monoklonal antikorlar	21
Şekil 13. Kolorektal kanser tipine bağlı olarak tedavi yaklaşımları.....	21
Şekil 14. Ülkemizde medikal onkologlarca tercih edilen ilk sıra tedaviler.....	22

Şekil 15. Çeşitli tipte polimerik yapılar	23
Şekil 16. Dendrimerin temel yapıları	24
Şekil 17. Farklı çözünürlükteki ortamlarda dendrimerin konformasyonu	25
Şekil 18. Farklı yapılarla sahip dendrimerler	25
Şekil 19. G4-G7 arası dendrimerlerin molekül yapıları ve boyutları	26
Şekil 20. Dendrimer sentez metotlarından yakınsak ve ıraksak metot.....	27
Şekil 21. Dendrimer ve ilaçlar arasında kurulan çeşitli bağlar ve etkileşimler	28
Şekil 22. Katyonik dendrimerlerin hücre membranları üzerindeki toksisitesi.....	30
Şekil 23. Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) formülleri	38
Şekil 24. Steglich esterifikasyon reaksiyonu	41
Şekil 25. FK-3.5 ve FK-4.5 formülasyonlarının hazırlanışı	44
Şekil 26. Okzaliplatinin modifikasyon reaksiyonu.....	45
Şekil 27. Modifiye okzaliplatinin dendrimer ile konjugasyon reaksiyonu	46
Şekil 28. % yükleme oranı ve % yükleme etkinliği formülleri	48
Şekil 29. Fark (f_1) ve benzerlik (f_2) faktörlerinin formülleri	49
Şekil 30. Okzaliplatin, G3.5, G4.5 dendrimer ve boş çözelti kromatogramları	52
Şekil 31. Okzaliplatin, G3.5 ve G4.5 dendrimer spektrumları (100 μ g/mL)	53
Şekil 32. HPLC ve spektrofotometre standart eğrileri	54
Şekil 33. Regresyon doğrularına ait bilgiler	54
Şekil 34. Okzaliplatinin çeşitli çözücü ve tamponlardaki çözünürlükleri	59
Şekil 35. Dendrimer konsantrasyonunun çözünürlüğe olan etkisi.....	60
Şekil 36. PAMAM G3.5 konsantrasyonunun çözünürlüğe olan etkisi.....	61
Şekil 37. PAMAM G4.5 konsantrasyonunun çözünürlüğe olan etkisi.....	61
Şekil 38. FK-3.5 formülasyonu UV spektrumu	62

Şekil 39. Okzaliplatin, PAMAM G3.5 ve FK-3.5 FT-IR spektrumları	63
Şekil 40. FK-4.5 formülasyonu UV spektrumu	64
Şekil 41. Okzaliplatin, PAMAM G4.5 ve FK-4.5 FT-IR spektrumları	64
Şekil 42. Okzaliplatin ve modifiye okzaliplatin FT-IR spektrumları	65
Şekil 43. Modifiye okzaliplatin ¹ H-NMR spektrumu	66
Şekil 44. Modifiye okzaliplatin ¹³ C-NMR spektrumu.....	66
Şekil 45. Modifiye okzaliplatin, PAMAM G3.5 ve KK-3.5 FT-IR spektrumları.....	67
Şekil 46. KK-3.5 ve modifiye okzaliplatin ¹ H-NMR spektrumları	68
Şekil 47. Modifiye okzaliplatin, PAMAM G4.5 ve KK-4.5 FT-IR spektrumları.....	69
Şekil 48. KK-4.5 ve modifiye okzaliplatin ¹ H-NMR spektrumları	70
Şekil 49. 1 mol dendrimer ile kompleksleşen okzaliplatin miktarı.....	73
Şekil 50. F6 formülasyonu <i>in vitro</i> salım verileri.....	74
Şekil 51. F21 formülasyonu <i>in vitro</i> salım verileri.....	74
Şekil 52. Kimyasal konjugat formülasyonlarının <i>in vitro</i> salım verileri.....	75
Şekil 53. HT-29 hücre hattında konsantrasyonlara göre % canlılık verileri	79
Şekil 54. Okzaliplatin ve KK-3.5 konjugatı log (IC ₅₀) değerleri	79

TABLULAR

Tablo 1. Okzaliplatin direncine neden olan çeşitli mekanizmalar	7
Tablo 2. Okzaliplatinin kritik farmakokinetik parametreleri	10
Tablo 3. Okzaliplatinin Türkiye piyasasındaki müstahzarları.....	12
Tablo 4. Kalın barsakta neoplazm oluşumunu engelleyebilen ilaçlar	19
Tablo 5. Kolorektal kanserlerde kullanılan etkin maddeler	20
Tablo 6. Dendrimerlerin ve klasik düz zincirli polimerlerin özellikleri	23
Tablo 7. Çeşitli PAMAM dendrimerlerin molekül ağırlığı ve NH ₂ grubu sayısı	26
Tablo 8. Dendrimer içeren çeşitli ticari.....	32
Tablo 9. HPLC metodunun özellikleri.....	35
Tablo 10. Standart eğrinin hazırlanmasında kullanılan çözeltiler	37
Tablo 11. 100mL tampon çözelti hazırlanması için gereken maddeler	39
Tablo 12. Tezde hazırlanan formülasyon tiplerinin kodlanması	40
Tablo 13. Dendrimerlerin sahip oldukları olası ilaç etkileşim bölgesi sayıları.....	40
Tablo 14. FK-3.5 formülasyonları.....	42
Tablo 15. FK-4.5 formülasyonları.....	43
Tablo 16. Çeşitli kinetik tipleri ve matematiksel olarak ifadeler	50
Tablo 17. HPLC ve spektrofotometre doğrusallık verileri	53
Tablo 18. HPLC yöntemi 1. güne ait kesinlik verileri	55
Tablo 19. HPLC yöntemi 2. güne ait kesinlik verileri	55
Tablo 20. HPLC yöntemi 3. güne ait kesinlik verileri	56
Tablo 21. Spektrofotometrik yöntem 1. güne ait kesinlik verileri	56
Tablo 22. Spektrofotometrik yöntem 2. güne ait kesinlik verileri	56
Tablo 23. Spektrofotometrik yöntem 3. güne ait kesinlik verileri	57

Tablo 24. HPLC yöntemi doğruluk verileri.....	57
Tablo 25. Spektrofotometrik yöntem doğruluk verileri	58
Tablo 26. HPLC için stabilite verileri	58
Tablo 27. Spektrofotometre için stabilite verileri	58
Tablo 28. HPLC metodu için sistem uyumluluk testi verileri.....	59
Tablo 29. Dendrimer konsantrasyonunun çözünürlüğe olan etkisi.....	60
Tablo 30. Dendrimerlerin ortalama boyut ve polidispersite indeksi verileri	71
Tablo 31. Dendrimerlerin zeta (ζ) potansiyel verileri	71
Tablo 32. Dendrimer formülasyonlarına yüklenme özellikleri.....	72
Tablo 33. F6 ve F21 salım profillerinin f_1 değeri ile kıyaslanması	75
Tablo 34. F6 ve F21 salım profillerinin f_2 değeri ile kıyaslanması	76
Tablo 35. Kimyasal konjugatların salım profillerinin f_1 değeri ile kıyaslanması	76
Tablo 36. Kimyasal konjugatların salım profillerinin f_2 değeri ile kıyaslanması	76
Tablo 37. F6 ve F21 formülasyonlarına çeşitli kinetik modellerin uygulanması.....	77
Tablo 38. Kimyasal konjugatlara çeşitli kinetik modellerin uygulanması	78
Tablo 39. Hücre kültürü çalışması verileri	79

ÖZGEÇMİŞ

GENEL BİLGİLER

İsim : Hakan
Soyisim : NAZLI
Doğum Yeri ve Yılı : Gaziantep / 02.07.1988

Adres : Ecz. Hakan NAZLI
Araştırma Görevlisi
Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji AD
Edirne / Türkiye 22030

Telefon : +90 284 235 01 80 – 1242
Faks : +90 284 235 01 40
E-posta : hakannazli@trakya.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans : 2007 – 2012
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (3,30 / 4,00)

Yüksek Lisans : 2014 – 2019
Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Nanoteknoloji AD (94,22 / 100)

Doktora : 2015 –
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Teknoloji AD

MESLEKİ TECRÜBE

Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi 2013 – 2015
Eczacı

Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji AD 2015 – 2016
Araştırma Görevlisi

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji AD 2016 – 2017
Araştırma Görevlisi

Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji AD 2017 –
Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce : İyi
Almanca : Giriş

İLGİ ALANLARI

Mikro ve Nano Boyutlu Formülasyonlar
Dendrimerik İlaç Taşıyıcı Sistemler
Kendiliğinden Emülsifiye Olan Sistemler (SEDDS)

BİLİMSEL AKTİVİTE

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

H.NAZLI, B.MESUT, Ş.H.TEKARSLAN ŞAHİN, Y.ÖZSOY "Self Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Formulation Design of Aprepitant" Poster No:12 19th International Pharmaceutical Technology Symposium 17-19 September Antalya / Türkiye (Eylül 2018)

Uluslararası Konferans ve Sempozyumlar

- 19th International Pharmaceutical Technology Symposium 17-19 September Antalya / Türkiye (Eylül 2018)

- 4th Pulmonary Drug Delivery Workshop 2017 19-21 September Istanbul / Turkey (Eylül 2017)

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- F.C.KORUCU, H.NAZLI, G.GEDİK, İ.ÇİÇİN "Biyobenzer Ürünlerde Klinik Uygulamada Karşılaşılabilecek Sorunlar" Marmara Pharmaceutical Journal 20: 44-51, 2016 (Ocak 2016)

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

- G.GEDİK, Ö.SARP, H.NAZLI, Ç.OLTULU, Ö.GÜNDÜZ "Farelerde okzaliptin ile nöropatik ağrı modeli oluşturmada yeni yaklaşımlar" Poster No:31 1. Ulusal Marmara Eczacılık Kongresi 3-5 Kasım İstanbul / Türkiye (Kasım 2016)
- G.GEDİK, H.NAZLI "Dendrimerik okzaliptin" Poster No:26 1. Ulusal Marmara Eczacılık Kongresi 3-5 Kasım İstanbul / Türkiye (Kasım 2016)
- F.C.KORUCU, H.NAZLI, Y.BAYEZIT, İ.ÇİÇİN "Kemoterapiye bağlı hataların önlenmesi için yapılan eczacılık uygulamaları" Poster No:108 5. Türk Tıbbi Onkoloji Kongresi 19-23 Mart Antalya / Türkiye (Mart 2014)

Ulusal Konferans ve Sempozyumlar

- 1. Ulusal Marmara Eczacılık Kongresi 3-5 Kasım İstanbul / Türkiye (Kasım 2016)
- İyi Klinik Uygulamalar Eğitim Toplantısı (Eylül 2015)
- İleri Teknoloji Ürünleri ve Geri Ödeme (TUFTAD) (Mayıs 2015)

Sertifikalar

- Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası (Aralık 2013)