

**DOSETAKSEL İÇEREN NANOPARTİKÜLLERİN FORMÜLASYONU
VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**FORMULATION AND IN VITRO EVALUTION OF NANOPARTICLES
CONTAINING DOCETAXEL**

DİLA DEMİR

Prof. Dr. YILMAZ ÇAPAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

Dila Demir'in hazırladığı "Dosetaksel İçeren Nanopartiküllerin Formülasyonu ve *In Vitro* Değerlendirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

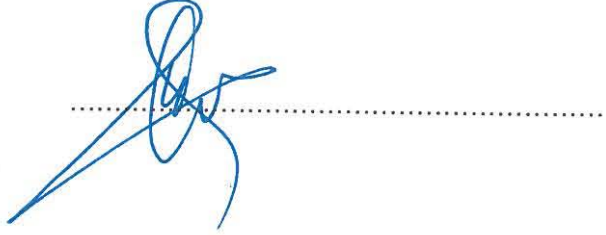
Başkan

(Prof. Dr. İmran Vural)



Danışman

(Prof. Dr. Yılmaz Çapan)



Üye

(Doç. Dr. R. Neslihan Gürsoy)




Üye

(Doç. Dr. Hakan Eroğlu)



Üye

(Doç. Dr. Zeynep Şafak Teksin)



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

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

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

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

beyan ederim.

31/10/2013

DİLA DEMİR

ÖZET

DOSETAKSEL İÇEREN NANOPARTİKÜLLERİN FORMÜLASYONU VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Dila DEMİR

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yılmaz Çapan

Ekim, 2013, 94 sayfa

Nanoteknoloji, maddeyi atomik ve moleküler seviyede kontrol etme bilimidir. Günümüzde farklı birçok uygulama alanı bulunan nanoteknoloji, nanotıp alanında yapılan pek çok çalışma ile kanser tedavisinde umut vaad etmektedir.

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir biçimde bölünmesi ile başlayan ölüm nedenlerinin baş sıralarında yer alan karmaşık ve önemli bir hastalıktır. Mevcut durumda uygulanan kanser tedavileri cerrahi yöntem, radyasyon tedavisi ve kemoterapi ile sınırlıdır. Kullanılan bu üç yöntem, normal dokulara zarar verme veya tamamlanmayan eradikasyon ile sonuçlanabilir.

Farmasötiklerin nanopartiküller içerisine enkapsülasyonu; kontrollü salım sağlanması, ilaç toksisitesini azaltması ve istenilen bölgeye hedeflendirilebilme özellikleri sayesinde kanser tedavisinde yaşanan problemlere çözüm sunmaktadır. Dosetaksel taksoid familyasına ait bir antikanser ajandır. Bu çalışmada, dosetakselin toksik etkilerini azaltan, kontrollü salım sağlayan nanopartiküller geliştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda polimer olarak poli(laktik-ko-glikolik-asit) (PLGA) ve sürfaktan olarak polivinil alkol (PVA) kullanılmıştır. PLGA'nın resomerleri farklı konsantrasyonlarda kullanılarak ve farklı çözücüler içerisinde çözülerek *in vitro* karakterizasyon çalışmaları ile (partikül boyutu, zeta potansiyeli,

yükleme etkinliği, salım çalışmaları) nanopartikül özelliklerine etkileri incelenmiştir. Hazırlanan dosetaksel yüklü nanopartiküller içerisinden en uygun formülasyon seçilerek MCF-7 hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin değerlendirilmesi amacıyla hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan dosetaksel yüklü nanopartiküllerin partikül büyüklüklerinin homojen olarak dağıldığı gözlenmiştir.

Dosetakselin hazırlanan formülasyonlarda yüksek yükleme değerlerine sahip olduğu gözlenmiş ve salım profillerinde başlangıçtaki patlama etkisini takiben kontrollü salımı gerçekleşmiştir. Sitotoksite çalışmalarında dosetaksel yüklü formülasyon boş formülasyona göre daha yüksek sitotoksik etkiye yol açmıştır. Bu alışmalar, dosetaksel yüklü nanopartiküllerin kanser tedavisinde yeni bir yol olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: PLGA, Dosetaksel, Kanser Tedavisi, Nanopartikül.

ABSTRACT

FORMULATION AND IN VITRO EVALUATION OF NANOPARTICLES CONTAINING DOCETAXEL

Dila DEMİR

**Master degree, Department of
Nanotechnology and Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. Yılmaz Çapan

October, 2013, 94 pages

Nanotechnology is the science of controlling materials in the atomic and molecular level. Today, along with its various applications in different fields, nanotechnology stands out to be quite promising in the cancer treatment since there have been many studies done in the field of nanomedicine.

Defined as one of the top causes of death, cancer is a complex and important disease which starts with uncontrolled cell division. Currently applied cancer treatments are limited to surgery, radiation therapy, and chemotherapy. These three methods may result in damaging the normal tissues or incomplete eradication.

Due to the ability of a controlled release, pharmaceutical encapsulation into the nanoparticles reduces drug toxicity and can be targeted into the intended area; thus, it provides a solution to the problems encountered. Docetaxel is an anticancer agent that belongs to the taxoid family. In this study, nanoparticles have been developed that provide controlled release with reduced toxic effects of docetaxel.

With this purpose in mind, poly(lactic-co-glycolic-acid) (PLGA) as a polymer, and polyvinyl alcohol (PVA) as a surfactant were used. Resomers of PLGA were used

with different concentrations and were dissolved in different solvents. After *in vitro* characterization studies (particle size, zeta potential, encapsulation efficiency, release studies) effects of these variables on nanoparticle properties were examined. Selected optimum formulation through the prepared docetaxel loaded nanoparticles was used for cell culture studies in order to evaluate the cytotoxicity on MCF-7 cells. Prepared docetaxel loaded nanoparticles size were dispersed homogenously.

In the prepared formulations of docetaxel, high encapsulation efficiencies were observed and in the release profiles initial burst effect was followed by controlled release. Cytotoxicity studies showed that docetaxel loaded nanoparticle formulation has caused more cytotoxic effect in comparison with placebo nanoparticles. These studies have shown that the docetaxel loaded nanoparticles could be a new approach to the cancer therapy.

Keywords: PLGA, Docetaxel, Cancer Treatment, Nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca ilminden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Sn. Prof. Dr. Yılmaz Çapan' a,

Hücre kültür çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Sn. Prof. Dr. İmran Vural'a,

Çalışmalarım sırasında sağladığı bilimsel destek ve yardımları nedeniyle Sn. Doç. Dr. Hakan Eroğlu'na,

Araştırma süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Dr. Fırat Yerlikaya' ya,

Çalışmalarım esnasında destekleri ile bana yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Kim. Alkım Aydın, Uzm. Ecz. Seçil Toktaş ve Uzm. Ecz. Nazlı Erdoğan' a,

Çalışmam sırasında arkadaşlıklarıyla zor günlerimi kolaylaştıran Kim. İpar Coşkun, Ecz. Behiye Dinç, Uzm. Ecz. Kıvılcım Öztürk, Ecz. Yağmur Akdağ, Uzm. Ecz. Elif Sarıgöl' e,

Deneylerimi yapmama olanak sağladıkları için Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Teknolojisi Bölümü'nün hocalarına, yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, sekreterlerine, teknisyen ve hizmetlilerine,

Her zaman desteğini yanımda hissettiğim beni bugünlere getiren sevgili annem Meryem Güraslan'a ve tüm aileme,

Çalışmamın her aşamasında koşulsuz şartsız desteğini esirgemeyen eşim Ahmet Can Demir'e,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	x
ŞEKİLLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nanoteknoloji.....	3
2.1.1. Tanım	3
2.1.2. Tarihçe	5
2.1.3. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları	7
2.1.3.1. İlaç Taşınmasında Nanoteknoloji	9
2.2. Nanopartiküller	11
2.2.1. Polimerik Nanopartiküller.....	12
2.2.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri	12
2.2.2.1. Polimerlerin Dispersiyonu	13
2.2.2.1.1. Emülsifikasyon/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi	13
2.2.2.1.2. Spontan Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon Yöntemi	14
2.2.2.1.3. Tuzla Çöktürme/Emülsifikasyon Difüzyon Yöntemi	14
2.2.2.1.4. Süperkritik Sıvı Teknolojisi Kullanılarak Nanopartiküllerin Hazırlanması	15
2.2.2.2. Polimerizasyon Yöntemi	16
2.2.2.3. Hidrofilik Polimerler ile Nanopartiküllerin Hazırlanması	16
2.2.2.3.1. İyonotropik Jelasyon.....	17
2.3. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler.....	18

2.3.1. Polimerlerin Seçimi.....	18
2.3.1.1. Biyoparçalanabilir Olmayan Polimerler.....	19
2.3.1.2. Biyoparçalanabilir Polimerler	19
2.3.1.2.1. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA).....	23
2.3.1.2.2. Kitosan	27
2.4. Nanopartiküllerin Özelliklerinin İlaç Taşınmasına Etkisi	29
2.4.1. Partikül Büyüklüğü.....	29
2.4.2. Yüzey Özellikleri.....	31
2.4.3. İlaç Yükleme.....	32
2.4.4. İlaç Salımı.....	32
2.5. Kanser	34
2.5.1. Tümörün Yapısı.....	35
2.5.2. Kanser Tedavisi.....	38
2.5.3. Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji	39
2.6. Dosetaksel.....	40
2.6.1. Tarihsel Gelişimi ve Yapısı	40
2.6.2. Farmakokinetik Özellikleri.....	41
2.6.3. Etki Mekanizması	42
2.6.4. Klinik Kullanımı	43
3.GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Araç ve Gereçler	46
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
3.1.2. Kullanılan Aletler	47
3.2. YÖNTEM.....	48
3.2.1. Dosetakselin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini.....	48
3.2.1.1. Analitik Yöntem Validasyonu	48
3.2.1.1.1. Doğrusallık (<i>Linearity</i>).....	49
3.2.1.1.2. Doğruluk (<i>Accuracy</i>)	49

3.2.1.1.3. Kesinlik (<i>Precision</i>)	50
3.2.1.1.3.1. Tekrarlanabilirlik (<i>Repeatability</i>)	50
3.2.1.1.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik (<i>Reproducibility</i>)	50
3.2.1.1.4. Duyarlılık (<i>Sensitivity</i>)	51
3.2.1.1.4.1. Saptama Sınırı (<i>Limit of Detection</i>).....	51
3.2.1.1.4.2. Miktar Tayin Sınırı (<i>Limit of Quantification</i>).....	51
3.2.1.1.5. Özgünlük (<i>Specificity</i>).....	51
3.2.2. Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları.....	52
3.2.2.1. Boş PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması	52
3.2.2.2. Doseksel Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması	53
3.2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	55
3.2.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	55
3.2.3.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi.....	56
3.2.3.3. <i>In Vitro</i> Salım Deneyleri.....	57
3.2.4. Sitotoksikite Çalışmaları	57
4. BULGULAR	59
4.1. Dosekselin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini.....	59
4.1.1. Analitik Yöntem Validasyonu	60
4.1.1.1. Doğrusallık	60
4.1.1.2. Doğruluk	61
4.1.1.3. Kesinlik	62
4.1.1.3.1. Tekrarlanabilirlik	62
4.1.1.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik	62
4.1.1.4. Duyarlılık	63
4.1.1.5. Özgünlük	63
4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	64
4.2.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	64
4.2.1.1. Boş PLGA Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli.....	64

4.2.1.2. Doseksel Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli	65
4.2.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi Sonucunda Elde Edilen Bulgular	66
4.2.3. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları Yapılacak Formülasyonların Belirlenmesine İlişkin Bulgular	68
4.2.4. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmalarına İlişkin Bulgular	71
4.2.5. Sitotoksisite Çalışmalarına İlişkin Bulgular	71
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	73
5.1. Tartışma	73
5.1.1. Dosekselin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	73
5.1.2. Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları.....	74
5.1.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	77
5.1.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	77
5.1.3.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi.....	79
5.1.3.3. <i>In vitro</i> Salım Çalışmaları	79
5.1.4. Sitotoksisite Çalışmaları	80
5.2. SONUÇLAR	81
KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ	94

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 2.1. Nanoteknolojinin En Çok Kullanılan 10 Uygulaması.....	8
Çizelge 2.2. İlaç taşınmasında kullanılan polimerler.....	22
Çizelge 2.3. Dosetaksele ait farmakokinetik parametreler.....	42
Çizelge 3.1. Dosetaksel miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.....	48
Çizelge 4.1. Dosetakselin HPLC ile miktar tayininde elde edilen regresyon verileri (n=6).....	61
Çizelge 4.2. Dosetaksel'in gün içi ve günler arası doğruluğu	61
Çizelge 4.3. Dosetaksel için analitik yöntemin tekrarlanabilirlik sonuçları	62
Çizelge 4.4. Dosetakselin gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları (n=3)	63
Çizelge 4.5. Hazırlanan boş nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri (n=6).....	64
Çizelge 4.6. Aseton ile hazırlanan dosetaksel yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyelleri (n=3).....	65
Çizelge 4.7. Etil asetat ile hazırlanan dosetaksel yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyelleri (n=3).....	66
Çizelge 4.8. Aseton ile hazırlanan PLGA nanopartiküllerine ait yükleme etkinliği sonuçları.....	67
Çizelge 4.9. Etil asetat ile hazırlanan PLGA nanopartiküllerine ait yükleme etkinliği sonuçları.....	67
Çizelge 4.10. Tek yönlü varyans analizi ile salım ve hücre kültürü çalışmaları için seçilen formülasyonlar (*Salım çalışmaları için uygun bulunan formülasyonlar, **Salım ve hücre kültürü çalışmaları için uygun bulunan formülasyon)	70

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Nano ölçü birimini gösteren örnekler	4
Şekil 2.2. Nanopartiküller (A) lipozom, (B) misel, (C) fonksiyonelleştirilmiş (solda) ve ilaç enkapsüle edilmiş (sağda) dendrimerler, (D) nanoküre ve (E) nanokapsül	11
Şekil 2.3. Emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi	14
Şekil 2.4. PLGA yapısı (m ve n ile ifade edilen kısımlar laktik ve glikolik asit sayısını göstermektedir)	23
Şekil 2.5. Kimyasal yapıları (A) kitin, (B) kitosan	28
Şekil 2.6. Partiküler sistemlerden ilaç salım mekanizmaları	33
Şekil 2.7. Tümörün yapısı, aktif ve pasif hedefleme yöntemleri.....	37
Şekil 2.8. Paklitaksel (A) ve dosetakselin (B) yapısı. Farklılıklar mavi ve kırmızı ile işaretlenmiştir	40
Şekil 3.1. Boş PLGA nanopartiküllerin hazırlanması	53
Şekil 3.2. Dosetaksel yüklü nanopartiküllerin hazırlanması.....	55
Şekil 4.1. 10 µg/ml dosetaksel için HPLC kromatogramı. Enjeksiyon Hacmi: 20µl, Akış hızı: 1ml/dk, Kolon fırını sıcaklığı: 25±0,5°C, Mobil faz: Asetonitril : Ultra saf su (60:40), Kolon: Inertsil ODS-3, Partikül iriliği: 5µm Uzunluk: 250mm İç çap: 4.6mm, Dalga boyu 227 nm, Dedektör: UV dedektör	59
Şekil 4.2. Dosetakselin kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6).....	60
Şekil 4.3. Yükleme etkinliği ve <i>in vitro</i> salım çalışmalarında elde edilen boş PLGA nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları.....	64
Şekil 4.4. Enkapsülasyon etkinliği için ana etken grafikleri	68
Şekil 4.5. Zeta potansiyeli için ana etken grafikleri	69
Şekil 4.6. Polidispersite indeksi için ana etken grafikleri.....	69
Şekil 4.7. Partikül büyüklüğü için ana etken grafikleri.....	70
Şekil 4.8. 100 mg dosetaksel yüklü PLGA nanopartiküllerinin <i>in vitro</i> salım profilleri (n=3).....	71
Şekil 4.9. Kontrol gruplarına karşı dosetaksel çözeltisi, dosetaksel yüklü nanopartiküller ve plasebo nanopartiküllerin sitotoksikite çalışması sonuçları (n=12, hata çubukları standart sapmayı göstermektedir)	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

a/h	Ağırlık/hacim
AKM	Atomik kuvvet mikroskobu
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Etil selüloz
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
i.v.	İntravenöz
MPS	Mononükleer fagosit sistem
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
NCI	Ulusal Kanser Enstitüsü
NNI	Ulusal Nanoteknoloji Girişimi
PACA	Polisiyanoakrilat
PBCA	Polibütil siyanoakrilat
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCL	Poli(e-kaprolakton)
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol
PEO	Polietilen oksit
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PHB	Polihidroksibutirat
PMA	Polimetil akrilat
PNP	Polimerik nanopartiküller
PVA	Polivinil alkol
RES	Retiküloendotelyal sistem

SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SS	Standart sapma
S/Y	Yağ içinde su emülsiyonu
S/Y/S	Su içinde su/yağ emülsiyonu
TEM	Taramalı elektron mikroskobu
T _g (°C)	Camsı geçiş sıcaklığı
TİM	Tarayıcı iğne mikroskobu
TPF	Tripolifosfat
TTM	Taramalı tünelleme mikroskobu
VK	Varyasyon katsayısı
YE	Yükleme etkinliği
YK	Yükleme kapasitesi
Y/S	Su içinde yağ emülsiyonu

1. GİRİŞ

Kanser son yıllarda insidansı ve mortalitesi hızla artan bir hastalıktır. Yüzyılın başlarında ölüme neden olan hastalıklar sıralamasında yedi ve sekizinci sıralarda yer alırken bugün birçok ülkede kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırayı almıştır.

Kanser tedavisinde mortaliteyi azaltmak ve sağkalımı artırmak için farklı birçok tedavi yöntemleri kullanılır. Bunlar; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi-hormon tedavisi ve yeni tedavi yöntemlerinden immunoterapi, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi ve anjiyogenez inhibitörleri olarak sayılabilir.

Kanser tedavisi için son yıllarda çok sayıda ilaç ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiş olmasına karşın günümüzde ilerlemiş kanser vakalarında şifa sağlayıcı tedavi seçenekleri hemen hemen yok gibidir. Bu durum özellikle kanser gelişim sürecinin karmaşıklığı ve henüz aydınlatılması gereken çok sayıda noktaların olması ile kısmen açıklanabilir.

Uzun yıllardır yapılan çalışmalar sonucunda kanser biyolojisinin daha iyi anlaşılması önemli gelişmelere neden olmuş ve bu gelişmeler daha iyi teşhis ve tedavi yöntemleri olarak sonuç vermiştir. Tüm bu gelişmelere rağmen kansere bağlı mortalite oldukça yüksektir. Bunun en büyük sebebi uygulanan terapötik ajanların sağlıklı dokular üzerinde yan etkilerini göstermeden seçici olarak hedeflenen bölgeye ulaşmasının sağlanamamasıdır. Birçok kanser tipinin tedavisinde cerrahi rezeksiyon, radyasyon terapisi ve kemoterapi birlikte kullanılmaktadır. Bu tedaviler normal hücreler üzerindeki spesifik olmayan etkileri nedeni ile önemli oranda morbidite ve mortalite ile sonuçlanmaktadır. Bir terapötik formülasyonun etkinliğinin artışı; direkt olarak seçici olarak hastalıklı dokuları hedefleme, biyolojik bariyerleri geçme ve terapötik ajanı salım yetenekleri ile ilişkilendirilmektedir.

Nanoteknolojinin terapötik ajanlar ile birlikte kullanımı kanser tedavisinde karşılaşılan bu zorlukların aşılmasında büyük bir potansiyel olarak görülmektedir. Son yıllarda bu konuda terapötik ajanların taşınmasında en çok üzerinde çalışılan

yöntemlerden biri polimerik nanopartiküllerdir. Polimerik nanopartiküller tedavide ihtiyaç duyulan yüksek ilaç yükleme kapasitesi, kontrollü salım, hedeflendirilebilme özelliklerinin yanı sıra kolay hazırlanmaları nedeni ile ilaç taşıyıcı sistemler içerisinde önemli bir yere sahiptirler.

Dosetaksel klinik olarak iyi anlaşılmış anti-mitotik bir kemoterapi ajanıdır. Temel olarak meme, ovaryum ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında amaç, normal hücreler üzerinde toksik etkileri olan dosetaksel etkin maddesi içeren, biyoparçalanabilir, toksik olmayan PLGA polimeri kullanılarak sitotoksitesi azaltılmış, hedeflendirilebilir ve kontrollü salım sağlayan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirmektir. Çalışmada farklı PLGA rezomerleri farklı yüzdelerde kullanılarak, farklı çözücüler ile formülasyonlar hazırlanmıştır. Formülasyonlarda kullanılan farklı parametrelerin ilaç yüklü nanopartiküllerin boyut, zeta potansiyel ve salım profilleri üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknoloji

2.1.1. Tanım

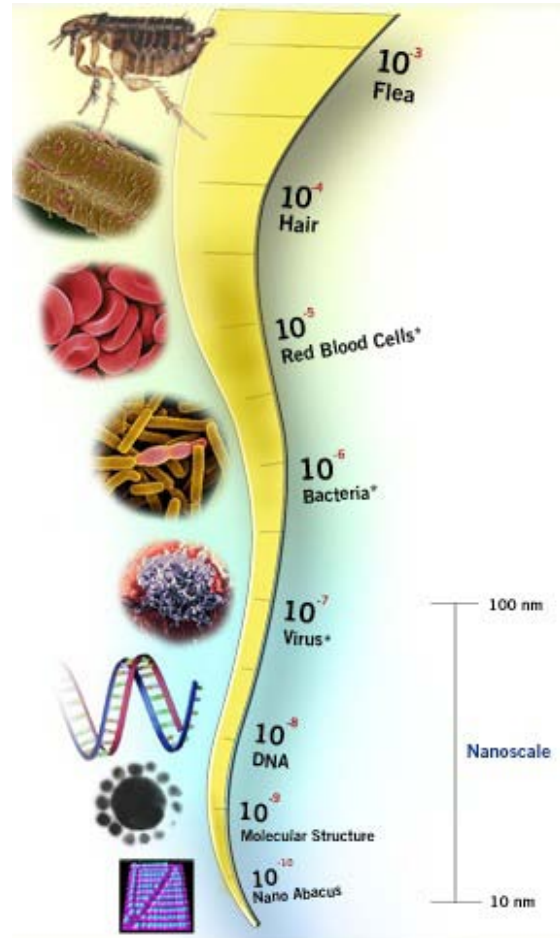
“Nano” terimi, bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri anlamına gelmektedir. Bir nanometre ise metrenin bir milyarda birine eşit bir uzunluk birimidir. “Nano” terimi, bir şeyin bir milyarda biri anlamına gelir. “Nanoteknoloji”, “nanobilim” gibi başında “nano” öneki bulunan terimler “nanometre” teriminden gelmektedir. Temel olarak nanometre diğer ölçü birimleri gibi bir ölçü birimidir [1].

“Nanobilim” nanometre ölçeğinde madde ve enerjiyi inceleyen bilimdir. Nanoteknolojinin önemi, bu ölçekte fizik kurallarının farklı işleyişi ve maddenin farklı özellikler taşımasından kaynaklanmaktadır. Nano-ölçek seviyesindeki malzemelerin özellikleri makroskobik ölçekten tamamen farklı olup, nano boyutlara yaklaştıkça birçok yeni özellik ortaya çıkmaktadır. Nanometre ölçütlerinde kütleli malzeme özelliklerinin yerini kuantum özellikleri alır. Yüzey davranışı kütleli malzeme davranışlarını baskılar [2]. Yüz nanometreden daha küçük boyutta olan malzemeler kütleli halde olan malzemelere göre toplam hacimlerine oranla çok büyük yüzeye sahiptirler. Örneğin, boyutu üç beş nanometreye kadar olan malzemelerde atomların üçte biri yüzey atomlarıdır. İnsan saçının bir telinin çapında olan bir elementte ise, elementin atomlarının yalnızca çok küçük bir miktarı yüzeyde bulunmaktadır. Bu fazladan açıkta olan yüzey elementlerin ve nanoparçacıkların birbirleriyle olan etkileşimlerini etkiler. Böylece, kompozit malzemelerde nanoparçacıkların kullanımı bunların sertliğini artırabilir ve/veya ağırlıklarını düşürebilir, kimyasal ve termal dayanıklılıklarını artırabilir ve ışıkla diğer ışınlarla olan etkileşimlerini değiştirebilir [3].

Nanoteknoloji tam olarak nanoboyutta uygulamaları olan tüm teknolojiler anlamına gelir. Nanoteknoloji, daha fazla işlevi olan, daha az ham madde ve daha az enerji tüketen, daha küçük, daha ucuz, daha hafif ve daha hızlı cihazların üretiminin önünü açmaktadır [3]. Yani nanoteknoloji, özel bir bilim ya da mühendislik alanından çok, birçok teknolojinin, işlemin ve tekniğin toplamıdır.

Nanoteknolojinin en fazla başvurulan ve nano-boyut paradigmasını da dâhil eden tanımı, ABD “Ulusal Nanoteknoloji Girişimi” (*National Nanotechnology Initiative - NNI*) tarafından sağlanmıştır. NNI, nanoteknolojiyi şöyle tanımlamaktadır:

Nanoteknoloji, yaklaşık 1 – 100 nanometre aralığında olan boyutlardaki maddenin incelenmesi ve işlenmesidir. Bu boyutlarda yapılan bu çalışmalarda gerçekleşen benzersiz fenomenler, yepyeni uygulamalara olanak sağlamaktadır. Nano-boyuttaki bilimi, mühendisliği ve teknolojiyi kapsayan nanoteknoloji, maddenin bu boyut ölçeğinde görüntüleme tekniğini, ölçümünü, modellemesini ve manipülasyonunu içermektedir. Nano-boyutta, malzemelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, tek tek atomların ve moleküllerin ya da kütleli haldeki malzemenin özelliklerinden temel olarak ve yararlı bir yönde farklı olmaktadır. Nanoteknoloji alanında AR-GE, bu yeni özelliklere sahip olan gelişmiş malzemeler, aygıtlar ve sistemlerin anlaşılması ve yaratılmasına yönelmiştir [4]. Nano ölçü birimini gösteren örnekler Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 1. Nano ölçü birimini gösteren örnekler [5]

Yaklaşık olarak 50 nanometrenin altındaki boyutlarda bir madde söz konusu olduğunda, “kuantum fiziği kanunları” geleneksel fizik kurallarının yerini alır. Bunlar bir maddenin iletkenliğinde, elastisitesinde, reaktifliğinde, sertliğinde, renginde ve sıcaklıkla basınca olan dayanıklılığında değişimlere neden olurlar [6]. Bu tür değişimler ise, nanoteknolojinin daha küçük, daha hızlı, daha ‘akıllı’, daha ucuz, daha güvenli, daha temiz ve daha kesin çözümlere olanak sağlayacağı tüm endüstriyel sektörler için yararlıdır [7].

Nanoteknoloji, tek tek atomların, moleküllerin ya da molekül kümelerinin kendiliğinden düzenlenmelerine etki ederek, yeni ya da oldukça farklı özellikteki malzemeler ve aygıtlar yaratmayı amaçlar. Nanoteknoloji ile farklı yollarla malzeme üretmek mümkündür. Bu yollar yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı yaklaşım olarak özetlenebilir. Yukarıdan aşağı yaklaşım ile en küçük yapıların dahi boyutunu nano-boyuta indirgemeyi sağlarken aşağıdan yukarıya doğru yaklaşım ise tek tek atomları ve molekülleri nano-yapılar oluşturacak şekilde manipüle etmeyi içerir [7].

2.1.2. Tarihçe

Bilimsel topluluk genellikle, nano-ölçeğin öneminin ilk kabul edilmesini, Nobel ödüllü fizikçi Richard Feynman’ın 29 Aralık 1959’da, Amerikan Fizik Topluluğu’nun Kaliforniya Teknoloji Enstitüsü’nde (Caltech) gerçekleştirilen yıllık toplantısında verdiği konuşmaya dayandırır. “Temelde yeterince boş yer var” başlıklı tarihsel konuşmasında Feynman, ilk kez malzemelerin ve aygıtların nanometre aralığındaki özelliklerinin gelecekte fırsatlara olanak tanıyacağını ve başka birçok şeyle birlikte, örneğin Brittanica Ansiklopedisi’nin 24 cildinin tamamını bir kalem ucuna yazıp sığdırılabileceğini ileri sürmüştür. Feynman, ayrıca, atomları ve molekülleri manipüle etme yeteneğini elde etmek için tekrarlamalı minyatürcülükten geçmeyi önerdi. Bu, onda-bir ölçekte olan bir makine araçları setini geliştirerek, daha sonra bunları, yüzde-bir ölçekte olan sonraki kuşak makine gereçlerini geliştirmek ve çalıştırmak için kullanarak, bu şekilde devam ederek de nihayet atomların ve moleküllerin dahi işlenebileceği bir safhaya gelene kadar devam ederek gerçekleşecekti. Özetle, bu tarihi konuşmasında Feynman, “Vurgulamak istediğim şey, bir şeyleri küçük ölçekte manipüle etmek ve kontrol etmektir” demiştir [8].

Dr. Richard Feynman, geleceğin bilim insanlarının ve mühendislerin atom ve moleküllerden karmaşık yapılar inşa edebileceklerini tahmin etmiştir. Ancak, “nanoteknoloji” terimi 1974 yılına kadar, Norio Taniguchi adındaki bir Japon araştırmacının mikrometre ölçekteki mühendislikle, yeni ortaya çıkmakta olan ve üstün duyarlılıklı mekanik işleme ve alt mikro-metre aralığında yüksek kalitede malzemelerin işlenmesini içeren alan arasında ayırım yapmasına kadar tam olarak belirginleşmemiştir. 1980’lerde, moleküler imalata ait temel fikirler, K. Eric Drexler’in “Moleküler İmalata Yönelik Protein Tasarımı” adlı makalesinde ortaya koyulmuştur. K. Eric Drexler daha sonraki bir çalışmasında da, kendi kendini kopyalayan bir ‘derleyicinin’ yaratılmasıyla, aygıtları ve yapıları karmaşık atomik spesifikasyonlar şeklinde üretmenin olası yöntemlerini tarif etmiştir. Moleküllerin yerlerini belirleyerek kimyasal tepkimeleri güdümlenebilecek olan bu araç, moleküler imalat için genel amaçlı bir aygıt olacaktır. Bu evrensel ‘derleyici’ görüşü her ne kadar tartışmalı olsa da, nano-malzemelerin üretimi için aşağıdan yukarıya teknolojilerin kullanımını ele alan bu bakış açısı, nanoteknoloji alanında önemli bir dal haline gelmiştir.

1981’de “taramalı tünelleme mikroskopunun” icat edilmesi, bilim insanlarına yapıları nanoölçekte manipüle etme ve bunların görüntülerini alma olanağı sağlamıştır. Bundan sonra, 1985’de “fullerenlerin” keşfi ve 1986’da da “atomik kuvvet mikroskopunun” icat edilmesi, nanobilimle nanoteknolojide asıl dönüm noktaları olmuş ve bunların, bilimle teknolojinin en fazla gelecek vadeden dallarını oluşturmak üzere evrimleşmelerinin önünü açmıştır. Nanoteknoloji alanındaki asıl gelişme, IBM’deki Gerd Binnig ve Heinrich Röhrer’in (1986 Nobel ödülü) 1981’de, hem malzemeleri atomik düzlemde incelemeye hem de bunları atomik ölçekte manipüle etmeye yarayan ilk aygıt olan “taramalı tünelleme mikroskopunu” (TTM) icat etmeleriyle olmuştur. “Tarayıcı iğne mikroskopu” (TİM), “atomik kuvvet mikroskopu” (AKM), “yakın alan mikroskopisi” ya da “taramalı elektron mikroskopisi” (TEM) gibi aygıtlar, atomik bağlanmanın, moleküllerin kendiliğinden bir araya gelmeleri ve malzemelerin en küçük ölçekteki yapılarının işleyişiyle ilgili görüntüler sağlamışlar ve atomik manipülasyonu kimyanın ‘deney beherinden’ çıkarıp mühendislik dünyasına taşımışlardır [3]. Nanoteknoloji tarihindeki bir diğer dönüm noktası, Curl Kroto ve Smalley’in 1985’teki çalışmalarının sonucu ürettikleri, yeni nano-yapılı karbon modifikasyonu olan, ‘Buckyball’ olarak da

adlandırılan, futbol topu biçimindeki “fullerenlerin” keşfidir. 1991’de ise, fullerenlerle ilgili çalışmaların sonucunda, temelde kenarları silindir oluşturacak şekilde yuvarlanmış grafit tabakalardan oluşan ve olağanüstü özellikleri nedeniyle elektronik malzeme mühendisliğinde muazzam uygulama potansiyeli olduğu öngörülen, karbon atomlarının tüpe benzer yapılarının keşfi gerçekleşmiştir. 1990’larda, örneğin ABD, Avrupa ve Japonya’daki federal hükümetler, nano-elektronik, nano-malzemeler vs. gibi nanoteknolojinin çeşitli dallarında programlarla ilgilenmeye başlamışlardır. 1990’ların sonlarına doğru bu alanın, çeşitli küçük çaplı bilim alanının dağıtılmasıyla değil, aynı bilimin, yani nanoteknolojinin farklı yönleriyle ele alınarak işleneceği anlayışı kabul edilmiştir. Farklı faaliyetleri, bir konuda odaklanmış girişimler (Örneğin ABD’deki Ulusal Nanoteknoloji Girişimi) olarak toplamak ve nanoteknolojiyi, disiplinlerarası, “anahtar teknoloji” olarak ilerletmek amaçlanmıştır. Bu esnada, neredeyse tüm sanayileşmiş ülkelerde nanoteknoloji, devlete ait araştırma ve geliştirme programlarının özel bir alanı olarak kurulmuştur.

Nano-ölçekte kimya, biyoloji, elektronik, fizik, malzeme bilimleri ve mühendislik alanları yakınsamaya başlar ve belirli bir disiplinin incelediği bir özellik gibi ayrımlar geçerliliğini yitirir. Tüm bu disiplinler, nanoteknoloji tarafından sağlanabilecek olan olasılıkları anlamaya ve bunlardan faydalanmaya katkıda bulunur. Ancak temel bilim tek bir noktaya yöneldiğinde, potansiyel uygulamalar sayısız çeşitlilik gösterir ve tenis raketlerinden tıbbı, hatta tamamen yeni enerji sistemlerine kadar olabilecek her şeyi içermektedir.

2.1.3. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

- Tıp (teşhis, tedavi, ilaç taşıma, görüntüleme, doku mühendisliği)
- Çevre (filtrasyon)
- Enerji (enerji tüketimini azaltma, geri dönüşümlü piller, enerji üretim verimliliğinin artırılması)
- Bilgi ve iletişim (bellek depolama, yeni yarıiletken cihazlar, yeni optoelektronik cihazlar, ekranlar, kuantum bilgisayarlar)
- Ağır Sanayi (roket, katalizler, inşaat)
- Tüketim malları (gıda, ev, optik)
- Tekstil

- Kozmetik
- Tarım

Çizelge 2.1. Nanoteknolojinin En Çok Kullanılan 10 Uygulaması [9]

<u>Enerji depolama, üretim ve dönüştürme</u>	Karbon nanotüpler ve diğer hafif nanomateryallere dayalı yeni hidrojen depolama sistemleri Kuantum noktalara dayalı fotovoltaik hücre ve organik ışık yayan cihazlar Güneş pili için kompozit film kaplamalarda karbon nanotüpler Hidrojen üretimi için nanokatalistler Hibrid protein-polimer biyomimetik membranlar
<u>Tarımsal, verimlilik, geliştirme</u>	Bitkiler için suyun ve gübrelerin yavaş salımlı ve suyun etkili dozajlarında kullanılması için nano gözenekli zeolitler ve hayvanlar için besin ve ilaçlar Herbisit dağıtımı için nanokapsüller Toprak kalitesi ve bitki sağlığı izlenmesi için nanosensörler Toprak kirletici maddelerin kaldırılması için nanomagnetler
<u>Su arıtma ve iyileştirme</u>	Su arıtma, deniz suyu arıtma ve detoksifikasyonu için nanomembranlar Kontaminantlar ve patojenlerin tespiti için nanosensörler Nanogözenekli zeolitler, nanogözenekli polimerler ve su arıtma için attapuljit killer Su arıtma ve iyileştirme için manyetik nanopartiküller Su kirliliğinin katalitik degradasyonu için TiO ₂ nanopartiküller
<u>Hastalık tanı ve görüntüleme</u>	Nanoliter sistemleri (<i>Lab-on-a-chip</i>) Karbon nanotüplere dayalı nanosensor dizileri Hastalık tanısı için kuantum noktalar Nanosensörler olarak manyetik nanopartiküller HIV ve kanser tanısı için antikor-dendrimer konjugatları Hastalığın teşhisi için nanotel ve nanobelt nanosensörler Tıbbi görüntü arttırıcılar olarak nanopartiküller
<u>İlaç taşıyıcı sistemler</u>	Yavaş ve uzun süreli ilaç salım sistemleri için nanokapsüller, lipozomlar, dendrimerler, nanobiyomagnetler
<u>Gıda işleme ve depolama</u>	Gıda ambalajında kullanılan plastik film

	<p>kaplamalar için nanokompozitler Gıda ekipman, ambalaj veya gıda dekontaminasyonu uygulamaları için antimikrobiyal nanoemülsiyonlar Patojen kontaminasyonunun tanımlanması için nanoteknoloji bazlı antijen tarama biyosensörleri</p>
Hava kirliliği ve iyileştirme	<p>Kendi kendini temizleme sistemleri ile hava kirliliğinin TiO₂ nanopartikül bazlı fotokatalitik degradasyonu Daha etkili, daha ucuz ve daha kontrollü katalitik dönüştürücüler için nanokatalistler Toksik maddeler ve sızıntıların tespiti için nanosensörler Gaz ayırma için nanocihazlar</p>
İnşaat / Yapı	<p>Asfalt ve betonu su sızıntısına karşı daha güçlü yapmak için nanomoleküler yapılar Morötesi ve kızılötesi radyasyonu engellemek için ısıya dayanıklı nanomalzemeler Daha ucuz ve dayanıklı konut, yüzeyler, kaplamalar, yapıştırıcılar, beton, ısı ve ışıktan koruma için nanomalzemeler Biyoaktivite ile kendi kendini temizleyen yüzeyler Kaplamalar</p>
Tıbbi izleme	<p>Glikoz, CO₂, ve kolesterol sensörleri ve homeostazinin <i>in situ</i> izlenmesi için nanotüpler ve nanopartiküller</p>
Vektör ve haşere algılama ve kontrol	<p>Haşere tespiti için nanosensörler Yeni tarım ilaçları, böcekler ve böcek kovucular için nanopartiküller</p>

2.1.3.1. İlaç Taşınmasında Nanoteknoloji

Nanopartiküller boyutları 10-1000 nm arasında olan partikül dispersiyonları veya katı partiküller olarak tanımlanabilir. İlaç, nanopartikül matrisi içinde çözündürülebilir, hapsedilebilir, adsorbe ettirilebilir, eklenebilir veya enkapsüle edilebilir [10].

Hazırlama yöntemine bağlı olarak nanopartiküller, nanoküreler veya nanokapsüller elde edilebilir.

Nanokapsüller veziküler sistemlerdir, ilaç bir kaviteye hapsedilir ve bir polimer membran ile çevrelenir, nanoküreler ise matris sistemlerdir burada ilaç nanoküreler içerisine uniform olarak disperse edilmiştir.

Son yıllarda, biyoparçalanabilen polimerik nanopartiküller, özellikle uzun süre dolaşımda kalabilen nanopartiküller olarak bilinen (*long circulating*), polietilen glikol (PEG) gibi hidrofilik polimerlerle kaplı olanlar uzun süre dolaşımda kalabilme yetenekleri sayesinde özel bir organa hedeflenebilmeleri, gen terapisinde DNA taşıyıcısı olabilmeleri, proteinleri, peptid ve genleri iletme yetenekleri sayesinde potansiyel ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır [11-14].

Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak tasarlanmasındaki temel hedef partikül boyutu, yüzey özellikleri ve aktif farmasötik ajanların salımı kontrol edilerek ilacın hedeflenen bölgeye özel, terapötik olarak optimum dozda ve hızda etki etmesini sağlamaktır. İlaçları degradasyondan koruması, hedeflendirilebilmesi, toksisite veya yan etkileri azaltması gibi üstün avantajları ile lipozomlar potansiyel taşıyıcılar olarak kullanılmalarına rağmen düşük enkapsülasyon etkinliği, suda çözünen ilacın kan komponentlerinin varlığında ani salımı ve düşük saklama stabilitesi gibi problemler nedeniyle uygulamaları sınırlıdır. Buna karşılık, polimerik nanopartiküller lipozomlara kıyasla bazı spesifik avantajlara sahiptir. Örneğin, ilaçların/proteinlerin stabilitesini arttırmaya yardım ederler ve kullanışlı kontrollü salım özelliklerine sahiptirler [15, 16].

Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasının avantajları:

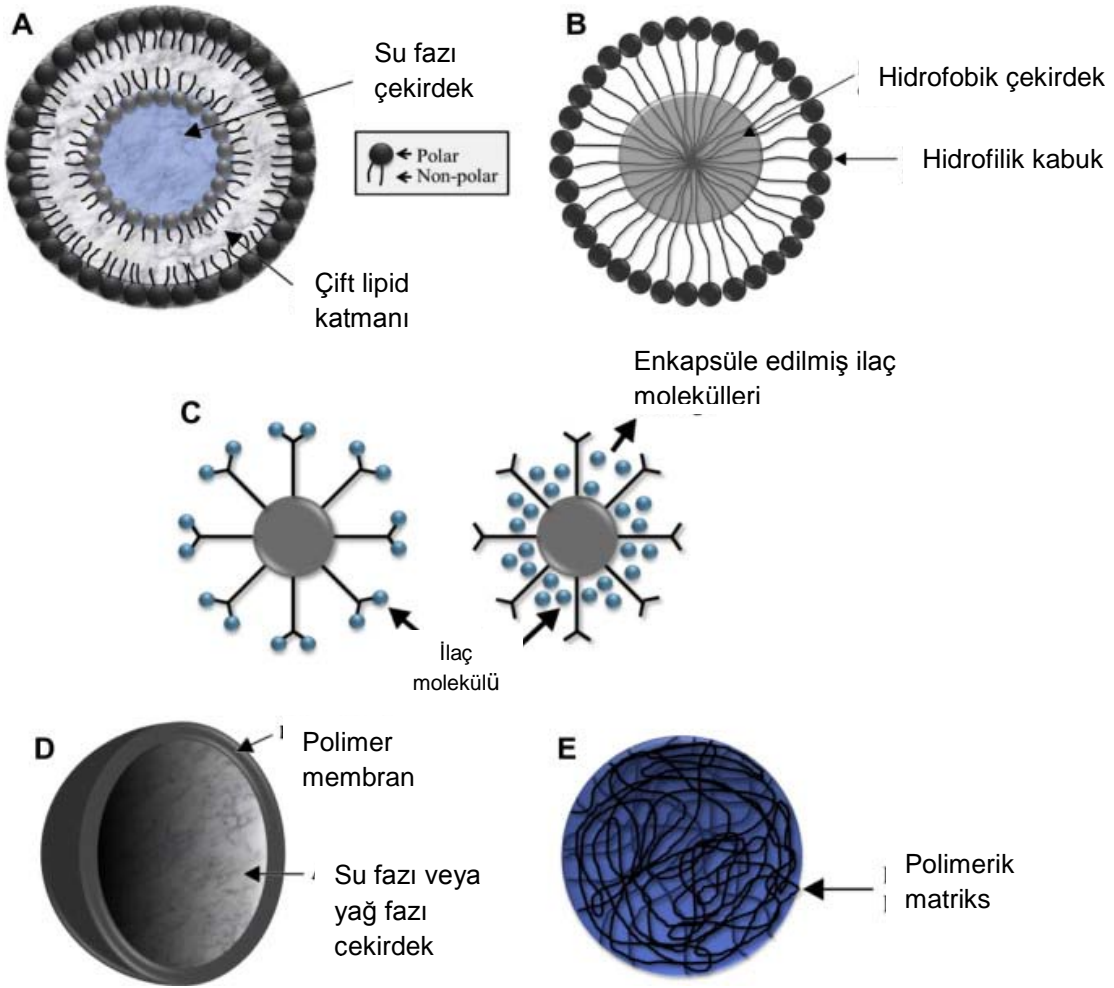
1. Nanopartiküllerin partikül büyüklükleri ve yüzey özellikleri parenteral uygulamadan sonra hem pasif hem aktif ilaç hedeflendirme için kolaylıkla ayarlanabilmektedir [17].
2. İlacın uzatılmış salımını taşıma sırasında ve yerleşim bölgesinde, ilacın terapötik etkisinin artışının sağlanması ve yan etkilerin azaltılması için ilacın organ dağılımının değiştirilmesi ve sonraki aşamada ilacın arındırılmasını kontrol edebilmektedirler [18].
3. Kontrollü salım ve partikül degradasyon karakteristikleri matriks bileşenlerinin seçimiyle ayarlanabilir. İlaç yüklemesi nispeten yüksek ve ilaçlar herhangi bir kimyasal reaksiyona gerek olmadan sistemlere hapsedilebilir, bu ilaç aktivitesinin korunması için önemli bir faktördür [18].

4. Partiküllerin yüzeylerine ligandlar eklenerek veya manyetik yönlendirme kullanılarak istenilen bölgeye hedeflendirmesi sağlanabilir [18, 19].

5. Sistem oral, nazal, parenteral, intra-oküler gibi birçok uygulama yolu için kullanılabilir [20].

2.2. Nanopartiküller

Nanopartiküller çeşitli kompozisyonları, yapıları ve yüzey özellikleri nedeni ile ilaç taşınmasında ilgi çekmektedirler [21]. Nanopartikül kompozisyonlarının ve yapılarının bu çeşitliliği taşıyıcıların spesifik uygulamalar ve hedefler için ayarlanabilir olmasına izin verir. Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler içerisinde en sık kullanılanlar: lipozomlar, miseller, dendrimerler, nanoküreler ve nanokapsüllerdir [22] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Nanopartiküller: (A) lipozom, (B) misel, (C) fonksiyonelleştirilmiş (solda) ve ilaç enkapsüle edilmiş (sağda) dendrimerler, (D) nanoküre ve (E) nanokapsül [22].

2.2.1. Polimerik nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller; doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan, boyutları 10-1000 nm arasında değişen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül (Şekil. 2.2) olarak adlandırılan ve etkin maddenin partikül içinde çözündürüldüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye adsorbe edildiği ya da bağlandığı matris sistemlerdir. Günümüzde en yaygın olarak araştırılan polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ya da bunların kopolimeri olan poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi biyoparçalanabilir ve biyouyumlu polimerlerden üretilen nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemleridir.

2.2.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Nanopartikül hazırlamak için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler formülasyonun polimerizasyon reaksiyonu gerektirmesi veya direkt makromolekülden/önceden şekillendirilmiş polimerlerden elde edilmesine göre iki ana kategoride sınıflandırılabilir [23].

1. Polimerlerin dispersiyonu

- I. Emülsifikasyon/ çözücü buharlaştırma yöntemi
- II. Spontan emülsifikasyon/çözücü difüzyon yöntemi
- III. Tuzla çöktürme/emülsifikasyon difüzyon yöntemi
- IV. Süperkritik sıvı teknolojisi kullanarak nanopartiküllerin hazırlanması

2. Monomerlerin polimerizasyonu

3. Hidrofilik polimerler ile nanopartiküllerin hazırlanması

Polimerizasyon yöntemleri emülsiyon ve arayüzey polimerizasyonu şeklinde sınıflandırılabilirken, emülsiyon polimerizasyon yöntemleri de sürekli faza bağlı olarak (organik ve su) iki tiptir.

Nanopartiküller ayrıca önceden şekillendirilmiş sentetik veya doğal polimerlerden ve makromoleküllerin desolvasyonu ile hazırlanabilir.

2.2.2.1. Polimerlerin Dispersiyonu

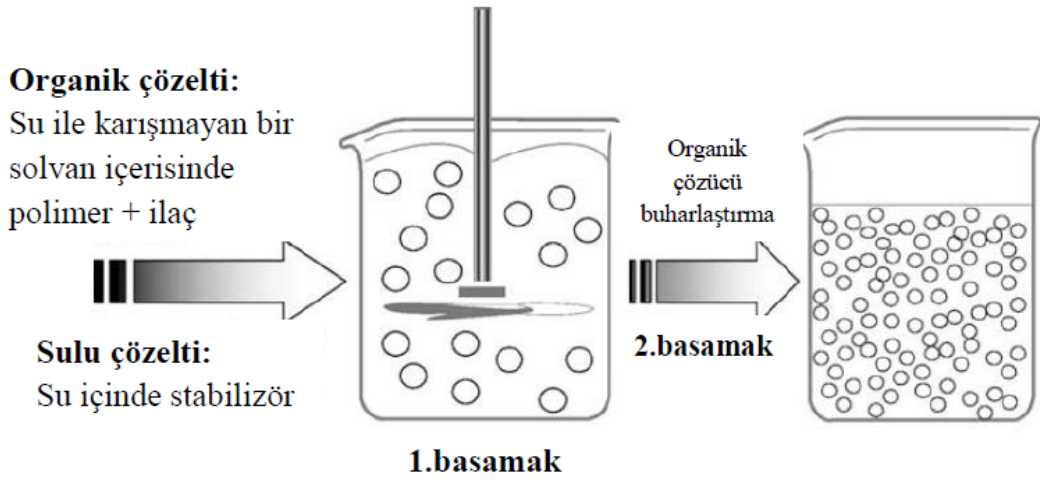
2.2.2.1.1. Emülsifikasyon/Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi iki basamaktan oluşur. İlk basamak polimer çözeltisinin sulu faz içerisinde emülsifikasyonunu gerektirir. İkinci basamakta ise çözücü buharlaştırılır, polimerin nanopartiküller olarak çökmesi indüklenir. Çözünmüş etkin madde içeren polimerik organik çözelti dispersiyon ajanı ve yüksek enerjili homojenizasyon kullanılarak nano boyutta damlacıkları halinde disperse edilir. Etkin madde polimer matrisi içerisinde iyi bir şekilde disperse olmuşsa polimer nanopartikül formunda çöker. Çözücü daha sonra sıcaklık artırılarak, basınç altında veya sürekli karıştırma ile buharlaştırılır (Şekil 2.3) [24].

Nanopartikülün boyutu; karıştırma hızı, dispersiyon ajanının tipi ve miktarı, organik ve sulu fazın vizkozitesi ve sıcaklığı ayarlanarak kontrol edilebilir [25].

Poli(laktik asit) (PLA)[26] , poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)[27], etilselüloz (EC) [28], selüloz asetat ftalat, poli (ε-kaprolakton) (PCL) [29] ve poli(hidroksibutirat)(PHB) sıkça kullanılan polimerlerdir.

Bu yöntemde polimer diklorometan, kloroform veya etilasetat gibi bir organik çözücüde çözülür. Etkin madde ise polimer çözeltisi içerisinde çözülür veya disperse edilir ve bu karışım jelatin, poli(vinilalkol), polisorbitat-80, poloksamer-188 gibi çeşitli sürfaktan/emülsifiye ajanı kullanılarak Y/S emülsiyonu elde etmek amacıyla sulu faz içerisinde emülsifiye edilir. Stabil emülsiyon oluştuktan sonra organik çözücü sıcaklık artırılarak, basınç altında veya sürekli karıştırma ile buharlaştırılır. Suda çözünen ilaç yüklü nanopartiküller hazırlamak için S/Y/S yöntemi kullanılır [30].



Şekil 2.3. Emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi [25]

2.2.2.1.2. Spontan Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon Yöntemi

Solvent evaporasyon yönteminin modifiye versiyonunda aseton veya metanol gibi suda çözünebilir bir çözücü diklorometan ve kloroform gibi suda çözünmeyen organik bir çözücü ile birlikte yağ fazı olarak kullanılır. Suda çözünebilir çözücünün (aseton veya metanol) spontan (ani) difüzyonu nedeniyle iki faz arasındaki yüzeyler arası türbülans küçük partiküllerin oluşmasını sağlar. Suda çözünebilir çözücünün konsantrasyonunun artması ile partikül boyutunun önemli ölçüde küçülmesi sağlanabilmektedir [31].

2.2.2.1.3. Tuzla Çöktürme/Emülsifikasyon Difüzyon Yöntemi

Bahsedilen diğer yöntemler hem çevre hem de fizyolojik sistem için zararlı organik çözücülerin kullanılmasını gerektirir [32]. US Food and Drug Administration (FDA) enjekte edilebilir koloidal sistemlerde bulunabilecek organik çözücü miktarını belirlemiştir. Bu şartı sağlaması için Allemann ve ark. nanopartikülleri hazırlamak için iki yöntem geliştirmişlerdir. İlk yöntem tuzla çöktürme diğeri ise emülsifikasyon çözücü difüzyon tekniğidir [36,37].

2.2.2.1.4. Süperkritik Sıvı Teknolojisi Kullanılarak Nanopartiküllerin Hazırlanması

Hedeflendirilmiş ilaç taşınmasına olanak sağlamak için istenilen fizikokimyasal özelliklerde nanopartikül üretmek farmasötik endüstrinin en yeni ilgi alanlarından biridir. Çözücü buharlaştırma, koaservasyon ve *in situ* polimerizasyon gibi konvansiyonel yöntemler çoğunlukla toksik çözücü ve/veya sürfaktan kullanımını gerektirmektedir. Bu nedenle, araştırmalar ilaç yüklü mikron ve mikronaltı boyutta partiküllerin üretiminde çevresel olarak daha güvenli enkapsülasyon yöntemlerinin geliştirilmesine yönelmiştir. Süperkritik sıvı teknolojisi, süperkritik sıvıların çevresel olarak güvenli olması nedeniyle biyoparçalanabilir mikro ve nanopartiküllerin hazırlanmasında alternatif olarak bulunmuştur [33].

Süperkritik sıvılar genel olarak süperkritik sıcaklığı üzerinde, basıncın değişmesine rağmen faz değiştirmeyen sıvılar olarak tanımlanır [33]. Süperkritik CO₂ (SC CO₂) uygun kritik koşullara sahip olması (T_c = 31,1 °C, P_c = 73,8 bar), toksik olmaması, yanıcı olmaması ve ucuz olması nedeniyle en yaygın kullanılan süperkritik sıvıdır. En sık kullanılan proses tekniği süperkritik anti-solvan (SAS) ve kritik çözeltinin ani genişlemesidir (RESS).

İşlem şartlarında SAS işlemi çözünen maddenin mikronize edilmesi için metanol gibi süperkritik sıvılarla (SC CO₂) tamamen karışabilen bir sıvı çözücü içerir, çünkü çözünen madde süperkritik sıvılarda çözünmemektedir, süperkritik sıvının yardımıyla oluşan sıvı çözünün özü çözünen maddenin ani presipitasyonuna neden olur, bu da nanopartiküllerin oluşumunu sağlar.

RESS prosesinde SAS prosesinden farklı olarak çözünen madde süperkritik sıvı içerisinde çözülür ve nozzle yoluyla düşük basınçlı bölgeye geçiş yapar [33].

Bu sebeple süperkritik sıvının çözücü gücü birden azalır ve sonuç olarak çözünen madde çöker. Bu yöntem temiz bir yöntemdir çünkü presipitasyona neden olan sıvı temel olarak çözücü içermez. RESS ve onun modifiye prosesi polimerik nanopartikül ürünleri için kullanılmaktadır [34].

Süperkritik sıvı teknoloji tekniği çevre dostu ve seri üretime uygun olmasına rağmen, özel tasarlanmış ekipman gerektirdiği için çok daha pahalı bir tekniktir.

2.2.2.2. Polimerizasyon Yöntemi

Bu metotta bir sulu faz içerisinde monomerler nanopartikül formu oluşturacak şekilde polimerize edilirler. İlaç ya polimerizasyon ortamında çözülerek ya da polimerizasyon bittikten sonra nanopartiküllere adsorbe edilerek nanopartiküle hapsedilir.

Daha sonra polimerizasyon için kullanılan çeşitli stabilizanlar ve sürfaktanların uzaklaştırılması için ultrasantrifüj kullanılarak saflaştırma yapılır ve partiküller sürfaktansız izotonik bir ortamda tekrar süspande edilirler. Bu teknik polibütilsiyanoakrilat veya poli(alkilsiyanoakrilat) nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmıştır. Nanopartikül formasyonu ve partikül büyüklükleri kullanılan sürfaktan ve stabilizerin konsantrasyonuna bağlıdır.

2.2.2.3. Hidrofilik Polimerler ile Nanopartiküllerin Hazırlanması

Diğer yöntemlerde kullanılan sentetik polimerlerin yanısıra kitosan, aljinat, jelatin gibi hidrofilik polimerler de nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Organik çözücülerle hazırlanan pek çok hidrofobik ya da hidrofilik taşıyıcının sınırlı protein yükleme kapasitesi nedeniyle Calvo ve ark. tarafından hidrofilik kitosan nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlama yöntemi, bir fazın kitosan ve etilen oksit diblok kopolimerini diğer fazın polianyon sodyum tripoli fosfatı (TPF) içerdiği iki fazın iyonik jelasyonuna dayanmaktadır [35-37]. Bu yöntemde kitosanın pozitif yüklü amino grupları negatif yüklü TPF ile etkileşime girmektedir. Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli kitosanın bileşiminin diblok polimerle farklılaştırılması ile 200-1000 nm ve 20-60 mV arasında değişmektedir. Elde edilen nanopartiküllerin sığır serum albumini, tetanoz ve difteri toksoidi, insülin ve oligonükleotidler gibi proteinlerle yüksek etkileşim gösterdiği bulunmuştur.

Mao ve ark. DNA-kitosan nanopartiküllerini kompleks-çöktürme yöntemi ile hazırlamışlar ve oral gen taşınımı için kullanmışlardır. Aynı yöntem DNA-jelatin nanopartiküllerinin hazırlanmasında da kullanılmıştır. Kitosan nanopartiküllerinin immünolojik ve antineoplastik proteinlerin yüklenmesi bakımından daha iyi taşıyıcılar olduğu kanıtlanmıştır [38]. Kitosan nanopartikülleri ayrıca emülsiyon-koaservasyon yöntemi ile üretilmiştir [39]. Bu yöntemde kitosan ve yüklenmek

istenen ilaç su fazında çözündürülmüş, S/Y emülsiyonu parafin likit içinde emülsifiye edici ajan yardımıyla hazırlanmıştır. Emülsiyonun stabilizasyonu amacıyla parafin likit içinde NaOH içeren diğer bir emülsiyon ortama eklenmiştir. NaOH ile temas anında kitosan nanopartikülleri polimerin koaservasyonu ile oluşturulmuştur.

2.2.2.3.1. İyonotropik Jelasyon

Kitosan polimeri kullanılarak nanopartikül hazırlanmasında sıkça kullanılan bir yöntem olan iyonotropik jelasyonda zıt yüklü makromoleküller arasında gerçekleşen kompleksleşmeden yararlanılır. Yöntemin tercih edilmesinin sebeplerinden biri yöntemin hazırlama sürecinin basitliği ve fazla ekipman gerektirmeyişidir. Yöntemde elektrostatik güçler aracılığıyla katyonik olan kitosana kolayca etkileşebilen çapraz bağlayıcı tripoli fosfat (TPF) kullanılmaktadır [40]. İyonotropik jelasyon yönteminde öncelikle iki ana faz olan polimer ve çapraz bağlayıcının uygun konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmaktadır. TPF çözeltisi içine kitosan ilave etmek suretiyle TPF-kitosan kompleksi oluşturulmuş ve nanopartiküller, karışmakta olan asidik özellikteki kitosan çözeltisini polianyonik TPF çözeltisinin damla damla ilave edilmesiyle elde edilmişlerdir [41]. Gerçekleşen etkileşmenin esası zıt yüklü iyonların kompleksleşmesi olup bu etkileşme sonrasında küresel nanopartiküller oluşturulmuştur. Kitosan nanopartiküllerinin hazırlama sürecinin kolay olması protein tipteki etkin maddelerin de nanopartiküllere yüklenmesine olanak sağlamıştır [37] .

Nanopartiküller proteinler, polisakkaritler ve sentetik polimerler gibi çok çeşitli materyallerden hazırlanabilirler. Matriks materyalinin seçimi birçok faktöre bağlıdır:

- a. Hedeflenen partikül boyutu
- b. İlacın özellikleri, örneğin suda çözünürlüğü ve stabilitesi
- c. Yüzey özellikleri, yüzey yükü ve permeabilitesi gibi
- d. Biyoparçalanabilirliğinin derecesi, biyoyumluluğu ve toksisitesi
- e. İstenen salım profili
- f. Son ürünün antijenliği

2.3. Nanopartiküllerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

2.3.1. Polimerlerin Seçimi

Polimerlerin seçimi ve tasarlanması, yapısının çeşitliliği ve bütün yüzeyi ve polimerin bulk özelliklerinin gerektirdiklerini anlamak bu sayede de istenilen kimyasal yüzeylerarası mekanik ve biyolojik fonksiyonlarını öğrenmek çok önemli bir konudur. Polimer seçimi, polimerin fizikokimyasal özelliklerine ek olarak, geniş biyokimyasal karakterizasyon ve spesifik prelinik testlerin güvenilirliğinin kanıtlanması gerekliliğine bağlıdır. Son zamanlarda Angelova ve ark. [42] biyomedikal uygulamalar için kullanılan polimerlerin rasyonel seçimi için kullanılan bir akış diyagramı ortaya koymuşlardır. Hidrofiliklik, kayganlık ve pürüzsüzlük gibi yüzey özellikleri ve yüzey enerjisi, doku ve kan yoluyla biyogeçimliliği buna ek olarak dayanıklılık ve permeabilite gibi fiziksel özellikleri etkiler [42]. Yüzey özellikleri aynı zamanda polimerlerin hidrolitik degradasyon ve şişme (hidrojeller) gibi suyu emme kapasitesini de belirler.

Diğer yandan, uzun dönem kullanıma uygun materyaller (ortopedik ve dental implantlar) sertliklerinde değişikliğe ve mekanik kuvvetlerinde kayba neden olan degradasyon veya erozyon prosesinden kaçınmak için su uzaklaştırıcı özellikte olmalıdır.

Yüzey özellikleri biyogeçimliliği artırmak için kimyasal, fiziksel ve biyolojik anlamda değiştirilerek geliştirilebilir. Enzimler, ilaçlar, proteinler ve antikorların polimer yüzeyine aşılması polimer terapötiklerinin, organ ve hücrelere hedeflenmesini sağlar. Kontrollü salım sistemleri için gerekli olan esas özellikler salım mekanizmasına (difüzyon ya da kontrollü dissolüsyon) dayanan moleküler ağırlık, adezyon, çözünürlük ve onun etki bölgesini içerir.

İlaç taşıma sistemleri mukozal dokulara hedeflendirildiğinde biyoadezivlik özelliğinin de hesaba katılması gerekir. Matrisin yapısal özellikleri, mikromorfolojisi ve gözenek boyutu polimerin içine (suyun) ve dışına (ilacın) kitlesel taşıma bakımından önemlidir.

Biyoparçalanabilir olmayan matrisler için ilaç salımı çoğu durumda difüzyon kontrollüdür ve düşük permeabiliteye sahip peptid ilaçların salımı yalnızca porlardan ve ilaç fazının çözünmesiyle oluşmuş kanallardan olabilir.

Biyoparçalanabilir polimerlerde degradasyon kimyasal bir prosestir, oysa erozyon dissolüsyon ve difüzyon proseslerine bağlı fiziksel bir olaydır. Polimer iskeletinin kimyasal yapısına bağlı olarak erozyon hem yüzey ve hem bulk erozyonu olarak gerçekleşir. Ayrıca erozyon prosesi ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzey modifikasyonu veya içerisinde hidrofobik monomer birimleri içeren polimerler kullanılarak kontrol edilebilir.

Çeşitli polimer yapıları (lineer, dallı, yıldız ve tarak benzeri polimer) ve polimer türlerinin hem fiziksel olarak karıştırılmış (polimer karışımları veya iç içe geçmiş ağ yapılar) veya kimyasal olarak bağlanmış kombinasyonu ilaç taşıyıcı sistemler olarak çok büyük kapsamda fırsatlar sunmaktadır. Polimer seçimi birincil kaygı olmasına rağmen, özellikle ilaç ile uyumluluk açısından, üretim sürecinin de dikkate alınması gerekmektedir, çünkü polimerizasyon sırasında kullanılan katkı maddeleri ilacı parçalayabilir. Doğal polimerler biyoparçalanabilirdir ve mükemmel bir biyouyumluluk sunarlar, diğer taraftan sentetik polimerler kompozisyonlarının geniş çeşitliliği ve kolaylıkla ayarlanabilen özellikleri nedeni ile kullanılabilir [42]. İlaç taşınmasında kullanılan doğal ve sentetik polimerler Çizelge 2.2'de verilmiştir.

2.3.1.1. Biyoparçalanabilir Olmayan Polimerler

Biyolojik ortamda parçalanamazlar. Bu polimerler hidrofil veya hidrofob yapıda olurlar. Hidrofil olanlar hidrojel olarak adlandırılır. Suda çözünmez ama suda şişerler. Hidrofoblar suda çözünmez ve şişmezler. Polisakkarit ve akrilik bazlı polimerler gibi birçok biyolojik olarak parçalanamayan polimer peroral dozaj şekli, transdermal filmler ve cihazların üretimi gibi geniş bir uygulama alanına sahiptir [43].

2.3.1.2. Biyoparçalanabilir Polimerler

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler doğal veya sentetik kaynaklıdır ve *in vivo* koşullarda, enzimatik, enzimatik olmayan veya iki yol birlikte kullanılarak normal

metabolik yollarla elimine edilebilen biyogeçimli ve toksikolojik olarak güvenli ürünler oluşturacak şekilde parçalanabilirler.

Polimerik cihazların içerisinde formüle edilen ilaçların salımı polimer bariyerinden difüzyonla, polimer materyalinin erozyonuyla ya da difüzyon ve erozyonun kombinasyonu ile gerçekleşir. Parenteral uygulama için seçilen polimerlerin biyouyumluluk (*biocompatibility*), ilaç uyumluluğu (geçimliliği), biyodegradasyon kinetiğine uygunluk ve mekanik özellikler gibi uyması gereken bazı koşullar bulunmaktadır. Doğal ve sentetik biyoparçalanabilen polimerler hedeflendirilmiş ilaç taşınması ve uzatılmış salım amacıyla çok geniş kapsamda araştırılmıştır. Bununla beraber yalnızca birkaçı biyouyumludur. İlaç taşınması amacıyla bovin serum albümin (BSA), insan serum albümin (HSA), kollajen, jelatin ve hemoglobin gibi doğal biyoparçalanabilen polimerler ile çalışılmıştır.

Bu doğal polimerlerin kullanımı pahalı olmaları ve düşük saflıkları nedeniyle sınırlıdır. Son yirmi yılda doğal polimerlere ilişkin pek çok probleme sahip olmaması, ilaç taşınmasında sentetik biyoparçalanabilen polimerlerin kullanımını giderek arttırmaktadır. Poli(amitler), poli(amino asitler), poli(alkil-a-siyano akrilatlar), poli(esterler), poli(ortoesterler), poli(üretanlar), ve poli(akrilamitler) çeşitli ilaç yüklü cihazların hazırlanmasında kullanılmaktadır [44].

Biyoparçalanabilir polimerlerin birçok çeşidi ilaçların, makromoleküllerin, hücrelerin ve enzimlerin taşınması amacıyla sentezlenir. Bu polimerlerin geniş kabul edilebilirliklerinin nedeni ana iskeletlerine eklenebilen ester, ortoester, anhidrit, karbonat, amid, üre ve üretan gibi değişken gruplarla biyoparçalanabilirliklerinin kontrol edilebilmeleridir. Biyoparçalanma enzimatik, kimyasal veya mikrobiyal orjinli olabilir. Bunların dışında diğer bazı faktörlerin etkisiyle ayrı ayrı veya eş zamanlı olarak meydana gelebilir.

Polimerlerin biyolojik olarak parçalanabilirliğini etkileyen faktörler:

- Kimyasal yapı ve kompozisyon
- Fizikokimyasal faktörler (iyon değişimi, iyonik kuvvet, pH)
- Fiziksel faktörler (şekil, boyut)
- Morfoloji (amorfor, yarıkristal, kristal, mikroyapı)
- Degradasyon mekanizması (enzimatik, hidroliz, mikrobiyal)

- Moleköl ağırlığı dağılımı
- Üretim koşulları ve sterilizasyon süreci
- Sertleştirme ve saklama koşulları
- Uygulama yolu ve etki bölgesi

Poliester bazlı polimerler ilaç taşımasında en geniş kullanım alanına sahip polimerlerdir. Poli(laktik asit) (PLA) ve poli(glikolik asit) (PGA) ve bu polimerlerin kopolimerleri olan poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ilaç taşıma uygulamaları için tasarlanıp kullanılan iyi tanımlanmış biyomateryallerdir [44].

PLA'nın stereokimyasal yapısı değiştirilerek mekanik, termal ve biyolojik özelliklerini modifiye etmek mümkündür. Ayrıca kopolimerdeki PLA ve PGA oranları değiştirilerek polimerin biyolojik olarak degradasyonu ayarlanabilir.

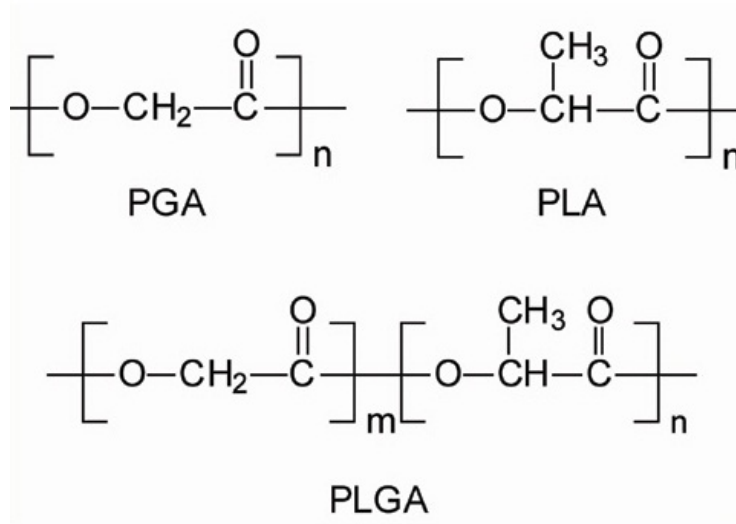
Çizelge 2.2. İlaç taşınmasında kullanılan polimerler [45]

Sınıflandırma	Polimer
Doğal Polimerler	
Protein bazlı polimerler	Kollajen, albumin, jelatin
Polisakkaritler	Agaroz, aljinat, karragenan, hiyalüronik asit, dekstran, kitosan, siklodekstrinler
Sentetik Polimerler	
Biyoparçalanabilir	
Poliesterler	Poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(hidroksi butirat), poli(ϵ -kaprolakton), poli(β -malik asit), poli(dioksanon), poli(laktid-ko-glikolik asit)
Polianhidritler	Poli(sebasik asit), poli(adipik asit), poli(tereftalik asit) ve çeşitli kopolimerler
Poliamidler	Poli(imino karbonatlar), poliamino asit
Fosfor bazlı Polimerler	Polifosfatlar, polifosfonatlar, polifosfazener
Diğerleri	Poli(siyano akrilatlar), poliüretanlar, poliorto esterler, poli-idropiranlar, poliasetallar
Biyoparçalanabilir Olmayanlar	
Selüloz türevleri	Karboksimetil selüloz, etil selüloz, selüloz asetat, selüloz asetat propiyonat, hidroksiopropil metil selüloz
Silikonlar	Polidimetilsiloksan, koloidal silika
Akrilik Polimerler	Polimetakrilatlar, poli(metil metakrilat), poli hidro(etil-metakrilat)
Diğerleri	Polivinil piroolidon, etil vinil asetat, poloksamerler, poloksaminler

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

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerler arasında ilaç taşınmasına en uygun olanı PLGA'dır. Biyolojik olarak parçalanabilmesi ve biyoyumluluğu sayesinde bu polimerlerle hazırlanan, vücuda yerleştirilebilen veya enjekte edilebilen ilaç yüklü partiküller veya implantlar gibi cihazlar FDA tarafından onaylanmıştır.

PLGA glikolik asit ve laktik asidin siklik dimerleri (1, 4-dioksan-2, 5-dion) olan iki farklı monomerin rastgele halka açılma kopolimerizasyonu ile sentezlenir. PGA, PLA ve PLGA yapısı Şekil 2.4'te gösterilmiştir. Polimerizasyon sırasında birbirini izleyen glikolik asit ve laktik asidin monomerik üniteleri ester bağları ile PLGA birbirine bağlanır [46]. Kopolimerin hazırlanışı sırasında kalay (II) 2 etilhekzanat, kalay (II) alkoksit veya alüminyum izopropoksit gibi katalizörler kullanılır.



Şekil 2.4. PLGA yapısı (m ve n ile ifade edilen kısımlar laktik ve glikolik asit sayısını göstermektedir) [47]

Laktid:glükolid oranına bağlı olarak PLGA'nın farklı formları elde edilebilir. Tüm PLGA polimerleri amorfudur ve camsı geçiş sıcaklığı 40-60°C aralığındadır. PLGA su varlığında ester bağlarının hidrolizi ile parçalanır. PLGA degradasyonu için zaman gerektiği ve degradasyonun laktid/glükolid oranı, uç grupları (ester veya serbest karboksil grubu) ve molekül ağırlığı ile ilişkili olduğu görülmüştür.

PLGA molekül ağırlığı, laktid/glükolid oranı ve terminal fonksiyonel grupları gibi farklı özellikleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerde en sık tercih edilen polimerdir.

Daha düşük molekül ağırlığı olan PLGA daha hızlı parçalanır ve ilacın daha hızlı salınmasını sağlar. Laktid içeriğinin artırılması polimer degradasyon hızında

düşüşe neden olur bu da daha yavaş ilaç salımı ile sonuçlanır [48, 49]. PLGA uç grupları polimerin hidrofiliğini etkileyen bir faktördür. Genellikle serbest karboksilik asit uç grupları taşıyan PLGA end-capped polimerle karşılaştırıldığında yüksek ani patlama ve salım hızına neden olur [50].

Serbest karboksil grup (temrini) bulunduran uç (*uncapped*) PLGA daha hidrofildir ve esterleşmiş karboksil grup (temrini) içeren uç (*end-capped*) tipi ile karşılaştırıldığında daha yüksek hidroliz hızına sahip olduğu görülmüştür [51].

İlacın nanopartiküllerden salım kinetiği polimerin doğası, morfolojisi ve ilaç dağılımına bağlıdır, faydalı ürünler elde edebilmek için bu anahtar özellikler ve salım mekanizması arasındaki ilişkinin anlaşılması büyük önem taşır [52, 53].

Ko-poliesterler arasında en geniş araştırma PLGA polimerleri ile yapılmaktadır. L ve DL laktidler kopolimerizasyon için kullanılmaktadır. Glikolid laktid oranının farklı kompozisyonlarda olması polimerlerin kristalinite derecesinin kontrol edilebilmesine izin verir. Kristalin PGA, PLA ile kopolimerize edilirse kristalinite derecesi azalır ve sonuç olarak bu hidrasyon ve hidroliz hızında artışa neden olur. Dolayısı ile kopolimerin degradasyon zamanının sentez sırasında kullanılan monomerlerin oranı ile ilişki olduğu sonucuna varılabilir. Genellikle daha yüksek glikolid içeriği daha hızlı degradasyon ile sonuçlanır. Bununla birlikte bu kuralın istisnası olarak 50:50 oranında PGA:PLA en yüksek degradasyon hızı gösterir [54]. Degradasyon ürünleri vücutta krebs döngüsünde kolaylıkla metabolize edilir.

Sentezleme yöntemindeki spesifik parametreler kontrol edilerek farklı fiziksel özellikte (boyut, boyut dağılımı, morfoloji, zeta potansiyel) PLGA nanopartiküller sentezlenebilir. PLGA nanopartikül formları oluşturmanın en sık kullanılan yolu tek veya çift emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemidir.

Basit emülsiyon prosesi yağ/su emülsifikasyonunu, çift emülsiyon prosesi ise su/yağ/su emülsifikasyonunu içerir. S/Y/S yöntemi peptidler, proteinler ve aşılardan gibi suda çözünen ilaçların enkapsülasyonu için en uygun yöntem iken Y/S yöntemi steroidler gibi suda çözünmeyen ilaçların enkapsülasyonu için idealdir [55]. Kısaca, yağ/su yöntemi için öncelikle PLGA su ile karışmayan uçucu bir organik çözücü içerisinde çözülür (ör; diklorometan), daha sonra ilaç bir çözelti veya ilaç partiküllerinin dispersiyonunu oluşturmak için polimer çözeltisi içerisine

eklenir. Bu polimer, çözücü, ilaç çözelti/dispersiyonu uygun karıştırma ve sıcaklık koşulları altında polivinil alkol (PVA) gibi bir emülgatör varlığında daha büyük hacimdeki bir su içerisinde emülsifiye edilerek yağ/su emülsiyonu oluşturulur. PVA emülsiyonu stabilize etmek, nispeten daha küçük partikül boyutu ve benzer boyut dağılımına sahip partiküller elde etmek için kullanılır [30]. Ardından yağ damlalarını katılaştırmak için ekstraksiyon veya buharlaştırma ile çözücü uzaklaştırılır, yıkama ve filtrasyon, eleme veya santrifüjle toplama sonrasında katı nanopartiküller elde edilir. Uygun koşullar altında kurutma işlemi veya liyofilizasyondan sonra enjekte edilebilen nanopartikül ürünleri elde edilir [44, 56, 57].

PLGA nanopartiküllerin ve plasmid DNA veya diğer ilaçları içeren nanopartiküllerin hazırlanma prosedürleri literatürde bulunmaktadır [57, 58]. PLGA nanopartiküllerin vücutta biyoparçalanabilir olmalarının nedeni su varlığında ester bağlarının parçalanarak asıl monomerleri ve normal fizyolojik koşullarda vücutta birçok metabolik yolun ürünü olan laktik ve glikolik asidi oluşturmalarıdır [46].

Böylelikle ilaç taşınmasında veya biyomateryal uygulamalarında PLGA kullanımı ile ilişkili en az sistemik toksisite bulunmaktadır. Athanasiou ve ark. tarafından yapılan derlemede *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda toksisite ve biyouyumluluk denemeleri PLGA nanomateryallerinin yeterli derecede biyouyumlu olduğu ve önemli toksisite bulunmadığı gösterilmiştir [46]. Kemik, eklem, kıkırdak ve menisküs uygulamalarını içeren *in vivo* çalışmalar ve önemli sayıda diğer çalışmada kas ve diğer yumuşak dokularda *in situ* çalışmalar yapılmıştır. Tüm sonuçlar PLGA biyomateryallerin *in vivo* kullanımını destekler niteliktedir, buna rağmen bazı durumlarda enflamatuar cevaplar rapor edilmiştir [46]. Biyodağılım çalışmaları PLGA nanopartiküler taşıyıcıların permeabilite ve alıkonma etkisini artırarak tanı ve tedavi ajanlarının akümülesyonunu arttırdığını göstermiştir. Örneğin, sağlıklı fareye florimetrik analiz yöntemi kullanılarak nanopartiküller aracılığı ile indosiyanın yeşili verilmiştir, nanopartiküller kanda olduğu kadar organlarda da serbest çözeltisi ile karşılaştırıldığında çok daha yüksek miktarlarda indosiyanın yeşili birikmesini sağlamıştır, PLGA nanopartiküllerin indosiyanın yeşili için taşıma sistemi olarak tümör tanısı ve fotodinamik terapisinde kullanımında büyük potansiyel olduğu görülmüştür [59]. Bu etki nanopartikül polietilenglikol/oksit ile kaplanarak yapılan yüzey modifikasyonu

ile arttırılır [60, 61]. Nanopartikülleri polietilenglikol (PEG) gibi hidrofilik bir polimer ile kaplamak PLA, PLGA, polikaprolakton ve polifosfazen nanopartiküllere uzun sirkülasyon özellikleri sunduğu gösterilmiştir.

Nanopartiküllerin yüzeyde hidrofilik polimerik zincirlerin bulunması nanopartikülleri önemli ölçüde opsonizasyon ve sonrasında fagositoza karşı sterik olarak stabilize eder [60]. Tüm medikal implantların cerrahi olarak yerleştirilmelerinden önce enfeksiyon ve diğer komplikasyon riskinin azaltılması için fabrikasyon sonrasında sterilize edilmesi gereklidir. Athanasiou ve ark. derlemesinde yaygın kullanılan sterilizasyon yöntemleri olan buhar, kuru ısı, etilen oksit gazı ve iyonize radyasyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantajların incelemiştir [46].

Aralarında kuru ısı ve buhar sterilizasyonu yüksek ısılarda gerçekleştirilmektedir ve polimerik nanopartiküllerin şiddetli degradasyon ve hidrolizine neden olmaktadır, etilen oksit toksik kalıntıları nedeniyle uygulanabilir değildir. - ışınlanması ise kararsızlık, bozulma ve çapraz bağların kırılmasına neden olur fakat mevcut durumda PLGA nanocihazların terminal sterilizasyonunda en sık kullanılan yöntemdir. Halen birçok çalışma PLGA cihazların sterilizasyonu için uygun bir yöntem geliştirmeye odaklanmıştır [62, 63].

İlaç taşınması farmasötik bileşiklerin insan veya hayvanlarda terapötik etkiye ulaşabilmek için uygulanma yöntem veya prosesidir [64]. İlaçlar (peptid, protein, antikor, aşı ve gen bazlı ilaçlar) konvansiyonel yöntemlerle taşınamayabilirler, terapötik olarak etkili oldukları moleküler boyut ve yük nedeniyle enzimatik degradasyona karşı duyarlı olabilir veya sistemik sirkülasyona yeterli etkinlikte absorbe olmayabilirler. Bu nedenle, birçok çalışma ilacın sadece vücudun hedef bölgesinde (tümör dokuları) aktif olduğu hedeflendirilmiş taşımaya ve kontrollü bir şekilde belli bir zaman periyodu içerisinde gerçekleşen uzatılmış salım (*sustained release*) formülasyonlarına odaklanmıştır. İlaç hedeflendirme ve uzatılmış ilaç salımı için çok çeşitli doğal ve sentetik biyoparçalanabilen polimerler araştırılmıştır [44, 65].

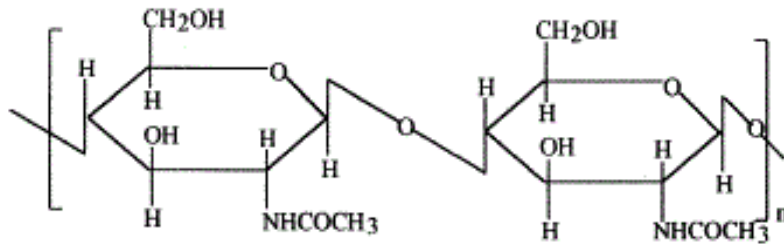
PLGA üstün özellikleri ile mikropartiküller, nanopartiküller, implantlar gibi çok çeşitli biyoparçalanabilir cihazların formüle edilmesi amacı ile kullanılmaktadır [44, 66].

Hücreçi ve mikron altı boyutları sayesinde nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin ilaç taşınmasında ayırıcı birçok özelliğe sahiptir. Nanopartiküller ince kılcal damarlardan nüfuz eder, epitelyal duvardan penetrasyonla (delik açma) geçer ve genellikle hücreler tarafından etkili bir şekilde alınırlar [67]. Bu terapötik ajanların etkili bir şekilde vücuttaki hedef bölgeye (organ veya doku) taşınmasına izin verir. Nanopartiküller enkapsüle edilen ajanın salımını nispeten daha kısa sürede ilaç salımı yapan doğal polimerlerle karşılaştırıldığında günlerden haftalara kadar uzatabilme avantajına sahiptir [65]. Bu özellikleri sayesinde, PLGA nanopartiküller birçok medikal uygulama için büyük bir potansiyele sahiptir ve hala etkin bir araştırma konusudur.

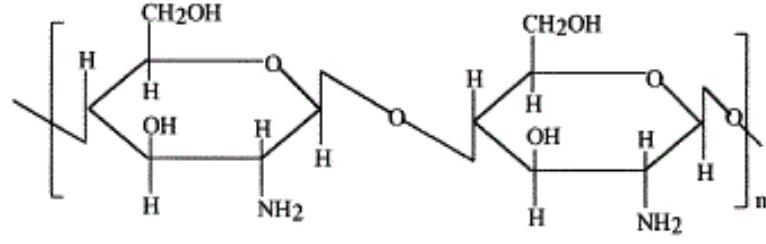
2.3.1.2.2. Kitosan

Kitosan, kitinin N-deasetillenmiş türevidir. Kitin, selülozdan sonra dünyada en çok bulunan ikinci doğal biyopolimerdir. Kitosan yapı olarak selüloza benzer bir polimerdir. Her ikisi de doğrusaβ -(1-4)-bağlı monosakkaritlerden meydana gelir. Bununla beraber kitosanın selüloza göre önemli farkı kitosanın glikozid bağlarıyla bağlanan 2-amino-2-deoksi-β-D-glukan yapısı taşımasıdır. Bu yapı polimerin genelinin %50'sinden fazlasını oluşturuyorsa yapı kitosan, yapının % 50'sinden fazlasını N-asetil-glukozamin oluşturuyorsa yapı kitin ismini alır [68]. Doğada bol bulunuşu, kitin ve onun bir türevi olan kitosanın kendilerine özgü kimyaları ile birleştiğinde pek çok potansiyel uygulamaları ortaya çıkmaktadır. Kitin; kabukluların, böcek dış iskeletlerinin, mantar hücre duvarlarının, mikrofauna ve planktonun bir bileşeni olarak bulunmaktadır. Kimyasal olarakβ(1 - 4)2-asetamido-2-deoksi-D-glukoz (veya N-asetil glukozamin) tekrarlanan birimlerinden oluşan bir polimerdir [69].

Şekil 2.5.'te kitin ve kitosanın kimyasal yapıları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



A



B

Şekil 2.5. Kimyasal yapıları (A) kitin, (B) kitosan [69]

Kitin ve kitosanın ticari olarak ilgi görmeleri yüksek oranda (%6.89) azot içermelerindedir (sentetik selüloz için bu oran %1.25'dir.). Bu yüksek azot oranı kitini yararlı bir şelat ajanı yapar. Günümüzde kullanılan polimerlerin pek çoğu sentetik malzemelerdir. Fakat bunların biyoyuşabilirlikleri ve biyoparçalanabilirlikleri, selüloz, kitin, kitosan gibi doğal polimerlere nazaran oldukça sınırlıdır. Bu doğal polimerlerin de reaktiviteleri ve işlenebilirlikleri sınırlıdır. Bu konuda kitin ve kitosan uygun fonksiyonel malzemeler olarak tavsiye edilmektedirler. Çünkü bu doğal polimerler, biyoyumluluk, biyoparçalanabilirlik, toksik olmama, adsorpsiyon gibi mükemmel özelliklere sahiptirler [69].

Kitosan; biyoyumluluk, antibakteriyal, antifungal ve antitümoral etki, hemostatik, ağır metal, protein ve yağ absorpsiyonu, biyoparçalanabilirlik gibi özellikler nedeniyle birçok alanda yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu kullanım alanlarının başında kontrollü ilaç salımı, biyosensör uygulamaları, hücre kültürü, gıda ve su arıtım sistemleri yer almaktadır. Selüloz, dekstran, pektin, aljinik asit, agar, agaroz ve karragenan gibi pek çok doğal polisakkarit nötr veya asidiktirler. Yalnız kitin ve kitosan son derece bazik polisakkaritlerdendir. Nötr veya bazik pH'da, kitosan serbest amino grupları içerir ve suda çözünmez. Oysaki asidik pH'da, kitosan amino fonksiyonlarının protonlaşmasından dolayı suda çözünür. Çözünürlük, serbest amino ve N-asetil gruplarının dağılımına bağlıdır. Kitosan asidik pH'da doğrusal bir elektrolitdir. Sonuç olarak kitosan asetik asit, formik asit gibi seyreltik asitlerde çözünür [69]. Kitinin azot içeriği deasetillenme derecesine bağlı olarak %5 ile %8 arasında değişmektedir. Doğal olarak kitinin tüm birimleri tamamen

asetillenmiş halde değildir; yaklaşık %16'sı deasetillenmiş haldedir. Kitosandaki azot da çoğunlukla birincil alifatik amino grupları şeklinde bulunmaktadır. Bu yüzden kitosan aminlerin tipik reaksiyonlarına maruz kalırlar; ki en önemlileri N-asetilasyon ve Schiff reaksiyonudur [70].

Kitosanın ilaç salım sistemlerinde kullanımının araştırıldığı birçok çalışma olmasına rağmen, kitosanın bu alanda kullanımı için bazı dezavantajlarının bulunduğu da bilinmektedir. Bu dezavantajlar, kitosanın seyreltik asetik asit hariç yaygın organik çözücüler içinde çözünmemesi, düşük mekanik özelliklere sahip olması ve ayrıca fiziksel özelliklerinin pH'ya çok bağlı olmasıdır. Bu nedenle kitosanın bir ilaç taşıyıcısı olarak kullanılması durumunda, özellikle ağızdan ilaç alınımında insan vücudunun iç organlarının belirlediği farklı pH değerleri altında ilaç salım davranışının kontrolü zor olmaktadır. Bu sebeple, ilacın aşırı salımının insan vücudunda hastalık etkilerine sebep olması olası bir durumdur. Diğer taraftan, kitosanın diğer polimerlerle karıştırılması yoluyla modifikasyonu, pratik kullanımlarda, fiziksel özelliklerinin geliştirilmesi için elverişli ve etkili bir metottur.

2.4. Nanopartiküllerin Özelliklerinin İlaç Taşınmasına Etkisi

2.4.1. Partikül Büyüklüğü

Nanopartiküler sistemlerin en önemli özelliği partikül boyutu ve boyut dağılımıdır. Bu özellikler nanopartikül sistemlerinin *in vivo* dağılımını, biyolojik ömrünü, toksisitesi ve hedeflenme yeteneğini belirler. Ayrıca ilaç yükleme etkinliğini, ilaç salımını ve nanopartiküllerin stabilitesini de etkiler. Birçok çalışma ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan mikron altı boyuta sahip nanopartiküllerin mikropartiküllere oranla birçok avantajı olduğunu göstermiştir [44].

Nanopartiküller mikropartiküllerle karşılaştırıldığında yüksek hücre içine alım ve küçük boyutları ve mobiliteleri sayesinde biyolojik hedeflere ulaşmada daha başarılı oldukları gözlenmiştir. Desai ve ark. Caco-2 hücre hattı ile yaptığı çalışmalarda 100 nm boyutta nanopartiküllerin hücre içine alınımının 1 µm boyuttaki mikropartiküllerden 2,5 kat daha fazla, 10 µm mikropartiküllere göre ise 6 kat fazla olduğu gösterilmiştir [71]. Bunu takip eden çalışmada ise, *in situ* rat intestinal loop modelinde mikropartiküllerin büyük bir çoğunluğu epitelyum duvarında

lokalize olurken nanopartiküllerin submukozal tabakalardan penetre olduğu gözlenmiştir [72].

Ayrıca nanopartiküllerin hiperozmatik mannitole sıkı geçitlerden kan beyin bariyerini geçtiği belirlenmiştir, bu sayede beyin tümörleri gibi tedavisi zor hastalıklarında terapötik ajanların taşınması sağlanabilecektir. Yapılan çalışmalar ile Tween 80 kaplı nanopartiküllerin kan beyin bariyerini geçtiği gösterilmiştir [73].

Bazı hücre hatlarında sadece mikronaltı nanopartiküller hücre içine etkin bir şekilde alınırken daha büyük boyutlardaki mikropartiküller alınamamaktadır [74].

İlaç salımı da partikül büyüklüğünden etkilenir. Daha küçük partiküller daha geniş yüzey alanına sahiptir bu nedenle ilacın büyük bir kısmı partikül yüzeyi ile ilişkili veya yüzeyine yakın olacaktır bu durum ilaç salımının hızlı olmasını sağlar. Oysa daha büyük partiküller büyük çekirdeklere sahip olduğundan daha çok ilaç enkapsülasyonuna izin verecek ve daha yavaş dışarı difüze olacaktır [75].

Küçük partiküller, nanopartikül dispersiyonunun saklama ve taşınması sırasında daha yüksek agregasyon riski taşırlar. Mümkün olan en küçük boyut fakat maksimum stabiliteye sahip nanopartikül formüle etmek her zaman karşılaşılan en büyük zorluktur.

Günümüzde kullanılan en hızlı ve en rutin partikül boyutu ölçme yöntemi foton korelasyon spektroskopisi ve dinamik ışık saçılma yöntemleridir. Foton korelasyon spektroskopisinde ortamın vizkozitesinin bilinmesi gerekir ve partikülün çapını Brown hareketi ve ışık saçılma özellikleri ile belirler. Foton korelasyon spektroskopisi ile elde edilen sonuçlar taramalı veya geçimli elektron mikroskopisi ile doğrulanır (SEM veya TEM).

2.4.2. Yüzey Özellikleri

Nanopartiküller intravenöz olarak uygulandığında immün sistem tarafından kolaylıkla tanınır ve sirkülasyondan fagositoz aracılığı ile uzaklaştırılırlar. Partikül

boyutu haricinde nanopartiküllerin kan bileşenleri, özellikle proteinler (opsoninler) tarafından absorbe edilme miktarlarını yüzey hidrofobiklikleri belirler. Bu da nanopartiküllerin *in vivo* kaderini etkiler [10, 76]. Bu opsoninlerin nanopartiküllerin yüzeyine bağlanması opsonizasyon olarak tanımlanır ve nanopartiküllerle fagositler arasında bir köprü gibi rol oynar. Konvansiyonel taşıyıcılarla ilaçların ilişkisi ilacın biyodağılım profilinde modifikasyona neden olur, özellikle karaciğer, dalak, akciğer ve kemik iliği gibi mononükleer fagositler sistemi (MPS) organlarına iletilir. Yüzeyi modifiye edilmemiş nanopartiküller (konvansiyonel nanopartiküller) kan akışına girdiklerinde hızlıca opsonize olur ve makrofajlar tarafından uzaklaştırılırlar.

Bu nedenle, nanopartiküllerle hedeflendirilmiş ilaç taşınma olasılığını artırmak için, opsonizasyonu en aza indirmek ve nanopartiküllerin *in vivo* sirkülasyonunu uzatmak gerekir.

Bunun için,

- a) Hidrofilik polimerler/sümfaktanlarla nanopartikül yüzeylerinin kaplanması,
- b) Nanopartiküllerin polietilen glikol (PEG), polietilen oksit, poloksamer, poloksamin ve polisorbata 80 (Tween 80) gibi hidrofilik segmentleri olan biyoparçalanabilir kopolimerlerle hazırlanması gibi işlemler yapılabilir.

Çalışmalar nanopartikül yüzeyindeki PEG tabakasının opsonin uzaklaştırıcı fonksiyonu olduğunu göstermiştir. PEG yüzeyindeki fırça yapısı ve ara yapılandırmaları fagositozu ve kompleman aktivasyonunu azaltır [12].

Nanopartiküllerin zeta potansiyeli genellikle nanopartiküllerin yüzey yük özelliklerini karakterize etmek için kullanılır. Partiküllerin elektriksel potansiyellerini ifade eder ve partiküllerin kompozisyonundan ve disperse edildiği ortamdan etkilenir. Zeta potansiyelleri (+/-) 30 mV değerlerinde olan nanopartiküller süspansiyon içerisinde stabildir. Yüzey yükü partiküllerin agregasyonunu engeller. Zeta potansiyel ayrıca yüklü aktif materyallerin partiküllerin içine mi hapsedildiği yoksa yüzeyine mi adsorbe olduğu hakkında bilgi verir.

2.4.3. İlaç Yükleme

Başarılı bir nanopartikül sistemi yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olmalıdır böylece uygulamada kullanılan matriks materyalinin miktarını azaltır.

İlaç yükleme iki yöntemle yapılmaktadır:

- Nanopartikülün üretimi ile eş zamanlı olarak ilaç yükleme (hapsetme yöntemi)
- Konsantre ilaç solüsyonunun taşıyıcı ile inkübe edilerek nanopartikülün üretiminden sonra ilacın absorbe edilmesi (adsorpsiyon/absorbsiyon yöntemi)

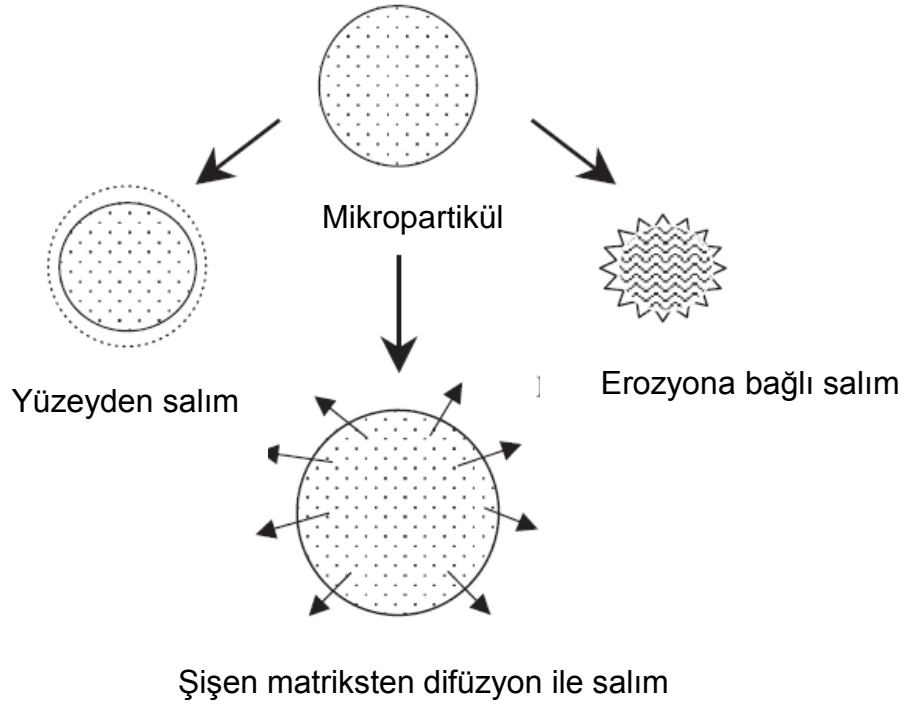
İlaç yükleme ve hapsetme etkinliği matris materyali veya polimer içerisindeki katı faz ilaç çözünürlüğüne bağlıdır ki bu polimer kompozisyonu, moleküler ağırlık, ilaç polimer etkileşimi ve fonksiyonel son grup (ester veya karboksil) varlığıyla ilişkilidir [77-79]. Makromolekül veya protein, minimum çözünürlük maksimum adsorbsiyona sahip olduğu izoelektrik noktasında en iyi yükleme etkinliği gösterir [35]. Küçük moleküller için, yapılan çalışmalarda ilaç yüklemesini arttırmak için ilaç ve matris materyali arasındaki iyonik etkileşimin kullanılmasının etkili bir yol olduğu görülmüştür.

2.4.4. İlaç Salımı

Uygun bir nanopartikül sistemi geliştirmek için ilaç salımı ve polimer degradasyonu önemli faktörlerdir.

Genellikle ilaç salım hızı:

1. İlacın çözünürlüğü
2. Yüzeğe bağlanmış/adsorbe olmuş ilacın desorbsiyonu
3. Nanopartikül matriksinden ilacın difüzyonu
4. Nanopartikül matris erozyonu/degradasyonu
5. Erozyon ve difüzyon proseslerinin kombinasyonuna bağlıdır [80].



Şekil 2.6. Partiküler sistemlerden ilaç salım mekanizmaları[81]

Böylece, çözünürlük, difüzyon ve matris materyallerinin biyodegradasyonu salım prosesini kontrol eder. Nanokürelerde ilacın uniform olarak dağıldığı durumlarda salım, sink koşullar altında difüzyon veya matriksin erozyonu ile gerçekleşir. Eğer ilacın difüzyonu matris erozyonundan hızlı ise salım mekanizması çoğunlukla difüzyon prosesi ile kontrol edilir. Hızlı ön salım (*rapid initial release*) veya patlama (*burst*) zayıf bağlanmış veya nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olmuş ilacın salımını ifade eder. Soppimath ve ark. hazırladığı derlemede yükleme yönteminin salım profilini etkilediği açıkça gösterilmiştir. Eğer ilaç hapsedme yöntemi ile yüklenirse sistem nispeten daha az patlama etkisi gösterir ve daha iyi uzatılmış salım özellikleri gösterir. Eğer nanopartikül polimer ile kaplı ise salım ilacın merkezden polimerik membran boyunca difüzyonu ile kontrol edilir. Membran kaplama salım için bir bariyer gibi görev yapar böylece polimer membran içerisindeki ilacın çözünürlük ve difüze olabilirliliği ilaç salımını kontrol eden faktör haline gelir. Buna ek olarak salım hızı ilaç ve eklenen yardımcı maddeler arasındaki iyonik etkileşimden etkilenir. İlaç daha az suda çözünür bir kompleks oluşturmak için yardımcı maddeler ile etkileşim içerisinde olduğunda ilaç salımı neredeyse hiç ani salım (*burst effect*) olmadan çok yavaş salım gerçekleştirir [82].

İlaçların *in vitro* salım çalışmaları için kullanılan çeşitli yöntemler:

- (1) Yapay veya biyolojik membranlar ile yan yana difüzyon hücreleri
- (2) Diyaliz torbası difüzyon tekniği
- (3) Ters diyaliz torbası tekniği
- (4) Ajitasyonu takiben ultrasantrifüj/santrifüj
- (5) Ultra-filtrasyon ve santrifüjlü ultra filtrasyon teknikleri

Genellikle salım çalışmaları kontrollü ajitasyonu (çalkalanma) takiben santrifüj işlemi ile gerçekleştirilir. Zaman alması ve nanopartiküllerin salım ortamından ayrılması sırasında karşılaşılan teknik zorluklar nedeni ile genellikle diyaliz tekniği tercih edilir.

2.5. Kanser

Kanser, vücuttaki hücrelerin anormal ve kontrolsüz gelişerek vücudun normal fonksiyonlarını aksatması ve vücudun diğer bölümlerine yayılması ile sonuçlanabilen bir hastalıktır. Kanseri hücreleri vücudun diğer bölgelerine kan ve lenf sistemi ile yayılabilir. Yüzden fazla farklı kanser tipi bulunmaktadır. Kanseri tipleri genellikle hastalığın başladığı organ veya hücre ile isimlendirilir. Örneğin, kolonda başlayan kanser kolon kanseri, derinin bazal hücrelerinde başlayan kanser tipine bazal hücre karsinoması adı verilir. Kanseri tipleri daha kapsamlı kategorilerde sınıflandırılabilir.

Kanseri ana kategeorileri:

- **Karsinoma** deride veya bu hat dokularda başlayan ya da iç organları kapsayan kanser türleridir.
- **Sarkoma** kemik, kıkırdak, yağ, kas, kan, damarlar veya diğer bağ veya destek dokularda başlayan kanser türleridir.
- **Lösemi** kemik iliği gibi kan yapıcı dokularda başlayan ve yüksek miktarda anormal kan hücresinin üretilerek kana karışmasına neden olan kanser türleridir.
- **Lenfoma ve miyeloma** immün sistem hücrelerinde başlayan kanser tipidir.
- **Santral sinir sistemi kanserleri** beyin ve spinal kord dokularında başlayan kanser türleridir [83].

Bütün kanser türleri hücrede başlar. Kanseri anlamak için normal hücreler, kanser hücresine dönüşürken meydana gelen mekanizmayı anlamak önemlidir. Vücut çok farklı tiplerde hücrelerden meydana gelmiştir. Bu hücreler büyür ve canlılığın devamını sağlamak için kontrollü olarak bölünürler. Hücreler yaşlandığında veya zarar gördüğünde, ölümler ve yerlerini yeni hücreler alır. Bununla birlikte, bazen bu düzenli proses yanlış gidebilir ve hücrenin genetik materyali (DNA) zarar görebilir veya değişime uğrayabilir, mutasyona uğramak normal hücrelerin büyümesi ve bölünmesini etkiler. Kontrolsüz şekilde bölünen hücrelerin oluşturduğu bu doku kitlesine tümör denir.

Tüm tümörler kanserli değildir, tümörler benign veya malign olabilir.

- Benign tümörler kanserli değildir. Bu tip tümörler uzaklaştırılabilir ve çoğu vakada nüksetmezler. Benign tümör hücreleri vücudun başka bölgelerine yayılmazlar.
- Malign tümörler kanserlidir. Bu tip tümör hücreleri yakın dokulara ve vücudun diğer bölgelerine yayılabilirler. Kanserin, vücudun bir bölgesinden başka bir bölgeye yayılmasına metastaz adı verilir.

Bazı kanserler tümör formunda değildir. Örneğin, lösemi kemik iliği ve kan kanseridir [84].

2.5.1. Tümörün Yapısı

Neoplastik dokular interstisyel, vasküler ve hücresel olarak üç alt kompartmana ayrılabilir. Tümörlerin damar oluşumu heterojendir, nekroz veya kanamalar gösteren bölgeler hızlı tümör büyümesi (anjyogenez) için yeterli besin ve oksijen kaynağını sürdürebilmek için yoğun bir şekilde vaskülarize olmuşlardır [85]. Tümör kan damarları, normal fizyolojik damarlarla karşılaştırıldığında genellikle endotelial hücrelerde nispeten yüksek hızda çoğalma, kıvrılma artışı, perisitlerde eksiklik ve atipik bazal membranı içeren bazı anormalliklere sahiptir [86, 87]. Tümörün artırılmış damar geçirgenliğinin vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), bradikinin, nitrik oksit, prostaglandinler ve matris metalloproteinazlar gibi çeşitli mediatörler tarafından düzenlenmiş olduğu düşünülmektedir. Makromoleküler taşıma tümörün damarları boyunca açık boşluklar, veziküller

vakuoler organeller (VVO) ve penetrasyon yoluyla gerçekleşir [88]. Ancak hangi yolların tümörün hiperpermeabilite ve makromoleküler transvasküler taşımada ağırlıklı olarak sorumlu olduğu tartışma konusu olmaya devam etmektedir.

Tümör interstisyel kompartmanı ağırlıklı olarak kollajen ve elastik fiber ağlardan meydana gelmiştir [89]. Bu çapraz bağlı yapı içerisinde dağılmış interstisyel sıvı ve makromoleküler bileşenler (hiyaluronat ve proteoglikanlar) bulunur ve hidrofilik jel formundadır. İntersitisyum normal dokulara benzemez, yüksek interstisyel basıncın neden olduğu dışa doğru konvektif interstisyel sıvı akışı ile karakterize edilir. Bundan dolayı, antikanser ilacın interstisyum içerisinde taşınması interstisyumun fizyolojik (ör; basınç) ve fizikokimyasal (ör; kompozisyon, yapı, yük) özellikleri ve molekülün fizikokimyasal özellikleri (boyut, konfigürasyon, yük, hidrofiliklik) tarafından kontrol edilir [89].

Terapötik ajanları *in vivo*'da tümör hücrelerine taşımada aşılması gereken bazı sorunlar bulunmaktadır:

- Fizyolojik bariyerler nedeniyle tümör seviyesinde ilaç direnci (hücresel esaslı olmayan mekanizmalar)
- Hücresel seviyede ilaç direnci (hücresel mekanizmalar)
- Antikanser ilaçların vücutta dağılması, biyo-dönüşümü ve temizlenmesi

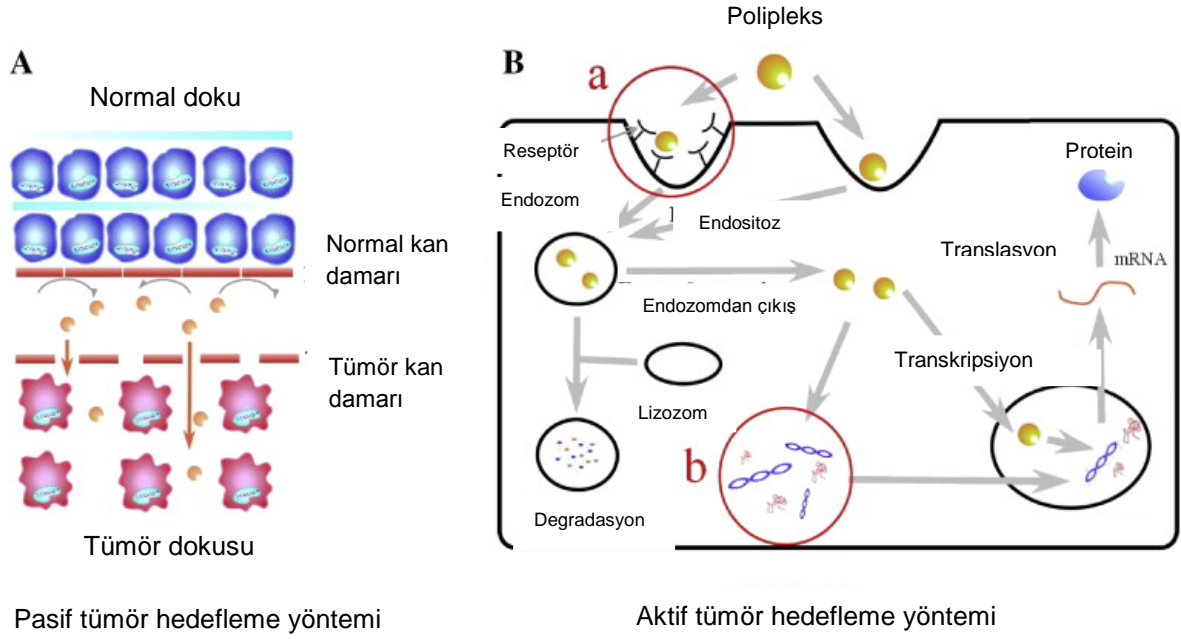
Kemoterapide, klinik ilaç direnci hem tümör boyutunun küçülmemesi hem de başlangıçta verilen pozitif yanıt sonrasında klinik olarak kötüye gitmek olarak tanımlanabilir.

İlk olarak hücresel olmayan ilaç direnç mekanizmasında zayıf vaskülarize tümör bölgeleri ile tümöre ilaç girişi etkili bir şekilde azaltılabilir, böylece kanserli hücreler sitotoksiteden korunur. Ayrıca tümörlerde asidik ortam basit ilaçlara karşı direnç mekanizması sağlar. Hücresel membranlardan difüzyonunu engellemek için bu bileşenler iyonize edilebilir. Yüksek interstisyel basınç ve düşük mikrovasküler basınç moleküllerin ekstrasvazyonunu geciktirir veya engeller [90].

Ayrıca, tümörlerin terapötik müdahaleye karşı direnci hücresel mekanizmalardan dolayı da olabilir, malign hücrelerin biyokimyasındaki uzun süreli değişiklikler olarak kategorize edilebilir. Bunlar, değiştirilmiş spesifik enzim sistemleri (ör;

topoizomeraz aktivitesi), değiştirilmiş apoptoz düzeni veya çoklu ilaç direncinden sorumlu protein veya çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinlerden P-glikoprotein'in dışı akış sistemi gibi taşıma esaslı mekanizmaları içerir [91] (Şekil 2.7).

Son olarak, antikanser ilaçlar çok geniş hacimlerde olacak şekilde dağılırlar. Kansere mücadele için kullanılan ilaçlar hem tümör hücreleri hem de normal hücreler için toksiktir, bu sebeple genellikle kemoterapinin etkinliği önemli yan etkiler nedeniyle sınırlıdır.



Şekil 2.7. Tümörün yapısı, aktif ve pasif hedefleme yöntemleri [92]

2.5.2. Kanser Tedavisi

Kanser dünya çapında en yüksek ölüm oranına sahip hastalıklarından biridir. 2007 de dünya çapında 7.021.000'nin üzerinde ölüme neden olmuştur ve ölümlerin %12,5'ine neden olan ikinci ölümcül hastalıktır [93].

Geçtiğimiz yıllarda kanser tedavisinde önemli gelişmeler olmasına rağmen günümüz teşhis ve tedavi yaklaşımları ağırlıklı olarak invazif (yani rastgele biyopsiler ve cerrahi müdahaleler), ışın tedavisi ve kemoterapötik ajanlar gibi basit, spesifik olmayan tekniklere dayanmaktadır [94]. Kanser ölümcül bir hastalık olmaya devam etmektedir ve günümüz terapötik yaklaşımları bu hastalığın kötü giden seyrini iyileştirmede henüz yeterli değildir.

Radyoterapi cerrahi müdahaleye ek olarak kullanılan bir tedavi yöntemidir. Tümör içeren belirli bir alan üzerinde uygulanan özel bir tür iyonize enerji kullanır. İyonlaştırma enerjisi kanser hücrelerinin nükleer genetik materyaline zarar verir böylece düzgün bir şekilde çoğalmalarını önler. Buna rağmen radyoterapi sadece hedeflendirildiği bölgede çalışır, eğer hedeflendirildiği alan dışında mutasyona uğramış hücreler bulunuyorsa tedavi ile yok edilemeyecektir. Bu da genellikle çoklu tedavi gerektirmektedir ve bunun sonucunda radyoterapiye ek olarak birçok yan etki eşlik eder [95].

En yaygın olarak bilinen kanser tedavisi ise kemoterapidir. Kemoterapi kanser hücreleri ve kemik iliği, sindirim sistemi ve kıl foliküllerinden bazı sağlıklı hücreleri de içeren hücresel bölünme hızının yüksek olduğu tüm hücreleri öldürerek mücadele eder. Kemoterapinin radyoterapiye göre üstünlüğü tüm vücutta etkili olmasıdır, böylece birincil ve ikincil tümör bölgelerini ortadan kaldırır. Kemoterapi intravenöz, oral, topikal ve intratumoral olmak üzere dört farklı yolla verilir. Ancak, kanser hücrelerinin tamamen yok edilebilmesi için kemoterapi kullanmak sıklıkla yetersiz kalmaktadır. Radyoterapi gibi kemoterapi hastaları kanser hücrelerinin ortadan kaldırılabilmesi için çoklu tedaviye ihtiyaç duyar.

Antikanser terapötikler çoğunlukla suda çözünmez ve enjekte edilebilen çözücüler olarak uygulanmaları için bir organik çözücüde çözülmeleri gerekir. Organik çözücüler toksiktir ve yan etkileri vardır. Antikanser ilaçların düşük molekül ağırlığında olması hızlı atılımı ve zayıf terapötik indeks ile sonuçlanır, bu durum bu ilaçların kanser hastalarına artan dozlarla uygulanmasını gerektirir, bu nedenle sitotoksikite ve diğer yan etkilerin artmasına neden olmaktadır. Ek olarak, kemoterapötik ilaçlar yalnız uygulandıklarında spesifiklikten yoksundur ve bu nedenle kanser olmayan dokularda önemli derecede hasara neden olurlar, bu

durum kemik iliği baskılanması, saç kaybı (alopesi) ve bağırsak epitel hücrelerinin dökülmesi de dahil olmak üzere birçok istenmeyen yan etki ile sonuçlanır[95].

2.5.3. Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji

Tıpta nanoteknoloji kullanımı veya nanotıp, genel olarak sağlık hizmetleri, özellikle kanser teşhis ve tedavisinde birçok açıdan etkileme potansiyeline sahiptir.

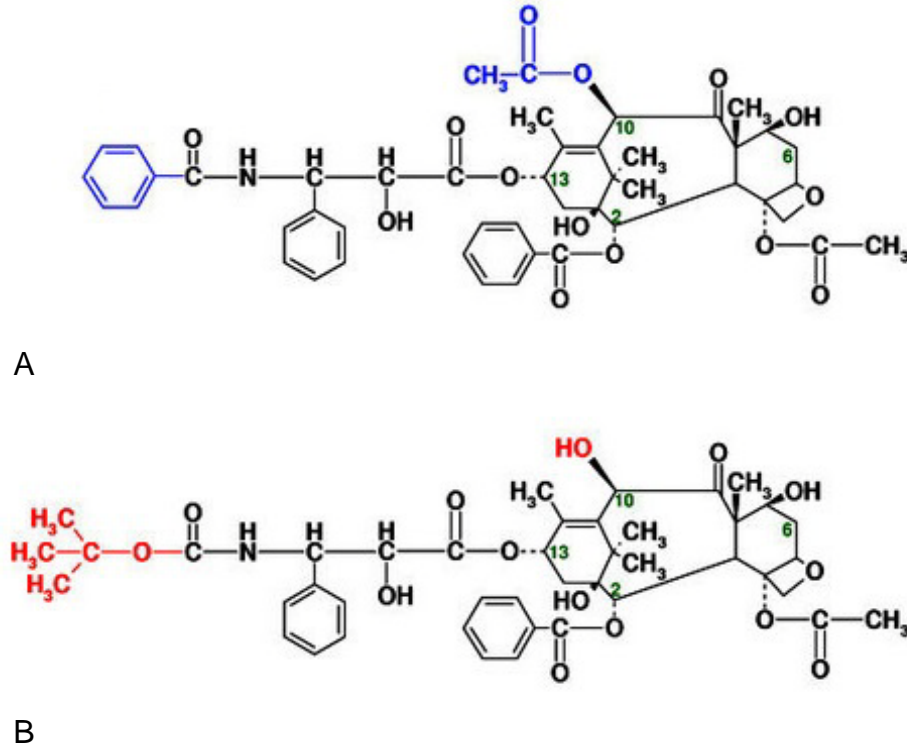
Nanopartiküller kemoterapötik ajanların birçok çeşidini hapsetmek ve daha iyi etkinlik, daha az toksisite için bu ajanların direkt ve spesifik olarak tümör bölgesine hedeflendirmesi amacıyla tasarlanabilirler [96-100]. Dahası nanopartiküllerin boyut ve yüzey özelliklerinin ayarlanabilir olması opsonizasyona uğramalarını önler böylece kan sirkülasyonunda uzatılmış bir mekanizma sağlar [101-104]. Nanopartiküllerin bu özellikleri onları nanotıpta en çok çalışılan sistemlerden biri yapmıştır.

Kanser tedavisinde en kritik noktalardan biri tümör hücreleri metastaz olmadan önce erken seviyelerde teşhis edebilmektir. Birçok kanser tipi eğer erken evrede teşhis edilebilirse etkili bir şekilde tedavi edilebilecek ve hastada tam iyileşme elde edilebilecektir. Maalesef erken evrede teşhiste önemli bazı sorunlar bulunmaktadır, çünkü kanserin ölümcül evreye ilerlemesinden önce klinik semptomlar çok nadir olarak gözlenebilmektedir. Etkili tarama ve kanserin seyri için minimal yayılma gösteren, kullanıcı dostu teknolojiler gerekmektedir. Kemoterapötik ilaçların taşınması kadar birçok kanser tipinin tanısal görüntülemesini geliştirmek için çok çeşitli nanopartikül bazlı teknolojiler geliştirilmektedir. Hedeflendirilmiş ilaç taşınması invaziv cerrahi müdahale ve radyasyon terapisine ihtiyacı ortadan kaldırmaya yardımcı olacaktır, daha duyarlı görüntüleme stratejileri erken teşhis ve daha iyi prognosise izin verecektir [105-108].

Böylece yüksek duyarlılıkta ve spesifik nanopartikül bazlı optik görüntüleme platformu geliştirmek kanser önleme, teşhis ve tedavisinde devrim niteliğinde bir etki yaratabilecektir [94].

2.6. Doksetel

2.6.1. Tarihsel Gelişimi ve Yapısı



Şekil 2.8. Paklitaksel (A) ve dosetakselin (B) yapısı. Farklılıklar mavi ve kırmızı ile işaretlenmiştir [109]

Taksol, yeni doğal antikanser bileşikler bulmak üzere NCI tarafından değişik birçok bitkinin tarandığı bir program kapsamında, ABD'de yetişen *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan 1971 yılında izole edilmiştir [110]. Bu yıldan sonra üzerinde yapılan yoğun çalışmalar sonucunda taksol; 1983 yılında faz I, 1985 yılında faz II çalışmalarına alınmıştır.

Taksol, FDA tarafından 1992 yılı içinde ovaryum ve 1994 yılında meme kanserli hastalara verilmek üzere ruhsatlandırılmıştır. Preparatı TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Company, New York, NY) olarak isimlendirilirken etkin maddesine paklitaksel (*paclitaxel-PTX*) (Şekil 2.8) adı verilmiştir [111].

1985 yılında taksolün yarisentez ile temini çalışmaları sırasında, taxotere adı verilen bir taksol analogu sentezlenmiştir. 1990 yılında faz I, 1992 yılında faz II çalışmalarına alınmıştır. Taxotere 1996 yılında antikanser ilaç olarak ruhsatlandırılmıştır. Preparatı TAXOTERE (Rhone-Poulenc Rorer Pharmaceutical, Inc., Collegeville, PA.) olarak isimlendirilirken etkin maddesine dosetaksel (*docetaxel-DTX*) (Şekil 2.8) adı verilmiştir [111]. DTX taksoid familyasına ait bir antikanser ajandır. Paklitakselin analogu olan DTX Avrupa'ya ait porsuk ağacı olan *Taxus baccata L.*'den ekstrakte edilen 10-deasetil bakkatin III yarisentezi ile elde edilir ve mikrotübül polimerizasyonunun inhibitörü olarak paklitakselden daha etkili olduğu gösterilmiştir [112]. Molekül ağırlığı 807,9 g/mol' dür. DMSO ve etanolde çözünürken, sudaki çözünürlüğü oldukça düşüktür. Paklitaksel ile karşılaştırıldığında iki modifikasyon sunar: bir hidroksil grubunun bakkatin III'ün 10'pozisyonu üzerindeki 3' asetil grubu ile yer değiştirmesi ve bir OC(CH₃)₃ grubunun C-13 yan zinciri ile yer değiştirmesidir. Bu iki yapısal modifikasyondan dolayı DTX paklitaksel ile karşılaştırıldığında suda daha yüksek çözünürlük ve tübülünlere karşı daha yüksek afinite göstermektedir [113].

2.6.2. Farmakokinetik Özellikleri

Yapılan çalışmalarla dosetakselin lineer farmakokinetik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Farmakokinetik parametreler Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Dosetaksele ait farmakokinetik parametreler [114]

Parametre	Dosetaksel (100mg/ m ² , 1sa)
-----------	---

t1/2 (dak)	4
t1/2 (dak)	36
t 1/2 (sa)	11.2
CL (L/sa/m ₂)	21
Cmax (mol/L)	4.7
AUC (mol/L • h)	5,69
Vss(L/m ₂)	67.3
Proteine bağlanma (%a)	>95
48 h idrarla atılımı (% doz)	<10
48 h feçesle atılımı (% doz)	70

2.6.3. Etki Mekanizması

Sitotoksik ajanların taksan sınıfının ikinci üyesi olan DTX, meme, over, prostat ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi pek çok maligniteye karşı antitümör etkisi gösterir [115]. Yapılan çalışmalar DTX'in PTX'den daha avantajlı olduğunu göstermiştir. *In vitro* çalışmalar hücre replikasyonunun inhibisyonunda DTX'in PTX'den 2,5 kat fazla potansiyeli olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni kısmen DTX'in hücre mitozunu hem S hem G2/M fazında engelleme yeteneği varken PTX'in yalnızca G2/M fazında engelleme yeteneğine sahip olmasından kaynaklanmaktadır [116] [117]. Buna ilave olarak, DTX hücre içine alımının daha iyi, hücreden atılmasının daha yavaş olması ve tümör dokusundan daha uzun terminal eliminasyon yarı ömrü sayesinde tümör hücrelerinde PTX'e oranla daha uzun alıkonma zamanına sahiptir [118].

Dosetaksel üç ayrı yolla çalışarak doğrudan veya dolaylı olacak şekilde apoptoza (programlı hücre ölümüne) neden olur. Dosetakselin temel terapötik etkisi mikrotübül dinamiklerinin baskılanmasıdır (birleştirme ve ayırma). Diğer yöntemler ise hücre siklusunun bozulması ve Bcl-2' nin fosforilasyonudur.

- DTX mikrotübüler ağı bozar.

Taxotere® hücrelerdeki, mitotik ve interfaz hücresel fonksiyon için zorunluluk olan, mükrotübüler ağı bozulmasında rol alan antineoplastik bir ajandır.

Boş tübülünleri bağlayarak tübülünlerin stabil mükrotübüller halinde birleşmesini destekler ve eş zamanlı olarak ayrılmalarını inhibe eder. Bu aktivite normal fonksiyonu olmayan mükrotübül yığınları üretimine ve mikrotübüllerin stabilizasyonuna sebep olur, bu durum hücrelerde mitozun inhibisyonu ile sonuçlanır.

- Hücre siklusunun birden çok fazını engeller.

Mikrotübül yapısını etkilemesinin yanısıra DTX hücrelerin yaşam döngüsündeki 3 fazı engelleyerek çalıştığı düşünülmektedir. Hücre döngüsünü S (*synthesis*) fazı, G2 (*growth 2*) fazı ve M (*mitotic*) faz aşamalarında bloke etmektedir. S fazında DNA eşlenmesi olmakta, G2 fazında büyümekte ve M fazında bölünmek için hazır hale gelmektedir. Hücre döngüsünün bu üç fazının engellenmesi ile DTX hücrelerin bir sonraki faza ilerlemesini olanaksız hale getirmekte, böylelikle apoptozisi tetiklemektedir.

- Bcl-2 fosforilasyonunu indükler.

DTX'in üçüncü yolu ise Bcl-2' nin fosforilasyonunu indükleyerek apoptozisi başlatmasıdır. Kanser hücrelerinde Bcl-2'nin yüksek ekspresyonu, apoptozisi önlemektedir. DTX Bcl-2 fosforilasyonunu sağlayarak inaktive eder ve hücre ölümünün gerçekleşmesini sağlar. Bu *in vitro* değerlendirme MCF-7 meme kanseri hücre hattını da içeren insan hücre hatlarında yapılmıştır [119].

2.6.4. Klinik Kullanımı

DTX suda çözünmediği için formülasyonlarında oldukça güçlü çözücü kullanılmıştır. Paklitaksel %50 alkol ve %50 Cremophor EL (Polioksietillenmiş hint yağı) içinde, dosetaksel ise polisorbat 80 (Tween 80) içinde hazırlanmıştır [111].

Dosetaksel faz I'e 1990 yılında girmiştir. Doz sınırlayıcı toksisite nötropeni olmuştur. Bazı vakalarda çok sık ve şiddetli olmamakla birlikte mukozitis ve ateş bildirilmiştir. Dosetakselin formülasyonu paklitaksel'den farklı olduğu için HSR'nin

daha az görülmesi beklenilmiştir. Bu nedenle faz I çalışmalarında premedikasyon uygulanmadan ilaç verilmiştir. 1992'de faz II çalışmaları başlamıştır.

Dosetaksel faz II çalışmalarında premedikasyon uygulanmadan 100 mg/m² dozda bir saatlik infüzyon şeklinde üç haftada bir tekrarlanarak uygulanmıştır [120-122].

Dosetakselin ana kullanımı antrasiklin bazlı kemoterapi ile başarı elde edilemeyen kanser türlerinin tedavisidir. Taxotere olarak pazarlanan dosetaksel temelde meme, prostat ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserine yönelik tedavide kullanılmaktadır [123]. Ayrıca klinik bulgular dosetakselin meme, kolorektal kanseri, akciğer, ovaryum, prostat, karaciğer, renal, gastrik, baş ve boyun kanseri, melanomaya karşı sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir [124].

Meme kanserleri

Dosetaksel metastatik meme kanserinde tek başına kullanılan aktif bir maddedir. Özellikle antrasiklin ile uygulanan standart tedavinin başarısız olduğu hastalarda belirgin etkinlikleri görülmüştür [111, 120, 121].

Dosetaksel ile yapılan çalışmalarda meme kanserinde %50-68 oranında başarı sağlanmıştır. Daha önce kemoterapi almış hastalarda cevap oranları %29-57'ye düşerken, daha önceden antrasikline karşı dirençli olan hastalarda ise belirgin derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Dosetakselin meme kanserindeki optimum dozu henüz saptanamamıştır. Paklitaksel ile karşılaştırıldığında, her iki bileşiğin meme kanserinde etkili olduğu görülse de genellikle dosetaksele karşı alınan yanıt paklitakselden daha fazladır. Günümüzde yapılan çalışmalarla her iki taksoit maddenin diğer tedavi protokollerinde yer alan maddelerle karşılaştırmalı ve beraber tedavileri üzerine araştırmalar devam etmektedir [122, 125, 126].

Ovaryum kanserleri

Dosetakselin ovaryum kanseri üzerine etkinliğini gösteren birkaç çalışma vardır. Daha önce platin türevleri ile tedavi edilmiş hastalarda dosetakselin cevap oranı %26'dır. Bu sebeple dosetakselin diğer antikanser maddelerle birlikte uygulanması planlanmıştır [121, 122].

Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

Dosetakselin 100 mg/m² dozu ile faz IV'de kemoterapiye cevap vermeyen hastalarda %38 oranında cevap alınmıştır. Ancak çok şiddetli nötropeni gelişmiştir. Bu çalışma ile dosetakselin ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanserine karşı önemli bir antitümör ilaç olduğu kabul edilmiştir. Dosetaksel küçük hücreli olmayan akciğer kanseri çalışmaları içinde doksorubusin, vinorelbin, etoposid ve irinotekan ile de beraber denenmektedir [127-129].

Baş ve Boyun Kanseri

Dosetakselin, skuamöz hücreli baş ve boyun kanserlerinde tek başına kullanıldığında orta düzeyde aktivite gösterdiği görülmüştür. Dosetaksel'in 100 mg/m² ve 60 mg/m² dozlarında bir saatlik infüzyonları ile yüksek dozda %36, düşük dozda %37 oranında iyileşme bildirilmiştir. Dosetakselin sisplatin, florourasil ve leukovorin ile beraber kullanılması sonucu çok iyi aktivite gösterdiği tespit edilmiştir [120, 122].

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Asetonitril	Merck, Almanya
Aseton	Merck, Almanya
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Biochrom, Almanya
Dosetaksel	Koçak Farma, Türkiye
Etil asetat	Merck, Almanya
Metanol (HPLC grade)	Sigma Aldrich, ABD
Metiltiyazoliltetrazolium (MTT)	Sigma, Almanya
PLGA (50:50) (Resomer RG 502)	Boehringer Ingelheim, Almanya
PLGA (50:50) (Resomer RG 502 H)	Boehringer Ingelheim, Almanya
PLGA (50:50) (Resomer RG 503)	Boehringer Ingelheim, Almanya
PLGA (50:50) (Resomer RG 503 H)	Boehringer Ingelheim, Almanya
Polivinil alkol (Mw:30 000-70 000 Da)	Sigma [®] , ABD

3.1.2. Kullanılan Aletler

ELISA okuyucu	VERSA max, Molecular Devices, ABD
Etüv	Dedeoğlu, Türkiye

Hassas Terazi	Shimadzu, Japonya Mettler Toledo, İsviçre
HPLC Sistemi	Agilent Technologies 1200 Series, ABD
İnkübatör (MCO-18AIC)	Sanyo, Japonya
Kolon (Inertsil ODS-3; 4,6mmx250mmx5µm)	GL Sciences Inc.
Laminar hava akımlı kültür kabini	BHG 2000 S/D Faster, İtalya
Liyofilizatör	Heto PowerDry PL3000, Jouan, Danimarka
Manyetik Karıştırıcı	Variomag Telesystem, Almanya Heidolph, Almanya
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Ölçüm Cihazı	Zetasizer Nanoseries ZS, Malvern Instruments, İngiltere
pH metre	Sartorius PP-20, Almanya
Santrifüj Aleti	Hermle Z383 K, Almanya
Termostatlı Yatay Çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Ultra Saf Su Sistemi	Simplicity 185-Milipore, ABD
Vorteks	Nüvemix, Türkiye
Yüksek hızlı homojenizatör	Ultraturrax T25 Basic, IKA, Almanya

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Dosekselin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

In vitro koşullardaki miktar tayini ters faz HPLC yöntemi ile yapılmıştır. DTX'in miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Dosetaksel miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar

Sabit faz	Inertsil ODS-3(4,6mmx250mmx5µm)
Hareketli faz A	% 60 Asetonitril
Hareketli Faz B	% 40 Ultra saf su
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Akiş hızı	1,0 mL/dk
Kolon sıcaklığı	25±0,5°C
Dedektör, Dalga Boyu	UV, 227 nm

3.2.1.1. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgün ve tekrarlanabilir olduğunu garanti etmek için uygulanan prosedürdür. Metot validasyonu, kullanılan analitik yöntemin güvenilirliğinin teminatıdır [130]. HPLC analitik yönteminin değerlendirilmesinde aşağıdaki parametreler incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır.

- Doğrusallık (*Linearity*)
- Doğruluk (*Accuracy*)
- Kesinlik (*Precision*)
- Duyarlılık (*Sensitivity*)
- Özgünlük (*Specificity*)

3.2.1.1.1. Doğrusallık (*Linearity*)

Doğrusallık, bir analitik yöntemin belirli bir aralıkta, analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının direkt olarak orantılı olmasını sağlama yeteneğidir [131] .

Bu amaçla 5 mg etkin madde 50 ml metanol içinde çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 µg/ml konsantrasyonlarda DTX içerecek şekilde 6 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir.

3.2.1.1.2. Doğruluk (*Accuracy*)

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığını ifade eder [131]. DTX'in miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (intra-assay) ve deneyler arası (inter-assay) doğruluğunun değerlendirilmesinde aşağıda verilen formül kullanılmıştır [132] (Formül 3.1) .

$$\% \text{ Bağıl Hata} = \frac{\text{Konsantrasyon} - \text{Tayin edilen konsantrasyon}}{\text{Konsantrasyon}} \times 100$$

(Formül 3.1)

Deney içi doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5, 5, 20 µg/ml), her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Deneyler arası doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5, 5, 20 µg/ml), her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden üç gün tayin edilmiştir.

3.2.1.1.3. Kesinlik (*Precision*)

Kesinlik, bir analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesinin ölçümü olarak tanımlanır [131]. Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Kesinlik, yalnız tesadüfi hataların dağılımı ile ilişkilidir, gerçek değerlerle ilgisi yoktur. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı konsantrasyonda numune ardı ardına ölçülerek, örnekler için varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak değerlendirilir. Kesinlik, tekrarlanabilirlik (*repeatability*) ve tekrar elde edilebilirlik (*reproducibility*) olarak ifade edilir [130] .

3.2.1.1.3.1. Tekrarlanabilirlik (*Repeatability*)

Kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır.

Tekrarlanabilirliğin tespiti için, kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5, 5, 20 µg/ml) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile altı kez ayrı ayrı analiz edilip, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen derişimler için VK değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için VK'nın %2'den küçük olması önerilmektedir [131] .

3.2.1.1.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik (*Reproducibility*)

Aynı konsantrasyondaki çözeltiden hareketle, aynı laboratuvar, aynı araştırmacı ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenir. Üç farklı konsantrasyon düzeyinde uygun sayıda bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün ve farklı günlerde gerçekleştirilir.

Deney içi tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5, 5, 20 µg/ml) her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Deneyler arası tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5, 5, 20 µg/ml) her bir

konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden üç gün tayin edilmiştir.

Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen derişimler için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında VK %2'den küçük olmalıdır [130] .

3.2.1.1.4. Duyarlılık (*Sensitivity*)

3.2.1.1.4.1. Saptama Sınırı (*Limit of Detection*)

Analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer, sinyal:gürültü oranınının 3:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir [131, 132].

3.2.1.1.4.2. Miktar Tayin Sınırı (*Limit of Quantification*)

Analitik yöntemin belirlenen şartlarda, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Bu değer, sinyal:gürültü oranınının 10:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir [131, 132] .

3.2.1.1.5. Özgünlük (*Specificity*)

Bir analitik yöntemin özgünlüğü; ortamda bulunan etkin madde dışındaki yardımcı maddelerin, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında, analiz edebilme yeteneğini göstermektedir, sayısal olarak ifade edilmez [133]. Bu ölçütlerin değerlendirilmesine yönelik olarak formülasyonda kullanılan diğer maddelerin (PLGA, PVA) formülasyonda buldukları konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromatogramları incelenmiştir. Ayrıca, ilaç yükleme ve *in vitro* salım çalışmalarında etkin madde yüklü nanopartikül formülasyonlarına uygulanan işlemler, boş nanopartiküllere de uygulanarak HPLC kromatogramları elde edilmiştir.

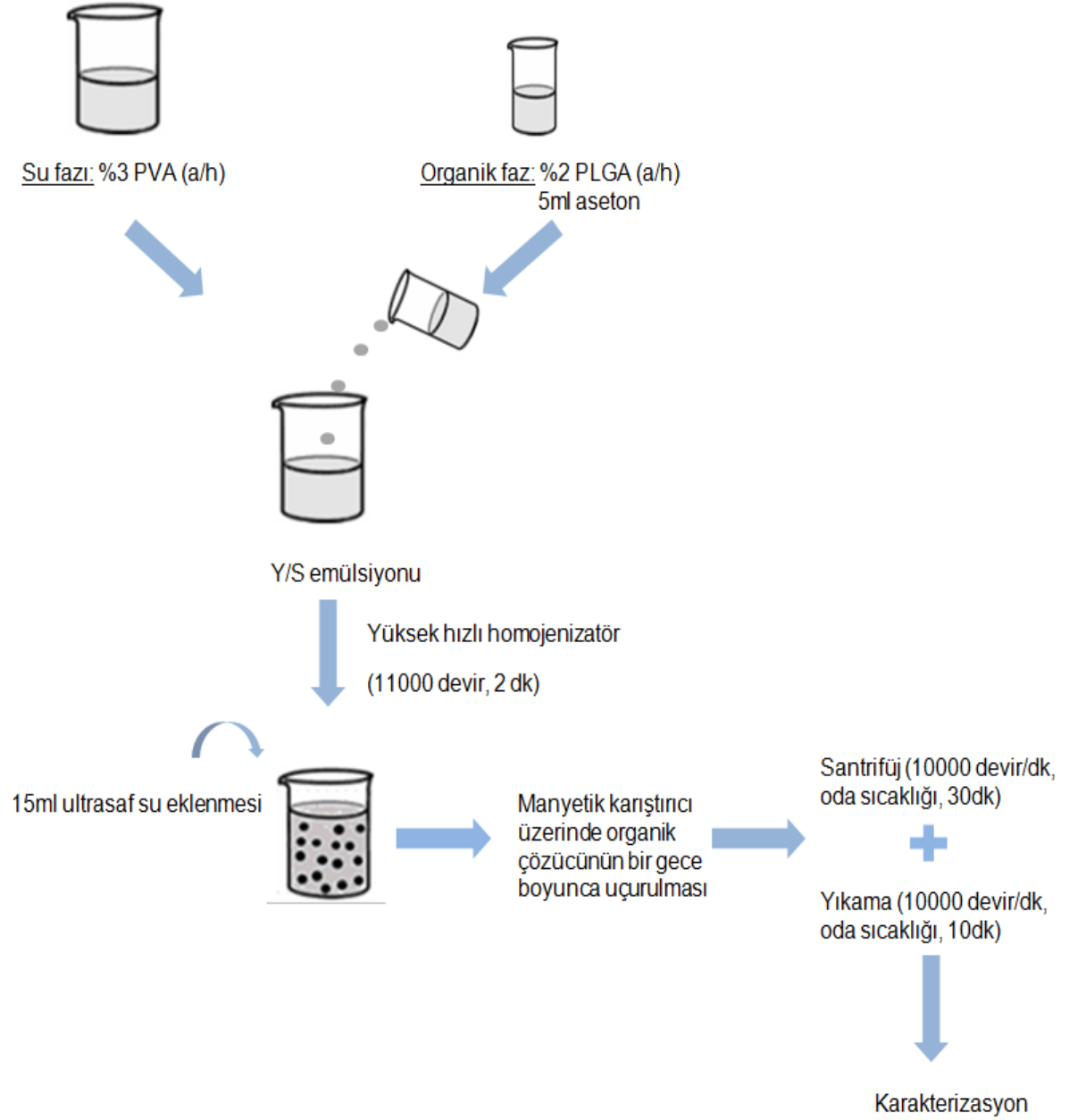
3.2.2. Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları

3.2.2.1. Boş PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Nanopartiküller emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır.

Tez çalışmasında boş olarak hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyonu yapılarak, dozetaksiel yüklü nanopartiküller ile boyut ve zeta potansiyelleri karşılaştırılmıştır.

Konsantrasyon %2 (a/h) olacak şekilde 5 ml aseton içerisinde PLGA (RG502H) çözülerek organik faz hazırlanmıştır. 10 ml %3 (a/h) konsantrasyonda polivinil alkol (PVA, ortalama moleküler ağırlık 30000-70000) ile ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda su fazı hazırlanmıştır. PVA çözeltisi oda sıcaklığına getirilmiştir. 10 ml PVA çözeltisi üzerine 5 ml PLGA çözeltisi hızlıca eklenmiştir. Karışım yüksek hızlı homojenizatör ile 2 dk, 11000 devir/dk hızda homojenize edilmiştir. Üzerine 15 ml ultra saf su eklenmiş ve Y/S emülsiyonu oluşturulmuştur. Bir gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde organik çözücünün uçması sağlanmıştır. Oluşan nanopartiküller 10000 devir/dakika'da 30 dk santrifüjlenerek çöktürülmüş, santrifüj sonrası süpernatant ayrılmıştır. Fazla PVA'nın uzaklaştırılması için 10 ml ultra saf su eklenerek 10 dakika 10000 devir/dakika'da santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant ayrılarak çöken nanopartiküllerin üzerine 20 ml saf su eklenerek tekrar süspansiyon edilmiştir.



Şekil 3.1. Boş PLGA nanopartiküllerin hazırlanması

3.2.2.2. Doseksel Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

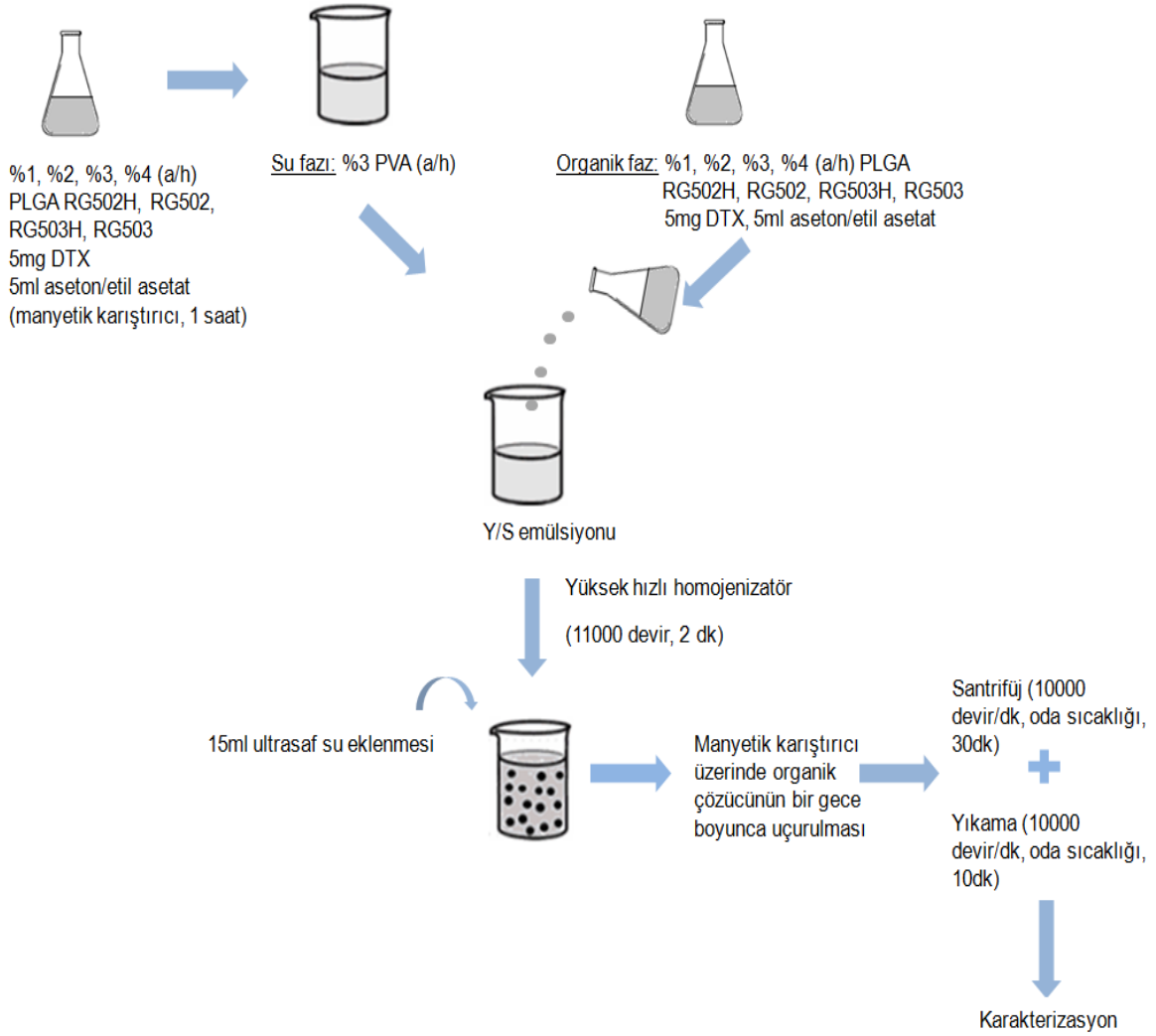
Doseksel yüklü nanopartiküller emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Etkin madde organik faz olarak kullanılan etil asetat, aseton gibi çözücülerde kolaylıkla çözünebilir lipofilik bir madde olması nedeni ile Y/S tekli emülsiyon oluşturulmuştur.

Tez çalışmasında farklı çözücüler, farklı PLGA resomerleri ve polimer yüzdeleri ile hazırlanan dosetaksel yüklü nanopartiküller; boyut, zeta potansiyel, ilaç yükleme etkinliği ve uygun bulunan formülasyonların salım profilleri bakımından karşılaştırması yapılmıştır.

Organik faz; PLGA RG502H (%1, %2, %3, %4 a/h), PLGA RG502 (%2 a/h), PLGA RG503H (%2 a/h), PLGA RG503 (%2 a/h) ve 5 mg dosetaksel 5 ml aseton ve ayrıca etil asetat içerisinde 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda çözüldürülmüştür.

Su fazı; 10 ml %3 (a/h) konsantrasyonda polivinil alkol (PVA, ort. molekül ağırlığı 30000-70000), manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözüldürülmüştür.

Organik faz ve su fazı oda sıcaklığına getirilmiştir. Emülsiyon oluşturmak için 10ml PVA çözeltisi üzerine 5 ml PLGA - dosetaksel çözeltisi hızlıca eklenmiştir. Karışım, yüksek hızlı homojenizatörde, 11000 devir/dk, 2 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Elde edilen emülsiyon üzerine difüzyon için 15 ml ultra saf su eklenmiştir. Y/S emülsiyonu oluşturulmuştur. Bir gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde organik çözücünün uçması sağlanmış ve oluşan nanopartiküller 10000 devir/dakika'da 30 dk santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası süpernatant ayrılmıştır. Fazla PVA'nın uzaklaştırılması için 10 ml ultra saf su eklenerek 10 dakika 10000 devir/dakika'da santrifüjlenmiştir. Çöken nanopartiküller son konsantrasyon %5 olacak şekilde mannitol içeren ultra saf su ile tekrar süspand edilerek tamamen dağılması sağlanmıştır. Hazırlanan örnekler bir behere konularak, 48 saat liyofilize edilmiştir. *In vitro* salım çalışmaları ve hücre kültür çalışması yapılmak üzere +4 ' de saklanmıştır. Dosetaksel yüklü nanopartiküllerin hazırlanması Şekil. 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Dostaksel yüklü nanopartiküllerin hazırlanması

3.2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Tez çalışmasında hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri foton korelasyon spektroskopisi ve lazer dopler anemometri esasına göre çalışan Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Her formülasyon için ardarda altı ölçüm yapılmıştır. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25 ve ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.3.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonların yükleme etkinliği doğrudan nanopartikül içerisinde bulunan ilaç miktarı veya dolaylı olarak serbest halde bulunan ve nanopartikül içerisine girmeyen ilaç miktarının tayini ile hesaplanabilir.

Süpernatanda serbest halde bulunan yüklenmemiş etkin madde miktarının tayininde Bölüm 3.2.1'de "*DTX'in Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini*" başlığı altında anlatılan HPLC tekniği kullanılmıştır. Toplam süpernatant hacmi tespit edildikten sonra, gerekli seyreltmeler yapılmıştır ve yeterli miktarı 0,45 µm por çaklığı na sahip enjektör filtresinden süzülerek analiz gerçekleştirilmiştir.

Santrifüj sonrası elde edilen nanopartiküllere yüklenen DTX miktarının direkt tayininde ise, ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Nanopartiküller etkin maddenin kolaylıkla çözüldüğü metanol içinde tekrar süspand edildikten sonra 30 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur. Bu sırada, nanopartiküllerin parçalanması, etkin maddenin ise, metanol fazına geçmesi beklenmektedir. 30 dakika sonunda, elde edilen örnek 0,45 µm por çaklığına sahip enjektör filtresinden süzülüp, etkin madde miktar tayini için Bölüm 3.2.1'de "*DTX'in Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini*" başlığı altında anlatılan HPLC tekniği kullanılmıştır.

Yükleme etkinliğinin tayini, ortama eklenen etkin madde ile nanopartikül formülasyonuna yüklenen etkin madde miktarları kullanılarak hesaplanır.

Etkin maddenin yüklenme etkinliği (% YE) ve yükleme kapasitesi (% YK) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (Formül 3.2, 3.3).

$$\%YE = \frac{\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Serbest etkin madde miktarı}}{\text{Toplam etkin madde miktarı}} \times 100$$

(Formül 3.2)

$$\%YK = \frac{\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Serbest etkin madde miktarı}}{\text{Nanopartikül ağırlığı (mg)}} \times 100$$

(Formül 3.3)

3.2.3.3. *In Vitro* Salım Deneyleri

Salım deneyleri ısıtılıcı su banyosunda $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, yatay çalkalayıcı 100 devir/dk hızda olacak şekilde yapılmıştır. Salım ortamı olarak %0,1 konsantrasyonda polisorbata 80 içeren pH 7,4 PBS çözeltisi hazırlanmıştır.

100 mg liyofilize toz nanopartiküller falkon tüplere tartılarak üzerine 5 ml salım ortamı eklenmiştir. 1., 2., 4., 8. ve 24. saatlerde, takip eden günlerde ise bir hafta boyunca günlük örnekler alınmıştır. Alınan örnekler 13500 devir/dk hızda 30 dk santrifüjlenmiş süpernatant ayrılarak üzerine 5 ml taze salım ortamı eklenmiş ve nanopartiküller tekrar süspand edilmiştir. Ayrılan örnekler 0,45 µm por açıklığına sahip enjektör filtresinden süzölmüştür. Bölüm 3.2.1'de "*DTX'in Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini*" başlığı altında anlatılan HPLC tekniği kullanılarak nanopartikül formülasyonundan salınan ilaç miktarı tayin edilmiştir.

3.2.4. Sitotoksosite Çalışmaları

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) içerisinde fenol kırmızısı bulunmayan hücre kültür ortamı veya tuz solüsyonunda hazırlandığında sarımtırak bir çözelti oluşturan, suda çözünen bir tetrazolyum tuzudur. Çözünmüş haldeki MTT aktif hücrelerin mitokondrial dehidrogenaz enzimleri tarafından çözünmez özellikteki mor formazan kristallerine dönüştürülür [134]. Suda çözünmeyen bu formazan kristalleri izopropanol veya başka çözücüler kullanılarak çözünür ve çözünen materyal spektrofotometrik yolla ölçülür [135].

Çalışmada sitotoksosite değerlendirmesi MTT testi ile yapılmıştır [136]. Dose-taksel yüklü nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksosite çalışmaları için ticari MCF-7 (insan meme karsinomu) hücreleri kullanılmıştır. Kültür ortamı olarak %10 (h/h) FBS, 50

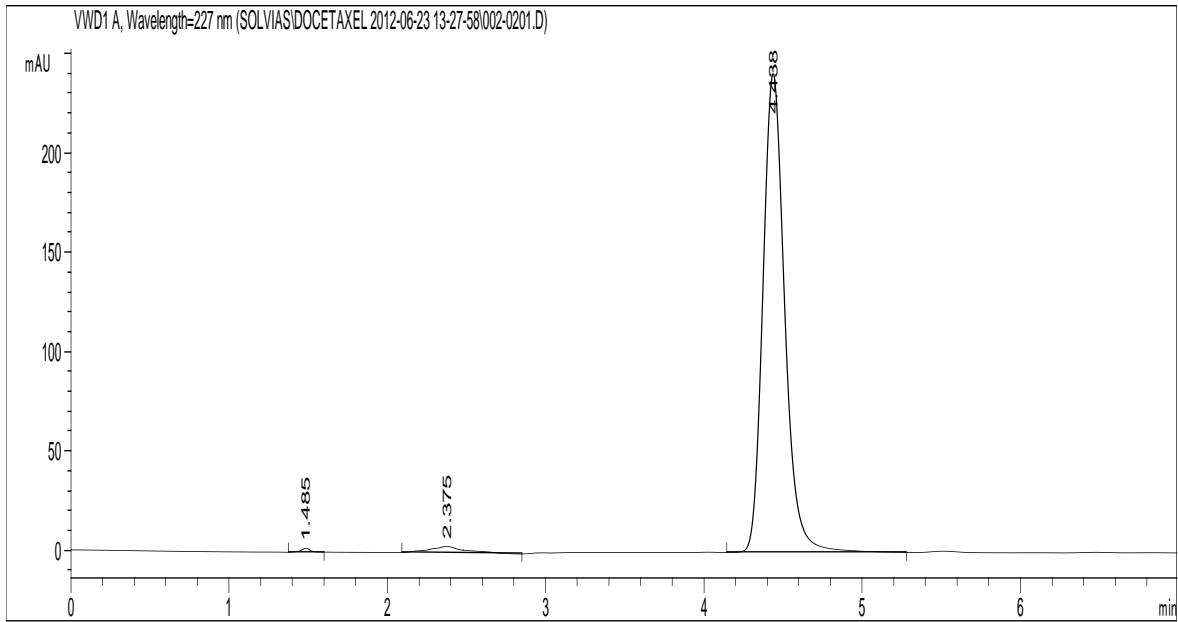
$\mu\text{g/ml}$ penisilin-streptomisin ve 2 mM L-glutamin içeren DMEM kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plaklara ekilen MCF-7 hücreleri inkübatörde (37 °C, %5 CO₂) 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonunda kültür ortamı uzaklaştırılarak %1 DMSO içeren kültür ortamı ile 10 nM dosetaksel içeren 100 μl dosetaksel çözeltisi, aynı miktarda dosetaksel içeren dosetaksel yüklü nanopartikül süspansiyonu ve içerisinde ilaç içermeyen boş nanopartikül süspansiyonu kuyucuklara eklenmiştir (n=12). Örnekler 48 saat inkübe edilmiş ve 25 μl MTT çözeltisi (5 mg/ml) eklenmiştir. Canlı olan hücrelerin MTT'yi sarı renkten koyu mavi renkli formazan kristallerine çevirmesi için 4 saat inkübasyon yapılmıştır.

İnkübasyon sonrasında, hazırlanan %23 SDS (a/h) içeren %45 DMF (h/h) çözeltisinden 80 μl kuyucuklara eklenmiştir. Plaklar inkübatörde bir gece bekletilmiş ve her bir kuyucuktaki canlı hücre sayısı 570 nm dalga boyunda bir ELISA mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. Doksetalin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

DTX'in HPLC ile miktar tayini Bölüm 3.2.1'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiş ve DTX'e ait aşağıdaki pik elde edilmiştir (Şekil 4.1). Kromatogramdan da görüldüğü gibi DTX'e ait pik düzgün bir şekilde elde edilmiş ve alıkonma zamanı 4,4 dakika olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. 10 µg/ml dosetaksele ait HPLC kromatogramı. Enjeksiyon Hacmi: 20 µl, Akış hızı: 1 ml/dk, Kolon fırını sıcaklığı: 25 ± 0,5°C, Mobil faz: Asetonitril : Ultra saf su (60:40), Kolon: Inertsil ODS-3, Partikül iriliği: 5 µm Uzunluk: 250 mm İç çap: 4.6 mm, Dalga boy 227 nm, Dedektör: UV dedektör

10 µg/ml konsantrasyonda dosetaksel çözeltisi ile yapılan sistem uygunluk testleri sonucunda aşağıdaki değerler elde edilmiştir.

Alıkonma süresi: 4,438 dk

Pik simetrisi: 0,803

Teorik tabaka sayısı: 4956,96

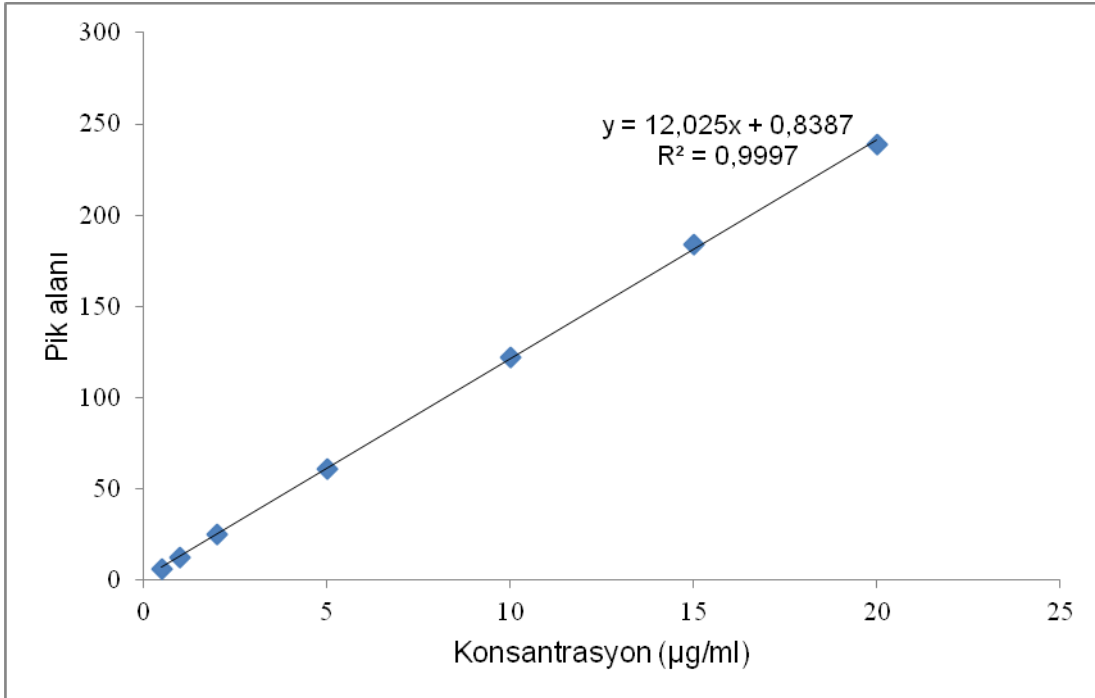
Kapasite faktörü: 1,99

4.1.1. Analitik Yöntem Validasyonu

4.1.1.1. Doğrusallık

DTX'e ait kalibrasyon doğrusu HPLC analizleri sonucunda Bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı gibi hazırlanmış ve her birinde 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 µg/ml konsantrasyonda DTX olan çözeltiler kullanılarak elde edilmiştir. Çalışmalar 6 seri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonundan sonra elde edilen pik alanları çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusuna ait denklem lineer regresyon ile bulunmuştur. DTX'in HPLC ile miktar tayininde lineer regresyon verileri Çizelge 4.1'de gösterilmekte olup, kalibrasyon doğrusu ve denklemi ise Şekil 4.2'de yer almaktadır.

Tanımlayıcılık katsayısı $R^2 = 0,9997$ olarak bulunarak denklemin doğrusallığı gösterilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Dosetakselin kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6)

Çizelge 4.1. Dosetakselin HPLC ile miktar tayininde elde edilen regresyon verileri (n=6)

Parametre	Sonuç
Konsantrasyon aralığı	0,5 - 20 µg/ml
Eğim (m)	12,025
İntersept (n)	0,8387
Tanımlayıcılık katsayısı (R²)	0,9997

4.1.1.2. Doğruluk

Kullanılan analitik yöntemin gün içi (intra-assay) ve günler arası (inter-assay) doğruluğuna ilişkin veriler, Bölüm 3.2.1.1.2'de anlatıldığı şekilde, % ortalama bağıl hatalar hesaplanarak elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusunda yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0.5, 5, 20 µg/ml), hazırlanmış olan üç adet çözeltinin absorpsiyonları ölçülmüş ve ölçülen konsantrasyon ile % bağıl hatalar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Dosetakselin gün içi ve günler arası doğruluğu

	Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Gerçek konsantrasyon (µg/ml) ± SS	% Ortalama Bağıl Hata (Doğruluk)
Gün İçi	0,5	0,493 ± 0,010	1,41
	5	4,984 ± 0,019	0,33
	20	19,787 ± 0,055	1,06
Günler arası	0,5	0,507 ± 0,011	1,37
	5	4,952 ± 0,031	0,97
	20	19,832 ± 0,116	0,84

4.1.1.3. Kesinlik

4.1.1.3.1. Tekrarlanabilirlik

Analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi için Bölüm 3.2.1.1.3.1'de anlatıldığı gibi, hazırlanan standart çözeltilerin absorbansları üçer kez arka arkaya HPLC'de okunarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ilaç konsantrasyonları arasındaki varyasyon katsayısı hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Hesaplanan varyasyon katsayıları %2'den küçük bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Doseksel için analitik yöntemin tekrarlanabilirlik sonuçları

Teorik Konsantrasyon (µg/ml)	Pik Alanı	Gerçek konsantrasyon (µg/ml)	X ± SS	VK%
0,5	6,7	0,496	0,490 ± 0,005	0,979
	6,8	0,496		
	6,7	0,487		
5	60,8	4,986	4,970 ± 0,017	0,335
	60,4	4,953		
	60,6	4,970		
20	239,9	19,880	19,822 ± 0,052	0,262
	239	19,806		
	238,7	19,781		

4.1.1.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik

Kullanılan analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliğinin incelenmesi için Bölüm 3.2.1.1.3.1'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. VK'nın %2'den küçük bir değere sahip olması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Dosetakselin gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları (n=3)

	Teorik konsantrasyon (µg/ml)	Gerçek konsantrasyon (µg/ml) ± SS	% VK (Kesinlik)
Gün İçi	0,5	0,493 ± 0,010	2,043
	5	4,984 ± 0,019	0,376
	20	19,787 ± 0,055	0,275
Günler arası	0,5	0,507 ± 0,011	2,242
	5	4,952 ± 0,033	0,623
	20	19,832 ± 0,116	0,587

4.1.1.4. Duyarlılık

Dosetakselin HPLC ile miktar tayininde kullanılan yöntemin duyarlılığı Bölüm 3.2.1.1.4'de belirtildiği gibi tespit edilmiştir.

a) Saptama Sınırı

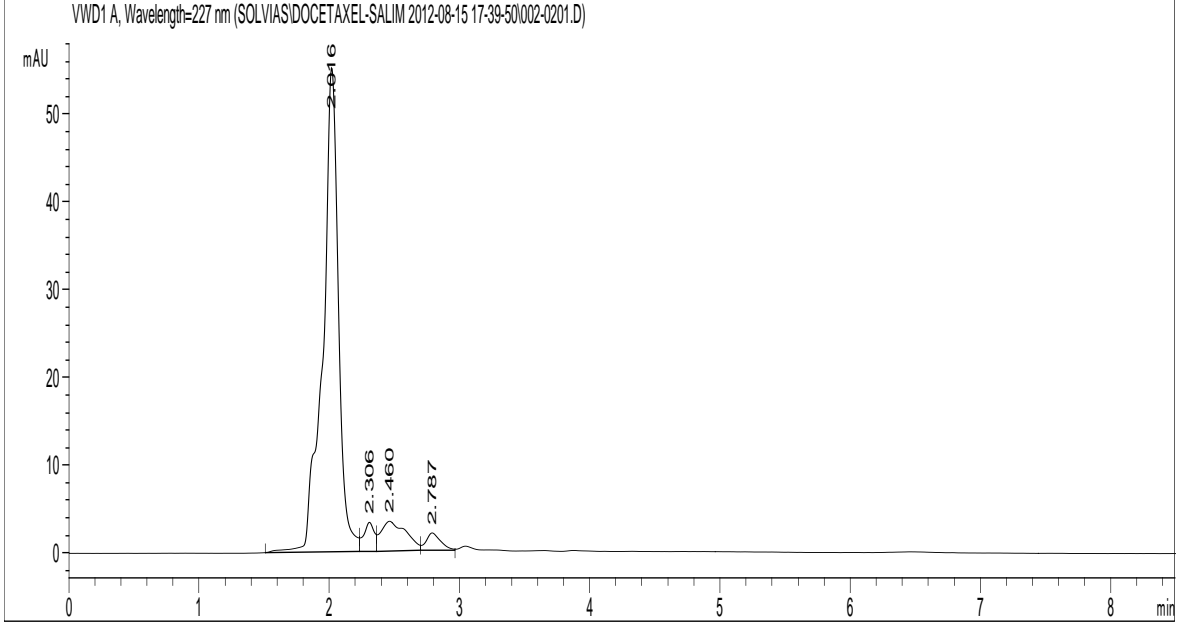
Saptama sınırı, analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Dosetakselin saptama sınırı 0,032 µg/ml olarak bulunmuştur.

b) Miktar Tayin Sınırı

Dosetakselin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon 0.108 µg/ml saptanmıştır.

4.1.1.5. Özgünlük

Bölüm 3.2.1.1.5'de açıklandığı şekilde, hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelerin ilaç ile aynı şartlarda pik verip vermediğinin belirlenmesi için HPLC kromatogramları alınmıştır. Formülasyonda kullanılan PVA, PLGA gibi maddelerin, dosetaksel ile aynı şartlarda pik vermediği görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Yükleme etkinliği ve *in vitro* salım çalışmalarında elde edilen boş PLGA nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları

4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.2.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

4.2.1.1. Boş PLGA Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli

Hazırlanan boş nanopartiküllerin partikül boyutları, zeta potansiyelleri Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Hazırlanan boş nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri (n=6)

%3 PVA					
%2 PLGA	Partikül Boyutu		PDI	Zeta Potansiyel	
Aseton	(nm)			(mV)	
n = 6	Ort±SS	%VK	Ort±SS	Ort±SS	%VK
	182,55 ± 2,62	1,43	0,06 ± 0,02	-20,65 ± 0,35	1,71

4.2.1.2. Doseksel Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli

Hazırlanan doseksel yüklü nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutları ve zeta potansiyelleri Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Aseton ile hazırlanan doseksel yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyelleri (n=3)

Formülasyonlar		Partikül Boyutu (nm)		PDI	Zeta Potansiyel (mV)	
PLGA Yüzdesi	PLGA Tipi	Ort±SS	%VK	Ort±SS	Ort±SS	%VK
1%	RG502H	153,8± 1,35	0,88	0,18±0,01	-24,6±5,30	21,54
2%	RG502H	211,2±4,53	2,15	0,15±0,03	-22,7±0,36	1,59
3%	RG502H	229,1± 3,84	1,67	0,13±0,06	-21,7±2,19	10,11
4%	RG502H	241,7± 3,35	1,39	0,09±0,06	-19,6±4,23	21,59
2%	RG503	221,6± 4,50	2,03	0,19±0,03	-21,1±1,96	9,30
2%	RG503H	239,3±22,42	9,37	0,27±0,04	-24,0±7,56	31,50
2%	RG502	225,0±7,61	3,38	0,20±0,08	-22,1±0,47	2,14

Çizelge 4.7. Etil asetat ile hazırlanan dosetaksel yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyelleri (n=3)

Formülasyonlar		Partikül Boyutu (nm)		PDI	Zeta Potansiyel (mV)	
PLGA Yüzdesi	PLGA Tipi	Ort±SS	%VK	Ort±SS	Ort±SS	%VK
1%	RG502H	232,9±0,15	0,06	0,136±0,005	-22,2±0,32	1,45
2%	RG502H	269,1±1,00	0,37	0,175±0,01	-13,2±0,26	2,01
3%	RG502H	275,4±2,42	0,88	0,320±0,03	-8,28±0,25	3,02
4%	RG502H	284,1±1,01	0,35	0,108±0,01	-14,8±0,8	5,44
2%	RG503	247,0±1,53	0,62	0,133±0,03	-7,44±0,48	6,45
2%	RG502	232,3±2,46	1,06	0,116±0,02	-12,56±0,74	5,87
2%	RG503H	422,6±2,38	0,56	0,327±0,03	-14,97±0,42	2,78

4.2.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi Sonucunda Elde Edilen Bulgular

Bölüm 3.2.3.2' te "*Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi*" başlığı altında anlatıldığı şekilde, PLGA nanopartiküllerine yüklenen dosetaksel miktarı tayin edilmiştir. Yükleme etkinliği, yükleme kapasitesi ve yüklenen miktarlara ilişkin elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9'da özetlenmektedir.

Çizelge 4.8. Aseton ile hazırlanan PLGA nanopartiküllerine ait yükleme etkinliği sonuçları

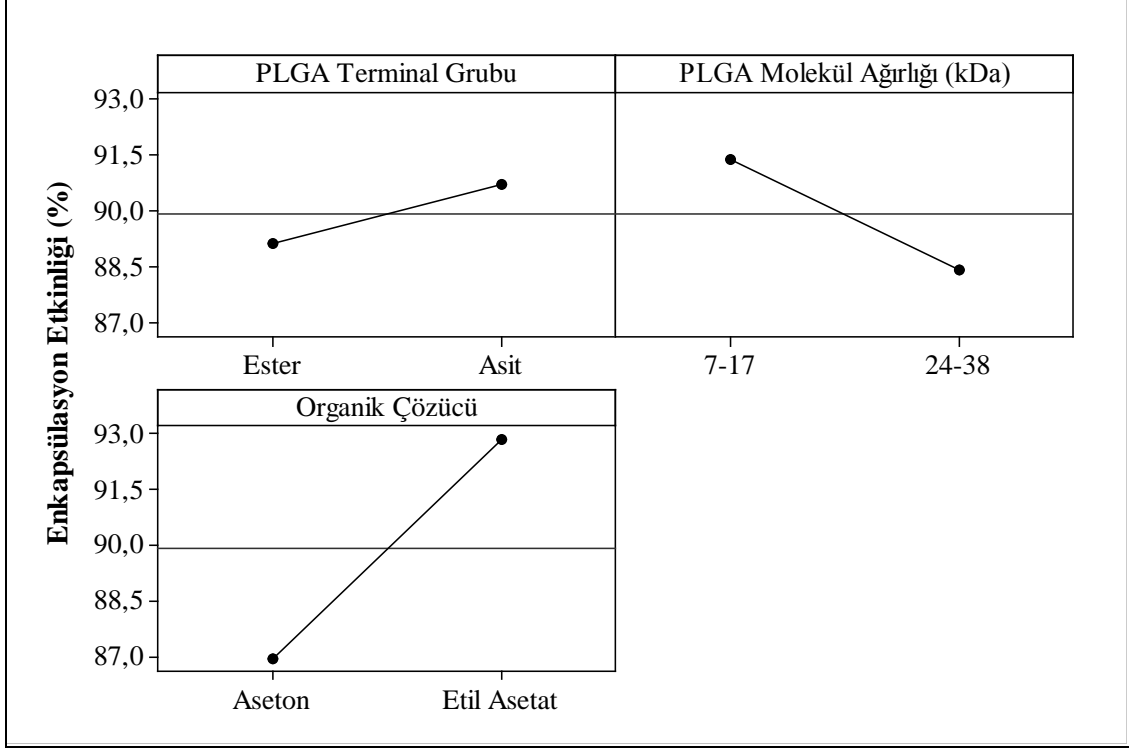
Formülasyonlar		Yükleme Etkinliği (% YE) \pm SS	Yüklenen Miktar (mg)	Yükleme Kapasitesi (YK%) \pm SS
PLGA yüzdesi	PLGA tipi			
1%	RG502H	%82,20 \pm 2,427	4,11	%29 \pm 0,009
2%	RG502H	%90,87 \pm 0,814	4,54	%32 \pm 0,003
3%	RG502H	%90,73 \pm 0,404	4,54	%32 \pm 0,0014
4%	RG502H	%89,73 \pm 0,814	4,49	%32 \pm 0,003
2%	RG503	%81,43 \pm 1,848	4,07	%29 \pm 0,007
2%	RG502	%88,80 \pm 1,054	4,44	%32 \pm 0,004
2%	RG503H	%86,80 \pm 0,608	4,34	%31 \pm 0,002

Çizelge 4.9. Etil asetat ile hazırlanan PLGA nanopartiküllerine ait yükleme etkinliği sonuçları

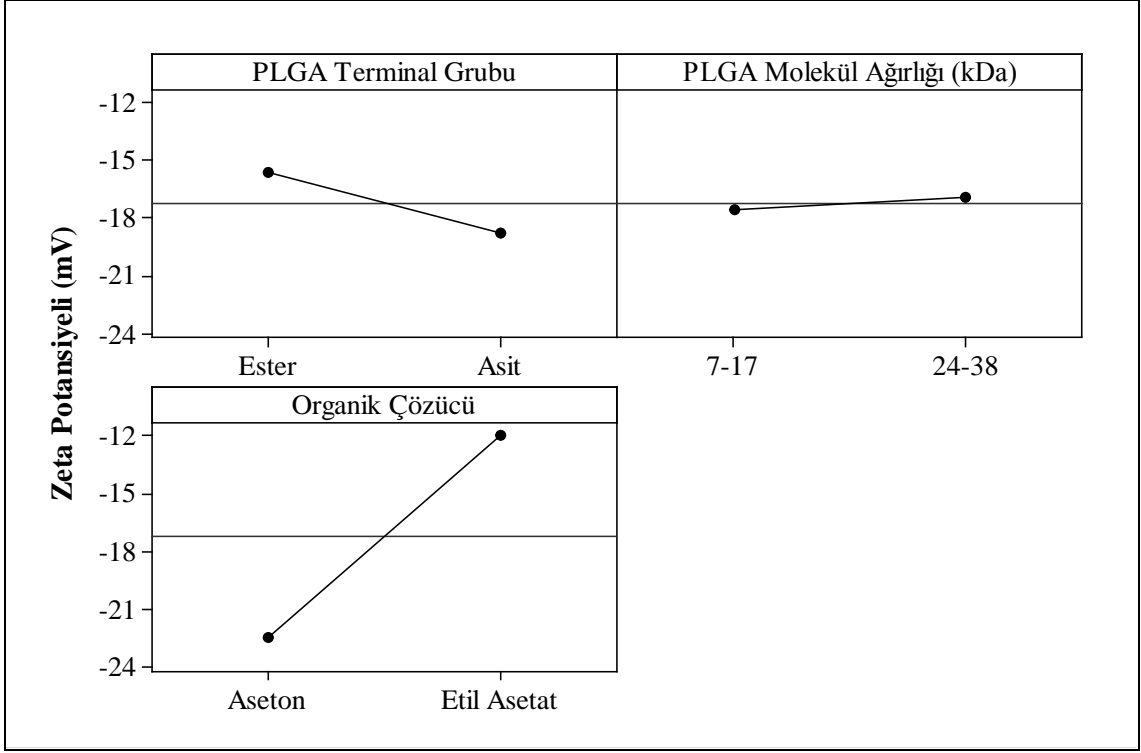
Formülasyonlar		Yükleme Etkinliği (% YE) \pm SS	Yüklenen Miktar (mg)	Yükleme Kapasitesi (%YK) \pm SS
PLGA yüzdesi	PLGA tipi			
1%	RG502H	%91.10 \pm 0,551	4,56	%32 \pm 0,002
2%	RG502H	%92,40 \pm 0,351	4,62	%33 \pm 0,001
3%	RG502H	%91,37 \pm 0,306	4,56	%32 \pm 0,001
4%	RG502H	%92,90 \pm 0,503	4,65	%33 \pm 0,018
2%	RG503	%92,70 \pm 0,207	4,64	%33 \pm 0,017
2%	RG502	%93,50 \pm 0,264	4,68	%33 \pm 0,001
2%	RG503H	%92,8 \pm 0,378	4,64	%33 \pm 0,001

4.2.3. *In vitro* Salım Çalışmaları Yapılacak Formülasyonların Belirlenmesine İlişkin Bulgular

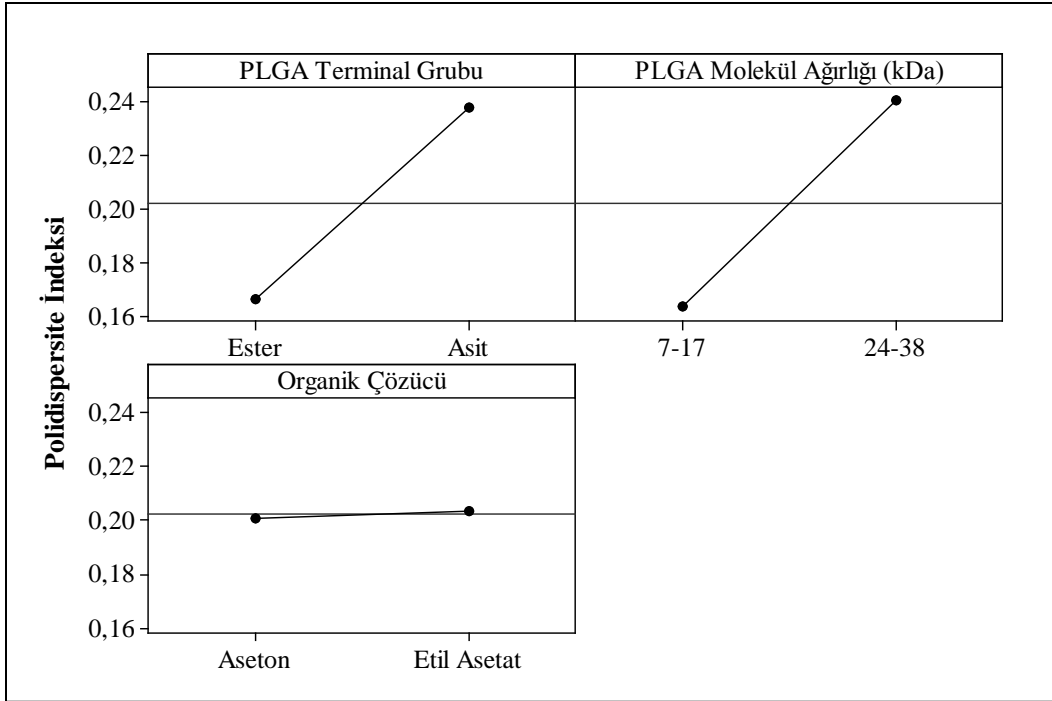
Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyonu sonucu elde edilen boyut, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinlik verileri göz önüne alınarak yapılan tek yönlü varyans analizi ile salım çalışmaları için uygun olan üç farklı formülasyon seçilmiştir.



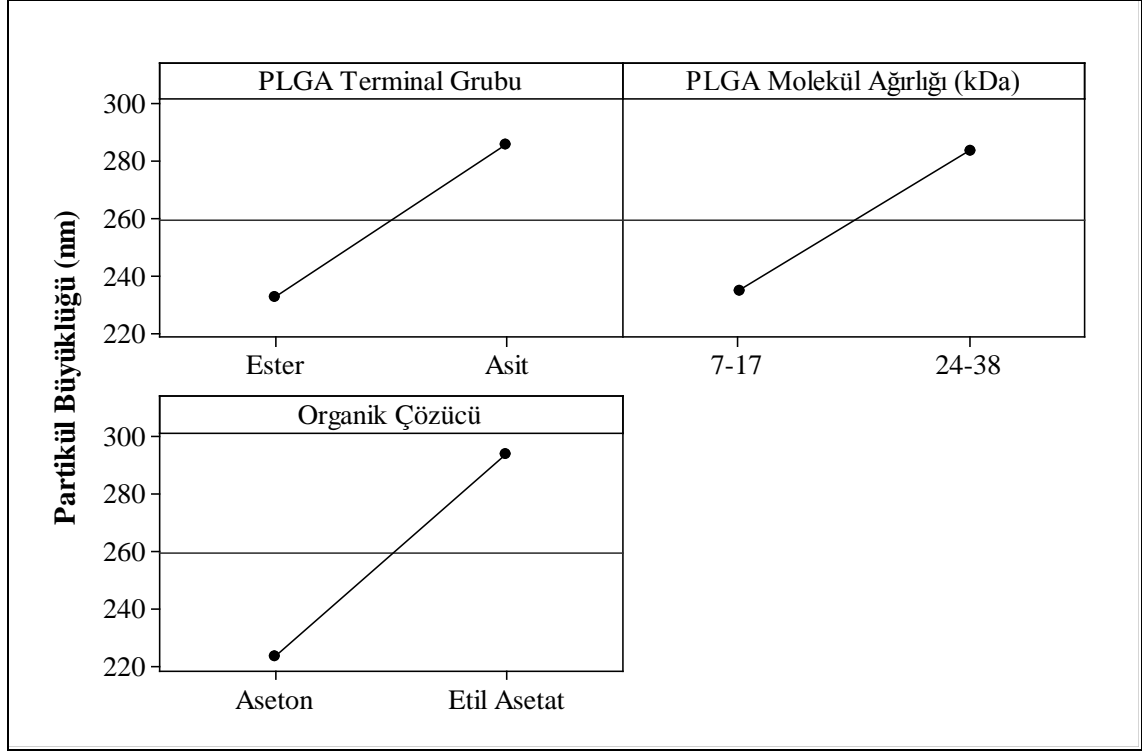
Şekil 4.4. Enkapsülasyon etkinliği için ana etken grafikleri



Şekil 4.5. Zeta potansiyeli için ana etken grafikleri



Şekil 4.6. Polidispersite indeksi için ana etken grafikleri



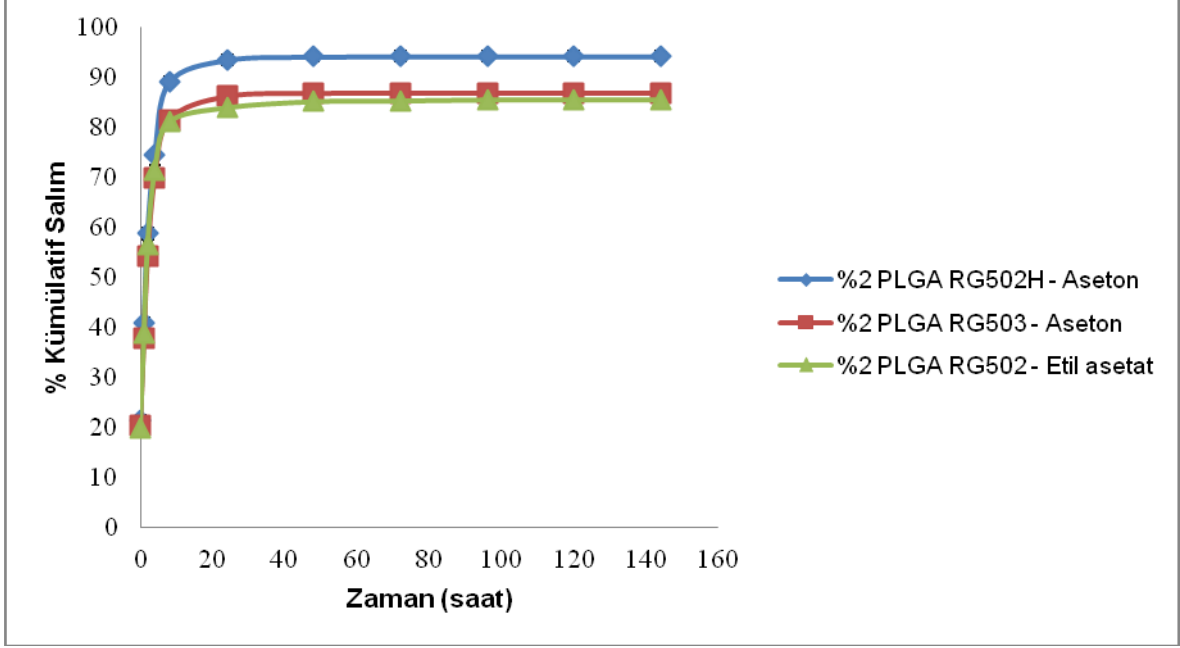
Şekil 4.7. Partikül büyüklüğü için ana etken grafikleri

Çizelge 4.10. Tek yönlü varyans analizi ile salım ve hücre kültürü çalışmaları için seçilen formülasyonlar (*Salım çalışmaları için uygun bulunan formülasyonlar, **Salım ve hücre kültürü çalışmaları için uygun bulunan formülasyon)

Formülasyon Kodu	PLGA Miktarı (%)	PVA Miktarı (%)	PLGA Terminal Grubu	PLGA Molekül Ağırlığı (kDa)	Organik Çözücü	PB (nm)	PDI	ZP (mv)	YE (%)
TFT01 (n=3)	2	3	Ester	7-17	Aseton	225,0	0,203	-22,1	88,8
TFT02 (n=3)*	2	3	Ester	7-17	Etil Asetat	234,9	0,117	-12,3	93,5
TFT03 (n=3)*	2	3	Ester	24-38	Aseton	221,6	0,185	-21,0	81,4
TFT04 (n=3)	2	3	Ester	24-38	Etil Asetat	249	0,160	-7,14	92,7
TFT05(n=3)**	2	3	Asit	7-17	Aseton	211,2	0,149	-22,7	90,9
TFT06 (n=3)	2	3	Asit	7-17	Etil Asetat	269,1	0,186	-13,1	92,4
TFT07 (n=3)	2	3	Asit	24-38	Aseton	239,3	0,267	-24,0	86,8
TFT08 (n=3)	2	3	Asit	24-38	Etil Asetat	424,7	0,351	-15,3	92,8

4.2.4. *In Vitro* Salım Çalışmalarına İlişkin Bulgular

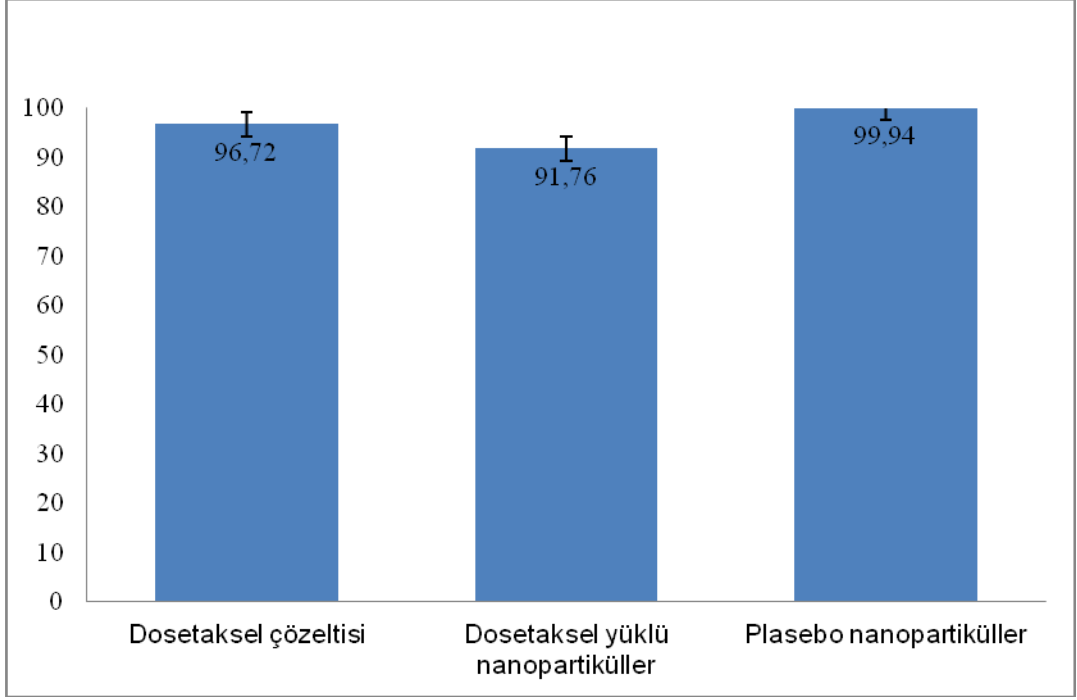
In vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.3.3' te "*In vitro* Salım deneyleri" başlığı altında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Varyans Analizi ile belirlenen %2 PLGA RG502H ve aseton ile hazırlanan, %2 PLGA RG503 ve aseton ile hazırlanan, %2PLGA RG502 ve etil asetat ile hazırlanan formülasyonlar ile çalışılmıştır. Zamanın fonksiyonu olarak % kümülatif salım miktarının gösterildiği grafik Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. 100 mg dosetaksel yüklü PLGA nanopartiküllerinin *in vitro* salım profilleri (n=3)

4.2.5. Sitotoksosite Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Bölüm 3.2.4. "*Sitotoksosite Çalışmaları*" başlığı altında anlatılan yöntemle sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır. Dosetaksel çözeltisi, dosetaksel içeren nanopartiküller ve dosetaksel içermeyen boş nanopartiküller 48 saat boyunca MCF-7 hücrelerine uygulanmıştır. Yapılan çalışmada dosetaksel yüklü nanopartiküllerin plasebo nanopartiküller ve dosetaksel çözeltisine kıyasla daha fazla toksik etki gösterdiği gözlenmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ($p < 0,5$) ve literatür ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlar ve toksik etkinin inkübasyon süresinin artışı ile arttığı gözlenmiştir [137]. Hücre canlılığına ait bulgular Şekil 4.9'da görülmektedir.



Şekil 4.9. Kontrol gruplarına karşı dosectaxel çözeltisi, dosectaxel yüklü nanopartiküller ve plasebo nanopartiküllerin sitotoksosite çalışması sonuçları (n=12, hata çubukları standart sapmayı göstermektedir)

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5.1. Tartışma

5.1.1. Dosetakselin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

Çalışmada dosetakselin miktar tayini için UV dedektörlü yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Dosetaksel için HPLC analitik yöntemi geliştirilirken literatürde bulunan çalışmalardan B. Mallikarjuna Rao ve ark. [138] tarafından geliştirilen yöntemden yararlanılmış ve üzerinde bazı değişiklikler yapılmıştır. Bölüm 3.2.1'de bulunan Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi sabit faz olarak Inertsil ODS-3 (4,6 mmx250 mmx5 µm) kolon ve hareketli faz olarak asetonitril:ultra saf su (60:40) kullanılmıştır. Analiz $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ kolon sıcaklığı ve 227 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen kromatogram bölüm 4.1'de görüldüğü şekildedir. Kromatogramdaki dosetaksel pikinin alıkonma zamanı 4,438 dk olarak bulunmuştur. Elde edilen pik simetrisi (0,803) ve teorik tabaka sayısı (4956,96) değerleri Avrupa Farmakopesi'ne uygun aralıktadır.

Dosetaksele ait kalibrasyon doğrusu bölüm 3.1'de anlatıldığı gibi 0,5-20 µg/ml aralığındaki yedi farklı konsantrasyonla yapılan 6 seri analiz ile elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusu Şekil 4.2'de ve regresyon verileri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Elde edilen tanımlayıcılık katsayısının 1'e olan yakınlığı sistemin doğrusallığını ifade ettiğinden bulunan 0,9997 değeri uygun bulunmuştur.

Validasyon çalışmaları için % bağıl hata değerlerinin %2'nin altında olması beklenir [131]. Kullanılan analitik yöntemin yapılan gün içi ve günler arası doğruluk çalışmalarında bölüm 4.1.1.2'de anlatıldığı gibi düşük, orta, yüksek olacak şekilde üç farklı konsantrasyonda çalışılmış ve % bağıl hata değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen bağıl hata değerlerinin %2'nin altında olması geliştirilen analitik yöntemin gün içi ve günler arası doğruluğunu göstermiştir.

Kesinlik çalışmaları altında üç farklı konsantrasyonda tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri çalışılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmasında analizi yapılan konsantrasyonlar arasındaki varyasyon katsayıları hesaplanmış ve 0,26 ile

0,98 arasında bulunmuştur. Tekrar elde edilebilirlik çalışmalarında ise pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmış ve 0,28 ile 2,24 arasında bulunmuştur. Kesinlik çalışmalarında elde edilen tüm % VK değerleri %2'nin altındadır.

Yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen konsantrasyon 0,10793 µg/ml olup, saptama sınırı 0,03238 µg/ml'dir.

Özgünlük parametresi incelenirken Bölüm 3.2.1.1.5'de belirtildiği gibi nanopartikül formülasyonuna giren malzemelerin, oluşan nanopartiküllerin etkin madde ile aynı koşullara ve aynı alıkonma zamanında pik verip vermediği kontrol edilmiş ve Şekil 4.3'te görüldüğü gibi dosetakselin alıkonma zamanında herhangi bir pik olmadığı gözlenmiştir.

Analitik yöntem geliştirmek için önemli olan doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, özgünlük parametrelerinin bulguları tümü ile değerlendirildiğinde, yöntemin analitik amaçla validasyonunun yapıldığı ve geçerli bir yöntem olduğu görülmüştür.

5.1.2. Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında tüm nanopartikül formülasyonları emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanışı Bölüm 3.2.2'de anlatılmıştır. Boş ve ilaç yüklü nanopartiküllerin elde edilmesi sırasında Ozturk ve ark. çalışmasından yararlanılmıştır [139].

Nanopartiküller hazırlanırken FDA tarafından onaylı, biyoparçalanabilir ve biyouyumlu sentetik bir polimer olan ve birçok çalışmada tercih edilen PLGA kullanılmıştır. Çalışmada PLGA tercih edilmesinin nedeni birçok çalışmada kullanımına bağlı olarak klinik alanda uzun süreli deneyimin olması, uygun degradasyon özelliklerine sahip olması ve uzatılmış ilaç salım imkanı sağlamasıdır. PLGA tercih edilmesinin diğer bir sebebi ise; polimer-ilaç matrisinin fiziksel özelliklerinin polimer molekül ağırlığı, laktid:glükolid oranı ve ilaç konsantrasyonu değiştirilerek kolaylıkla ayarlanabilmesidir [140].

Seçilen polimer, hazırlanan nanopartiküllerin özellikleri üzerinde etkilidir. PLGA ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu seçilen polimerin kopolimer

kompozisyonu ve molekül ağırlığından etkilenmektedir. Mittal ve ark.[141] yaptığı çalışmada PLGA 50:50'nin farklı molekül ağırlığına sahip tipleri ile farklı kopolimer kompozisyonları PLGA (50:50; MW-85000 Da), PLGA (65:35; MW-97000 Da), PLGA (85:15; MW-87000 Da) karşılaştırılmıştır. Farklı laktid:glükolik oranları (PLGA 50:50, PLGA 65:35, PLGA 85:15) ile hazırlanan nanopartiküller karşılaştırıldığında en düşük partikül boyutunun PLGA 50:50 ile hazırlanan nanopartiküller ile elde edildiği gözlenmiştir. PLGA 50:50'nin farklı molekül ağırlıkları ile hazırlanan nanopartiküllerde ise 14500 Da molekül ağırlığına sahip polimer ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu $98,3 \pm 2,6$ nm iken molekül ağırlığı arttıkça partikül boyutunda artış gözlenmiş ve 213000 Da molekül ağırlığındaki polimer ile hazırlanan nanopartiküllerde partikül boyutu $155,4 \pm 3,9$ nm olarak bulunmuştur [141].

Tez çalışmasında 7000-17000 Da ve 24000-38000 Da olmak üzere iki farklı molekül ağırlığı karşılaştırılmıştır. RG502 (7000-17000 Da) ile hazırlanan nanopartiküllerin daha yüksek molekül ağırlığına sahip RG503 (24000-38000 Da) ile kıyaslandığında ve RG502H (7000-17000 Da) daha yüksek molekül ağırlığına sahip RG503H (24000-38000 Da) ile kıyasla daha küçük partikül boyutu elde edildiği gözlenmiştir.

İlaç yüklenecek polimerin seçimi sırasında en önemli faktör polimerin salım profiline olan etkisidir. Tez çalışmasında istenen, *burst effect* olarak tanımlanan ani salım ve onu takiben kontrollü bir salım profili geliştirmektir. PLGA ile yapılan çalışmalar oligomerler içerisindeki glükolik asit yüzdesinin polimerin ağırlık kaybını hızlandırdığını göstermiştir. PLGA 50:50 (PLA/PGA) en hızlı degradasyonu gösterirken, PLGA 65:35 yüksek glükolik asit oranının sağladığı yüksek hidrofilik özelliği sayesinde ikinci hızlı degradasyonu göstermektedir. Bu sıralamayı sırası ile PLGA 75:25 ve PLGA 85:15 izlemiştir. Bu sonuçlar glükolik asit oranının artışının degradasyon hızını arttırdığını göstermiştir. Glükolik asit miktarı matriksin hidrofilik özelliğinin ayarlanmasında en kritik parametre olup degradasyon ve ilaç salım hızını doğrudan etkilemektedir [140]. Tez çalışmasında, Makadia ve ark. yaptığı bu çalışmalardan yararlanılarak istenilen salım profiline en yakın özellik gösteren PLGA 50:50 seçilmiştir [142].

Yüksek molekül ağırlığına sahip polimerler genellikle daha düşük degradasyon hızına sahiptirler. Molekül ağırlığı polimer zincir boyutu ile direkt olarak ilişkili olduğundan daha uzun polimer zinciri bulunan polimerler daha küçük polimer zinciri olan polimerlere göre daha uzun degradasyon zamanı gerektirirler [140].

PLGA' nın uç grupları karboksilik asit veya ester olan tipleri mevcuttur. PLGA hidroliz hızı bu uç grupların kimyasına bağlıdır. Karboksilik asit uç gruplar polimerin daha hidrofilik özellikte olmasını sağlamakta, su alımını artırarak hidrolizi kolaylaştırmaktadır. Ayrıca PLGA matriksindeki karboksilik asitler ester bağ degradasyonunun otokatalizini arttırmaktadır. Bu nedenlerle alkil ester grubu ile sonlanan PLGA rezomerleri serbest karboksil grubuna sahip olanlara oranla daha uzun degradasyon ömrüne sahiptirler [143].

Polimerin molekül ağırlığı, uç grupları, kopolimer kompozisyonunun yanında formülasyonlar hazırlanırken kullanılan polimer konsantrasyonu da nanopartiküllerin partikül boyutu ve buna bağlı olarak yükleme etkinliği üzerinde etkili bir parametredir. Mainardes ve ark. [144] yaptığı çalışmada farklı miktarlarda PLGA (12,5 mg, 25 mg, 50mg) içeren nanopartiküller hazırlanmış ve 243 ± 12 nm ile en küçük partikül boyutu en düşük konsantrasyonda PLGA içeren formülasyonda elde edilirken yüksek konsantrasyonda PLGA içeren nanopartiküllerde partikül boyutu 360 ± 25 nm olarak bulunmuştur [144].

PLGA polimeri diklorometan, etil asetat ve aseton gibi organik çözücülerde çözünmektedir [145]. Çalışmada etil asetat ve aseton olmak üzere iki farklı çözücü kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır.

Sürfaktan miktarının nanopartikülün özellikleri üzerine etkili olduğu bilinmektedir. Eğer sürfaktanın konsantrasyonu çok düşük ise polimer damlacıklarının agregasyonu meydana gelir. Bu duruma alternatif olarak eğer çok yüksek konsantrasyonda sürfaktan kullanılırsa nanopartikül formülasyonuna yüklenmek istenen ilaç ve sürfaktan arasında meydana gelen etkileşim nedeni ile ilaç yükleme kapasitesinde azalma meydana gelebilir. Kwon ve ark. emülsifikasyon difüzyon yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada küçük nanopartiküller oluşturmak için en uygun PVA konsantrasyonunun %2 ile %4 arasında olduğunu göstermişlerdir

[146]. Tez çalışmasında %3 konsantrasyonda PVA, stabilize edici ajan olarak kullanılmıştır.

5.1.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

5.1.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Tez çalışması kapsamında hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyellerinin ölçümüne ait bilgiler Bölüm 3.2.3.1'de ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Hazırlanan boş PLGA nanopartiküllerin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri Bölüm 4.2.1.1'de Çizelge 4.5' da verilmiştir. Dosetaksel yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümleri sonucu elde edilen bulgular Bölüm 4.2.1.2'de verilmiştir ve bu değerler Çizelge 4.6 ve 4.7'de özetlenmiştir.

Hazırlanan boş nanopartiküller ile dosetaksel yüklü nanopartiküller karşılaştırıldığında partikül boyutları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.05$). İlaç yüklü nanopartiküllerin boş nanopartiküllere göre daha yüksek partikül boyutu ve polidispersite indeksleri olduğu gözlenmiştir. Yükleme sırasında yüzeye adsorbe olan ve nanopartikül içerisine hapsolan ilacın partikül boyutunda artışa neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [147].

Çalışmada PLGA RG502, PLGA RG502H, PLGA RG503, PLGA RG503H; %1, %2, %3, %4 konsantrasyonlarda; çözücü olarak etil asetat ve aseton kullanılarak formülasyonlar hazırlanmıştır.

Aseton ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklükleri; %1 PLGA RG502H için $153,8 \pm 1,35$ nm, %2 PLGA RG502H için $211,2 \pm 4,53$ nm, %3 PLGA RG502H için $229,1 \pm 3,84$ nm, %4 PLGA RG502H için $241,7 \pm 3,35$ nm olarak bulunmuştur. %2 PLGA ile hazırlanan nanopartiküller için partikül büyüklükleri; RG503 için $221,6 \pm 4,50$ nm, RG503H için $239,3 \pm 22,42$ nm, RG502 için $225 \pm 7,6$ nm olarak bulunmuştur.

Etil asetat ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklükleri; %1 PLGA RG502H için $232,86 \pm 0,15$ nm, %2 PLGA RG502H için $269,03 \pm 1,0$ nm, %3 PLGA RG502H için $275,4 \pm 2,42$ nm, %4 PLGA RG502H için $284,1 \pm 1,01$ nm olarak bulunmuştur.

%2 PLGA ile hazırlanan nanopartiküller için partikül büyüklükleri; RG503 için $247 \pm 1,53$ nm, RG502 için $232,3 \pm 2,46$ nm, RG503H için $422,6 \pm 2,38$ nm olarak bulunmuştur.

%1, %2, %3, %4 RG502H ile hazırlanan formülasyonlar karşılaştırıldığında en düşük partikül boyutunun hem aseton hem etil asetat ile hazırlanan formülasyonlar için %1 PLGA içeren formülasyonlar olduğu, en yüksek partikül boyutunun ise %4 PLGA içeren formülasyonlar olduğu gözlenmiştir. Polimer konsantrasyonu arttıkça partikül boyutu artmaktadır ve bu sonuçlar literatür ile uyumludur [144].

Fonseca ve ark. [148] tarafından yapılan çalışmada farklı PLGA resomerleri kullanılarak hazırlanan boş ve paklitaksel yüklü nanopartiküller karşılaştırılmıştır. Çalışmada RG502H ile hazırlanan ilaç yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu 122 ± 3 nm bulunurken, RG502 ile hazırlanan ilaç yüklü nanopartiküllerin boyutu 133 ± 2 nm olarak bulunmuştur. Tez çalışmasında optimum formülasyon olarak belirlenen RG502H, RG502 ile karşılaştırıldığında karboksilik asit uç grupları içeren rezomer ile hazırlanan formülasyonun daha küçük partikül boyutuna sahip olduğu gözlenmiştir [148].

Partiküler sistemlerin yüzey yükü zeta potansiyel ölçümü ile tespit edilmektedir. Bir süspansiyon içindeki partiküllerin yüksek pozitif veya negatif zeta potansiyel değerlerine sahip olmaları istenen bir durumdur. Çünkü sahip oldukları yükler ile partiküller birbirini iterek, bir araya gelme eğilimlerini engellemiş olurlar. Fakat, partiküller düşük zeta potansiyel değerlerine sahip ise, partiküllerin agregasyonlarına yol açmaktadırlar. İlaç yüklü olmayan tüm nanopartiküllerin yüzey yükü, PLGA yüzeyinde yer alan terminal karboksilik asit gruplarının varlığı ve PVA'nın sahip olduğu negatif yükten dolayı negatif değerdedir.

Dosetaksel yüklü nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri $-7,44 \pm 0,48$ mV ile $-24,6 \pm 5,30$ mV arasında değişmektedir. Boş nanopartiküller ile ilaç yüklü nanopartiküller kıyaslandığında zeta potansiyel değerinin negatif yönde artışı gözlenmiştir. Bunun sebebi ise dosetakselin negatif yüke sahip olmasıdır.

5.1.3.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi

Çalışma kapsamında hazırlanan DTX yüklü PLGA nanopartiküllerin yükleme etkinliği, yükleme kapasitesi ve yüklenen miktarlara ilişkin elde edilen bulgular Bölüm 4.2.2 içerisindeki Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Nanopartiküler sistemin başarılı olabilmesi için beklenen yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olmasıdır. Yapılan çalışmalarla yükleme etkinliği ve yükleme kapasitesinin kullanılan polimerin tipi, molekül ağırlığı ve konsantrasyonu, kullanılan organik çözücünün sudaki çözünürlüğü, ilaç ile polimer etkileşimi gibi birçok parametreye bağlı olduğu görülmüştür.

Polimer konsantrasyonundaki artış enkapsülasyon etkinliğini arttırmaktadır. Yüksek polimer konsantrasyonunun enkapsülasyon etkinliği üzerindeki etkisi iki yolla yorumlanmaktadır. Yüksek konsantrasyondaki polimer disperse fazın yüzeyinde daha hızlı presipite olmakta ve faz sınırları boyunca ilaç difüzyonunu önlemektedir. İkinci neden ise yüksek konsantrasyon, çözeltinin vizkozitesini arttırmakta ve polimer damlacıkları arasındaki ilaç difüzyonunu engellemektedir.

PLGA RG502H ile çalışılarak polimerin farklı yüzdelerinin (%1, %2, %3, %4) karşılaştırıldığı çalışmada polimer yüzdesi arttıkça yükleme etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca partikül boyutu sonuçlarında gözlendiği gibi polimer yüzdesindeki artış partikül boyutunu arttırmış ve yüklenen ilaç miktarı da artış göstermiştir.

Aseton ile hazırlanan formülasyonlarda en yüksek yükleme etkinliği değeri %90,87 olarak bulunmuştur. Bu yükleme etkinliği değeri %2 PLGA RG502H ile hazırlanan nanopartiküller ile elde edilmiştir. Etil asetat ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında ise en yüksek enkapsülasyon etkinliği %93,5 değeri ile %2 PLGA RG502 ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında gözlenmiştir.

5.1.3.3. İn Vitro Salım Çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.3.3'te "*İn Vitro Salım Deneyleri*" başlığı altında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Salım çalışmalarında Bölüm 4.2.3.'te belirtildiği gibi tek yönlü varyans analizi ile belirlenen en uygun üç formülasyon kullanılmıştır. Bu formülasyonlar PLGA RG502 ve etil asetat ile hazırlanan, PLGA RG503 ve aseton

ile hazırlanan, PLGA RG502H ve aseton ile hazırlanan formülasyonlardır. Zamanın fonksiyonu olarak % kümülatif salım miktarının gösterildiği grafik Şekil 4.8 'de verilmiştir.

Salım çalışması yapılan formülasyonların tamamında öncelikle patlama etkisi şeklinde meydana gelen ani salım görülmüştür. Bunun nanopartiküllerin yüzeyine yakın ilaç kristallerine veya yüzeye adsorbe olmuş ilaç kristallerine bağlı olarak gerçekleşebileceği düşünülmektedir.

İlaç salımında partikül boyutu önemli bir parametredir. Büyük partikül boyutlarına sahip partiküller, küçük partikül boyutlarına sahip partiküllere kıyasla daha az ani salım ve daha uzun uzatılmış salım gösterir. Küçük partikül boyutuna sahip nanopartiküller, büyük yüzey alanına sahiptirler. Partikül yüzeyindeki ya da yüzeyine yakın bulunan ilaç hızlıca salındığından küçük partikül boyutuna sahip nanopartiküllerde daha fazla ani salım gözlenir. Buna karşın, partikül içinde enkapsüle olmuş ilaç yavaşça difüze olmaktadır [149].

Polimerin serbest karboksilik asit içermesi, su tutma kapasitesini ve degradasyon hızını artırır. Bu da polimer matriksinin, serbest karboksilik asit içermeyen polimere göre daha fazla şişmesine neden olur dolayısıyla etkin maddenin PLGA nanopartiküllerinden salımı, PLGA'nın şişmesi ile kontrol edilen diffüzyon hızına bağlı olarak daha hızlı gerçekleşir.

Etkin maddenin salım profili ve polimerin degradasyon hızı üzerinde etkili olan diğer bir parametre polimerin viskozitesidir. Viskozitenin düşük olması salım profili üzerinde istenen bir etki oluşturacağından 0,16–0,24 dl/g (0,1% içinde CHCl_3 , 25°C) viskoziteye sahip, organik fazın uçurulması aşamasında sıcaklığın etkisi göz önünde bulundurularak camsı geçiş sıcaklığı 42-46°C olan ve karboksilik asit içeren RG 502H ile hazırlanan formülasyonun en hızlı salım gösterdiği görülmektedir. Fakat bu fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

5.1.4. Sitotoksosite Çalışmaları

Sitotoksosite çalışmaları Bölüm 3.2.4. "*Sitotoksosite Çalışmaları*" başlığı altında anlatılan yöntemle yapılmış ve elde edilen bulgular Şekil 4.9'da verilmiştir.

Sitotoksosite çalışmalarında en uygun partikül boyutu ve salım profili gösteren %2 PLGA RG502H ve aseton ile hazırlanan formülasyon kullanılmıştır.

Çalışmalardan elde edilen bulgular dosetaksel yüklü nanopartiküllerin, plasebo nanopartikül formülasyonuna kıyasla %8,18 ve dosetaksel çözeltisine kıyasla %4,96 daha yüksek toksik etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Plasebo nanopartiküller ise en düşük sitotoksik etkiye sahiptir.

Literatürdeki çalışmalar ile ilaç yüklü nanopartiküllerin daha yüksek toksik etki göstermesi hedeflendiği üzere hücre içine alımın artışı ile hücreler üzerindeki toksik etkinin artışı şeklinde açıklanmıştır [137, 150].

5.2. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında kanser tedavisinde etkili bir ilaç olan dosetakselin, tedavide karşılaşılan zorlukları elimine etme amacı ile nanopartikül formülasyonları geliştirilmiştir. Geliştirilen formülasyonlar karakterize edilmiş ve karşılaştırılmıştır.

Emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile çalışma amacına uygun özelliklerde nanopartikül formülasyonları hazırlanabilmektedir.

Hazırlanan boş nanopartiküller ilaç yüklenen nanopartiküllere göre daha küçük partikül boyutuna sahiptir. İlaç yüklenen nanopartiküllerin boyutları 153,8 nm ile 362,4 nm arasında ve polidispersite indeksleri 0,2'den düşük bulunmuştur. Formülasyonlar tekdüze dağılım göstermektedir.

Polimer tipi, polimer yüzdesi ve nanopartiküller hazırlanırken kullanılan organik çözücü nanopartikül boyutu üzerinde etkili parametrelerdir.

Nanopartikül formülasyonlarında yüksek yükleme etkinliği elde edilmiştir. Yüzde yükleme etkinliği değerleri %81,43 ile %93,50 arasında bulunmuştur.

Dosetakselin nanopartikül formülasyonlarından salımı, önce hızlı bir salımı takiben kontrollü salım şeklinde gözlenmiştir. PLGA uç grupları, polimer molekül ağırlığı, polimer yüzdesinin salım profilleri üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir.

Sitotoksisite alışmaları sonucunda, dozetaksel yüklü nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde dozetaksel çözeltisine kıyasla daha yüksek ve uygulama zamanına bağlı olarak artan bir toksik etkisi olduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Sharifzadeh, M., Nanotechnology Sector Report, Cronus Capital Markets, 1st Quarter, **2006**.
2. TÜSİAD, Uluslararası Rekabet Teknolojileri: Nanoteknoloji ve Türkiye. **2008**.
3. Sharifzadeh, M., Nanotechnology sector report, cronus capital markets. **2006**.
4. <http://www.nano.gov/>,(Temmuz, **2013**).
5. http://discovernano.org/index_html.html, (Haziran, **2013**).
6. Nalwa, H.S., Nanostructured Materials and Nanotechnology.
7. Merkle, R.C., Biotechnology as a route to nanotechnology. Trends in Biotechnology, **1999**. 17(7): p. 271-274.
8. www.zyvex.com/nanotech/feynman.html (Haziran,**2013**).
9. Fabio Salamanca-Buentello, D.L.P., Erin B. Court, Douglas K. Martin, Abdallah S. Daar, Peter A. Singer Nanotechnology and the Developing World.
10. Brigger, I., C. Dubernet, and P. Couvreur, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. Adv Drug Deliv Rev, **2002**. 54(5): p. 631-51.
11. Langer, R., Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. Acc Chem Res, **2000**. 33(2): p. 94-101.
12. Bhadra, D., et al., Pegnology: a review of PEG-ylated systems. Pharmazie, **2002**. 57(1): p. 5-29.
13. Kommareddy, S., S.B. Tiwari, and M.M. Amiji, Long-circulating polymeric nanovectors for tumor-selective gene delivery. Technol Cancer Res Treat, **2005**. 4(6): p. 615-25.
14. Lee, M. and S.W. Kim, Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery. Pharm Res, **2005**. 22(1): p. 1-10.
15. Vila, A., et al., Design of biodegradable particles for protein delivery. J Control Release, **2002**. 78(1-3): p. 15-24.
16. Mu, L. and S.S. Feng, A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. J. Cont. Rel., **2003**. 86(1): p. 33-48.
17. Gelperina, S., et al., The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med, **2005**. 172(12): p. 1487-90.

18. Singh, R. and J.W. Lillard Jr, Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*, **2009**. 86(3): p. 215-223.
19. Wang, M. and M. Thanou, Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacological Research*, **2010**. 62(2): p. 90-99.
20. Agnihotri, S.A., N.N. Mallikarjuna, and T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J. Cont. Rel.*, **2004**. 100(1): p. 5-28.
21. Liechty, W.B. and N.A. Peppas, Expert opinion: Responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *Eur J Pharm Biopharm*, **2012**. 80(2): p. 241-6.
22. Steichen, S.D., M. Caldorera-Moore, and N.A. Peppas, A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci*, **2012**. 48(3): p. 416-427.
23. USPDI, t.E., Micromedex Inc., Syracuse Way (**1999**).
24. Soppimath, K.S., et al., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Cont. Rel.*, **2001**. 70(1-2): p. 1-20.
25. Pinto Reis, C., et al., Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*, **2006**. 2(1): p. 8-21.
26. Ueda H, K.J.J.M., Optimization of the preparation of loperamide loaded poly (L-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification solvent evaporation. **1997**. 14: p. 593- 605.
27. Ravi Kumar, M.N.V., U. Bakowsky, and C.M. Lehr, Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*, **2004**. 25(10): p. 1771-1777.
28. Bodmeier, R., et al., Spontaneous formation of drug-containing acrylic nanoparticles. *J Microencapsul*, **1991**. 8(2): p. 161-70.
29. Gref, R., et al., Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science*, **1994**. 263(5153): p. 1600-3.
30. M.F. Zambaux, F.B., R. Gref, P. Maincent, E.Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude, C. Vigneron, Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by double emulsion method *J. Cont. Rel.*, **1998**. 50: p. 31-40.
31. T. Niwa, H.T., T. Hino, N. Kunou, Y. Kawashima, Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J. Cont. Rel.*, **1993**. 25: p. 89-98.

32. Birnbaum, D.T., et al., Controlled release of beta-estradiol from PLGA microparticles: the effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *J. Cont. Rel.*, **2000**. 65(3): p. 375-87.
33. Jung J, P.M., Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. *J. Supercritical Fluids*, **2001**. 20: p. 179-21.
34. Sun, Y.P., et al., Polymeric nanoparticles from rapid expansion of supercritical fluid solution. *Chemistry*, **2005**. 11(5): p. 1366-73.
35. Calvo P, R.-L.C., Vila-Jato JL, Alonso MJ. and . Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polymer Sci.*, **1997**. 63: p. 125-132.
36. Calvo, P., et al., Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm Res*, **1997**. 14(10): p. 1431-6.
37. Fernandez-Urrusuno, R., et al., Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm Res*, **1999**. 16(10): p. 1576-81.
38. Tian, X.X. and M.J. Groves, Formulation and biological activity of antineoplastic proteoglycans derived from *Mycobacterium vaccae* in chitosan nanoparticles. *J Pharm Pharmacol*, **1999**. 51(2): p. 151-7.
39. Tokumitsu, H., H. Ichikawa, and Y. Fukumori, Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer: preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization. *Pharm Res*, **1999**. 16(12): p. 1830-5.
40. Kawashima, Y., et al., Novel method for the preparation of controlled-release theophylline granules coated with a polyelectrolyte complex of sodium polyphosphate-chitosan. *J Pharm Sci*, **1985**. 74(3): p. 264-8.
41. Aktas, Y., et al., Preparation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor. *Int J Pharm*, **2005**. 298(2): p. 378-83.
42. Angelova, N. and D. Hunkeler, Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol*, **1999**. 17(10): p. 409-21.
43. Kaş, H.S., İlaç taşıyıcı partiküler sistemler. "Kontrollü Salım Sistemleri" Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını, İstanbul, s. 65-102. , **2002**.
44. Jain, R.A., The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, **2000**. 21(23): p. 2475-90.
45. Pillai, O. and R. Panchagnula, Polymers in drug delivery. *Curr Opin Chem Biol*, **2001**. 5(4): p. 447-51.

46. Athanasiou, K.A., G.G. Niederauer, and C.M. Agrawal, Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials*, **1996**. 17(2): p. 93-102.
47. Huh, K.M., Y.W. Cho, and K. Park, PLGA-PEG block copolymers for drug formulations. *Drug Dev Deliv*, **2003**. 3(5).
48. Goepferich., A., Polymer degradation and erosion. Mechanisms and applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **1996**. 42: p. 1-11.
49. Li, S., Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomed Mater Res*, **1999**. 48(3): p. 342-53.
50. Walter, E., et al., Hydrophilic poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. *J Control Release*, **2001**. 76(1-2): p. 149-68.
51. Luan, X. and R. Bodmeier, Influence of the poly(lactide-co-glycolide) type on the leuprolide release from in situ forming microparticle systems. *J. Cont. Rel.*, **2006**. 110(2): p. 266-72.
52. Yang, Y.Y., T.S. Chung, and N.P. Ng, Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, **2001**. 22(3): p. 231-41.
53. T. Ehtezazi, C.W., C.D. Melia, Determination of the internal morphology of poly (D,L-lactide) microspheres using stereological methods. *J. Cont. Rel.*, **1999**. 57: p. 301-314.
54. <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/polymer-science/resomer.html> (Ekim, **2013**)
55. Fialho, S.L. and A. da Silva Cunha, Manufacturing techniques of biodegradable implants intended for intraocular application. *Drug Deliv*, **2005**. 12(2): p. 109-16.
56. Avgoustakis, K., et al., PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *J. Cont. Rel.*, **2002**. 79(1-3): p. 123-35.
57. Panyam, J., et al., Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery. *FASEB J*, **2002**. 16(10): p. 1217-26.
58. Cheng, F.Y., et al., Stabilizer-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for multimodal biomedical probes. *Biomaterials*, **2008**. 29(13): p. 2104-12.
59. Saxena, V., M. Sadoqi, and J. Shao, Polymeric nanoparticulate delivery system for Indocyanine green: biodistribution in healthy mice. *Int J Pharm*, **2006**. 308(1-2): p. 200-4.

60. Avgoustakis, K., Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Curr Drug Deliv*, **2004**. 1(4): p. 321-33.
61. van Vlerken, L.E., et al., Biodistribution and pharmacokinetic analysis of Paclitaxel and ceramide administered in multifunctional polymer-blend nanoparticles in drug resistant breast cancer model. *Mol Pharm*, **2008**. 5(4): p. 516-26.
62. Igartua, M., et al., Gamma-irradiation effects on biopharmaceutical properties of PLGA microspheres loaded with SPf66 synthetic vaccine. *Eur J Pharm Biopharm*, **2008**. 69(2): p. 519-26.
63. Shearer, H., et al., Effects of common sterilization methods on the structure and properties of poly(D,L lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *Tissue Eng*, **2006**. 12(10): p. 2717-27.
64. Sahoo, S.K. and V. Labhasetwar, Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today*, **2003**. 8(24): p. 1112-20.
65. Panyam J, L.V., Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv.Rev*, **2003**. 55(3)(329-347).
66. Jain, R., et al., Controlled drug delivery by biodegradable poly(ester) devices: different preparative approaches. *Drug Dev Ind Pharm*, **1998**. 24(8): p. 703-27.
67. Vinogradov, S.V., T.K. Bronich, and A.V. Kabanov, Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Adv Drug Deliv Rev*, **2002**. 54(1): p. 135-47.
68. Khor, E. and L.Y. Lim, Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, **2003**. 24(13): p. 2339-49.
69. Ravi Kumar, M.N.V., A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, **2000**. 46(1): p. 1-27.
70. Majeti N. V., K.R., A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, **2000**. 46: p. 1-27.
71. Desai, M.P., et al., The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res*, **1997**. 14(11): p. 1568-73.
72. Desai, M.P., et al., Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm Res*, **1996**. 13(12): p. 1838-45.
73. Kreuter J, R.P., Petrov V, Hamm S, Gelperina SE, Engelhardt B, Alyautdin R, von Briesen H, Begley DJ., Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm Res*, **2003**. 20: p. 409-16.

74. Zauner, W., N.A. Farrow, and A.M. Haines, In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J. Cont. Rel.*, **2001**. 71(1): p. 39-51.
75. Redhead, H.M., S.S. Davis, and L. Illum, Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *J. Cont. Rel.*, **2001**. 70(3): p. 353-63.
76. Muller, M., et al., Surface modification of PLGA microspheres. *J Biomed Mater Res A*, **2003**. 66(1): p. 55-61.
77. Govender, T., et al., PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J Control Release*, **1999**. 57(2): p. 171-85.
78. Govender, T., et al., Defining the drug incorporation properties of PLA-PEG nanoparticles. *Int J Pharm*, **2000**. 199(1): p. 95-110.
79. Panyam, J., et al., Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles. *J Pharm Sci*, **2004**. 93(7): p. 1804-14.
80. Washington, C., Drug release from microdisperse systems: a critical review. *Int. J. Pharm.*, **1990**. 58(1): p. 1-12.
81. Agnihotri, S.A., N.N. Mallikarjuna, and T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *J Control Release*, **2004**. 100(1): p. 5-28.
82. Soppimath, K.S., et al., Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Cont. Rel.*, **2001**. 70(1–2): p. 1-20.
83. <http://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html> (Mayis, **2013**).
84. <http://www.cancer.gov/> (Mayis,**2013**).
85. Jain, R.K., Delivery of molecular medicine to solid tumors: lessons from in vivo imaging of gene expression and function. *J. Cont. Rel.*, **2001**. 74(1-3): p. 7-25.
86. Seymour, L.W., Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, **1992**. 9(2): p. 135-87.
87. Baban, D.F. and L.W. Seymour, Control of tumour vascular permeability. *Adv Drug Deliv Rev*, **1998**. 34(1): p. 109-119.
88. Hobbs, S.K., et al., Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1998**. 95(8): p. 4607-12.

89. Jain, R.K., Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res*, **1987**. 47(12): p. 3039-51.
90. Krishna, R. and L.D. Mayer, Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci*, **2000**. 11(4): p. 265-83.
91. Links, M. and R. Brown, Clinical relevance of the molecular mechanisms of resistance to anti-cancer drugs. *Expert Rev Mol Med*, **1999** : p. 1-21.
92. Kang, J.-H., R. Toita, and Y. Katayama, Bio and nanotechnological strategies for tumor-targeted gene therapy. *Biotechnology Advances*, **2010**. 28(6): p. 757-763.
93. Garcia, M., Garcia, M., Jemal, A., Ward, E. M., Center, M. M., Hao, Y., Siegel, R. L., et al Jemal, A., Ward, E. M., Center, M. M., Hao, Y., Siegel, R. L., et al, Global cancer facts & figures. Atlanta, GA, USA: The American Cancer Society., **2007**.
94. Bharali, D.J. and S.A. Mousa, Emerging nanomedicines for early cancer detection and improved treatment: current perspective and future promise. *Pharmacol Ther*, **2010**. 128(2): p. 324-35.
95. Wong, H.L., et al., Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2007**. 59(6): p. 491-504.
96. Brannon-Peppas, L. and J.O. Blanchette, Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, **2004**. 56(11): p. 1649-59.
97. Koo, O.M., I. Rubinstein, and H. Onyuksel, Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine*, **2005**. 1(3): p. 193-212.
98. Sinha, R., et al., Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther*, **2006**. 5(8): p. 1909-17.
99. Kim, K., et al., Tumor-homing multifunctional nanoparticles for cancer theragnosis: Simultaneous diagnosis, drug delivery, and therapeutic monitoring. *J Control Release*, **2010**. 146(2): p. 219-27.
100. Wang, M. and M. Thanou, Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res*, **2010**. 62(2): p. 90-9.
101. Moore, A., et al., Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology*, **2000**. 214(2): p. 568-74.
102. Moghimi, S.M., A.C. Hunter, and J.C. Murray, Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*, **2001**. 53(2): p. 283-318.

103. Senthilkumar, M., P. Mishra, and N.K. Jain, Long circulating PEGylated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticulate delivery of Docetaxel to solid tumors. *J Drug Target*, **2008**. 16(5): p. 424-35.
104. Prencipe, G., et al., PEG branched polymer for functionalization of nanomaterials with ultralong blood circulation. *J Am Chem Soc*, **2009**. 131(13): p. 4783-7.
105. Ferrari, M., Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*, **2005**. 5(3): p. 161-71.
106. Nie, S., et al., Nanotechnology applications in cancer. *Annu Rev Biomed Eng*, **2007**. 9: p. 257-88.
107. Takeda, M., et al., In vivo single molecular imaging and sentinel node navigation by nanotechnology for molecular targeting drug-delivery systems and tailor-made medicine. *Breast Cancer*, **2008**. 15(2): p. 145-52.
108. Singhal, S., S. Nie, and M.D. Wang, Nanotechnology applications in surgical oncology. *Annu Rev Med*, **2010**. 61: p. 359-73.
109. Andersen, A., et al., High sensitivity assays for docetaxel and paclitaxel in plasma using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with UV detection. *BMC Clin Pharmacol*, **2006**. 6: p. 2.
110. Wani, M.C., et al., Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, **1971**. 93(9): p. 2325-7.
111. Arbuck, S.G. and B.A. Blaylock, Taxol: clinical results and current issues in development. *Taxol: Science and Applications*, **1995**. 379.
112. Keum, C.G., et al., Practical preparation procedures for docetaxel-loaded nanoparticles using polylactic acid-co-glycolic acid. *Int J Nanomedicine*, **2011**. 6: p. 2225-34.
113. Ali, S.M., et al., Novel cytotoxic 3'-(tert-butyl) 3'-dephenyl analogs of paclitaxel and docetaxel. *J Med Chem*, **1995**. 38(19): p. 3821-8.
114. Nurgün ERDEMOĞLU, B.Ş., Taksan sinifi bileşiklerin antitümör etkileri. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 29(1)77-90,**2000**.
115. Diaz, J.F. and J.M. Andreu, Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry*, **1993**. 32(11): p. 2747-55.
116. Bissery, M.C., et al., Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue. *Cancer Res*, **1991**. 51(18): p. 4845-52.
117. Escobar, P.F. and P.G. Rose, Docetaxel in ovarian cancer. *Expert Opin Pharmacother*, **2005**. 6(15): p. 2719-26.

118. Marchettini, P., et al., Docetaxel: pharmacokinetics and tissue levels after intraperitoneal and intravenous administration in a rat model. *Cancer Chemother Pharmacol*, **2002**. 49(6): p. 499-503.
119. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01248>.
120. Eisenhauer, E. and J. Vermorken, The Taxoids. *Drugs*, **1998**. 55(1): p. 5-30.
121. Rowinsky, E.K., The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annu Rev Med*, **1997**. 48: p. 353-74.
122. Lacroix, H. and C. Ligeza, Docetaxel (Taxotere) - an update. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **1998**. 7(2): p. 273-281.
123. <http://www.taxotere.com/professional/about/index.do>.
124. Lyseng-Williamson, K. and C. Fenton, Docetaxel. *Drugs*, **2005**. 65(17): p. 2513-2531.
125. Crown, J., Evolution in the treatment of advanced breast cancer. *Semin Oncol*, **1998**. 25(5 Suppl 12): p. 12-7.
126. Sledge, G.W., Jr., Doxorubicin/paclitaxel combination chemotherapy for metastatic breast cancer: the Eastern Cooperative Oncology Group experience. *Semin Oncol*, **1995**. 22(5 Suppl 12): p. 123-5; discussion 126-9.
127. Aapro, M.S., Combination docetaxel/vinorelbine for metastatic breast cancer and non-small-cell lung cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, **1997**. 11(8 Suppl 8): p. 46-49.
128. Miller, V.A., Docetaxel in the management of advanced non-small cell lung cancer. *Semin Oncol*, **1998**. 25(3 Suppl 8): p. 15-9.
129. Miller, V.A., et al., Phase II trial of a 75-mg/m² dose of docetaxel with prednisone premedication for patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer*, **1995**. 75(4): p. 968-72.
130. Guidance for Industry Validation of Analytical Procedures: Methodology Final Guidance (Rapor No). Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, **1999**.
131. Shabir, G.A., Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J Chromatogr A*, **2003**. 987(1-2): p. 57-66.
132. Tomiyama, N., et al., High-performance liquid chromatographic method for determination of DDT and its degradation products in rat plasma, liver and

- brain: validation and application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **2000**. 748(2): p. 361-8.
133. van Zoonen, P., et al., Some practical examples of method validation in the analytical laboratory. *Trends in Analytical Chemistry*, **1999**. 18(9): p. 584-593.
 134. Slater, T.F., B. Sawyer, and U. Straeuli, Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta*, **1963**. 77: p. 383-93.
 135. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **1983**. 65(1-2): p. 55-63.
 136. Sarisozen, C., et al., PEG-PE-based micelles co-loaded with paclitaxel and cyclosporine A or loaded with paclitaxel and targeted by anticancer antibody overcome drug resistance in cancer cells. *Drug Delivery*, **2012**. 19(4): p. 169-176.
 137. Chen, H., et al., Oral Delivery of DMAB-Modified Docetaxel-Loaded PLGA-TPGS Nanoparticles for Cancer Chemotherapy. *Nanoscale Research Letters*, **2010**.
 138. Rao, B.M., et al., A stability-indicating HPLC assay method for docetaxel. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**. 41(2): p. 676-681.
 139. Ozturk, K., et al., The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2010**. 65(9): p. 665-669.
 140. Makadia, H.K. and S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*, **2011**. 3(3): p. 1377-1397.
 141. Mittal, G., et al., Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J. Cont. Rel.*, **2007**. 119(1): p. 77-85.
 142. Esparza, I. and T. Kissel, Parameters affecting the immunogenicity of microencapsulated tetanus toxoid. *Vaccine*, **1992**. 10(10): p. 714-20.
 143. Houchin, M.L. and E.M. Topp, Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms. *J Pharm Sci*, **2008**. 97(7): p. 2395-404.
 144. Mainardes, R.M. and R.C. Evangelista, PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. *Int. J. Pharm.*, **2005**. 290(1-2): p. 137-144.

145. Song, K.C., et al., The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2006**. 276(1–3): p. 162-167.
146. Kwon, H.-Y., et al., Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **2001**. 182(1–3): p. 123-130.
147. Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA–PEG–folate conjugate. *J. Drug Target*, **2008**. 16(5): p. 415-423.
148. Fonseca, C., S. Simoes, and R. Gaspar, Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *J. Cont. Rel.*, **2002**. 83(2): p. 273-286.
149. Hans, M.L. and A.M. Lowman, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, **2002**. 6(4): p. 319-327.
150. Saremi, S., et al., Thiolated chitosan nanoparticles for enhancing oral absorption of docetaxel: preparation, in vitro and ex vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*, **2011**. 6: p. 119-28.
151. Chen, H., et al., Oral Delivery of DMAB-Modified Docetaxel-Loaded PLGA-TPGS Nanoparticles for Cancer Chemotherapy. *Nanoscale Research Letters*, **2010**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Dila Demir
Doğum Yeri : Mersin
Medeni Hali : Evli
E-posta : dilababat@hotmail.com
Adresi : 3250. Sokak Tarz Evleri 7/28 Yaşamkent/ANKARA

Eğitim

Lise : Mehmet Adnan Özçelik Anadolu Lisesi/MERSİN
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi : İngilizce / İyi seviyede

İş deneyimi : MAK Sağlık Ürünleri Ltd. Şti/Ürün Müdürü/2011

Deneyim Alanları : Medikal

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi : -

Tezden Üretilmiş Yayınlar: -

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar: -