

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

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

GÖZDE AYGÜL

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2011

ANKARA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI'nda**
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan (Danışman) :

Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

Üye :

Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL

Üye :

Doç. Dr. İmran VURAL

Üye :

Doç. Dr. R. Neslihan GÜRSOY

Üye :

Yard. Doç. Dr. Hakan EROĞLU

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından 19/10/2011 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil DENİZLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

PAKLİTAKSEL İÇEREN NANOPARTİKÜLLERİN FORMÜLASYONU VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

GÖZDE AYGÜL

ÖZ

Belirli bir doku veya organdaki hasarlı hücrelerin kontrolsüz bir biçimde çoğalması sonucu bir kitle ya da tümör oluşumuna yol açan kanser hastalığı, dünyada sıklıkla görülen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. İlaç ya da biyomolekülleri taşımak amacı ile kullanılan nanopartiküler sistemler kanser tedavisi için de araştırılmaktadır. Polimerik nanopartiküller kanser tedavilerinde ilaç yükleme etkinliğini artırması, kontrollü salım sağlaması, ilacın toksisitesini azaltması ve istenilen yere hedeflenebilmesi gibi avantajlarından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Paklitaksel mikrotübüllerin yıkılmasını engelleyerek hücre bölünmesini geç mitotik evrede (G2) inhibe eder ve hücrelerin çoğalmasını önler. Taxol[®], toksik ve alerjik etkiye sahip Cremophor EL içeren paklitakselin piyasa preparatıdır. Bu çalışmada, Cremophor EL taşıyıcısını içermeyen ve sonuçta alerjik etkilerin azaltıldığı, formülasyon stabilitesinin ve biyoyararlanımının artırıldığı, kontrollü salım sağlayan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Amacımız doğrultusunda farklı poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve polivinil alkol (PVA) konsantrasyonlarında nanopartiküller, emülsifikasyon-çözücü difüzyon yöntemi ile hazırlanmış olup, PLGA ve PVA konsantrasyonlarının in vitro karakterizasyon çalışmaları (partikül boyutu, zeta potansiyeli, yükleme etkinliği, salım çalışmaları) üzerine etkisi incelenmiştir. Ayrıca hazırlanan paklitaksel yüklü PLGA nanopartikül formülasyonları, Caco-2 hücreleri üzerindeki sitotoksitesinin değerlendirilmesi için, hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan paklitaksel yüklü nanopartiküllerin homojen olarak dağıldıkları, partikül büyüklük dağılımlarının 186.9 nm - 239 nm arasında değiştiği gözlenmiştir. Paklitakselin, hazırlanan formülasyonlarda yüksek yükleme değerlerine sahip olduğu gözlenmiş ve salım profillerinde de başlangıçta patlama etkisini, bunu takiben kontrollü salımı gerçekleştirmiştir. Sitotoksite çalışmalarında, paklitaksel yüklü formülasyon, boş formülasyona göre sitotoksik etkiye yol açmıştır. Yapılan çalışmaların, paklitaksel taşınmasını sağlayan polimerik PLGA nanopartikül formülasyonlarının

sitotoksisteyi azaltarak, paklitakselin çözünlük, biyoyararlanım ve stabilitesini arttıran umut vaad edici bir yaklaşım oldukları görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: PLGA, Paklitaksel, Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler, Kanseri Tedavisi.

Danışman: Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı.

FORMULATION AND IN VITRO EVALUTION OF NANOPARTICLES CONTAINING PACLITAXEL

GÖZDE AYGÜL

ABSTRACT

Cancer, which forms a mass or a tumor by reproducing uncontrolled damaged cells in a particular tissue or organ, is one of the common causes of death worldwide. Nanoparticle systems used to deliver drug or biomolecules have been investigated for the purpose of cancer treatment. Polimeric nanoparticles have been frequently used in cancer treatment because of their advantages of increasing drug encapsulation efficiency, providing controlled release, reducing toxicity of the drug and being directed to the target. Paclitaxel stops cell division in the late mitotic phase (G2) by preventing microtubules destruction and inhibits the proliferation of the cells. Taxol which contains Cremophor EL having an allergic effect, is the commercial product of paclitaxel. The aim of our work is to develop nanoparticle drug delivery systems which do not contain Cremophor EL thus reducing the toxic and allergic side effects and cytotoxicity, improving the formulation stability and bioavailability and providing controlled drug release. For our goal, nanoparticles have been prepared in different concentration of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and polyvinyl alcohol (PVA) by emulsification-solvent diffusion method. The effects of PLGA and PVA concentrations on in vitro characterization studies (particle size, zeta potential, loading efficiency, release studies) have been investigated. In addition, cell culture studies have been conducted in order to evaluate prepared paclitaxel loaded PLGA nanoparticle formulation cytotoxicity on Caco-2 cells. It has been observed that prepared paclitaxel loaded nanoparticles are uniformly dispersed and particle size distributions vary between 186.9 nm and 239 nm. It has been seen that prepared formulation of paclitaxel has high loading values and release profiles leading to initial burst effect and followed by controlled release. In cytotoxicity studies, drug loaded nanoparticle formulation has resulted in more cytotoxic effect than blank nanoparticle formulation. According to the results of the studies performed, it has been shown that polymeric PLGA nanoparticle formulations for paclitaxel delivery

is a promising approach reducing cytotoxicity, improving the solubility, bioavailability and stability of paclitaxel.

Key words: PLGA, Paclitaxel, Nanoparticle Drug Delivery Systems, Cancer Treatment.

Advisor: Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN, Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Technology Department.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum Sayın Hocam Prof. Dr. Yılmaz Çapan'a

Hücre kültürü çalışmalarım sırasında yardımlarını gördüğüm Sn. Doç. Dr. İmran Vural'a,

Çalışmalarım sırasında büyük yardım ve desteklerini gördüğüm Ecz. Fırat Yerlikaya'ya,

Çalışmalarım esnasında destekleri ile bana yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Bio. Öğrt. Canan Ulutaş Gülmez ve Bio. Dila Babat'a,

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Ecz. Özge Çevik, Kim. Selva Burçin Hizmetli, Ecz. Seçil Çaban, Ecz. Kıvılcım Öztürk, Ecz. Can Sarısözen, Ecz. Merve Cansız'a,

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

Zaman, mekan gözetmeksizin ihtiyacım olan her an yanımda bulabileceğimden şüphe ettirmeyen dostum Bio. Z.Yeliz Akkaya'ya,

TÜBİTAK-Yurt İçi Yüksek Lisans Bursiyeri olarak, tez çalışmalarımı gerçekleştirme ve bilime katkı sağlama yolunda sağladıkları destek için TÜBİTAK- Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na,

Hayatımın bu aşamasında sevgi ve dostluğunu her zaman hissettiren tüm arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında sevgileri ile maddi ve manevi yönden daima yanımda olan ve bunu her an hissettiren anneme, babama ve sevgili kardeşime teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

| | SAYFA |
|---|-------|
| ÖZ..... | i |
| ABSTRACT..... | iii |
| TEŞEKKÜR..... | v |
| İÇİNDEKİLER..... | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | x |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | xiv |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1. Nanoteknoloji..... | 3 |
| 2.1.1. Nanoteknolojinin Tanımı ve Amaçları..... | 3 |
| 2.1.2. Nanoteknolojinin Kullanım Alanları..... | 5 |
| 2.1.3. Nanoteknolojinin Avantajları..... | 7 |
| 2.1.4. Nanoteknolojinin İlaç Taşınımındaki Yeri..... | 8 |
| 2.2. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler..... | 10 |
| 2.2.1. Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemler..... | 11 |
| 2.2.2. Nanopartiküller..... | 12 |
| 2.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanma Yöntemleri | 15 |
| 2.3.1. Polimerlerin Şekillenmesiyle Oluşan Nanopartiküllerin Üretilmesi..... | 17 |
| 2.3.1.1. Emülsifikasyon/Çözücü Buharlaştırma Metodu..... | 17 |
| 2.3.1.2. Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon Metodu..... | 19 |
| 2.3.1.3. Tuzla Çöktürme/Emülsifikasyon Difüzyon Metodu..... | 20 |
| 2.3.1.4. Nanoçöktürme..... | 20 |
| 2.3.1.5. Süperkritik Sıvı Teknolojisi..... | 22 |
| 2.3.1.6. Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi..... | 23 |
| 2.3.1.7. Püskürterek Kurutma Yöntemi..... | 23 |
| 2.3.2. Polimerizasyon Metodu..... | 24 |
| 2.4. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 2.4.1. Polimerlerin Sınıflandırılması..... | 25 |
| 2.4.2. Biyoparçalanabilir Olmayan Polimerler..... | 27 |
| 2.4.3. Biyoparçalanır Polimerler..... | 27 |
| 2.4.4. Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)..... | 29 |
| 2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu..... | 33 |
| 2.5.1. Partikül Boyutu..... | 34 |
| 2.5.2. Zeta Potansiyel..... | 35 |
| 2.5.3. Etkin Madde Yükleme Kapasitesi..... | 35 |
| 2.5.4. Etkin Madde Salımı..... | 36 |
| 2.6. Kanser..... | 38 |
| 2.6.1. Kanser Tedavi Yöntemleri..... | 41 |
| 2.6.2. Kemoterapide Karşılaşılan Problemler..... | 42 |
| 2.6.3. Nanopartikül Teknolojisi ve Kemoterapi..... | 43 |
| 2.7. Paklitaksel..... | 44 |
| 2.7.1. Tarihsel Gelişimi..... | 44 |
| 2.7.2. Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri..... | 46 |
| 2.7.3. Farmakokinetik Özellikleri..... | 47 |
| 2.7.4. Hücre Bölünmesi ve Kontrol Mekanizmaları..... | 48 |
| 2.7.5. Etki Mekanizması..... | 49 |
| 2.7.6. Klinik Uygulamalarda Karşılaşılan Sınırlamaları ve Endikasyonları..... | 50 |
| 2.7.7. Piyasa Preparatları..... | 52 |
| 2.8. Hücre Kültürü Çalışmaları..... | 55 |
| 2.8.1. Tanımı ve Tarihçesi..... | 55 |
| 2.8.2. Uygulama Alanları..... | 58 |
| 2.8.3. Sitotoksitite Çalışmaları..... | 59 |
| 3. DENEYSEL..... | 60 |
| 3.1. Araçlar ve Gereç..... | 60 |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler..... | 60 |
| 3.1.2. Kullanılan Aletler..... | 61 |
| 3.2. Yöntem..... | 62 |
| 3.2.1. Paklitakselin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini..... | 62 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1.1. Kalibrasyon Doğrusu..... | 62 |
| 3.2.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu..... | 62 |
| 3.2.1.2.1. Doğrusallık (“Linearity”)..... | 63 |
| 3.2.1.2.2. Doğruluk (“Accuracy”)..... | 63 |
| 3.2.1.2.3. Kesinlik (“Precision”)..... | 64 |
| 3.2.1.2.3.1. Tekrarlanabilirlik (“Repeatability”)..... | 64 |
| 3.2.1.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik (“Reproducibility”)..... | 65 |
| 3.2.1.2.4. Duyarlılık (“Sensitivity”)..... | 65 |
| 3.2.1.2.4.1. Saptama Sınırı (“Limit of Detection”)..... | 65 |
| 3.2.1.2.4.2. Miktar Tayin Sınırı (“Limit of Quantification”)..... | 65 |
| 3.2.1.2.5. Özgünlük (“Specificity”)..... | 66 |
| 3.2.1.2.6. Stabilitate (“Stability”)..... | 66 |
| 3.2.2. Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları..... | 66 |
| 3.2.2.1. Boş PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması..... | 66 |
| 3.2.2.2. Paklitaksel Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması..... | 68 |
| 3.2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu..... | 71 |
| 3.2.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri..... | 71 |
| 3.2.3.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi..... | 71 |
| 3.2.3.3. İn Vitro Salım Deneyleri..... | 72 |
| 3.2.4. Sitotoksisite Çalışmaları..... | 72 |
| 4. BULGULAR..... | 74 |
| 4.1. Paklitakselin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini..... | 74 |
| 4.1.1. Kalibrasyon Doğrusu..... | 75 |
| 4.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu..... | 76 |
| 4.1.2.1. Doğrusallık..... | 76 |
| 4.1.2.2. Doğruluk..... | 76 |
| 4.1.2.3. Kesinlik..... | 76 |
| 4.1.2.3.1. Tekrarlanabilirlik..... | 76 |
| 4.1.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik..... | 77 |
| 4.1.2.4. Duyarlılık..... | 78 |
| 4.1.2.5. Özgünlük..... | 78 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.2.6. Stabilité..... | 79 |
| 4.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu..... | 80 |
| 4.2.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri..... | 80 |
| 4.2.1.1. Boş PLGA Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli..... | 80 |
| 4.2.1.2. Paklitaksel Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli..... | 82 |
| 4.2.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular..... | 83 |
| 4.2.3. İn Vitro Salım Çalışmalarına İlişkin Bulgular..... | 83 |
| 4.3. Sitotoksisite Çalışmalarına İlişkin Bulgular..... | 85 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 86 |
| 5.1. Tartışma..... | 86 |
| 5.1.1. Paklitakselin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu..... | 86 |
| 5.1.2. Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları..... | 97 |
| 5.1.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu..... | 90 |
| 5.1.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri..... | 90 |
| 5.1.3.1.1. Boş PLGA Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri..... | 90 |
| 5.1.3.1.2. Paklitaksel Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri..... | 92 |
| 5.1.3.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi..... | 95 |
| 5.1.3.3. İn Vitro Salım Çalışmaları..... | 96 |
| 5.1.4. Sitotoksisite Çalışmaları..... | 97 |
| 5.2. Sonuç..... | 97 |
| KAYNAKLAR..... | 99 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 110 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| ŞEKİL | SAYFA |
|------------|---|
| Şekil 2.1 | Nanometre ve mikrometre boyutlarını anlatan örnekler..... 4 |
| Şekil 2.2 | Nanoteknolojinin kullanım alanları..... 7 |
| Şekil 2.3 | Nanokapsül ve nanoküre modelleri..... 12 |
| Şekil 2.4 | Biyoparçalanır nanopartikül çeşitleri..... 13 |
| Şekil 2.5 | Polimerik nanopartiküllerin hazırlanma yöntemleri..... 16 |
| Şekil 2.6 | Çift emülsiyon (s/y/s) hazırlama yöntemi..... 18 |
| Şekil 2.7 | Biyoparçalanır polimerlerin parçalanma mekanizmaları A) Bulk erozyon B) Yüzey erozyonu..... 27 |
| Şekil 2.8 | PLGA yapısı..... 29 |
| Şekil 2.9 | PLGA nanopartiküllerinin hidrolizi..... 31 |
| Şekil 2.10 | PLGA nanopartiküllerinin hazırlama yöntemleri..... 32 |
| Şekil 2.11 | Kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesi..... 38 |
| Şekil 2.12 | Uzun süreli kalıtsal değişimlerin birikimi ile normal hücreden invaziv tümöre ilerleme gösteren tümör gelişimi... 40 |
| Şekil 2.13 | Paklitakselin etki mekanizması..... 50 |
| Şekil 2.14 | Taksan çekirdeği..... 50 |
| Şekil 2.15 | Taksanların yapısı (A) Paklitaksel (B) Doksataksel..... 51 |
| Şekil 2.16 | Abraxane formülasyonunun yapısı..... 53 |
| Şekil 3.1 | Boş PLGA nanopartiküllerin hazırlanması..... 68 |
| Şekil 3.2 | Paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllerin hazırlanması..... 70 |
| Şekil 4.1 | Paklitaksele ($10 \mu\text{g. ml}^{-1}$) ait HPLC kromatogramı..... 74 |
| Şekil 4.2 | Paklitakselin kalibrasyon doğrusu ve denklemi..... 75 |
| Şekil 4.3 | Yükleme etkinliği ve in vitro salım çalışmalarında elde edilen, etkin madde yüklü ve boş PLGA nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları..... 79 |
| Şekil 4.4 | Boş PLGA nanopartikül boyutu dağılım grafikleri (A) Diklorometan, (B) Aseton..... 81 |
| Şekil 4.5 | Boş PLGA nanopartiküllerine ait zeta potansiyel dağılım grafikleri (A) Diklorometan, (B) Aseton..... 81 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Şekil 4.6 | 1mg dozda paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllerinin vitro salım profilleri (n=3) (A) Kümülatif salım miktarı (μg), (B) % Kümülatif salım..... | 84 |
| Şekil 4.7 | Paklitaksel formülasyonlarının Caco-2 hücreleri üzerinde 24 ve 48 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksisite sonuçları (n=3)..... | 85 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| ÇİZELGE | | SAYFA |
|--------------|---|-------|
| Çizelge 2.1 | Nanoteknolojinin uygulama alanları..... | 6 |
| Çizelge 2.2 | İnsan sağlığını büyük ölçüde tehdit eden hastalıkların tedavisi için geliştirilen nanoteknolojik yaklaşımlar..... | 10 |
| Çizelge 2.3 | Nanopartiküllerin terapötik kullanımı..... | 15 |
| Çizelge 2.4 | Çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonları..... | 18 |
| Çizelge 2.5 | Tuzla çöktürme yöntemi ile hazırlanan polimerik nanopartiküller..... | 20 |
| Çizelge 2.6 | Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonları..... | 21 |
| Çizelge 2.7 | Polimerlerin biyoparçalanabilirliğini etkileyen faktörler... | 28 |
| Çizelge 2.8 | PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyon teknikleri..... | 34 |
| Çizelge 2.9 | İlaç salımını etkileyen faktörler..... | 37 |
| Çizelge 2.10 | Dünyada görülen kanser çeşitleri..... | 39 |
| Çizelge 2.11 | Paklitakselin tarihsel gelişim aşamaları..... | 45 |
| Çizelge 2.12 | Farklı çözücülerde paklitakselin yaklaşık çözünürlük değerleri..... | 46 |
| Çizelge 2.13 | Paklitakselin farmakokinetik özellikleri..... | 47 |
| Çizelge 2.14 | Hücre kültürünün gelişim aşamaları..... | 56 |
| Çizelge 3.1 | Paklitakselin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşulları..... | 62 |
| Çizelge 3.2 | Formülasyon parametreleri..... | 67 |
| Çizelge 4.1 | Paklitakselin HPLC ile miktar tayininde elde edilen regresyon verileri (n=3)..... | 75 |
| Çizelge 4.2 | Paklitakselin gün içi ve günler arası doğruluğu..... | 76 |
| Çizelge 4.3 | Paklitaksel için analitik yöntemin tekrarlanabilirlik sonuçları..... | 77 |
| Çizelge 4.4 | Paklitakselin gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları (n=3)..... | 77 |
| Çizelge 4.5 | Analitik yöntem validasyonunda paklitaksele ait stabilite sonuçları..... | 79 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Çizelge 4.6 | Diklorometan ile hazırlanan %1, 3 ve 5 (a/h) PVA konsantrasyonu ve %2 (a/h) PLGA konsantrasyonundaki nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri..... | 80 |
| Çizelge 4.7 | Aseton ile hazırlanan %1, 3 ve 5 (a/h) PVA konsantrasyonu ve %2 (a/h) PLGA konsantrasyonundaki nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri..... | 80 |
| Çizelge 4.8 | %1, 3 ve 5 (a/h) PVA konsantrasyonu ve %2, 3, 4 (a/h) PLGA konsantrasyonundaki paklitaksel yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri..... | 82 |
| Çizelge 4.9 | PLGA nanopartiküllerine ait yükleme etkinliği sonuçları. | 83 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|------|--|
| a/h | :Ağırlık/hacim |
| AIDS | :Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu |
| ASR | :Yaşa bağlı insidans hızı |
| ATP | :Adenozin trifosfat |
| DCM | :Diklorometan |
| DMAB | :Didesil dimetil amonyum bromür |
| DMEM | :Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMF | :Dimetilformamid |
| DMSO | :Dimetil sülfoksit |
| DNA | :Deoksiribonükleik asit |
| EDTA | :Etilen diamin tetra asetik asit |
| EMA | :Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı |
| FBS | :Foetal bovine serum |
| FDA | :Amerikan İlaç ve Gıda Kurumu |
| HPLC | :Yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| i.v. | : İntravenöz |
| MSS | :Merkezi sinir sistemi |
| MTT | :3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür |
| NCI | :Ulusal Kanser Enstitüsü |
| PACA | :Poli siyanoakrilat |
| PBCA | :Poli bütül siyanoakrilat |

| | |
|---------|---|
| PBS | :Fosfat tamponlu tuz çözeltisi |
| PCL | :Poli (ϵ -kaprolakton) |
| PDI | :Polidispersite indeksi |
| PEG | :Poli (etilen glikol) |
| PEO | :Poli (etilen oksit) |
| PEO-PPO | :Poli (etilen oksit)- poli (propilen oksit) |
| PGA | :Poli (glikolik asit) |
| PLA | :Poli(laktik asit) |
| PLGA | :Poli (laktik-ko-glikolik asit) |
| PMA | :Poli (metil akrilat) |
| PNP | :Polimerik nanopartiküller |
| PVA | :Poli (vinil alkol) |
| RES | :Retiküloendotelyal sistem |
| SDH | :Süksinat dehidrogenaz |
| SDS | :Sodyum dodesil sülfat |
| SLS | :Sodyum lauril sülfat |
| SS | :Standart sapma |
| THF | :Tetrahidrofuran |
| Tg (°C) | :Camsı geçiş sıcaklığı |
| XPS | :X-Işını fotoelektron spektrofotometresi |
| VK | :Varyasyon katsayısı |
| YE | :Yükleme etkinliği |
| YK | :Yükleme kapasitesi |

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde en önemli sağlık sorunlarından birisidir. Dünya genelinde kalp ve damar hastalıklarından dolayı meydana gelen ölüm nedenlerinin ardından kanser gelmektedir. Sık görülmesi ve ölüm oranının yüksek olmasından dolayı bir halk sağlığı sorunudur.

Sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesine ve bölünüp, çoğalmasına neden olmaktadır.

Kanser tedavisinin amacı tüm kanserli hücreleri yok etmektir. Günümüzde cerrahi girişim, radyoterapi, kemoterapi gibi kullanılan bir çok tedavi yöntemleri vardır. Fakat bu yöntemlerin çeşitli olumsuzlukları vardır. Cerrahi girişimde kanser hücrelerinin tamamen temizlenememesi, tümör hücrelerinin metastaz süreçlerini artırabilir. Radyoterapi ve kemoterapide ise tamamen kanser hücrelerine hedeflendirme yapılamaması, tümör hücrelerinin yanında sağlıklı hücrelerin de ölmesine yol açmaktadır. Günümüzde kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir tedavi yöntemi olan kemoterapide, ilaç toksisitesi ve kanser hücrelerinin antikanser ilaçlara karşı direnç kazanması kemoterapinin etkinliğini azaltmaktadır.

Son yıllarda, kanser tedavisi için nanopartiküller ile yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir. Nanopartiküllerin hazırlama kolaylıklarından, etkin ilaç yükleme kapasitelerinden, kontrollü salımını sağlamalarından, adjuvanların toksik etkisini engellemelerinden, istenilen farmakokinetik etkiyi göstermelerinden ve kanser hücrelerine hedeflenebilmelerinden dolayı antikanser ilaç taşıyıcı sistem çalışmaları için önemli bir alternatif olmaktadır. Polimerik nanopartiküller çözünebilir bir polimer matriks içerisinde ilaç taşıyan kolloidal sistemlerdir. Nanopartiküllerin sahip oldukları küçük boyutlarından dolayı, kanserli endotel hücrelere sızması kolaylaşır. Böylece, tümör hücrelerinde nanopartikül konsantrasyonunun istenen düzeyde olma imkanı vardır.

Paklitaksel, son yılların en önemli kemoterapötik ajanlarından biridir. Ovaryum, prostat, meme, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin ve AIDS ile ilişkili Kaposi sarkoma tedavisinde kullanılmaktadır. Paklitaksel mikrotübüllerin stabil halde

kalmasını sağlar. Hücrede mikrotübüllerin polimerizasyonunu arttırarak ve depolimerizasyonunu önleyerek hücre bölünmesini engellemektedir.

Paklitakselin sudaki zayıf çözünürlüğünden dolayı, Taxol® (Bristol-Myers Squibb) ticari preparatında, Cremophor EL (polietoksillenmiş hintyağı):dehidrate alkol karışımı (1:1, h/h) içermektedir. Fakat, Cremophor EL aşırı duyarlılık reaksiyonu, nefrotoksisite, nörotoksisite ve kardiotoksisite gibi bir çok yan etkilere yol açmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, Cremophor EL / etanol taşıyıcısını içermeyen, sonuçta toksik yan etkilerin ve sitotoksisitenin azaltıldığı, formülasyon stabilitesinin ve biyoyararlanımın arttırıldığı paklitaksel içeren polimerik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirmektir. Bu amaçla farklı PLGA ve PVA konsantrasyonu içeren paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküler sistemleri geliştirilmiştir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen nanopartiküllerin partikül boyutu, zeta potansiyeli, yükleme etkinliği ve in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilip karakterize edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları ile hazırlanan nanopartikül formülasyonunun sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasında, FDA'den onaylı, biyoparçalanabilir, toksik olmayan, biyolojik olarak uyumlu bir polimer olan PLGA kullanılarak nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Dispersiyon ajanı olarak ise, PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan PVA seçilmiştir. PLGA nanopartiküler sistemler sıklıkla kullanılan bir yöntem olan emüsifikasyon-çözücü difüzyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Tez çalışmasında, PLGA ve PVA konsantrasyonun paklitaksel içeren nanopartikül formülasyonları üzerindeki etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoteknoloji

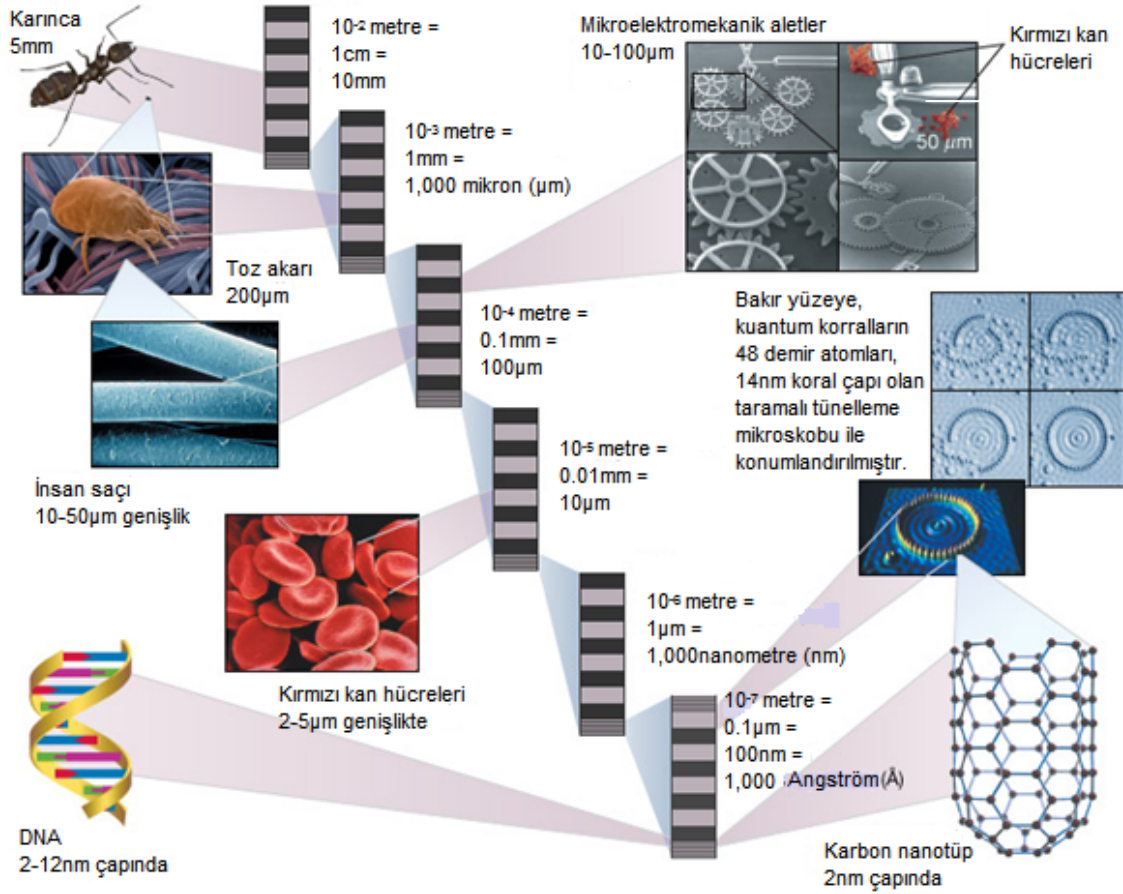
2.1.1. Nanoteknolojinin Tanımı ve Amaçları

Nano kelimesi, Yunanca “cüce” anlamındaki “nanos” tan gelmekte olup, herhangi bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biridir. Amerikan Ulusal Nanoteknoloji Enstitüsü'ne göre nanoteknoloji; ‘görüntüleme, ölçüm, modelleme ve manipule etmeyi kapsayan, 1-100 nanometre boyutlarındaki maddelerin anlaşılması ve kontrolüdür’. Avrupalılar nanoteknolojiyi uygulamaları ve ürünleri içeren 100 nanometreden küçük mühendislik yapıları ile ilgili bir teknoloji olarak daha basitçe tanımlama eğilimindedirler (Davies, J. C., 2006).

İnsan saç teli çapının yaklaşık 10000 nanometre olduğu düşünülürse ne kadar küçük bir ölçekten bahsedildiği daha rahat anlaşılmaktadır. İnsan hücresi 5000 – 200000 nm'dir, bir bakterinin içindeki ribozom 25 nm, bir DNA molekülü ise 2 nm çapında, protein 1-20 nm, ATP molekülü ise 10 nm çapındadır. Hidrojen atomunun çapı ise 0.1 nm olup göz ile görülemeyecek kadar küçüktür (Ochekpe, N. ve ark., 2009).

Nanoteknoloji, atomlarla oynayan bir teknolojidir (Davies, J. C., 2006). Maddenin yapıtaşı olan atomları ya da molekülleri istenilen şekilde düzenlemeye olanak vermesinin yanında, her alanda daha dayanıklı, daha hafif ve doğaya daha az zarar vererek üretim yapılmasını sağlayacak bir teknolojidir (Thrall, J. H., 2004). Atom ve molekülleri tek tek manipüle ederek istenilen yapının oluşturulması ilkesine dayanır. Bir başka deyişle nanoteknoloji, atomları ve molekülleri tek tek işleme ve yeniden düzenleme yoluyla kullanışlı materyal, araç ve sistem yaratma sanatı ve bilimidir (Ochekpe, N. ve ark., 2009).

Yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nano ölçeklerde bir nesneyi oluşturmaktadır. Nanoteknoloji de bu bağlamda “çok küçük maddelerin teknolojisi” olmaktadır. Şekil 2.1'de nanometre boyutunu gösteren örnekler verilmiştir (<http://www.britannica.com/blogs/2010/12/nanotechnology-the-science-of-miniaturization-picture-essay-of-the-day/>).



Şekil 2.1. Nanometre ve mikrometre boyutlarını anlatan örnekler (<http://www.britannica.com/blogs/2010/12/nanotechnology-the-science-of-miniaturization-picture-essay-of-the-day/>)

Nanoteknoloji, maddenin atomik-moleküler boyutta mühendisliğinin yapılarak yepyeni özelliklerinin açığa çıkarılması; nanometre ölçeğindeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması, kontrol ve üretim amacıyla, fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesine olanak vermektedir.

Nanoyapıların sentezinde temel olarak iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; (Erkoç, Ş., 2008, Ocak, N. ve ark., 2009)

- Aşağıdan yukarıya (bottom-up) yöntemi: Atomlar veya moleküller ile organik veya inorganik yapı inşa etmeye dayanır. Organik veya inorganik yapıları, maddenin en temel birimi olan atomlardan başlayarak atom-atom, molekül-molekül inşa edilmesi yöntemini ifade eder. Nano yapıları birleştirmek için doğadaki

kuvvetlerden yararlanılır. Örneğin DNA gibi biyolojik sistemlerin kendi kendine birleşme özelliğinden yararlanılarak karbon nanotüplerin kontrolü sağlanabilir.

- Yukarıdan aşağıya (top down) yöntemi: Bulk materyaller bu yöntem ile nanoyapılar haline alırlar. Yukarıdan aşağıya yönteminde, kırmak, kesmek ya da oyma basma teknikleri kullanılır. Ağırlıklı olarak litografik yöntemler kullanılmaktadır. Oyma ve işleme yöntemi ile nano yapılar ve şekiller elde edilir.

2.1.2. Nanoteknolojinin Kullanım Alanları

Nanoteknolojinin bir çok alanda giderek artan oranda kullanılmasının ve bunun derin toplumsal etkilerinin, ikinci bir sanayi devrimine yol açtığı ve tüm teknolojik gelişmeleri gölgede bırakacak devrim niteliğindeki yeniliklerin özellikle nanoteknoloji ile destekleneceği düşünülmektedir.

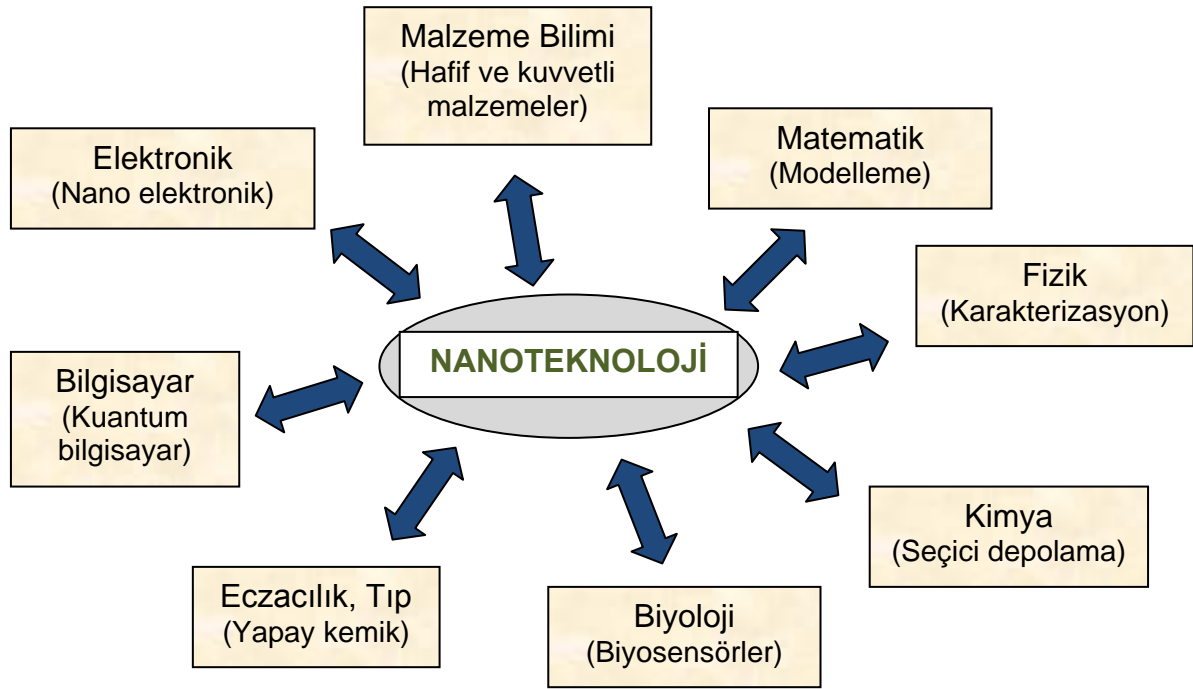
Nanoteknoloji disiplinlerarası bir alan olarak ana kapsamda üç alana ayrılır. Bu alanlar; nanoelektronik, nanomalzemeler ve nanobiyoteknolojidir. Çizelge 2.1'de nanoteknolojik uygulamalar gösterilmiştir (Ochekpe, N. ve ark., 2009).

Çizelge 2.1. Nanoteknolojinin uygulama alanları (Ochekpe, N. ve ark., 2009)

| Nanoteknoloji Alanları | Uygulamaları |
|--|---|
| Nanoelektronik | |
| Bilgisayar | Kameralarda ve bilgisayarlarda kuantum noktaları ve nanoteller, televizyonlarda katod ışınları yerine nanotüpler kullanılması |
| Sensörler | Nanomalzemelerin toprak, su, bitkilerin, gıda ürünlerinin ve diğer ürünlerin kalitesini değerlendirmek için kullanılması |
| Nanobiyoteknoloji | |
| Biyonano sensörler | Enzim ve silikon çiplerinin kombinasyonlarının insanlara ya da hayvanlara implante edilmesi ve böylece hastalıkların gözlenmesi ve ilaçların doğru dozda uygulanması |
| Biyomimetik yapılar | Hastalıkların teşhisi, moleküler görüntüleme ve ilaç taşınması |
| İlaç taşınması | İlaç ve gen terapisi için yeni formülasyonların geliştirilmesi |
| Doku mühendisliği | Doku iskelesini baz alarak nanomalzemeler kullanılıp, hasarlı dokuların onarılması ve tekrar üretimi |
| Endüstriyel Alan | Mikrosensörlerin, mikromakinaların, optoelektronik elemanların imalatı ve uygun şekilde bir araya getirilmesi |
| Nanomalzemeler | |
| Bir boyutlu malzemeler (<i>İnce filmler</i>) | Su geçirmez kumaşlar ve elektronik malzemeler için ince film ve tabakaların kullanılması |
| İki boyutlu malzemeler (<i>Karbon nanotüpler, Karbon nanoteller</i>) | Molibden disülfid gibi inorganik nanotüplerin kataliz ve enerji depolama için kullanımı Veri saklama, elektronik ve optoelektronik cihazlar için silikon nanotellerin kullanılması Sensörler, elektrik akımının iletilmesi ve antistatik ambalajlar için karbon nanotüplerin kullanılması Hidrojen yakıt tüplerinde hidrojeni muhafaza etmek için nanotüp kullanılması |
| Üç boyutlu malzemeler (<i>Nanopartiküller, Kuantum noktaları, Dendrimerler, Fullerenler</i>) | Kozmetik, tekstil, boya, katalizör ve ilaç taşınması için nanopartiküllerin kullanılması, kaydırıcı olarak fullerenlerin (karbon malzemeleri) ilaç taşınmasında ve elektrik devrelerinde kullanılması |

Nanometre boyutlarında malzemelerin sahip oldukları üstün fiziksel özellikleri kullanarak çeşitli alanlarda (bilişim, elektronik, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp, savunma, tekstil, makine ve inşaat sanayileri vb.) çalışmalar yapılmaktadır (Kumari, A. ve ark., 2010).

Nanoteknoloji disiplinlerarası bir alandır. Temel bilimler ve biyofizik, moleküler biyoloji, biyomühendislik gibi uygulamalı bilimlerin birleşimini içerir (Jain, N. K., 2007). Nanoteknolojinin kullanım alanları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Nanoteknolojinin kullanım alanları

2.1.3. Nanoteknolojinin Avantajları

Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde nanoteknolojik uygulamaların geniş sektörlerde geçerli olan bir çok avantajları vardır (Ocekpe, N. ve ark., 2009). Bunlar;

- Yeni ürünler üretmek ve varolan ürünler üzerinde çalışmalar yaparak geliştirmek,
- İnşaat ve mühendislik için, daha sert daha güçlü ve daha hafif malzemeleri üretme imkanı

- Organizmaları ve toksinleri yakalayan filtreler üreterek, temiz içme suları elde etmek,
- Çevredeki kirleticileri uzaklaştırmak,
- Cihazların ve ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ile kronik hastalıklarda daha iyi görüntüleme, teşhis ve tedavinin sağlanması,
- Taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi,
- Ucuz ve temiz enerji sağlanmasıdır.

2.1.4. Nanoteknolojinin İlaç Taşınımındaki Yeri

Çoğu ilaç taşıyıcı sistemlerin zorlukları; düşük biyoyararlanım, in vivo stabilite, çözünürlük, istenilen bölgeye uzun süreli ve hedeflenen taşıma, terapötik etkinlik, yan etkiler ve ilacın plazmadaki dalgalanmalarını kapsar. Fakat ilaç taşınmasında nanoteknoloji, bu zorlukların üstesinden gelmek için tasarlanmış bir yaklaşımdır. Nanoyapıların mikron altı ve nano ölçekte geliştirilip üretilmesi ile birçok avantaj sağlanmıştır.

Genellikle nanoyapıların, enkapsüle edilen ilacın gastrointestinal kanalda hidrolitik ve enzimatik parçalanmadan korunması, uzatılmış salım ve hedef bölgeye ilacın taşınmasını sağlaması, gen terapide proteinlerin ve genlerin de oral yoldan taşınmasını sağlaması, epitel dokudan difüzyonu kolaylaştırarak ilaç emilimini artırması, farmakokinetik ve ilaç doku dağılımı profilini değiştirmesi, intraselüler penetrasyon ve dağılım geliştirmesi gibi avantajları vardır (Couvreur, P. ve Vauthier, C., 2006, Ocheke, N. ve ark., 2009). Nanoyapılı ilaç taşıyıcı sistemler, suda çözünemeyen ilaçların taşınmasını da sağlar. Nanoyapıların vücutta özel alım mekanizmalarının var olması nedeniyle ilaçların oral biyoyararlanımını artırır, ilacın salımını uzatır ve daha az plazma ilaç düzeyi dalgalanmasına yol açıp, yan etkileri en aza indirir. Sahip oldukları küçük boyutları nedeniyle, dokulara ve hücrelere nüfuz etmesi ile, ilaçların etkili bir şekilde etki bölgesine taşınmasını sağlamaktadır.

Farmasötik teknolojide, nanoteknoloji uygulamalarının ana amacı ilaç hedefleme ile ilgilidir. Kansere tedavisinde uygulamalar arasında 'Caelyx, Doxil, Abraxane' yer alır. Diğer bir uygulama alanı da bulaşıcı hastalıkların tedavisinde klinik uygulamalar için onaylanmış 'Ambisome' uygulamasıdır (İnsan bağışıklık eksikliği virüsü, leishmaniasis, sıtma, hastane enfeksiyonları vb.) (Couvreur, P. ve Vauthier, C., 2006). Bu gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılan konvansiyonel ilaç formülasyonları, sağlıklı dokular için yüksek oranda toksik olup, terapilerde kullanımlarında birçok yan etkilere yol açmaktadır.

Nanoteknoloji, peptit ve proteinlerin alınmasında oluşan problemleri aşmak için ve yeni geliştirilecek ilaçlar için umut verici alternatif bir yol olmuştur (Kaparissides, C. ve ark., 2006). İlaçların birçoğu aslında konvansiyonel formülasyonlar ile uygulandığında hem suda hem organik ortamda az çözünen ve dolayısıyla düşük biyoyararlanım, düşük ya da düzensiz emilim profili gösterirler. Nükleik asitlerin taşınmasında nanoteknolojinin kullanılması eşsiz bir fırsat sunmaktadır. Nükleik asitler biyolojik ortamda hızlıca bozulur ve biyolojik bariyerleri güçlükle geçerler. Ayrıca bu molekül terapötik etkiyi sağlamak için hücre içi hedefe ulaşmalıdır. Bu nedenle, nükleik asitlerin terapötik potansiyeli için, hedef bölgeye sunacak uygun taşıyıcılara ihtiyaç vardır (Yan, H., 2004, Couvreur, P. ve Vauthier, C., 2006).

Çizelge 2.2'de insan sağlığını tehdit eden hastalıkların tedavisinde nanoteknolojik yaklaşımlar ile terapötik etkinliğin geliştirilmesi görülmektedir (Couvreur, P. ve Vauthier, C., 2006).

Çizelge 2.2. İnsan sağlığını büyük ölçüde tehdit eden hastalıkların tedavisi için geliştirilen nanoteknolojik yaklaşımlar (Couvreur, P. ve Vauthier, C., 2006)

| Hastalık | Terapötik Amaç | Nanoteknolojik Çözüm Yolu |
|--------------------------------|--|---|
| Kanser | Etkinliği artırmak Toksisiteyi azaltmak Biyodağılımı kontrol etmek Hücre içi penetrasyonu arttırmak | Nanopartiküller Lipozomlar, miseller PEG'lenen nanopartiküller PEG'lenen lipozomlar, PEG'lenen miseller, hedeflenmiş nanopartiküller, hedeflenmiş lipozomlar |
| Enfeksiyon | Etkinliği artırmak Toksisiteyi azaltmak Biyodağılımı kontrol etmek Hücre içi penetrasyonu arttırmak (antijen sunucu hücreler, makrofajlar, dendritik hücreler gibi) | Nanopartiküller Lipozomlar, PEG'lenen nanopartikül, PEG'lenen lipozomlar |
| Metabolik hastalıklar | Parçalanmadan korumak (terapötik peptitler ve proteinler) Mukozal adsorpsiyonu iyileştirmek Kontrollü ve uzatılmış salım sağlamak | Nanopartiküller, lipozomlar Nanopartiküller Lipozomlar |
| Otoimmün hastalıklar | Bağışıklık sistemini hedefleyerek biyodağılımı kontrol etmek Kontrollü ve uzatılmış salım | PEG'lenen nanopartiküller, PEG'lenen lipozomlar |
| Ağrı tedavisi | Kontrol ve uzatılmış salım Merkezi sinir sistemine (MSS) karşı biyoyararlanımı geliştirmek | Lipozomlar MSS'e hedeflenen lipozomlar, nanopartiküller, katı lipid nanopartiküller |
| Gen terapiye bağlı hastalıklar | Parçalanmadan korumak Hücreye alımı artırmak | Katyonik nanoküreler Katyonik lipidler |

2.2. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler

İlaç taşıyıcı sistemler bir ilacın uygulanmasında, uygulama sürecini, salımını kontrol eden sistemlerdir. İlaç taşıyıcı partiküler sistemler polimerik ilaç taşıyıcı sistemler ve nanopartiküller başlıkları altında aşağıda incelenmektedir.

2.2.1. Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaç taşıyıcı sistemler nanoboyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlerin klinik çalışmalara çevrilmesi ile gelişmiştir. Nanoboyuttaki ilaç taşıyıcı sistemler, küçük moleküller (hidrofilik ya da hidrofobik), peptid protein esaslı ilaçlar, nükleik asitler gibi çeşitli terapötik ajanları enkapsüle etme yeteneğine sahiptir (Dinarvand, R. ve ark., 2011).

Son yıllarda biyoparçalanır polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi büyük bir ilgi odağı olmuştur. Çeşitli polimerler ilaç taşıma çalışmalarında hedef bölgeye ilacı taşıma ve yan etkileri azaltarak terapötik etkinliği artırmak amacıyla kullanılmaktadır (Soppimath, K. S. ve ark., 2001).

Konvansiyonel dozaj formları üzerinde biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak uyumlu polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin avantajları şunlardır (Kumari, A. ve ark., 2010, Dinarvand, R. ve ark., 2011);

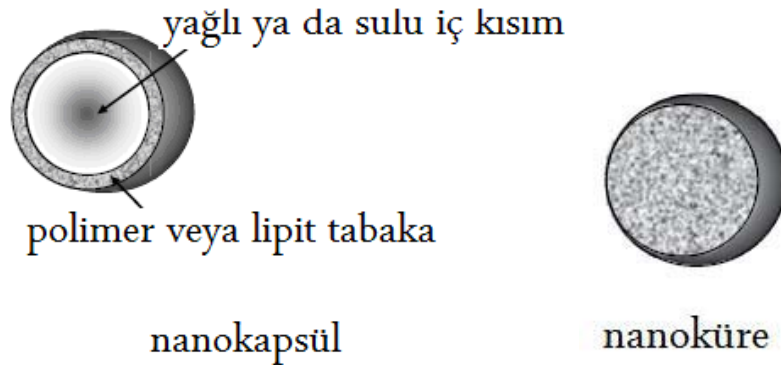
- Terapötik etkinliği geliştirir ve toksisiteyi düşürür.
- Daha düşük ve daha verimli doz kullanımını sağlar.
- Daha az doz sıklığı gerektirir.
- Daha iyi hasta uyuncu sağlar.
- İlacı hidrolitik ya da enzimatik parçalanmadan korur ve stabilitesini sağlar.
- Hoş olmayan tat ve kokuyu maskeleyebilir.
- Polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin en büyük avantajı polimer matriks içindeki ilacın değişmeden kalması ve bu nedenle biyolojik etkileri, emilim, dağılım, metabolizması ve atılımı, polimerden salındıktan sonra doğal ilaçla aynı olmasına olanak vermesidir.
- Uygun sistem hazırlandığında, parametreler kontrol edilerek istenilen salım profili elde edilebilir.

Polimerik ilaç taşıyıcı sistemler arasında dendrimerler, polimerik miseller, niozomlar, nanojeller ve nanopartiküller yer almaktadır.

2.2.2. Nanopartiküller

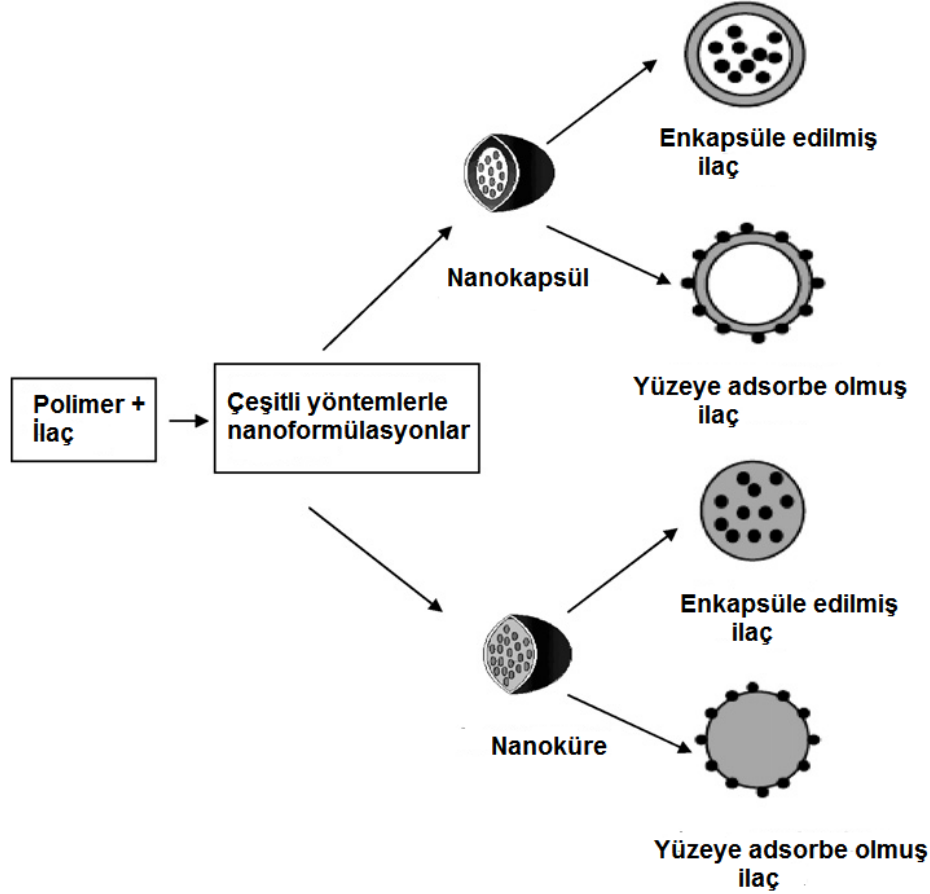
Nanopartiküller genellikle 10-1000 nm aralığında katı, koloidal partiküller olarak tanımlanır ve doğal ya da sentetik polimerlerden hazırlanırlar (Soppimath, K. S. ve ark., 2001, Allard, E. ve ark., 2009). Nanopartiküller ilaç taşınmasında önemli bir çalışma alanı olmuştur. Çünkü bir çok ilacı vücudun herhangi bir bölgesine taşıyabilmektedir. Doğal polimerler (örn; polisakkaritler, proteinler gibi) saflıklarındaki değişkenliklerinden dolayı genellikle tercih edilmezler. Sentetik polimerler nanopartikül üretiminde büyük bir ilgi odağı olmuştur. Nanopartikül üretiminde en çok kullanılan polimerler; poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA) ve bunların kopolimerleri poli (laktik-ko glikolik asit) (PLGA)'dir. Bu polimerler biyouyumlu polimerlerdir. Parçalanma oranları ve dolayısıyla ilaç salım hızları PLA oranı değiştirilerek hidrofobik özellik artırılır veya PGA oranı değiştirilerek hidrofilik özellik artırılabilir (Hans, M. L. ve Lowman, A. M., 2002).

Nanopartiküller terim olarak nanoküreler ve nanokapsüller gibi nanoparçacıkların herhangi biri için verilmiş genel bir ifadedir. Nanoküreler küre şeklindeki matris parçacıklardır, yani ilaç molekülünün matris yapısı içerisinde çözündüğü, hapsediği, enkapsüle veya adsorbe edildiği, katı ve koloidal partiküllerdir. Nanokapsüller polimerik bir duvarla çevrili, ara yüzeyde lipofilik ve/veya hidrofilik dispersiyon ajanları içeren çoğunlukla yağlı ve bazen sulu bir çekirdekten oluşan mikron altı nanopartiküllerdir (Soppimath, K. S. ve ark., 2001). Şekil 2.3'te şematize edilmiş halleri görülmektedir (Allard, E. ve ark., 2009).



Şekil 2.3. Nanokapsül ve nanoküre modelleri (Allard, E. ve ark., 2009)

İlaç nanopartiküller içinde çözünür, hapsedilir, nanopartikül matrisine bağlanır veya yüzeye tutturulur (Soppimath, K. S. ve ark., 2001). Biyoparçalanır nanotaşıyıcıların sentezi ve ilacın enkapsülasyonu Şekil 2.4'te gösterilmiştir (Kumari, A. ve ark., 2010).



Şekil 2.4. Biyoparçalanır nanopartikül çeşitleri (Kumari, A. ve ark., 2010)

Nanopartiküllerin önemli avantajları vardır. Nanopartiküller intravenöz enjeksiyon ve kas içi ve deri altı bölgeler de dahil, olası tahriş edici reaksiyonların azalması ve aynı zamanda makrofajlardan kaçma yeteneğine sahiptir. Ayrıca, bu polimerik nanopartiküllerin küçük boyutlarından dolayı, enkapsüle edilmiş antikanser ilaçların bağırsak hücre zarında bulunan P-glikoproteinler tarafından eliminasyondan kaçma eğilimi vardır. İlaç enkapsüle edilmiş nanopartiküllerin oral alımı uzatılmış salım sağlayabilir. Nanopartiküllerin başlıca avantajları (Kumar, R., 2000, Hans, M. L. ve Lowman, A. M., 2002, Garcia-Garcia, E. ve ark., 2005, Kaur, I. P. ve ark., 2008, Singh, R. ve Lillard, J. W., Jr., 2009, Dinarvand, R. ve ark., 2011);

- Nanopartiküller, biyolojik olarak parçalanabilme, biyogeçimlilik, toksik olmama, mukoadesiflik gibi avantajlı biyolojik özelliklere sahiptir.
- Yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahiptirler.
- İlacın çözünürlüğünü geliştirerek, biyoyararlanımı artırır.
- Hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları içermeye olanak sağlar.
- Polimerik partiküler yapı katı matriks içine hapsedilmiş terapötik ajanı enzimatik parçalanmadan (örn; proteazlar, nükleazlar gibi) korur.
- Nanopartiküllerin polimerik yapıları aktif maddenin doku veya organlara hedeflendirilmesini, salımının kontrolünü sağlar.
- Diğer kolloidal taşıyıcı sistemlerle kıyaslandıklarında polimerik nanopartiküller biyolojik sıvılarda çok daha yüksek stabiliteye sahiptirler.
- Nanopartiküller kolaylıkla sterilize edilebilen kolloidal partiküllerdir.
- Küçük partikül boyutları nanopartiküllerin küçük kapillere penetrasyonuna imkan verir ve hücreler tarafından tutulmalarını sağlar. Böylece, vücutta hedeflenen bölgede istenen aktif madde salımı sağlanır.
- Aktif maddenin hedef bölgede sürekli salımını sağladıkları için aktif maddenin diğer organ ve dokular üzerindeki sistemik toksisitesini azaltırlar.
- Aktif maddenin vücuttaki dağılımını ve terapötik etkinliğini düzenler.
- Üretim teknikleri genel olarak basit ve kolaydır.
- Nanopartiküllerin yüzey özellikleri çeşitli ajanlarla modifiye edilerek retiküloendotelial sistem (RES) makrofajları tarafından tanınması engellenir.
- Yüksek fiziksel stabilite gösterirler.
- Nanopartiküller hedef organları da dahil olmak üzere karaciğer, dalak, akciğer, omurilik ve lenf gibi organlara ulaşmak için dokulardaki hücrelerden ve boşluklardan penetre olabilir.

Nanopartikül Dozaj Formunun Terapötik Uygulamaları Çizelge 2.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Nanopartiküllerin terapötik kullanımı (Couvreur, P. ve Vauthier, C., 2006)

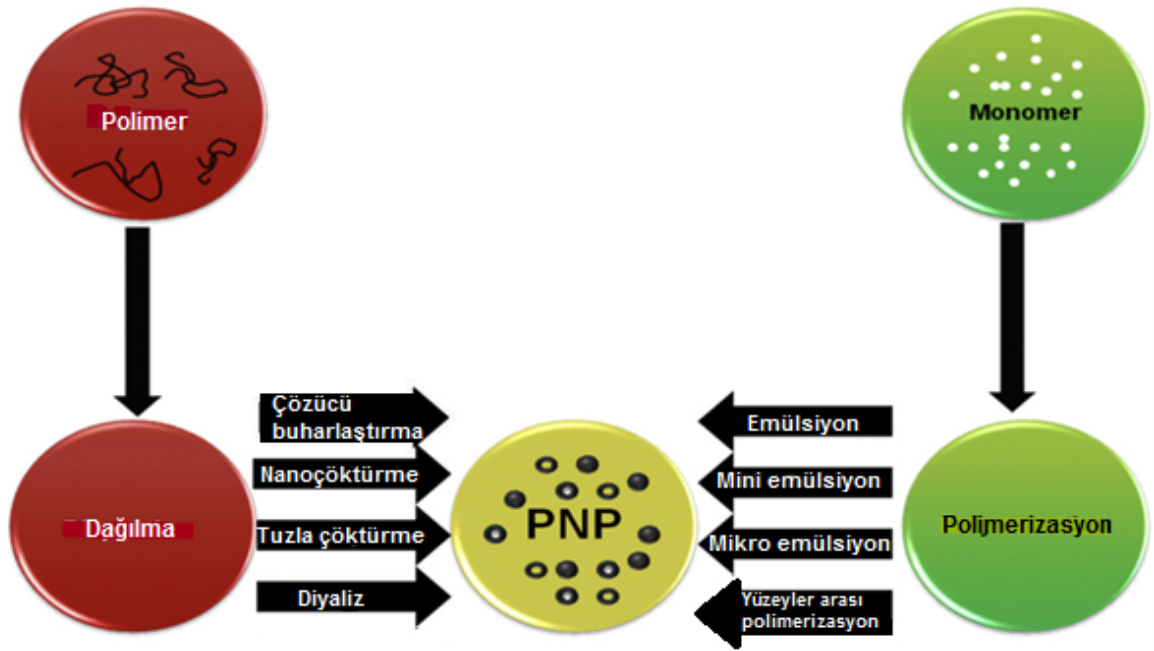
| Uygulama | Kullanılan Materyal | Amaç |
|----------------------------|---|---|
| Kanser tedavisi | Antikanser ajanlar, oligonükleotidler ve polialkil siyanoakrilat nanopartiküller | Hedefleme, toksisiteyi azaltma, antitümör ajanların geri alınımını artırma, in vivo ve in vitro stabiliteyi iyileştirme |
| Hücre içi hedefleme | Antiparazitik, antibakteriyal veya antiviral ajanların polialkil, siyanoakrilat, poliester nanopartiküller | Hücre içi enfeksiyon, RES hedeflenmesi |
| Uzatılmış sistemik dolaşım | Adsorbe olmuş polietilen glikol ile poliester, poliester türevleri | Uzatılmış sistemik ilaç, RES tarafından geri alımı önlemek |
| Aşı adjuvanı | Oral ve intramüsküler immünizasyon Aşı ile poli metil metakrilat nanopartiküller | Artan immün cevap Alternatif uygun adjuvan |
| Peroral absorpsiyon | Proteinler ve terapötik ajanlar ile poli metil metakrilat nanopartiküller | Artan biyoyararlanım Gastrointestinal enzimlerden koruma |
| Oküler dağılım | Steroidlere bağlı glokom, antienflamatuarlar, antibakteriyal ajanlar ile polialkil siyanoakrilat nanopartiküller | İlaç birikimini iyileştirmek |
| Diğer uygulamalar | Peptide poli siyanoakrilat nanopartiküller Transdermal uygulamalar için poli-siyanoakrilat nanopartiküller Radyoaktif veya farklı ajanlar ile nanopartiküller | Kan beyin engeline geçiş Absorpsiyonu iyileştirmek Görüntüleme |

2.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanma Yöntemleri

Nanopartiküller, belirli uygulamalara göre optimize edilmelidir. İstenilen özelliklere ulaşabilmek için ilk olarak hazırlık çalışması yapılmalıdır. Bu yüzden, belirli bir uygulama için istenilen özelliklere sahip nanopartikül elde etmek için hazırlama teknikleri çok önemlidir. Polimer ve yöntem seçimi son ürünün istenilen

özelliklerine (morfoloji, salım profili vb), ilacın doğal yapısına ve kaplama materyalinin özelliklerine göre seçilir.

Polimerik nanopartiküller polimerlerin şekillendirilmesiyle ya da direkt olarak monomerlerden klasik polimerizasyon yöntemi ile polimerler elde edilmesiyle hazırlanabilir. Çözücü buharlaştırma, tuzla çöktürme, diyaliz ve süperkritik sıvı teknolojisi gibi yöntemler polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için kullanılabilir (Mohanraj, V. J. ve Chen, Y., 2006). Diğer bir yandan, polimerik nanopartiküller mikroemülsiyon, miniemülsiyon, dispersiyon ajanı içermeyen emülsiyon ve yüzeylerarası polimerizasyon yöntemleri gibi bir çok polimerizasyon yöntemleri kullanılarak direkt olarak monomerlerin polimerizasyonu ile de sentezlenebilir. Şekil 2.5'te farklı hazırlama yöntemlerini içeren şema görülmektedir (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011)



Şekil 2.5. Polimerik nanopartiküllerin hazırlama yöntemleri (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011)

Hazırlama yönteminin seçimi polimerik sistemin türüne, uygulama alanına, istenilen boyuta vb. bir çok faktöre dayanarak yapılır. Örneğin, biyomedikal ya da çevresel alandaki uygulamalar için geliştirilecek olan polimerik sistem, dispersiyon ajanları ya da organik solvan kalıntıları gibi katkı maddelerinden ve reaktanlardan

arındırılmış olmalıdır. Bu durumda, süperkritik çözelti seçilmelidir. Çünkü bu yöntemde nanopartikül hazırlama sürecinde herhangi bir dispersiyon ajanı ya da organik çözücü kullanılmamaktadır (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011).

2.3.1. Polimerlerin Şekillenmesiyle Oluşan Nanopartiküllerin Üretilmesi

2.3.1.1. Emülsifikasyon/Çözücü Buharlaştırma Metodu

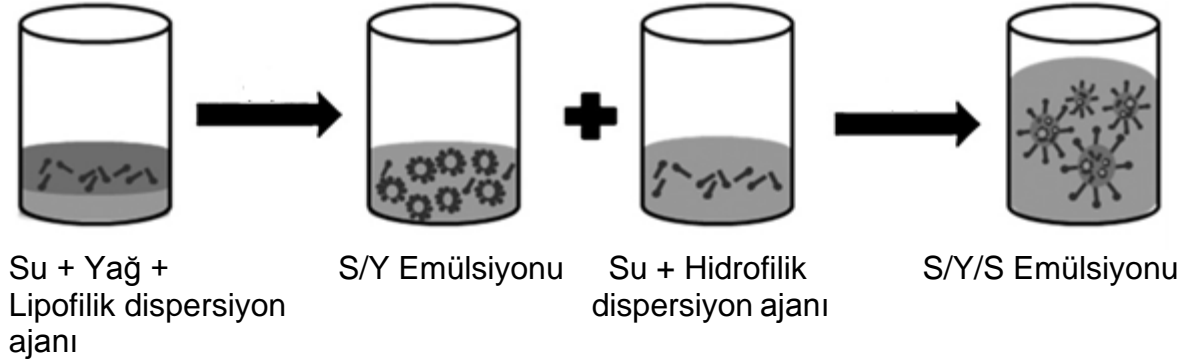
Çözücü buharlaştırma, önceden oluşturulmuş bir polimerden polimerik nanopartikül hazırlamak için geliştirilen ilk yöntemdir. Bu yöntemde polimer çözeltisi uçucu çözücüler içinde hazırlanarak, dispersiyon ajanı içeren sulu faza eklenerek emülsiyonlar formüle edilir. Çözücü uçurma yöntemi, emülsifikasyon sırasında oluşan iç fazdaki damlacıkların stabilitesi ve agrege olmasının engellenmesi için dispersiyon ajanı ya da emülsifiye edici bir ajan gerektirir. Sulu fazda jelatin, poli (vinil alkol), polisorbitat 80, poloksamer 188 vb. gibi dispersiyon ajanları kullanılır (Soppimath, K. S. ve ark., 2001). Dispersiyon ajanları amfifilik özellikte olduğundan iki faz arasındaki yüzeylerarası serbest enerjiyi düşürürerek stabiliteyi destekler. Ayrıca, damlacık yüzeyinde bir yük ya da sterik engel oluşturulması, birleşmeye ve topaklaşmaya (flokülasyon) karşı direnç kazandırır.

Geçmişte diklorometan ve kloroform gibi toksik etkiye sahip çözücüler yaygın olarak kullanılmaktaydı. Fakat bu çözücüler etil asetat, aseton gibi daha az toksikolojik profile sahip çözücülerle yer değiştirdi. Organik çözücünün sabit basınç altında, sıcaklığın artırılmasıyla ya da sürekli karıştırılmasıyla buharlaşması sağlanır ve emülsiyon, nanopartikül süspansiyonuna dönüşür. Bu yöntem, yüksek hızlı homojenizatör veya ultrasonikasyon ile homojenize etme ve bunu takiben oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda ya da düşük basınç altında çözücünün buharlaştırılması ile gerçekleştirilir. Sertleşen nanopartiküller ultrasantrifüj ile toplanır ve distile su ile bir kaç kez yıkanarak dispersiyon ajanı gibi katkı maddelerinin uzaklaşması sağlanır. Son olarak örnek liyofilize edilir.

Literatürlerde, çözücü buharlaştırma polimerik nanopartikülleri hazırlamak için kullanılan en yaygın tekniktir. Bu yöntemde emülsiyon oluşması için iki ana strateji kullanılmaktadır: Tek emülsiyon hazırlama örn; yağ içinde su fazı (s/y) veya su içinde yağ fazı (y/s) ya da çift emülsiyon hazırlama örn; s/y/s emülsiyonu gibi. Çift emülsiyon genellikle suda çözünen ilaçların hapsedilmesinde kullanılan bir

yöntemdir. Genellikle polimer organik solvan içinde çözünerek yağ fazını oluştururken, su fazında da stabilizör bulunmaktadır.

Şekil 2.6'da çift emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemini şematize olarak göstermektedir (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011)



Şekil 2.6. Çift emülsiyon (s/y/s) hazırlama yöntemi (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011)

Nanopartiküller, polimer ve kopolimerler ile farklı çözücüler ve stabilizörler kullanılarak hazırlanır. Çizelge 2.4'de farklı polimerler ile hazırlanan emülsiyon tipleri görülmektedir (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011).

Çizelge 2.4. Çözücü uçurma yöntemi ile hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonları (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011)

| Polimer | Organik çözücü | Stabilizör | Emülsiyon tipi | Partikül boyutu (nm) | Kaynak |
|----------|----------------------|----------------|----------------|----------------------|---------------------------------|
| POP | Aseton | Poloksamin 908 | Y/S | 200 | (Vandorpe, J. ve ark., 1996) |
| PLGA | Diklorometan/ Aseton | PVA | Y/S | 60-200 | (Song, C. X. ve ark., 1997) |
| PLGA | Diklorometan | Span 40 | S/Y/S | 200 | (Lemoine, D., Preat, V., 1998) |
| PLA | Diklorometan | PVA | S/Y/S | 200 | (Zambaux, M. F. ve ark., 1998) |
| PEG-PLA | Diklorometan | Sodyum kolat | S/Y/S | 200 | (Queltec, P. ve ark., 1999) |
| mPEO-PLA | Diklorometan | Sükroz | S/Y/S | 268 | (Zambaux, M. F. ve ark., 1999) |
| PLGA | Kloroform | SDS | S/Y/S | 76 | (Musyanovych, A. ve ark., 2008) |

Çözücü buharlaştırma yöntemi ile polimerik nanopartiküller kolay hazırlanmasına rağmen, buharlaşma sürecinde nano damlacıkların birleşimi partikül boyutunu ve morfolojisini etkileyebilir.

Emülsifiye edici ajanın tipi ve miktarı, nanopartiküllerin morfolojisi, boyutu, enkapsülasyon etkinliği, salım profili ve partiküllerin alımı gibi özelliklerinin saptanmasında büyük rol oynar. Farmasötik uygulamalar için, emülsifiye edici ajan terapötik uygulamalar için kabul edilebilir olmalıdır. Partiküllerin boyutları homojenizasyon hızı, çözücü madde tipi ve miktarı, organik ve sulu fazın viskozitesi, sıcaklık gibi parametrelerden etkilenmektedir (Pinto Reis, C. ve ark., 2006).

Çözücü buharlaştırma yöntemi kolay bir yöntem olmasına rağmen, bir çok parametre partikül oluşmasında etkilidir. Bunlar; polimer bileşimi ve ağırlığı, enkapsüle edilecek ilacın çözünürlüğü, emülsiyonun sıcaklığı, karıştırma hızı, kullanılan çözücünün özellikleri ve kullanılan emülsifiye edici ajanın özellikleridir.

2.3.1.2. Emülsifikasyon/Çözücü Difüzyon Metodu

Çözücü buharlaştırma yönteminin modifiye bir yöntemidir. Aseton ya da metanol gibi su ile karışabilen bir çözücü ile diklorometan veya kloroform gibi su ile karışmayan organik çözücüler birlikte yağ fazını oluşturur. Suda çözünen çözücülerin (aseton ya da metanol) hızla buharlaşması ile iki fazın arayüzeyindeki oluşan türbülans ile iki faz arasında daha küçük partikül oluşumunu sağlamaktadır. Suda çözünen çözücünün konsantrasyonu arttıkça, partikül boyutu azalmaktadır (Soppimath, K. S. ve ark., 2001, Pinto Reis, C. ve ark., 2006, Ozturk, K. ve ark., 2010).

Benzil alkol, propilen karbonat, etil asetat, izopropil asetat, metil asetat, metil etil keton, benzil alkol, bütillaktat ve izovalerik asit gibi çözücüler kullanılmaktadır. Bu yöntem bir çok çalışmada PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Dinarvand, R. ve ark., 2011).

Bu yöntemin yüksek enkapsülasyon etkinliği (genellikle > % 70), homojenizasyona gerek duyulmaması, yüksek oranlarda ve tekrar edilebilir üretimi, ölçek büyütme kolaylığı, dar boyut dağılımı gibi avantajları vardır (Pinto Reis, C. ve ark., 2006).

2.3.1.3. Tuzla Çöktürme/Emülsifikasyon Difüzyon Metodu

Sulu polimer çözeltisine tuz ekleme ile polimerin çözeltiden ayrılıp başka bir faz oluşmasını kapsayan bir yöntemdir. Bu yöntemin bir dezavantajı son üründe ilaç salımında yan etki oluşturabilecek yüksek oranda tuzun bulunmasıdır.

Tuzla çöktürme yöntemi emülsifikasyon/çözücü difüzyon yönteminin modifiye halidir. Polimer ve ilaç aseton gibi bir çözücüde çözülür. Oluşan bu çözelti daha sonra tuzla çöktürme ajanı (magnezyum klorür, kalsiyum klorür ve magnezyum asetat gibi elektrolitler ya da sukroz) ve polivinil piroolidon ya da hidroksietil selüloz gibi koloidal stabilizör içeren sulu faz içinde emülsifiye edilir. Oluşan yağ/su emülsiyonu asetonun sulu faza diffüze olması için yeterli hacimde su ya da sulu çözelti ile seyreltilip nanokürelerin oluşması sağlanır (Pinto Reis, C. ve ark., 2006, Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011). Çizelge 2.5'de tuzla çöktürme yöntemi ile hazırlanan nanopartikül formülasyonları görülmektedir (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011).

Çizelge 2.5. Tuzla çöktürme yöntemi ile hazırlanan polimerik nanopartiküller (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011)

| Polimer | Tuzla Çöktürme Ajanı | Organik Çözücü | Partikül Boyutu (nm) | Kaynak |
|----------|----------------------|----------------|----------------------|---------------------------------|
| PEO | $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | Aseton | 280±03 | (De Jaeghere, F. ve ark., 1999) |
| PLGA | $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | THF | >200 | (Konan, Y. N. ve ark., 2002) |
| PLGA | $CaCl_2$ | Asetonitril | 480 | (Perugini, P. ve ark., 2002) |
| PEO-PLGA | $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | Aseton | 190±70 | (Zweers, M. L. ve ark., 2006) |
| PMA | NaCl | Dil.HCl | 100-250 | (Fan, Y. F. ve ark., 2006) |
| PLGA | PVA | Aseton/DCM | 111.4±2.3 | (Zhang, Z. ve ark., 2006) |

2.3.1.4. Nanoçöktürme

Polimerik nanopartiküller üretmek için nanoçöktürme yöntemi Fessi ve ark. tarafından geliştirilmiştir (Fessi, H. ve ark., 1989). Ayrıca bu yöntemde çözücü yer değiştirme yöntemi de denir (Dinarvand, R. ve ark., 2011).

Yöntemin temel prensibi, su ile karışabilen yarı polar çözücünün yer değiştirmesinden sonra polimerin ara yüzeylere birikmesine dayanır. Nanoçöktürme yöntemi üç temel bileşimden oluşur; polimer (sentetik, yarısentetik veya doğal), polimer çözücüsü, polimerin çözünmediği bir çözücü. Organik çözücüler (örn; etanol, aseton, hekzan, Diklorometan) su ile karışabilir ve kolaylıkla buharlaşabilen özellikte olanlar seçilir. Bu yüzden aseton bu yöntem için en çok kullanılan polimer çözücüsüdür. Bazen aseton ve az miktarda su, aseton ile etanol ve metanol gibi ikili çözücü karışımları kullanılmaktadır. Diğer taraftan, çözücü olmayan faz, bir ya da daha fazla doğal ya da sentetik dispersiyon ajanı içeren bir çözücüden ya da birçok çözücü karışımından oluşur. Çizelge 2.6'da, farklı polimer, çözücü, stabilizör ajan kullanılarak nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan nanopartikül örnekleri görülmektedir (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011).

Çizelge 2.6. Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan polimerik nanopartikül formülasyonları (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011)

| Polimer | Çözücü | Stabilizör ajan | Partikül boyutu (nm) | Kaynak |
|---------|--------|-----------------|----------------------|---|
| PLGA | Aseton | PVA | 95-560 | (Yallapu, M. M. ve ark., 2010) |
| PBCA | Aseton | Pluronic F 68 | 269±4 | (Yordanov, G. G. ve Dushkin, C. D., 2010) |
| PLA | Aseton | Poloksamer 188 | 250±50 | (Seyler, I. ve ark., 1999) |
| PCL | Aseton | Span 20 | 741-924 | (Limayem, I. ve ark., 2006) |
| PCL | Aseton | Polisorbat 80 | 266±11 | (Zili, Z. ve ark., 2005) |
| PLGA | Aseton | - | 165±5 | (Nehilla, B. J. ve ark., 2008) |

Görüldüğü gibi kullanılan polimerler teorik olarak geniş bir yelpazeye sahip olmasına rağmen uygulamada sayıları sınırlanmıştır. Kullanılan polimerler biyoparçalanabilir özelliktedir. Genellikle poli (ϵ -kaprolakton) (PCL), PLA ve PLGA kullanılır.

Polimerik nanopartiküller, karıştırıcı altında organik fazın sulu faza yavaşça eklenmesiyle üretilir. Hatta sulu fazın organik faza eklenmesi bile polimerik nanopartiküllerin oluşmasını sağlamaktadır.

Yöntemin başarısını belirleyen ve nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini etkileyen temel değişkenler; organik fazın sulu faza eklenmesi, organik fazın sulu faza eklenme hızı, sulu fazın karıştırma oranı ve organik faz hacminin sulu faz hacmine oranıdır. Aynı şekilde polimerik nanopartikülün karakteristik özellikleri, bileşenlerin konsantrasyonundan da etkilenir (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011).

Nanoçöktürme basit, hızlı ve tekrar edilebilir bir yöntemdir. Nanoküre ve nanokapsül hazırlamada da yaygın olarak kullanılmaktadır (Pinto Reis, C. ve ark., 2006).

2.3.1.5. Süperkritik Sıvı Teknolojisi

Çözelti buharlaştırma, nanoçöktürme ve polimerizasyon gibi yöntemlerde toksik çözücüler ve dispersiyon ajanları kullanılmaktadır. Bu yüzden doğaya daha az zararlı, mikron ve mikron altı partikül boyutunda ilaç yükleme yöntemleri üzerinde çalışılmıştır. İlaç yüklü nanopartiküllerde çözücü artıkları kalırsa, toksik etki oluşturur ve belki de polimer matriksinde ilaçların parçalanmasına yol açabilir.

Süperkritik sıvı teknolojisi partikül üretimi için farklı ve etkili bir yöntem olarak düşünülmektedir. Nitekim, süperkritik sıvı teknolojisi kullanılarak partiküllerin oluşumu, formülasyonu ve kontrollü salımın çalışıldığı örnekler mevcuttur (Pinto Reis, C. ve ark., 2006, Mohanraj, V. J. ve Chen, Y., 2006).

Süperkritik sıvı teknolojisi cazip bir alternatif olmuştur. Çünkü kullanılan çözücüler toksik özellikte olmayıp, bu yöntemde partiküllerin yüksek saflıkta ve herhangi bir organik çözücü kalıntısı olmadan üretilmesine olanak vermektedir (Soppimath, K. S. ve ark., 2001).

Süperkritik sıvı yöntemi oldukça karmaşık bir işlemdir ve pahalı ekipmanın kullanımını gerektirmektedir.

Süperkritik sıvı teknolojisi kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin geliştirilmesinde en çok kullanılan işlemler; (Soppimath, K. S. ve ark., 2001, Byrappa, K. ve ark., 2008, Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011)

1. Kritik çözeltilinin hızlıca genişmesi (Rapid expansion of supercritical solution) (RESS);

Çözelti oluşturmak için çözünen madde süperkritik sıvıda çözünür, kapiller nozzle karşısında çözeltilinin hızlıca büyüüp, genişlemesi takip eder. Yüksek derecede aşırı doygunluk, hızlıca basıncın azalması ile birlikte, süperkritik sıvıların çözücü gücü birden azalır ve solut çöker. Böylece iyi dağılmış partikül oluşumuna olanak vermektedir. Bu yöntem yüksek molekül ağırlığına sahip polimerler için uygun değildir. Çünkü polimer süperkritik sıvıda çözünmesi sınırlıdır.

2. Süperkritik anti-solvent (SAS)

Yüksek basınçta, yeterli anti-solvent sıvı faza girer ve solvent gücü azalır, çözünen madde aniden çöker. Çökmeden sonra, istenilen son basınca geldiğinde, anti- solvent kanaldan akar. Böylece kalan solvent uzaklaştırılır. Solventin süperkritik sıvı içinde ekstrakte edilmesi solutun aniden çökmesine sonuç olarak da nanopartikülün oluşmasına sebep olur.

2.3.1.6. Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi

Yağ/su emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemine benzer olup, emülsifikasyonu takiben şekillendirilmiş partiküller, büyük hacimdeki çözücü olmayan ortama dökülerek, kalan organik çözücünün ortamdan buharlaşması sağlanır. Böylece partiküllerin hızlı bir şekilde sertleşmesi sağlanır (Rao, J. P. ve Geckelera, K. E., 2011).

2.3.1.7. Püskürterek Kurutma Yöntemi

Partikül kurutma sürecinde örnek sıvı halinde sıcak kurutma ortamında püskürtülerek kuru partikül formu verilir. Örnek, bir çözelti, süspansiyon, emülsiyon veya hamur şeklinde olabilir. Ortaya çıkan ürün, örnek maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre, kurutma yöntemine bağlı olarak toz, granül ya da aglomere partiküller halinde üretilebilir. Püskürterek kurutma endüstride sıklıkla

kullanılır. Püskürterek kurutma yöntemi kontrollü salım sağlayan ürünlerin üretiminde kanıtlanmış bir yöntemdir. En önemli avantajı güvenilir olması, hızlı olması ve zor koşullarda kullanılabilir olmasıdır (Guterres, S. S. ve ark., 2009).

2.3.2. Polimerizasyon Metodu

Nanopartiküller, monomerlerin polimerizasyonu ile de üretilir. Couvreur ve ark. (Couvreur, P. ve ark., 1979) polimerizasyon yöntemi ile metil ve etil siyanoakrilatları asidik sulu ortamda, dispersiyon ajanı olarak polisorbitat 20 kullanarak hazırlayıp, ~200 nm çapında nanopartikül elde etmişlerdir. Siyanoakrilat monomerler, manyetik karıştırıcıda yüzey aktif madde varlığında sulu ortama eklenerek alkilsiyanoakrilatların oda sıcaklığında polimerize olması sağlanır.

İlaç, monomerlere önceden eklenebileceği gibi, polimerizasyon reaksiyonu sırasında da polimerizasyon ortamına eklenerek çözündürülür. Nanopartikül süspansiyonu ultrasantrifüj ile ya da izotonik, dispersiyon ajanının olmadığı ortamda yeniden süspand edilerek saflaştırılabilir.

Polimerizasyon sırasında, dekstran-70, dekstran-40, dekstran-10, poloksamer-188,-184,-237, polisorbitat-20,-40,-80 vb gibi birçok stabilizör/dispersiyon ajanı kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin partikül boyutu ve molekül ağırlığı, kullanılan stabilizörün/dispersiyon ajanının tipine ve konsantrasyonuna bağlıdır (Soppimath, K. S. ve ark., 2001).

2.4. Nanopartiküler Sistemlerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Polimerler çok yönlü özelliğe sahip ve son bir kaç yıl içinde hayatımızı gündün güne değiştiren materyallerdir. Polimerler özellikle son yıllarda ilaç formülasyonlarının geliştirilmesinde, biyomedikal uygulamalar arasında geniş bir kullanım alanına sahip olmuştur (Pillai, O. ve Panchagnula, R., 2001).

Polimerler, çok sayıda aynı ya da farklı atom veya fonksiyonel grubun, kimyasal bağlarla az ya da çok düzenli şekilde bağlanmasıyla oluşan, uzun zincirli, yüksek moleküler ağırlığına sahip moleküllerdir.

Hazırlanacak ilaç taşıyıcı sistemin uygulama yolu, kullanılan ilacın yapısı, dozu ve istenilen salım profilinin eldesi için polimer seçimi önemlidir. Formülasyonlarda kullanılacak polimer seçimi için, fizikokimyasal özelliklerinin yanı sıra, biyokimyasal karakterizasyonu ve güvenli olduğunu kanıtlamak için spesifik klinik öncesi çalışmaları gerektirir. Hidrofiliklik, kayganlık, düzgünlük ve yüzey enerjisi gibi yüzey özellikleri ile geçirgenlik, dayanıklılık ve parçalanabilirlik gibi fiziksel özellikleri doku ve kanda biyoyumlu olup olmadığını etkileyen özelliklerdir (Pillai, O. ve Panchagnula, R., 2001).

2.4.1. Polimerlerin Sınıflandırılması

Polimerler biyoparçalanabilen ve biyoparçalanamayan olarak iki sınıfa ayrılır. İlaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde biyoparçalanır sistemler dikkat çekmektedir. Çünkü biyoparçalanmayan sistemlerin vücuda girmesinden sonra vücuttan uzaklaştırmak için bir başka işleme ihtiyaç duyulur. Doğal ve sentetik polimerler, polimerik nanopartiküllerin yapımında kullanılırlar.

İlaç taşıma sistemlerinde kullanılan polimerler; (Pillai, O. ve Panchagnula, R., 2001)

1) Doğal polimerler

Biyoparçalanabilen polimerler; (selüloz, jelatin, pullulan, kitozan, aljinat)

Ayrıca doğal polimerler, proteinler (albümin, jelatin) ve polisakkaritler (aljinat, kitozan, dekstran) olmak üzere ikiye ayrılırlar.

2) Sentetik polimerler

a) Biyoparçalanabilen polimerler;

Poliesterler; Polilaktik asit (PLA), Polilaktik ko-glikolik asit (PLGA), poli (hidroksi bütirat) , poly (ϵ -kaprolakton), poly (β -malik asit), poli (dioksanlar)

Polianhidritler; Poli(sebasik asit), poli(adipik asit), poli(tereftalik asit) ve çeşitli kopolimerler

Poliamidler; Poli(imino karbonatlar), poli (amino asit)

Fosfor bazlı polimerler; Polifosfatlar, polifosfonatlar, polifosfazener

Diğerleri; Poli(siyanoakrilatlar), poliüretanlar, poliortoesterler, polihidropropanlar, poliasetallar

Bu polimerler hem biyolojik olarak parçalanabilen hem de biyoyumlu polimerlerdir ve vücuda enjeksiyonları ve implantları kolay olur (Uhrich, K. E. ve ark., 1999).

b) Biyoparçalanamayan polimerler;

Selüloz türevleri; Karboksimetil selüloz, etil selüloz, selüloz asetat, selüloz asetat propiyonat, hidroksipropil metil selüloz

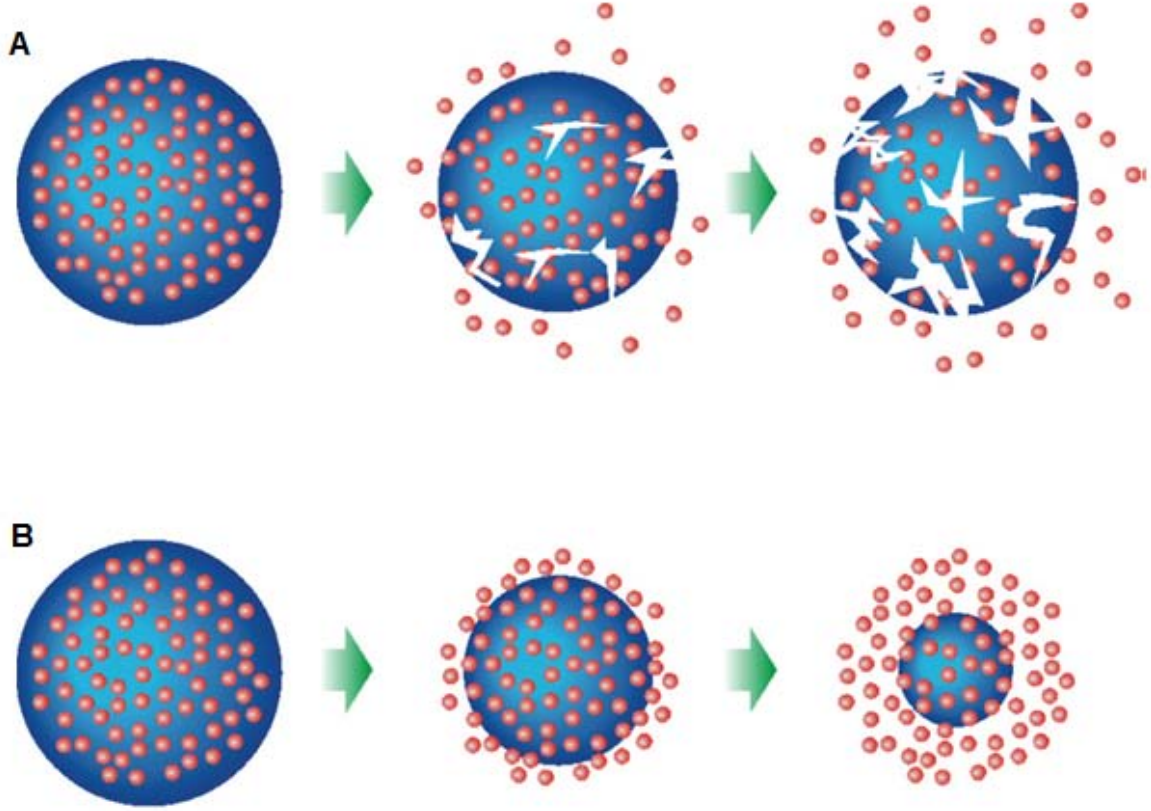
Silikonlar; Polidimetil siloksan, koloidal silika

Akrilik Polimerler; Polimetakrilatlar, poli(metil metakrilat), poli hidro(etil-metakrilat)

Diğerleri; Polivinil pirolidon, etil vinil asetat, poloksamerler, poloksaminler

Sentetik polimerler, önceden sentezlenen (Polianhidrit, Poli kaprolakton-PECL, Poli laktik asit-PLA, metakrilik asit) ve hazırlama sırasında sentezlenen (Poli siyanoakrilat- PACA) polimerlerden oluşur.

Biyodegradasyon enzimatik, kimyasal veya mikrobik kaynaklı olabilir. Erozyon fiziksel bir fenomendir ve çözünme ve difüzyon sürecine bağlıdır. Polimer omurgasının kimyasal yapısına bağlı olarak erozyon, yüzey veya bulk erozyon ile oluşabilir. Yüzey erozyonu, erozyon hızı polimerin hacim içine su nüfuz etme oranını aştığı zaman gerçekleşir. Bulk erozyonu, su moleküllerinin matrikse daha hızlı bir oranda girdiği zaman gerçekleşir (Uhrich, K. E. ve ark., 1999). İlaç taşıyıcı sistemlerden biyoparçalanır polimerlerde genellikle bulk erozyon görülür (Siepmann, J. ve Gopferich, A., 2001). Biyoparçalanır polimerlerin degradasyon mekanizmaları Şekil 2.7'de görülmektedir (Dinarvand, R. ve ark., 2011).



Şekil 2.7. Biyoparçalanır polimerlerin parçalanma mekanizmaları A) Bulk erozyon B) Yüzey erozyonu (Dinarvand, R. ve ark., 2011)

2.4.2. Biyoparçalanabilir Olmayan Polimerler

Bu polimerler biyolojik ortamda parçalanamayan polimerlerdir. Bu nedenle bu polimerlerin dezavantajı vücutta toksik etkiye yok açmalarıdır. Biyolojik olarak parçalanamayan polimerlere selüloz türevleri (karboksimetil selüloz, etil asetat, selüloz asetat), silikonlar (polidimetil siloksan) ve akrilik türevleri (poli(hidroksi etil metakrilat), poli(metoksi etil metakrilat), poli(metakrilik asit)) sayılabilir (Pillai, O. ve Panchagnula, R., 2001) .

2.4.3. Biyoparçalanır Polimerler

Biyoparçalanır polimerlerin geliştirilmesi ile son yıllarda önemli gelişmelere sahip olan ilaç taşıyıcı sistemlerin, terapötik ajanların aktivitelerinin uzatılması ve

kontrolünü gerçekleştirmektedir. Biyoparçalanır polimerler, çeşitli ilaçlar, makromoleküller, hücre ve enzimleri taşımak için sentezlenmiştir.

Ester, ortoester, anhidrit, karbonat, amid, üre ve üretan gibi değişken grupların kendi omurgasına eklenmesi ile polimerlerin biyoparçalanabilirlik özellikleri ayarlanabilir (Pillai, O. ve Panchagnula, R., 2001).

Biyoparçalanır polimerlerin kullanılması, ilaç salındıktan sonra sistemin ortadan kaldırılmasını sağlayan basamağı çıkarır. Bu durum bazı uygulamalarda diğer sistemlere göre önemli avantajlar sağlar. Biyoparçalanır polimerler polimerik yapının hidrolitik ya da enzimatik yol ile ayrılması ile çözünürler. Biyoparçalanır polimerlerin parçalanmasını etkileyen faktörler Çizelge 2.7'de verilmiştir (Pillai, O. ve Panchagnula, R., 2001, Dinarvand, R. ve ark., 2011).

Çizelge 2.7. Polimerlerin biyoparçalanabilirliğini etkileyen faktörler (Pillai, O. ve Panchagnula, R., 2001, Dinarvand, R. ve ark., 2011)

Polimerlerin biyoparçalanabilirliğini etkileyen faktörler

Kimyasal yapı ve bileşimi

Fizikokimyasal faktörler (iyon değişimi, pH, iyonik güç)

Fiziksel faktörler (şekil, boyut)

Morfoloji (amorf yapı, yarı kristal, kristal, mikroyapı)

Parçalanma mekanizması (enzimatik, hidroliz, mikrobiyal)

Molekül ağırlığı dağılımı

Üretim koşulları ve sterilizasyon işlemi

Sertleşme ve saklama koşulları

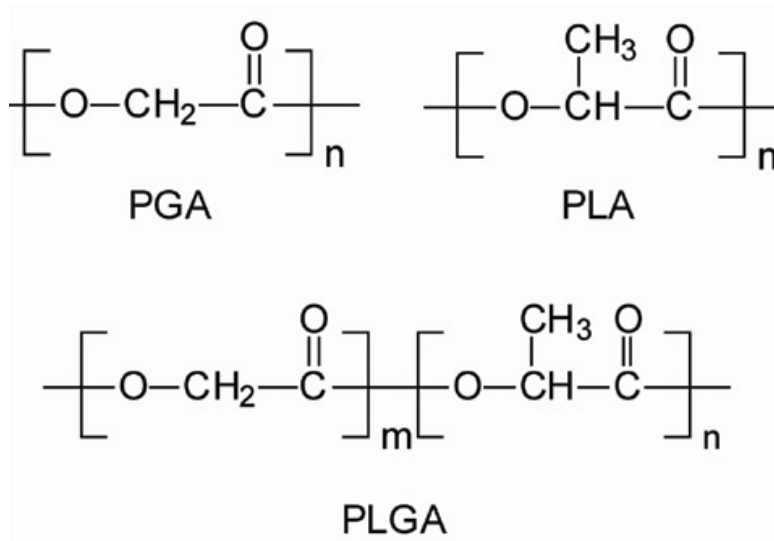
Uygulama yolu ve hedef yeri

Poliester bazlı polimerler ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA) ve kopolimerleri poli (laktik asit-koglikolik asit) (PLGA) iyi tanımlanmış, ilaç taşıma uygulamalarında kullanılan biyomateryallerdir.

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

PLGA ilaç taşıyıcı sistemler için sıklıkla kullanılan FDA'den onaylı, biyoparçalanır nanotaşıyıcılardan biridir.

Başlangıçta, polia (-hidroksi asit)'lerden 1960'larda sentetik, biyoparçalanır polimerik sütürlar geliştirilmiştir (Vert, M., 2005). Poliesterlerin bu grubu biyoyumlu olmasından dolayı ilaç taşıyıcı sistemler arasında en fazla araştırılan biyoparçalanır polimerik taşıyıcılar sınıfında yer almaktadır. Bu sınıfta yer alan polimerler laktik ve glikolik asitin homo- ve ko-polimer türevleridir. Poli laktik asit (PLA), poli glikolik asit (PGA), ve bunların kopolimeri poli (laktik asit-ko-glikolik asit)'dir (PLGA). PLGA termoplastik alifatik ve hidrofobik poli (ester) türüdür. Adından da anlaşılacağı gibi, PLGA D, L-laktik ve glikolik asidin kopolimerizasyonu ile hazırlanır. PLGA'in kimyasal yapısı Şekil 2.8'de gösterilmiştir (Huh, K. M. ve ark., 2003)



Şekil 2.8. PLGA yapısı (m ve n ile gösterilen yerler laktik ve glikolik asit sayısını ifade etmektedir) (Huh, K. M. ve ark., 2003)

PLGA, polikondenzasyon reaksiyonu ile ya da diesterlerin halka açılması ile sentezlenir (Dinarvand, R. ve ark., 2011). Poli (α-hidroksi asitler), genellikle kondenzasyon reaksiyonu ile sentezlenir. Sıklık glikolik ve laktik asit diesterlerinin

halka açılma polimerizasyonu, yüksek molekül ağırlıklı polimerler üretmek için etkin bir yöntemdir.

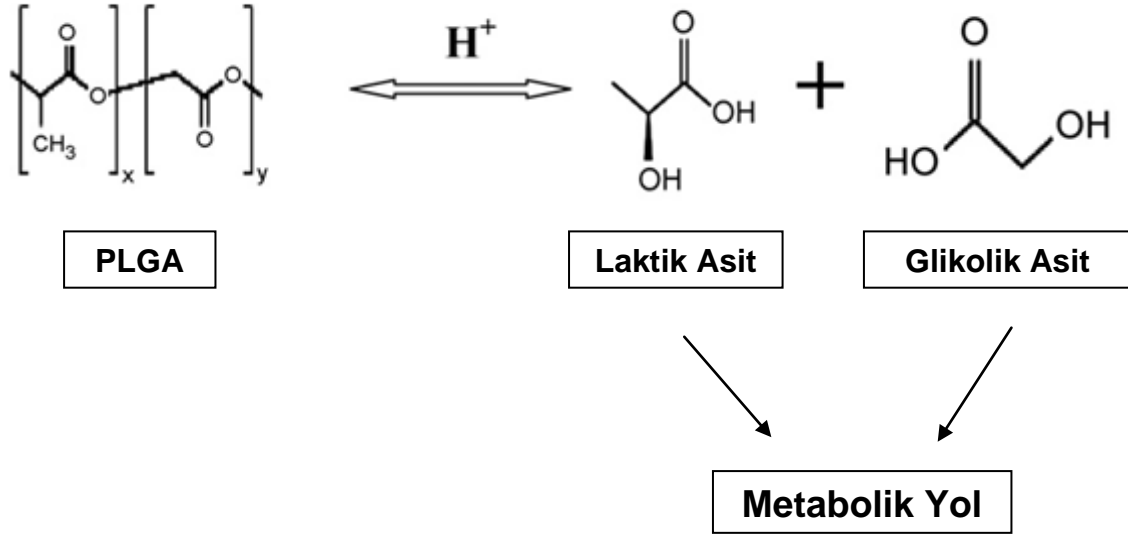
Polilaktik asit polimerinde asimetrik karbon bulunması, optikçe aktif stereoregular formun (L-polilaktik asit) ve optik olarak inaktif rasemik formun (D, L-polilaktik asit) oluşumuna yol açmaktadır. L-polilaktik asit polimer zincir yapısının yüksek bir düzenlilik göstermesinden dolayı doğada yarı kristal yapıdadır. Buna karşın, D,L-polilaktik asidin polimer zincir yapısı düzensiz olmasından dolayı amorf yapıdadır. Poliglikolik asit, metil yan gruplarından yoksun olmasından dolayı yüksek kristal özellik gösterir. PLGA kopolimeri L-polilaktik asit ve poliglikolik asitten hazırlanır. Polimerin kristallik derecesi ve erime noktası molekül ağırlıkları ile ilgilidir.

Mekanik dayanıklılık, şişme davranışı, hidroliz kapasitesi ve biyoparçalanma oranı PLGA polimerinin kristallik derecesinden etkilenmektedir. Kristallik derecesi ise kopolimer zincirlerindeki monomerlerin bireysel oranlarına (laktik ve glikolik) bağlıdır. Laktik asit, glikolik asite göre daha hidrofobiktir. Bu yüzden laktik asitce zengin PLGA daha az hidrofilik özellikte olmakta, daha az su absorbe etmekte ve böylece daha yavaş degrade olmaktadır (Gopferich, A., 1997). PLGA kopolimerinin camsı geçiş sıcaklığı fizyolojik sıcaklığın (37°C) üzerindedir. PLGA'in molekül ağırlığı ve laktid bileşimi azaldıkça, camsı geçiş sıcaklığı azalmaktadır (Dinarvand, R. ve ark., 2011). PLGA'in Tg (°C) değeri 45-55, parçalanma oranı 1-6 ay arasındadır (Huh, K. M. ve ark., 2003).

Polimerin in vitro ve in vivo parçalanma süreci birçok faktöre bağlıdır. Bunlar; (Dinarvand, R. ve ark., 2011)

- Hazırlama yöntemi
- Düşük molekül ağırlığına sahip bileşimleri içermesi (monomerler, oligomerler, katalizörler)
- Boyut ve şekil
- Morfoloji
- Polimerin fiziksel özellikleri (molekül ağırlığı, kimyasal yapısı, hidrofobikliği, kristallik derecesi ve camsı geçiş sıcaklığı)
- Fizikokimyasal özellikleri (ortamın pH'sı, sıcaklığı ve iyonik gücü)
- Hidroliz mekanizması

PLGA, laktik ve glikolik asit monomerik birimlerindeki ester bağlarının verimine göre, spesifik olmayan hidrolitik ayrılma ile parçalanır ve daha sonra da vücuttan atılır. Bu yüzden PLGA biyoparçalanır polimer olarak adlandırılır. Polimer vücutta hidrolize uğrayarak laktik ve glikolik asit gibi metabolit monomerlere dönüşür (Şekil 2.9) (Kumari, A. ve ark., 2010). Laktik asit trikarboksilik asit döngüsüne girer ve vücuttan karbondioksit ve su şeklinde atılır. Glikolik asit ya böbreklerden değişmeden atılır ya da trikarboksilik asit döngüsüne girerek karbondioksit ve su şeklinde vücuttan atılır (Houchin, M. L. ve Topp, E. M., 2008).



Şekil 2.9. PLGA nanopartiküllerinin hidrolizi (Kumari, A. ve ark., 2010)

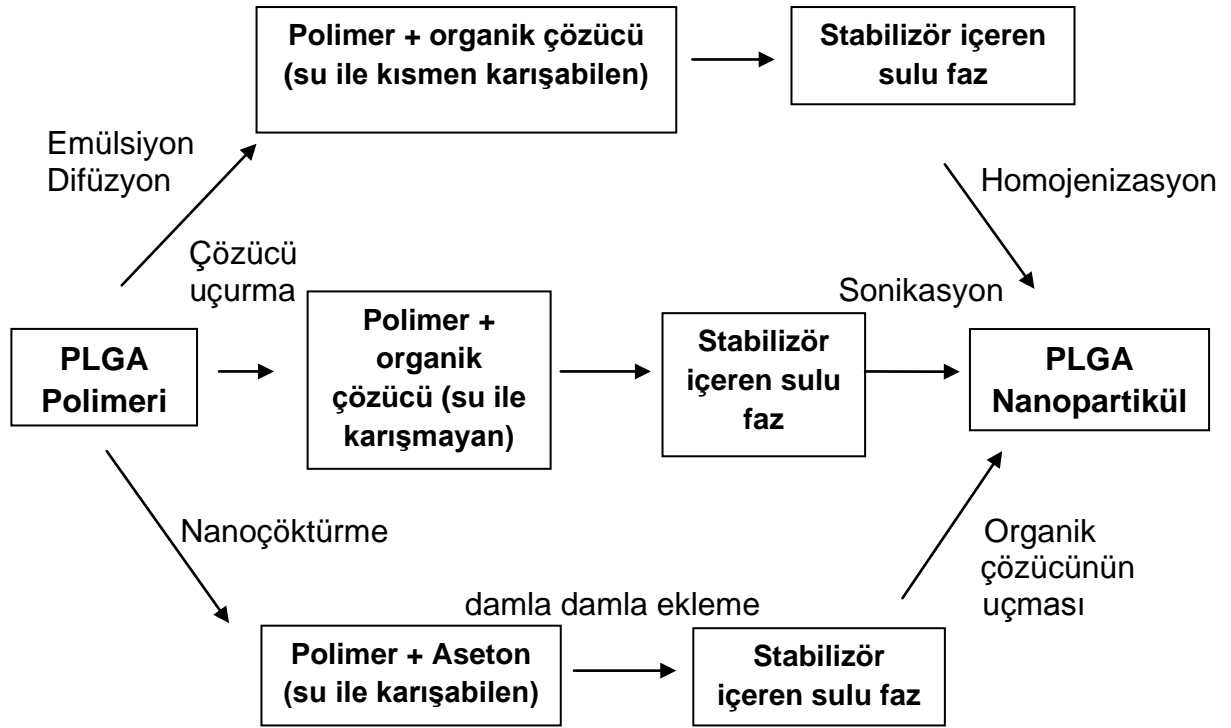
Genellikle parçalanma süresi, düşük molekül ağırlıklı, daha hidrofilik, daha amorf polimerlerde ve daha yüksek glikolid oranına sahip kopolimerde daha kısa sürede gerçekleşir (Dinarvand, R. ve ark., 2011). Bu kopolimerler amorf yapıda ve diklorometan ve etil asetat gibi organik solvanlarda kolaylıkla çözünebilirler.

PLGA parçalanma oranı, enkapsüle edilmiş herhangi bir farmasötik ajanın salımını kontrol eder. İlaç polimerden hem difüzyon ile hem de erozyon ile salınır.

İlaç taşımada PLGA polimeri kullanmanın en büyük avantajı, PLGA'in biyolojik moleküllere kolaylıkla parçalanması ve vücuttan normal metabolik yollar ile uzaklaştırılabilmesidir.

PLGA özelliklerinden biyoparçalanabilirlik ve düşük toksisite özellikleri, yara kapama, diş onarımı, kırık tespiti, ligament rekonstrüksiyonu, vasküler greft, trakeal replasmani, ventral herniorafi, sinir tamiri ve ilaç taşıma gibi bir çok medikal ve farmasötik uygulamalar için uygun olmasını sağlamaktadır.

PLGA nanopartiküller genellikle emülsifikasyon-difüzyon, emülsiyon-çözücü buharlaştırma, ara yüzeylere birikme (interfacial deposition) ve nanoçöktürme yöntemleri ile hazırlanırlar. Hazırlama yöntemleri Şekil 2.10'da görülmektedir (Kumari, A. ve ark., 2010).



Şekil 2.10. PLGA nanopartiküllerinin hazırlama yöntemleri (Kumari, A. ve ark., 2010)

Emülsifikasyon difüzyon yönteminde PLGA polimeri organik çözücülerde (etil asetat, diklorometan, aseton vb.) çözünür ve stabilizör içeren sulu faza aktarılarak homojenizatör ile emülsiyon oluşturulur.

Çözücü buharlaştırma yönteminde polimer, uçucu organik çözücülerde (DCM, aseton, etil asetat vb.) çözünür ve sürekli karıştırma altında stabilizör/emülgatör içeren ya da içermeyen sulu faza eklenip, sonikasyon yapılır.

Ara yüzeylere birikme yöntemi, hem nanokapsül hem de nanoküre oluşumu için kullanılır. Nanopartiküller su ile karışabilen organik çözücü ile su fazının ara yüzeyinde oluşur ve santrifüj ile nanopartiküller ayrılır.

PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan yöntemlerden biri de nanoçöktürmedir. Polimer asetonunda çözünür ve manyetik karıştırıcıda stabilizör/emülgatör içeren ya da içermeyen sulu faza damla damla eklenir ve organik faz düşük basınç altında uçurulur (Kumari, A. ve ark., 2010).

2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin karakterizasyonu, ilaç uygulamalarından önce özelliklerinin anlaşılmasını sağladığından çok önemlidir.

Nanopartikül boyutu sadece salım profilinin tespitinde ve parçalanmalarında önemli bir parametre olmayıp, aynı zamanda ilacın dokuya penetrasyonu ve hücreye alımı açısından da önemlidir. Polimerin molekül ağırlığı polimerin partikül boyutunu, yükleme etkinliğini ve parçalanma oranını etkiler (Dinarvand, R. ve ark., 2011).

İlacın ve polimerin fiziksel durumu, in vitro ve in vivo ilaç salım özelliğini etkileyeceğinden tespit edilmelidir. Zeta potansiyel partiküllerin stabilitesi ile mukoadezyonu ve pH'nın bir işlevi olarak hücreler arası geçişi etkileyebilir.

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda araştırılan parametrelere bağlı olarak birçok hassas teknik vardır. Bu teknikler Çizelge 2.8'de özetlenmiştir (Dinarvand, R. ve ark., 2011).

Çizelge 2.8. PLGA nanopartiküllerinin karakterizasyon teknikleri (Dinarvand, R. ve ark., 2011)

| | |
|--|---|
| Partikül boyutu, boyut dağılımı, morfoloji | Dinamik ışık saçılması ya da foton korelasyon spektrofotometresi, Taramalı elektron mikroskobu (SEM) Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) Atomik kuvvet mikroskobu X-ışını fotoelektron spektrofotometresi (XPS) |
| Molekül ağırlığı | Boyut dışlama kromatografisi (Size Exclusion Chromatography) |
| Yüzey yükü | Zetasizer |
| Kristallik özeliği | X-ışını kırınımı, diferansiyel taramalı kalorimetre |
| Hidrofobiklik | Su ile temas açısı ölçümü |
| Hidrofiliklik | Hidrofobik etkileşim kromatografisi |
| İlaç yükleme etkinliği, ilaç salımı | Boyut dışlama kromatografisi (Size Exclusion Chromatography), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) |

2.5.1. Partikül boyutu

Nanopartikül boyutu belirlenmesinde en hızlı ve en sık kullanılan yöntemler foton korelasyon spektroskopisi ve dinamik ışık saçılmasıdır. Foton korelasyon spektroskopisi ile partikül boyutu, Brown hareketi ve ışık saçılması özelliklerine göre tayin edilir. Foton korelasyon spektroskopisi ile elde edilen sonuçlar genellikle taramalı elektron mikroskobu veya geçirimli elektron mikroskobu tarafından da doğrulanır (Singh, R. ve Lillard, J. W., Jr., 2009).

Nanopartiküllerin partikül boyutu Malvern cihazları gibi cihazlar ile ölçülür. Malvern cihazı ışık saçılmasına göre çalışır. Işık saçılması, örnekteki partiküllerin ortalama çaplarını ve polidispersitelerini ölçmek için kullanılır. Işık saçılması, örnek çözeltisinin içindeki partiküllerin moleküler yapısı ve hareketleri ile ilgili bilgi verir. Dinamik ışık saçılmasında yansıyan ışık miktarının ölçülmesi temeli kullanılmaktadır. Paralel yönlendirilmiş bir ışın demeti, partikül içeren akımdan geçirildiğinde sapmalar, dağılmalar gözlenmektedir. Bu sapma ve dağılmalar,

sapma açısı ile partikül boyut dağılımı ve şekline bağlı olmaktadır. Sistemde ışık şiddetinde değişim olmayacak biçimde düzenekler bulunmaktadır. Bu tür aygıtlarda düşük derişimleri de saptamak olanaklıdır (Goldburg, W. I., 1999).

Partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı nanopartiküllerin karakterizasyonu için en önemli özelliklerdendir. Partikül boyutu ilaç yükleme, ilaç salımı ve stabilitesini de etkilemektedir.

2.5.2. Zeta Potansiyel

Zeta potansiyel mikroskobik malzemelerin yüzeylerindeki elektronik yükün önemli bir göstergesidir.

Nanopartiküllerin zeta potansiyeli genellikle nanopartikül yüzeyindeki yükün karakterizasyonu için tayin edilir (Couvreux, P. ve ark., 2002). Kolloidal süspansiyon veya emülsiyonun stabilitesinin kontrolü ve tahmininde de kullanılır. Zeta potansiyel ayrıca, yüklü aktif bir maddenin nanopartiküle enkapsüle olup olmaması ya da yüzeye adsorbe olup olmadığının belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Zeta potansiyel, parçacıkların elektriksel potansiyellerini yansıtır ve partikül bileşimi ve onların dağıldığı ortam tarafından etkilenir. Deiyonize su ile süspande edilen partiküllerin zeta potansiyeli, zetametre cihazında, partikül yükü izlenerek ölçülmektedir.

Partiküllerin etrafındaki ayrılabilir iyon bulutunun başlangıcı ile ortam arasındaki elektrostatik yük farkının yarattığı voltaj farkı zeta potansiyel olarak adlandırılır. Yüzey yükü partiküllerin agregasyonunu engellediği için, zeta potansiyelleri ± 30 mV üzerindeki nanopartiküllerin, süspansiyon içinde stabil oldukları gösterilmiştir (Singh, R. ve Lillard, J. W., Jr., 2009).

2.5.3. Etkin Madde Yükleme Kapasitesi

Başarılı bir nanotaşıyıcı sistem yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olmalıdır. İlaç yükleme iki yöntem ile gerçekleştirilebilir. İlaç, nanopartikül formülasyonu sırasında eklenir ya da adsorpsiyon yönteminde olduğu gibi ilaç nanopartiküller oluştuktan sonra eklenir. Bu yöntem nanotaşıyıcı ile konsantre ilaç çözeltisinin inkübasyonu ile sağlanır (Kumar, R., 2000).

İlaç yükleme ve enkapsülasyon etkinliği ilacın matriks materyali içindeki (katı polimer ya da sıvı dispersiyon ajanı) çözünürlüğüne bağlıdır. Çözünürlüğü de matriks kompozisyonu, molekül ağırlığı, ilaç-polimer etkileşimi ve hem ilaçta hem de matrikste fonksiyonel grupların (örn; ester ya da karboksil grubu) varlığına bağlıdır (Panyam, J. ve ark., 2004) . Bazı nanopartikül formülasyonlarında ilaç yükleme ve etkileşime çok az ya da hiç etkisi olmayan PEG kullanılır (Peracchia, M. T. ve ark., 1997). Ayrıca makromoleküller, ilaçlar ya da proteinler kendi izoelektrik noktası yakınlarında yüklendiklerinde, nanopartikül içine hapsedilmesi ile yüksek yükleme etkinliği göstermiştir (Calvo, P. ve ark., 1997). Küçük moleküller için yapılan çalışmalarda, ilaç ve matriks materyali arasında iyonik etkileşimin ilaç yükleme oranını etkin bir şekilde artırdığı gösterilmiştir (Chen, Y. ve ark., 2003).

Etkin madde yükleme kapasitesi ile nanopartiküllere hapsedilen etkin madde miktarını ifade eden enkapsülasyon etkinliği (encapsulation efficiency) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır :

$$\% \text{ Enkapsülasyon etkinliği} = [\text{Nanopartiküle yüklenen etkin madde miktarı (mg)} / \text{Nanopartikül miktarı (mg)}] \times 100$$

2.5.4. Etkin Madde Salımı

Bir nanopartiküler taşıyıcı sistem geliştirirken ilaç salımı ve polimerin biyoparçalanma derecesini dikkate almak gerekir. İlaç salım oranı; ilacın çözünürlüğüne, kullanılan polimerin özelliklerine, ilacın yüzeye adsorbe olmasına ya da desorpsiyonuna, ilacın nanopartikül matrikse difüzyonuna, nanopartikül parçalanmasına ya da matriks erozyonuna, ve erozyon-difüzyon kombinasyonlarına bağlıdır (Mohanraj, V. J. ve Chen, Y., 2006).

Nanokürelerde ilaç tekdüze olarak dağılmış, ilaç salımı difüzyon ya da matriks erozyonu ile gerçekleşmektedir. Eğer ilaç difüzyonu matriks erozyonundan hızlıysa salım mekanizması difüzyon işlemi ile kontrol edilir. Hızlı, ani başlangıç salım ya da patlama (burst) özellikteki salım, nanopartiküllere zayıf bağlanan ya da yüzeye adsorbe olan ilaçtan gelen salım profilidir (Magenheim, B. ve ark., 1993). İlacın yüklenme yönteminin salım profili üzerindeki etkisinin önemi açıktır. Eğer ilaç

nanopartiküle hapsolmuş ise, patlama salımı düşük düzeyde etkili olacak ve uzatılmış salım gösterecektir (Fresta, M. ve ark., 1995).

PLGA gibi biyoparçalanır polimerler ile hazırlanan nanopartikülerde ilaç salımı polimerin parçalanmasıyla gerçekleşmektedir. Parçalanma hızı polimerin alkil zincir uzunluğuna göre değişmektedir (Kang, F. ve Singh, J., 2001).

Eğer nanopartikül polimer ile kaplanmış ise, polimerik membrandan ilacın salımı difüzyon ile gerçekleşir. Membran kaplamalar, ilaç salımında bir bariyer gibi davranır. Bu nedenle ilaç çözünürlüğü ve polimerik membrandan difüzyonu ilaç salımında belirleyici faktörlerdir. Ayrıca salım, ilaç ve yardımcı maddeler arasındaki iyonik etkileşimlerden de etkilenir. Hapsedilen ilaç yardımcı maddelerle etkileştiğinde, suda daha az çözünen, yavaş salım profili gösteren kompleks oluşur ve neredeyse hiç patlama salımı gerçekleştirmez (Chen, Y., et al. , 1994). Oysa yardımcı maddelerin eklenmesi örn; kitozana etilen oksit- propilen oksit blok kopolimeri (PEO-PPO) eklenmesi, PEO-PPO ile kitozan arasındaki yarışmalı elektrostatik etkiden dolayı, ilaç ile matriks materyali arasındaki etkiyi azaltmaktadır. Bu yüzden de ilaç salımı artmaktadır (Calvo, P. ve ark., 1997) . Nanopartiküllerden ilaç salımını etkileyen faktörler Çizelge 2.9'da gösterilmektedir (Kaş, H. S., 2002).

Çizelge 2.9. İlaç salımını etkileyen faktörler (Kaş, H. S., 2002)

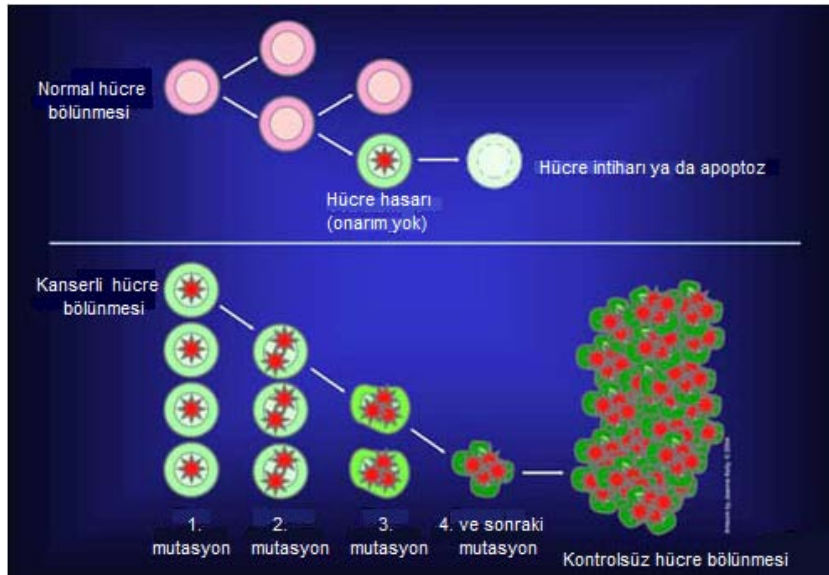
| İlaç | Polimer | Nanopartikül | Çözünme ortamı |
|-------------------------------|------------------------|---|-------------------|
| Moleküler ağırlığı | Moleküler ağırlığı | Hazırlama yöntemi | pH |
| Çözünürlüğü | Kristal yapısı | Partikül boyutu | Sıcaklık |
| Partikül boyutu | Biyoparçalanabilirliği | İlaç miktarı | Karıştırma hızı |
| Nanopartiküllerdeki yerleşimi | | Yüzey özellikleri | Emülgatör varlığı |
| Polimerlerle etkileşimi | | Çapraz bağlayıcı konsantrasyonu ve çapraz bağlanma süresi | Enzim varlığı |

Çeşitli yöntemler nanopartiküllerden ilacın salımı için kullanılabilir; yan yana difüzyon hücreleri, diyaliz torbası ile difüzyon, ters diyaliz torbası ile difüzyon, karıştırma bunu takiben ultrasantrifüj / santrifüj, ultrasantrifüj. Genellikle salım çalışmaları karıştırma ve bunu takiben santrifüj yöntemi ile tayin edilir. Salım ortamında nanopartiküllerin ayrılmasında karşılaşılan sorun karıştırmanın zaman alıcı olmasıdır. Bu yüzden genellikle diyaliz yöntemi tercih edilir. Fakat bu yöntemde endüstriyel kullanımda zorluklar yaratmaktadır (Singh, R. ve Lillard, J. W., Jr., 2009) .

2.6. Kanser

Geçmişteki en önemli ölüm nedenleri arasında yer alan bulaşıcı hastalıklar, tıptaki gelişmeler ile kontrol altına alınmıştır. Buna karşın, kansere yakalanma riski gün geçtikçe önemli ölçüde artmaktadır.

Kalp ve damar hastalıkları hala ölümlerin ana nedeni olmasına rağmen, kanser günümüzün büyük bir sorunudur. Kanser, hücrelerden oluşan bir kitle (tümör) gibi görünse de, aslında bir hücre hastalığıdır (Knowles, M. A. ve Selby, P., 2005). Kanser, hücrelerin kontrolsüz ve normal olmayan büyümeleri ile karakterize edilen bir hastalık grubudur. Şekil 2.11'de kontrolsüz hücre bölünmesi şematize edilmiştir (National Cancer Institute, U. S.).

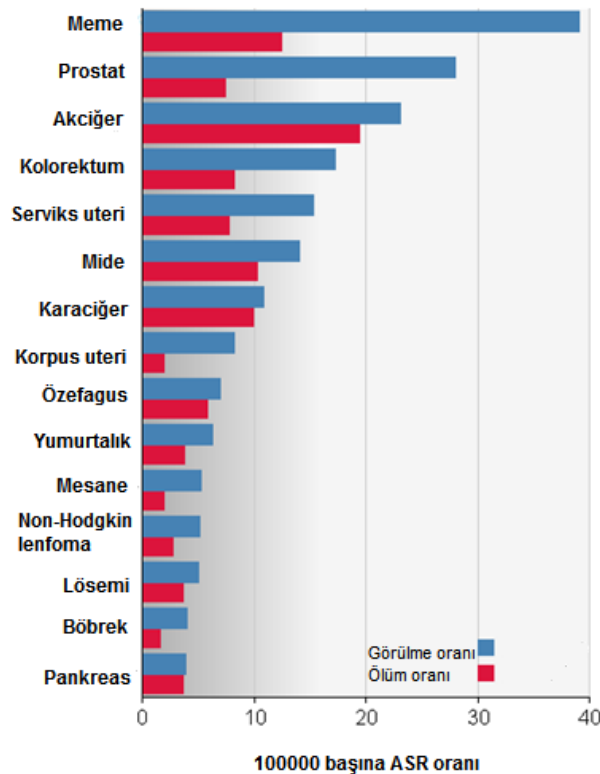


Şekil 2.11. Kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesi (National Cancer Institute, U.S.)

Bu hücreler vücuttaki dokuları, metabolizmayı bozarlar ve vücudun herhangi bir yerine kan ve lenf yolu ile yayılma eğilimi gösterirler. İnsanlar hücrelerden oluşur ve normal hücreler kontrollü hızda büyür ve bölünürler. Kansere vücudun herhangi bir yerindeki tek bir normal hücredeki genin değişimine yol açar. Bu değişiklik gerçekleşikten sonra genin ifadesi değişir ve hücreler artık anormal şekilde davranır. Kansere aslında bu gibi pek çok tür hataların birikiminden kaynaklanmaktadır (<http://www.who.int/>, 2011).

Kansere dünya çapında ölümlerin başta gelen nedenlerinden biridir. 2008 yılında 7.6 milyon kişinin ölümüne yol açmıştır (tüm ölümlerin %13'ü). Kansere vücudun herhangi bir yerini etkileyebilen hastalıkların büyük bir bölümünü içine alan genel bir terimdir. Dünyada sıklıkla görülen kanser tipleri; akciğer kanseri 1.4 milyon, mide kanseri 740000, kolorektal kanser 610000, meme kanseri 460000 ölüme yol açmıştır. Tüm kanserlerin %70'inden daha fazlası düşük ve orta gelire sahip ülkelerde görülmektedir. Dünya çapında kanserden kaynaklı ölümlerin 2030 yılında 11 milyonu aşacağı düşünülmektedir (<http://www.who.int/>, 2011). Dünyada en sık görülen kanserler Çizelge 2.10'da görülmektedir (<http://globocan.iarc.fr>, 2008);

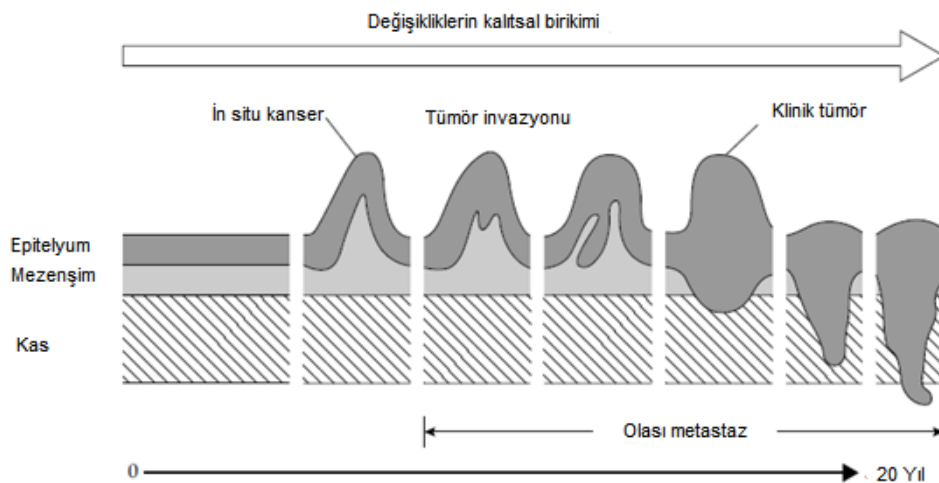
Çizelge 2.10. Dünyada görülen kanser çeşitleri (<http://globocan.iarc.fr>, 2008)



Kanser, organizmadaki hücrelerin kontrolsüz çoğalmalarıyla oluşan tümörlerdir. Tümör hücreleri normal kontrol mekanizmalarının eksikliği ile normal hücrelerden ayrılır. Kanser hücrelerinde, hücrelerin çoğalmalarını sınırlayan mekanizmalar ve apoptoz mekanizması bozulmuştur. Bu özellikleri taşıyan tümörler 3 sınıfta incelenir:

1. İyi huylu (benign) tümörler herhangi bir dokuda oluşabilir, bölgesel büyür ve o olduğu bölgede baskı yaparak hasara yol açar. Sınırları belli oldukları için metastaz yapma yetenekleri yoktur.
2. Genellikle epitel dokuda oluşan in situ tümörler morfolojik görünüm bakımından kötü huylu tümörlere benzerler. Genellikle küçük boyutlardadır.
3. Kanser belirli bir kapasiteyi işgal eden ve altta yatan mezenşimi yok eden kötü huylu tümörlerden gelişmiştir. Kötü huylu (malign) tümörler çevrelerindeki dokulardan bir zar ile ayrılmadıklarından, yani sınırları belli olmadığından dolayı vücutta yayılma özelliği gösterirler (Knowles, M. A. ve Selby, P., 2005).

Karsinogenez çok aşamalı kanser gelişim sürecidir. Şekil 2.12’de karsinogenez aşamaları görülmektedir (Knowles, M. A. ve Selby, P., 2005). Konakçı tepkisi ve çevresel maruziyetten bu değişikliğin oranı etkilenebilir. Hayvanlarda yapılan çalışmalar sonucunda, kanser üreten bir ajan (kanserojen) uygulaması ile bir tümör üretimine hemen yol açmadığı görülmüştür. Kanser uzun süreli bir latent döneminden sonra ortaya çıkar.



Şekil 2.12. Uzun süreli kalıtsal değişimlerin birikimi ile normal hücreden invaziv tümöre ilerleme gösteren tümör gelişimi (Knowles, M. A. ve Selby, P., 2005).

Kanser hücreleri genelde iki özelliğe sahiptir; 1. Kontrolsüz üreme ve 2. Bulunduğu yerden vücudun başka bir yerine sıçraması (metastaz). Kanser hücrelerinde hücre döngüsünün kontrolü kaybolmuştur ve hücrelerin çoğalması normalden daha hızlıdır.

2.6.1. Kanser Tedavi Yöntemleri

İdeal kanser tedavisinin amacı tüm kanserli hücreleri yok etmektir. Günümüzde son bir kaç yıldır kullanılan bir çok tedavi yöntemi (cerrahi girişim, radyoterapi, kemoterapi) ile biyolojik ajanlar, immünoterapi ve yeni spesifik küçük moleküller ile tedaviyi içeren yeni tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır. Bir çok vakada tedavi tam olarak gerçekleşmemektedir. Çünkü tümör hayati organlardan tüm vücuda yayılma eğilimi göstermektedir.

Solid tümörlerin genel olarak kullanılan tedavi yaklaşımlarında, cerrahi olarak çıkarılmasını takiben, radyoterapi ve/veya sistemik kemoterapi uygulanarak malign hücrelerin öldürülmesi gerçekleştirilip, tümörün metastazı ve yeniden büyümesi önlenmiş olur. Cerrahi yöntem uygulandığında, tümör hücrelerinin kalıntıları kalabilir ve durum daha hızlı bir metastatik süreci tetikleyerek, kalan kanser hücrelerinin büyüme hızını değiştirip, istenmeyen bir yan etki yaratabilir.

Radyasyon terapisi tümör hücrelerini yok etmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Fakat, radyasyon terapisinde yüksek doz uygulandığından tümör hücrelerinin yanında normal hücreleri de öldürmektedir. Bazı tümör hücreleri de radyasyona direnç kazanabilmektedir.

Kemoterapi kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya devam etmektedir. Kemoterapi kanser hücrelerini öldüren veya çoğalmalarını kontrol altında tutan kemoterapötik ajanların kullanılması ile gerçekleştirilen tedavi yöntemidir. Kemoterapide, ilaç toksisitesinden dolayı büyük bir risk oluşturmanın yanında, ilaçların hastanın bağışıklık sistemini de etkilediğinden dolayı, kemoterapi sırasında hastanın bulaşıcı hastalıklara karşı direnci de düşmektedir. Kemoterapinin etkisiz kalması ve yan etkilerinin oluşmasına, kemoterapik ajanların toksisitesi, farmakokinetik özellikleri, formülasyonları ve kanser hücrelerinin antikanser ajanlara direnç kazanması gibi faktörler etkilemektedir (Feng, S. S., 2004).

Antikorlar gibi biyolojik moleküller ve sitokinler gibi biyolojik yanıt değiştirciler de immünoterapide kullanılmaktadır. İlacın hedeflenmesinde kullanılan spesifik işaretleyicilerin yanında kanser hücrelerinde meydana gelen moleküler değişimlerin bilinmesi gen terapisinin bir çok çeşitlerinde gelişim sağlar (Feng, S. S., 2004).

2.6.2. Kemoterapide Karşılaşılan Problemler

Kemoterapinin etkinliği, kullanılan ilaç, hastanın durumu, uygulanan dozaj formu ve bu dozlama rejimi vb. gibi bir çok faktöre bağlıdır (Feng, S. ve Chien, S., 2003, Brewer, E. ve ark., 2010).

Dozaj formu; Paklitaksel gibi anti kanser ilaçlarının bazıları çok hidrofobiktir. Klinik uygulamalarda, anti kanser ilaçların suda çözünürlüklerini arttırmak için çözünürlük artırıcı yardımcı maddelerin kullanılmaları gerekmektedir. Fakat bu yardımcı maddeler ciddi yan etkilere yol açabilmektedir.

Farmakokinetik; Kemoterapötik ajanın dozu, tedavinin başarısında önemli bir belirleyicidir. Kanser hücrelerinin uzun süreler boyunca yüksek ilaç konsantrasyonuna maruz kalması gerekir. Genellikle ilacı en küçük dozda uzun dönem uygulamanın, yüksek dozda kısa süre ile uygulamaya kıyasla çok daha iyi etkiler ortaya çıkardığına inanılmaktadır. Kan konsantrasyonundaki önlenemeyen dalgalanmalar terapötik etkinin stabilitesini kötü yönde etkilemektedir. Kemoterapinin son etkinliğinin değerlendirilmesinde ana belirleyici, ilacın kanda uygulandığı süre içerisinde gözlenen etkin ilaç konsantrasyonunun AUC (eğri altında kalan alan) değeridir. Anti kanser ilaçların kontrollü salım kavramı bu kapsamda değerlendirilmektedir.

Toksisite; Anti kanser ilaçları kanserli hücrelerin yanında, sağlıklı hücreleride etkiler. Genel olarak, kemoterapide kullanılan toksik ilaçlar, hücre döngüleri boyunca daha hızlı bir geçişe sahip olan kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere göre daha etkilidirler. Fakat, kemik iliği ve bağırsak epitel hücreleri gibi hızlı bir hücresel döngüye sahip hücreler ciddi şekilde etkilenebilmektedirler.

İlaç direnci; Kemoterapötik ajanları uzun dönem uygulamalarda kanser hücreleri tarafından ilaç direnci gelişimine bağlı başarısızlıklar elde edilmektedir. Hücrelerin

direnç kazanması, varolan hücre sayısı arasında, tümör hücrelerinin artışından kaynaklanmış olabilir. Dolayısıyla tümör hücrelerini sadece kemoterapi ile tedavi etmek zordur.

2.6.3. Nanopartikül Teknolojisi ve Kemoterapi

Özellikle kemoterapi ve gen taşınımı için biyoparçalanır polimerlerden oluşan ilaç taşıma sistemi olarak kullanılan nanopartiküllerin araştırılması ve gelişimi son bir kaç yılda yoğun bir araştırma konusu olmuştur (Feng, S. ve Chien, S., 2003). FDA'den onaylı çeşitli polimerler, birçok antikanser ilacın vücutta kontrollü salımını sağlamak, adjuvanların toksik etkisini engellemek, istenilen farmakokinetik etkiyi göstermek ve kanser hücreleri tarafından alımını sağlamak için nanopartikül formülasyonları oluşturmada kullanılmaktadır (Feng, S. ve Chien, S., 2003).

Kanser tedavisi için birçok nanopartikül sistem araştırılmaktadır (Haley, B. ve Frenkel, E., 2008). Kanser tedavisi için araştırmalarda kullanılan taşıyıcılar; dendrimerler, lipozomlar, polimerik nanopartiküller, miseller, protein nanopartiküller, seramik nanopartiküller, viral nanopartiküller, metalik nanopartiküller ve karbon nanotüplerdir (Byrne, J. D. ve ark., 2008). Nanoteknolojinin kanser ile ilgili örnekleri arasında meme kanseri için lipozomlar gibi enjekte edilebilir ilaç taşıyıcı nanovektörlerin kullanılması, biyolojik olarak hedeflenen nanoboyutlu manyetik rezonans görüntüleme (MRG) kontrast ajanların nöroonkolojik müdahalelerin bağlamında intraoperatif görüntülemeye kullanılması, DNA ve proteinlerin yüksek özgüllüğünü tespit edebilen nanopartikül bazlı yöntemlerin kullanılmasını sayılabilir (Ferrari, M., 2005).

Genel olarak nanopartiküllerin boyutları küçük boyutlarda tutularak kanser endotel hücrelerine sızması amaçlanır. Bu durum, tümör bölgelerinde nanopartikül konsantrasyonunu istenen düzeyde tutmayı sağlar (Haley, B. ve Frenkel, E., 2008).

Günümüzde FDA onaylı olan ve kanser tedavisinde kullanılan birkaç tane ilaç taşıyıcı nanoteknolojik sistem vardır. Kanser tedavisinde ilk olarak lipozomal antikanser ilaç formülasyonları onaylanmıştır. Amerika'da ticari olarak iki tane lipozomal formülasyon vardır. Bunlar; PEG ile modifiye edilmiş lipozomal doksorubisin (Amerika'da Doxil[®], Amerika dışında Caelyx[®]) ve lipozomal

daunorubisindir (DaunoXome®). Avrupa'da üçüncü olarak onaylanan lipozomal formülasyon PEG'lenmemiş lipozomal doksorubisindir (Myocet®). Bu formülasyonlara ek olarak albümin bağlı paklitaksel nanopartikülleri de ticari olarak kullanılmaktadır. Abraxane® meme kanseri için kullanılmak üzere FDA'den 2005 yılında onay almış paklitaksel nanopartikül formülasyonudur (Haley, B. ve Frenkel, E., 2008).

Biyoparçalanır polimerlerden oluşan nanopartiküller kanser tedavisinde kullanılmak üzere bir çözüm olmuştur.

2.7. Paklitaksel

Paklitaksel, son 15 - 20 yılda kemoterapide belirgin şekilde avantajlarının olduğu Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından onaylanmış, mikrotübül stabilize edici bir ajandır (Singla, A. K. ve ark., 2002).

2.7.1. Tarihsel gelişimi

Paklitaksel, ilk defa 1967 yılında Pasifik bölgesinde yetişen bir ağaç olan *Taxus brevifolia*'nın (Taxaceae) yaprak ve kabuklarından ekstre edilmiş olan antiproliferatif bir ilaçtır (Feng, S. ve Huang, G., 2001). Paklitaksel, güçlü antineoplastik aktivite gösteren doğal kemoterapötik bir diterpenoid psödoalkoloittir (Jennewein, S. ve Croteau, R., 2001, Jackson, J. K. ve ark., 2007). 1967 yılında Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından doğal ürünlerden sitotoksik ajanların belirlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda saptanmıştır. Daha sonraları meme ve yumurtalık kanseri gibi bir çok kansere karşı antikanser ilacı olarak etki gösterdiği bulunmuştur (Feng, S. S., 2004).

Son zamanlarda kanser vakaları arasında meme kanseri %26 oranında bulunmuş olup, kansere bağlı kadın ölümlerinde ikinci sırayı almaktadır. Paklitakseldeki antitümöral özelliklerin keşfedilmesi, meme kanseri kemoterapisinde önemli bir adım olmuştur (Chakravarthi, S. S. ve Robinson, D. H., 2011). 2009 yılında, kadınlardaki kanser vakalarında meme kanseri %27 olarak hesaplanmıştır (Chakravarthi, S. S. ve ark., 2010).

Paklitakselin tümör hücrelerinde antineoplastik aktivitesi belirgindir (Danhier, F. ve ark., 2009). Hem FDA hem de EMA tarafından, meme ve yumurtalık kanserine, AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomaya, küçük hücreli olmayan akciğer kanserine karşı kanser aktivitesi olan, onaylı bir ilaçtır (Wang, C. ve ark., 2011). Ayrıca, paklitaksel, tek bir ajan olarak kullanılmayan yanında, diğer antineoplastik ajanlarla kombine olarak da kullanılıp, tiroid, mesane, baş ve boyun kanserlerine karşı da başarılı etkiler göstermiştir (Vicari, L. ve ark., 2008, Chakravarthi, S. S. ve ark., 2010).

FDA tarafından 1992 yılında yumurtalık kanseri ve meme kanserine (Jennewein, S. ve Croteau, R., 2001), 1994 yılında ileri safha meme kanserine ve 1999 yılında erken safha meme kanserine karşı etki gösterdiği onaylanmıştır.

Çizelge 2.11'de paklitakselin tarihsel gelişim aşamaları özetlenmiştir (Cragg, G. M., 1998, Panchagnula, R., 1998, Singla, A. K. ve ark., 2002).

Çizelge 2.11. Paklitakselin tarihsel gelişim aşamaları (Cragg, G. M., 1998, Panchagnula, R., 1998, Singla, A. K. ve ark., 2002)

| Tarih | Gelişim Aşamaları |
|--------------|---|
| 1962-68 | Doğal üründen sitotoksik ajanların Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından keşfi |
| 1967 | Antitümör aktivitesinin keşfi |
| 1969 | Paklitakselin saf olarak eldesi |
| 1971 | Yapının aydınlanması |
| 1979 | Mekanizmasının keşfi |
| 1983 | Faz 1 çalışmalarının başlaması |
| 1986 | Aşırı duyarlılık reaksiyonunun gözlenmesi |
| 1988 | Ulusal Kanser Enstitüsü'nün (NCI) premedikasyon rejimini önermesi |
| 1989 | Yumurtalık kanserine karşı etkisinin ispat edilmesi |
| 1991 | Meme kanserine karşı etkisinin onaylanması |
| 1992 | Küçük hücreli olmayan akciğer kanserine karşı kanser aktivitesinin onaylanması |
| 1992 | FDA tarafından yumurtalık kanserine karşı antikanser etkisinin onaylanması |
| 1994 | FDA tarafından meme kanserine karşı antikanser etkisinin onaylanması |
| 1994 | Hindistan'da yumurtalık kanseri tedavisi için kullanımının onaylanması |
| 1995 | Hindistan'da meme kanseri tedavisi için kullanımının onaylanması |

2.7.2. Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri

Kimyasal formülü 5 β ,20-Epoksi-1,2 α ,4,7 β , 10 β ,13 α -hidroksitaks-11-en-9-one 4,10-diasetat-2-benzoat-13-ester (2R, 3S)-N-benzoil-3-fenilizoserin), moleküler formülü C₄₇H₅₁NO₁₄ olan paklitaksel güçlü antineoplastik aktivite gösteren doğal kemoterapötik bir ajandır (Panchagnula, R., 1998, Singla, A. K. ve ark., 2002).

Paklitakselin moleküler ağırlığı 853,9 g/mol'dür, erime noktası 216-217°C'dir. Paklitaksel beyaz kristal toz şeklindedir. Lipofilik özelliktedir, suda çözünmez, polar organik solvanlarda (metanol, etanol, asetonitril, kloroform, diklorometan) kolaylıkla çözünür (Panchagnula, R., 1998, Singla, A. K. ve ark., 2002, Pharmacopeia, U.S., 2007). Molekül yapısında, benzen halkaları ve suda çözünmemesine yol açan hidrofobik yapılar bulunur. Paklitakselin çeşitli organik çözücülerdeki çözünürlükleri Çizelge 2.12'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.12. Farklı çözücülerde paklitakselin yaklaşık çözünürlük değerleri (Adams, J. D. ve ark., 1993, Singla, A. K. ve ark., 2002)

| Çözücü | Çözünürlük, mg/ml |
|---------------------------------|-------------------|
| Diklorometan | ≥19 |
| Asetonitril | ≤22 |
| n-Heptan | <1 |
| Etanol | ~39 |
| İzopropanol | ~12 |
| %75 Propilen glikol | <1.4 |
| %75 Polietilen glikol (PEG) 400 | 31 |
| Soya yağı | 0,3 |
| Triasetin | 75 |

Paklitakselin sudaki çözünürlüğü yok denecek kadar azdır. Paklitaksel az alkali su ortamında hızlıca yıkılır. Paklitakselin pKa değeri 11.99'dur (<http://www.drugbank.ca/drugs/DB01229>).

2.7.3. Farmakokinetik Özellikleri

Paklitakselin farmakokinetik davranışı doğrusal olmayan bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir. Plazma konsantrasyonu ve ilaç maruziyeti, doz artmasıyla orantısız bir şekilde artmaktadır. Elde edilen plazma düzeyleri, in vitro etkileri indüklemek için uygundur. Plazma proteinlerine yüksek oranda bağlanmasına rağmen, paklitaksel kolaylıkla plazmadan uzaklaştırılır. Paklitakselin dağılım hacmi büyüktür, çünkü vücudun her yerinde bulunan tübülün proteinlerini bağlama isteği çoktur. Renal yolla atılımı önemsizdir, fakat hepatik hücrelerde oksidatif metabolizma, safradan atılım ve doku bağlayıcı sistemik atılımdan sorumludur. Hayvanlarda paklitaksel testisler ve merkezi sinir sistemi gibi klasik tümör bölgeleri dışında vücudun tüm dokularına dağılır (Rowinsky, E. K., 1997) . Çizelge 2.13'de paklitakselin farmakokinetik özellikleri özetlenmiştir (Rowinsky, E. K., 1997).

Çizelge 2.13. Paklitakselin farmakokinetik özellikleri (Rowinsky, E. K., 1997)

| Özellik | Paklitaksel |
|------------------------------|---|
| Farmokokinetik davranış | Doğrusal değil |
| Optimal linear model | 2-3 kompartman |
| Eliminasyon yarı ömrü | |
| 2 kompartman | ~7 saat |
| 3 kompartman | ~20 saat |
| Kararlı durum dağılım hacmi | geniş, ~182 litre/m ² |
| Plazma konsantrasyon piki | ~ 5µM (175mg/m ² , 3 saatden fazla) ~ 10µM (250mg/m ² , 3 saatden fazla) ~ 0.5µM (175mg/m ² , 3 saatden fazla) |
| Plazma proteinlerini bağlama | > %95 |
| Sistemik temizlenme | ~350ml/min/m ² |
| Renal temizlenme | < %5-10 |
| Karaciğerden temizlenme | belirgin, feçesden %70-80 |
| İlaç etkileşimi | P450 indükleyicisi ve inhibitörler |

Paklitakselin plazmadan eliminasyonu bifazik olarak gerçekleşir. Paklitaksel oral yoldan absorbe olmamaktadır. Plazma proteinlerine bağlanma oranı %76 - %97 arasındadır. Genel kabul görmüş dozu 200-250 mg/m²'dir, 3 saat veya 24 saat

infüzyon olarak verilir. Paklitaksel farmakokinetiği geniş değişkenlik gösterir. Terminal yarı ömrü 1.3-8.6 saat aralığında ve kararlı durum dağılım hacmi $\sim 87.1 \text{ m}^2$ olarak bulunmuştur. İlaç sitokrom P450 aracılı karaciğer metabolizması ile atılırken (Rowinsky, E. K. ve Donehower, R. C., 1993), %10'dan daha azı da değişmeyen formda idrardan atılır. İlacın çoğu dışkı ile atılır. %90'dan daha fazlası plazma proteinlerine hızlıca bağlanır. Paklitakselin farelerde 6 saat infüzyonu sonrasında en yüksek konsantrasyon akciğer, karaciğer, böbrek ve dalakta bulunmuştur (Singla, A. K. ve ark., 2002).

2.7.4. Hücre Bölünmesi ve Kontrol Mekanizmaları

Hücre döngüsü bir bölünmenin tamamlanmasından, bir sonraki bölünmeye kadar geçen olaylar bütünüdür. Hücre döngüsünde mitotik faz, döngünün %90'ını kapsayan interfaz evresini takiben gelen, mitoz evresini (çekirdek bölünmesi) ve sitokinez evresini (stoplazma bölünmesi) kapsar ve M fazı olarak bilinir. İnterfaz evresi hazırlık evresi olarak bilinir ve bu evrede hücreler sitoplazmik organellerini ve hücre proteinlerini çoğaltarak büyür ve bölünmeler ile kromozomlarındaki DNA'nın replikasyonlarını gerçekleştirirler. İnterfaz evresi G1 fazı (birinci ara), S fazı (sentez) ve G2 fazından (ikinci ara) oluşur. G1 fazında ribozomlar ve organeller iki katına çıkar. Ardından organellerin iki katına çıkma işleminin de sürdüğü ve yeni DNA sentezinin gerçekleştiği S fazı gelir. G2 fazı bir başka evre replikasyon bitimi ile mitoz başlangıcını ayıran evredir. Bu evrede hücre mitoz hazırlanır. Mitoz evresi profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden oluşur (Arellano, M. ve Moreno, S., 1997, Tyson, J. ve Novak, B., 2001).

Hücreler mitoz bölünme sonucunda kendilerinin kopyası olan iki yavru hücre oluştururlar. Bu hücrelerden birinde oluşacak bir kusur, yavru hücreye ve bu hücreden oluşacak olan diğer tüm yavru hücrelere aktarılır. Dolayısıyla, kusurlu olan hücre sayısı sürekli olarak artacaktır; bu da organizmada fonksiyon kaybına neden olur. Bu nedenle, hücre bölünmesi belirli bazı kurallar ve kontroller altında gerçekleşir (Campbell Neil, R. J., 2006).

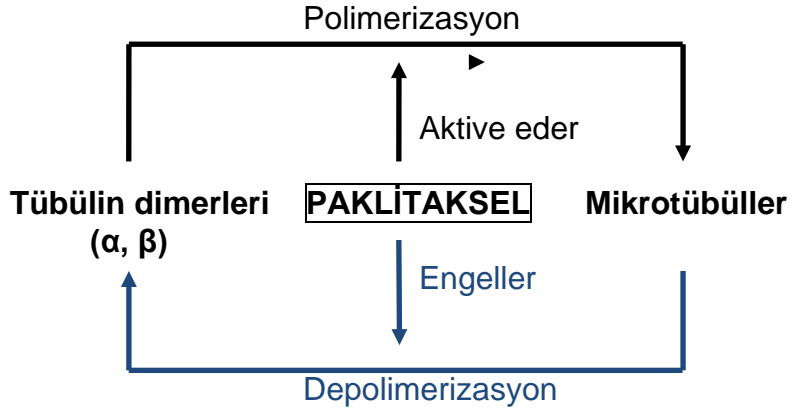
Hücre döngüsü kontrolünün G1/S geçiş (DNA sentezinden hemen önce) ve G2/M geçiş (mitozdan hemen önce) noktalarının yakınında yapıldığı bilinmektedir. Her iki noktada da döngünün ilerlemesine veya durmasına karar verilir. Bu kararın

verilmesinin kontrolü, iki sınıf protein tarafından yapılır; birincisi, protein kinazlardır. Bu enzimler hedef proteinleri seçerek fosforil yapısına dönüştürürler. İkinci grup proteinler ise siklinlerdir. Kinazların ve siklinlerin birbiriyle etkileşimi sonucu hücrenin hücre döngüsüne girişini düzenleyen bir kontrol molekülü üretilir (Bell, S. ve Dutta, A., 2002, Klug, W. S. ve ark., 2002).

2.7.5. Etki Mekanizması

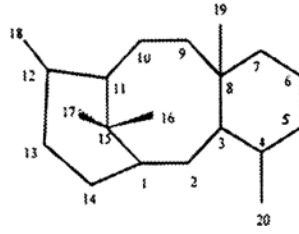
Mikrotübüller ökaryotik hücre stoplazmasında bulunan, 25 nm çapında, 25 - 200µm uzunluğunda olan içleri boş silindirik şekilde çubuklardır. Mikrotübüller tübülün adı verilen globüler proteinlerinden oluşur. Her tübülün dimer yapıda olup, α ve β übü linlerden meydana gelir. Mikrotübüller hücreye biçim verip, onu desteklemelerinin yanı sıra organellerin hareket etmesinde de rol alırlar. Ayrıca mikrotübüller hücre bölünmesi sırasında kromozomların ayrılmasından da sorumludurlar (Campbell Neil, R. J., 2006).

Paklitakselin diğer antikanser ajanlarına göre etki mekanizması farklılık gösterir. Normalde hücre büyümesinde, hücreler bölünmeye başladığında mikrotübüller şekil alır. Hücre bölünmesi durduğunda ise mikrotübüller yıkılır. Paklitaksel mikrotübüllerin yıkılmasını engelleyerek hücre bölünmesini geç mitotik evrede (G2) engeller (Vicari, L. ve ark., 2008, Danhier, F. ve ark., 2009). Mikrotübüllerin ayrılmasına yol açan Vinca alkaloidler gibi diğer tübülün bağlayan ajanların aksine, paklitaksel tübülün dimerlerinin polimerizasyonunu da sağlar. Normalde mikrotübül toplanması için gerekli olan faktörlerin (guanin trifosfat, GTP gibi) eksikliğinde bile mikrotübüller oluşturmak için tübülün dimerlerinin polimerizasyonuna yardımcı olur ve depolimerizasyonu önleyerek mikrotübülleri stabilize eder. Paklitaksel tübülün dimerlerinden çok mikrotübüllere bağlanır. Paklitaksel için bağlayıcı bölge mikrotübüllerdeki tübülünlerin β -alt birimlerinin N-terminal ucundaki 31 aminoasittir (Rowinsky, E. K., 1997, Panchagnula, R., 1998). Paklitakselin etki mekanizması Şekil 2.13'te şematize edilmiştir (Panchagnula, R., 1998)



Şekil 2.13. Paklitakselin etki mekanizması (Panchagnula, R., 1998)

Şekil 2.14'de taksan molekülünün yapısı görülmektedir (Singla, A. K. ve ark., 2002).



Şekil 2.14. Taksan çekirdeği (Singla, A. K. ve ark., 2002)

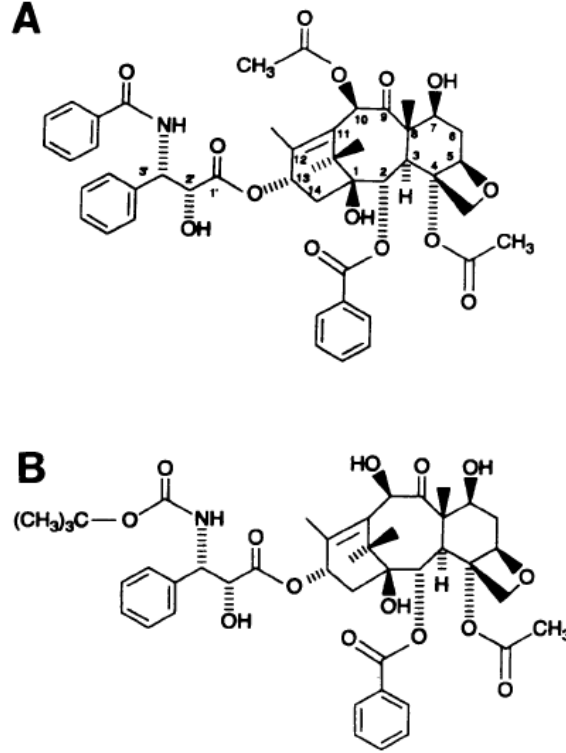
2.7.6. Klinik Uygulamalarda Karşılaşılan Sınırlamaları ve Endikasyonları

Paklitakselin klinik uygulamalar için iki tane sınırlaması vardır (Singla, A. K. ve ark., 2002);

Üretimi; Elde edildiği kaynak sınırlama getirmiştir. Çünkü 100 yıldan fazla yaşta olan dört ağaç, bir hasta tedavisi için gerekli olan 2 gram paklitaxel üretmek için kullanılmaktadır (Feng, S. S., 2004). Paklitakselin üretiminin gerçekleşmesine rağmen, büyük ölçekli sentez pratik olarak gerçekleşmemektedir. Sentez aşaması bir çok basamağı içerir. Dolayısıyla maliyeti çok yüksek olmaktadır.

Paklitakselin porsuk ağacının (*Taxus bacatta*) dikenleri ve dallarından ekstrakte edilen yarı sentetik formu daha uygundur (Rowinsky, E. K., 1997, Panchagnula, R., 1998). Yarı sentetik form olan Doksataksel (Taxotere[®], Aventis Pharma) Avrupa'daki porsuk ağacından elde edilmiş olan antikanser ajanıdır. FDA,

paklitakselin yarı sentetik formu, 1995 yılında onaylanmıştır. Paklitaksele göre sudaki çözünürlüğü daha fazladır. Paklitaksel ve doksataksel C-13 pozisyonunda bir ester bağlı kompleks içeren bir taksan halkasından oluşur. Şekil 2.15’de paklitakselin ve doksatakselin kimyasal yapıları şematize edilmiştir (Rowinsky, E. K., 1997).



Şekil 2.15. Taksanların yapısı (A) Paklitaksel (B) Doksataksel (Rowinsky, E. K., 1997)

Çözünürlük; Paklitakselin diğer bir sınırlaması ise klinik uygulamalardaki zorluğudur. Paklitaksel ile yapılan kemoterapi tedavilerinde, tümörün paklitaksele direnç kazanması ve paklitakselin suda düşük çözünürlüğe sahip olması tedavide zorluklara yol açmaktadır (Chakravarthi, S. S. ve Robinson, D. H., 2011). Paklitakselin suda çözünürlüğü 0.5mg/L’den daha azdır (Huang, H. H. ve ark., 2009).

Paklitakselin klinik uygulamalarda kullanılan tek dozu Cremopher EL (polietoksillenmiş hintyağı) ve absöü alkolden oluşan adjuvandır. Fakat Cremopher EL aşırı duyarlılık reaksiyonu, nefrotoksisite, nörotoksisite ve kardiyotoksisite gibi bir çok yan etkilere yol açmaktadır.

Paklitaksel, ticari açıdan en başarılı antikanser ajanlarından biri olduğundan beri, 1999 yılında dünya çapında 1.5 milyar Amerikan Doları satışı yapılmıştır (Feng, S. S., 2004).

Cremophor EL'nin toksik etkisini önlemek için, paklitakselin daha iyi bir formülasyonunun geliştirilmesi için bir çok çalışma yapılmıştır. Diğer antikanser ilaçların formülasyonları için de benzer problemler gözlenmektedir. Varolan ya da yeni geliştirilen antikanser ilaçları için etkili taşıyıcıların geliştirilmesi önemli bir buluş olacaktır.

Ayrıca paklitaksel düşük terapötik indekse sahip olup, toksik yan etkilere de yol açmaktadır. En önemli yan etkileri arasında kemik iliği baskılanması, kan hücresi üretiminin azaltılması, geri dönüşümlü saç dökülmesi, sindirim problemleri, sinir hasarı yer alır. Ancak, mükemmel terapötik etkinliği, yol açtığı yan etkilere göre daha ağır basar.

2.7.7. Piyasa Preparatları

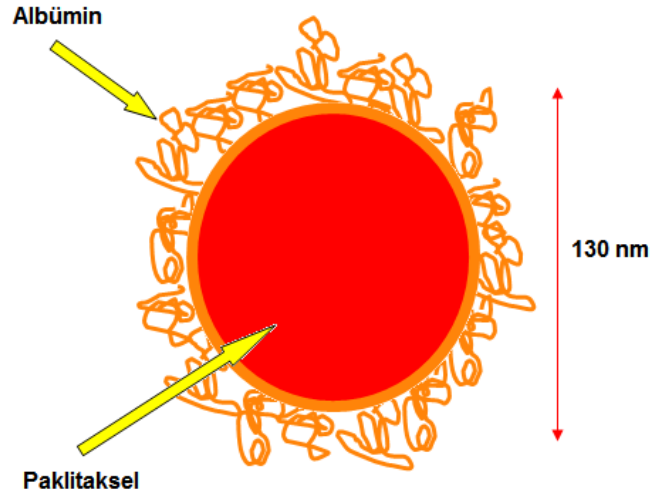
Taksanlar, ürolojik malignantlar da dahil olmak üzere birçok tümörün tedavisinde yaygın ve aktif olarak kullanılmaktadır. Paklitaksel klinik uygulamalar için ticari olarak bulunan taksandır.

Paklitaksel Taxol ticari isminde, Bristol-Myers Squibb ilaç şirketi tarafından, jenerik olarak ise Anzatax (Orna) ticari ismi altında üretilmektedir (Ommaty, R., 2006, Miele, E. ve ark., 2009).

Paklitakselin sudaki düşük çözünürlüğü, formülasyon geliştirmede zorluklara yol açar. Sudaki çözünürlük problemini aşmak için lipid bazlı çözücüler kullanılmaktadır (Miele, E. ve ark., 2009). Paklitakselin intravenöz yolla uygulanan ilk konvansiyonel ticari ürünü, Cremophor EL (poli etoksillenmiş hint yağı) : absöü alkol (1:1) karışımından oluşan taşıyıcı içerisinde formüle edilmektedir. Cremophor EL, iyonik olmayan amfifilik bir dispersiyon ajanıdır. Cremophor'un oluşturduğu polimerik misel yapısı, oldukça hidrofobik bir çekirdeğe sahiptir. Paklitakseli enkapsüle ederek, sistemik dolaşımında taşınmasında rol alır. Bu nedenle, sistemik ilaç konsantrasyonu artar ve klerensi azalır. Genel kan dolaşımında ise, eritrositlerde ilaç akümüülasyonunun arttığı ve serbest ilaç fraksiyonunun azaldığı

gözlenmiştir. Absolü alkol ise formülasyonda yardımcı çözücü olarak kullanılmaktadır (Sparreboom, A. ve ark., 2005). Paklitaksel içinde Cremophor miktarı nispeten yüksek ve şiddetli toksik etkiye yol açmaktadır. Bu etki bazen de anafilaktik aşırı duyarlılık reaksiyonları, hiperlipidemi, nörotoksisite, ölümcül aşırı duyarlı reaksiyonlara dönüşmektedir (Weiss, R. B. ve ark., 1990, Jin, C. ve ark., 2009).

Bu ilaçlara bağlı toksik etkileri azaltmak için, paklitaksel nanopartikül formülasyonları geliştirilmiştir. Abraxane, Cremophor içermeyen, albümin bağlı, 130 nm boyutunda paklitaksel etkin maddesi içeren nanopartikül formülasyonudur. Taxol formülasyonunda ve onun jenerik eşdeğerindeki formülasyonda bulunan Cremophor'un yol açtığı toksik ve allerjik etkileri yok etmek amacı ile geliştirilmiştir (Sparreboom, A. ve ark., 2005). Abraxane, 2005 yılında, FDA onayı almıştır. 2.16'da paklitakselin piyasa preparatı olan Abraxane formülasyonunun yapısı görülmektedir.



Şekil 2.16. Abraxane formülasyonunun yapısı

(<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/06/slides/2006-4235S2-01-01-AbraxisBioscienc.ppt>)

Abraxane, sarı-beyaz renkte, steril, liyofilize toz haldedir. İntravenöz infüzyonu öncesinde, 20 ml %0.9 sodyum klorür ile sulandırılır. Her bir flakon, 100 mg paklitaksel ve yaklaşık 900 mg insan albümini içerir. Sulandırılmış süspansiyonun her ml'si 5 mg paklitaksel içerir. Abraxane herhangi bir çözücü maddesi içermez (Miele, E. ve ark., 2009).

Albüminin onkoloji alanında ilaç taşınmasında aracı olması, sahip olduğu özelliklerden dolayıdır. Albümin, hidrofobik moleküllerin (vitaminler, hormonlar ve diğer suda çözünmeyen plazma maddeleri) taşıyıcısıdır ve bu moleküllere kovalan olmayan şekilde tersinir olarak bağlanır. Ayrıca, albümin proteinlere bağlanıp, hücre yüzeyinde bulunan 60kDa glikoprotein (gp 60) reseptörünü (albondin) tanıyarak, endotelial transitoz yardımcı olur. Osteonektinin (sisteince zengin protein asit salgısı), gp60 ile benzer sekans homolojisinden dolayı albümine bağlanabildiği gösterilmiştir. Osteonektinler meme, akciğer ve prostat bölgelerinde sıklıkla bulunduğu için, albümin bağlı ilaçlar bu bölgelerde meydana gelen tümör bölgelerinde birikmektedir (Miele, E. ve ark., 2009).

Albümin bağlı paklitaksel formülasyonu, metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Villano, J. L. ve ark., 2006, Nie, S. ve ark., 2007). Abraxane albümin partiküllerine bağlanır ve bu yapı suda çözünmesini sağlar. Bu formülasyon sayesinde büyük dozlarda paklitaksel alımı sağlanır fakat bu durum toksik riski artırmaktadır (Villano, J. L. ve ark., 2006). Abraxane, Cremophor'un yol açtığı yan etkileri azaltmasına rağmen, klinik çalışmalarda faz III süresince, hastada nötropeni ve duyarlı nöropeniye yol açtığı tesbit edilmiştir. Herhangi bir dispersiyon ajanı ya da çözücü içermeyen Abraxane formülasyonunun birçok avantajı vardır: İlacın plazmada kalmasını uzun süreli ve sürekli olarak sağlar, dolayısı ile infüzyon süresini kısaltır ve standart Taxol formülasyonunda gözlenen akut toksisite reaksiyonları gözlenmez (Brusa, P. ve ark., 1997).

Paklitakselin sistemik ve lokal yolla taşınması için, oluşturduğu yan etkilerden dolayı alternatif paklitaksel taşıma sistemleri emülsiyon, miseller, lipozomlar, siklodekstrinler, implantlar, önilaç gibi araştırılmaktadır. Tarr ve Yalkowsky'nin yaptıkları çalışmada, paklitaksel yüklü yağ/su emülsiyon formülasyonu geliştirilmiştir (Tarr, B.D. ve Yalkowsky, S.H., 1987). İç fazda triasetin kullanarak paklitakselin çözünürlüğünün sağlandığını gösterilmiştir. Wheeler ve ark., Kaufman ve ark. da paklitaksel yüklü y/s emülsiyon formülasyonları geliştirmişlerdir (Wheeler, J.J. ve ark., 1994, Kaufman, R.J. ve ark., 1997). Miwa ve ark. (Miwa, A. ve ark., 1998) tarafından paklitaksel yüklü misel formülasyonu geliştirilmiştir. Geliştirdikleri formülasyonda partikül boyutu 100nm'den daha küçük elde edilmiştir. Küçük partikül boyutundan dolayı tümör hücrelerine pasif hedefleme

amaçlanmıştır. Ramaswamy ve ark. (Ramaswamy, M. ve ark., 1997) amfifilik diblok kopolimer kullanarak paklitaksel yüklü polimerik misel formülasyonu geliştirmişlerdir. Sampedro ve ark. (Sampedro, F. ve ark., 1993) tarafından farklı fosfolipidlerin kombinasyonunu kullanılarak paklitaksel yüklü lipozom formülasyonları geliştirilmiştir. Geliştirilen formülasyonların L1210 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelenmiş ve ilaç çözeltisine göre, lipozom formülasyonlarının daha toksik olduğu sonucuna varılmıştır. Bayındır ve Yüksel, paklitaksel yüklü niozom formülasyonları geliştirmişlerdir (Bayındır, Z. S. ve Yüksel, N., 2009). Niozomlar film hidrasyon metodu ile farklı sürfaktanlar kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların boyutları 229.3-588.2 nm arasında bulunmuştur. Gürsoy ve ark., paklitaksel yüklü kendiliğinden emülsifiye olabilen ilaç taşıyıcı sistem geliştirmişlerdir (Gürsoy ve ark., 2003). İlaç yükleme oranı, i.v. formülasyona göre beş kat daha fazla olarak bulunmuştur. Hücre kültürü çalışmalarında formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin toksik etkisi incelenmiştir. Yardımcı maddelerin sitotoksiteyi önemli ölçüde azalttığı ve stabil mikroemülsiyon oluşmasını sağladığı gösterilmiştir.

2.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.8.1. Tanımı ve Tarihçesi

Hücre kültürü, canlı dokulardan alınan hücrelerin in vitro koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, aminoasitler, vitaminler, dana veya at serumu içeren besleyici sıvılarda süspande edilerek steril tüp veya şişelere koyulur. Bu hücre süspansiyonu 36°C'de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucunda oluşan yapıya hücre kültürü denir.

Hücre kültüründe belirli bir hücre hattından çoğaltılan hücrelerde çeşitli çalışmalar yapılarak canlı ortamında (in vivo) yapılamayan denemeler yapılabilir ve buradan yola çıkılarak sonuçlara ulaşılabilir.

Yeni yüzyılda kanser araştırmalarının hız kazanması ile özellikle kanser ilaçlarının geliştirilmesinde, etkilerinin saptanmasında hücre kültürleri özellikle büyük önem kazanmıştır (Lacroix, M., 2008). Örneğin; kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda

belli bir maddenin etkilerini ya da bir hücre veya dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla hücre kültür çalışmaları yapılabilmektedir.

İlk defa 1951 yılında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Baltimore'da servikal kanser nedeniyle takip edilen Afrika kökenli Amerikalı bir hastanın kanser dokularının laboratuvarında kültürü başarılabildiği görülmüştür. Henrietta Lack adındaki hasta kanserin yayılması sonucu ölmüş ancak ölümsüz hücrelerinin kültürü adına atfen HeLa adı ile dünya genelindeki laboratuvarlara talep nedeniyle dağıtılmıştır (Lucey, B. P. ve ark., 2009). Kanser hücrelerinin ölümsüz olması ve çok kolay üretilibilmeleri çalışmalarda hücre kültürü gerektiren araştırmalara hız kazandırmıştır. Çizelge 2.14'de hücre kültürünün gelişim aşamaları görülmektedir (Alberts, B. ve ark., 2002).

Çizelge 2.14. Hücre kültürünün gelişim aşamaları (Alberts, B. ve ark., 2002)

| | |
|------|--|
| 1885 | <i>Roux</i> bir tavuk embriyosu nöral plağının bir kısmını ayırmış ve ılık bir tuzlu su çözeltisinde dokuyu birkaç gün yaşatarak doku kültürünün temellerini de atmıştır. |
| 1907 | <i>Harrison</i> , lenf pıhtısında, amfibi omuriliği yetiştirmiştir. Böylece aksonların tek bir sinir hücresinin uzantısı olarak üretilbildiğini göstermiştir. |
| 1910 | <i>Rous</i> sonradan RNA virüsü (Raus sarkoma virüsü) içerdiği anlaşılan tavuk tümör hücresinin filtre edilmiş özütüyle tümörü tetiklemiştir. |
| 1913 | <i>Carrel</i> hücreleri aseptik şartlar altında düzenli olarak besleyerek, uzun periyotlarda kültür ortamında büyüebildiklerini göstermiştir. |
| 1948 | <i>Earle ve arkadaşları</i> , L hücre hattından saflaştırdıkları hücrelerin kültüre alındıklarında, koloniler oluşturduklarını göstermişlerdir. |
| 1952 | <i>Gey ve arkadaşları</i> , günümüzde oldukça bilinen HeLa hücre hattını, bir insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin sürekli serisi şeklinde gözlemlemişlerdir. |
| 1954 | <i>Levi-Montalcini ve arkadaşları</i> , sinir büyüme faktörünün (NGF), doku kültüründe aksonların büyümesini uyardığını göstermişlerdir. |
| 1955 | <i>Eagle</i> , hücre kültürlerinin ihtiyaç duyduğu temel besin gereksinimlerinin ilk sistematik araştırmasını yapmış ve hayvan hücrelerinin serum proteinlerinin küçük bir kısmı ile desteklenmiş küçük moleküllerin karışımında çoğalabildiğini göstermiştir. |
| 1956 | <i>Puck ve arkadaşları</i> , HeLa hücrelerinin kültüründe büyüme şartlarını değiştirip, mutantları seçmiştir. |
| 1958 | <i>Temin ve Rubin</i> , kültürde Rous Sarkoma Virüsü'nü saflaştırarak, civciv hücrelerinin enfeksiyonu için kantitatif deney geliştirmiştir. |
| 1961 | <i>Hayflick ve Moorhead</i> , hücre kültüründe insan fibroblastlarının sınırlı sayıda bölünmeler sonrasında öldüklerini göstermiştir. |
| 1964 | <i>Littlefield</i> , somatik hibrit hücrelerinin seçici büyümeleri için HAT (hipoksantin-aminopterin-timidin) ortamını tanımlamıştır. |

| | |
|------|--|
| | <i>Kato ve Takeuchi</i> , doku kültüründe tek bir havuç kök hücresinden tam bir havuç bitkisi elde etmiştir. |
| 1965 | <i>Ham</i> , bazı memeli hücrelerinin klonal büyümeyi desteklemek için serum içermeyen ortamı tanımlamıştır. |
| | <i>Harris ve Watkins</i> , memeli hücrelerinde, insan ve fare hücrelerinin virüs kaynaklı füzyon ile heterokaryonları ilk defa üretmişlerdir. |
| 1968 | <i>Augusti-Tocco ve Sato</i> , doku kültürü için fare sinir hücre tümörünü (nöroblastoma) doku kültürüne uyumlamış ve elektriksel olarak uyarılabilen ve sinirsel süreçlerini uzatabilen klonlar izole etmiştir. Bu süre içinde iskelet kası ve karaciğer hücre hattını içeren farklılaşmış çeşitli hücre hatları da izole edilmiştir. |
| 1975 | <i>Köhler ve Milstein</i> , ilk monoklonal antikör salgılayan hibridoma hücre hatları üretmiştir. |
| 1976 | <i>Sato ve arkadaşları</i> , hormonların farklı karışımlarını gerektiren hücre hatlarını ve serum içermeyen ortamda büyüme faktörlerine bağlı büyümeyi gösteren ilk makale serisini yayınlamışlardır. |
| 1977 | <i>Wigler ve Axel ve onların arkadaşları</i> , Graham ve van der Eb tarafından geliştirilen metodu adapte ederek, kültür hücrelerinde tek bir kopya memeli genini tanımlamıştır. |
| 1986 | <i>Martin ve Evans ile arkadaşları</i> , fareden pluripotent embriyonik kök hücrelerini saflaştırarak kültürünü yapmışlardır. |
| 1998 | <i>Thomson ve Gearhart ile yardımcıları ise</i> , insan embriyonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlardır. |

Çok çeşitli kaynaklardan sağlanan ve dokulardan elde edilen hücre kültürleri üç bölümde incelenir:

- 1) Primer (birincil) hücre kültürleri
- 2) Sekonder veya diploid hücre kültürleri
- 3) Sürekli veya heteroploid hücre kültürleri

Primer hücre kültürü: Dokulardan tripsin ile ayrıştırılarak elde edilen hücrelerin in-vitro üretilmeleri ile elde edilen kültürlerdir. İn-vitro koşullarda pasajları kısıtlı olup, bir kaç pasajdan sonra üreyebilme yeteneklerini kaybederler. Örneğin: İnsan embriyonu böbreği (HEK), insan amniyonu (HAM), Rezüs maymun böbreği (RhMK), yeşil maymun böbreği (GMK), tavşan böbreği (RK).

Sekonder hücre kültürü: Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden elde edilirler. En fazla 50 kez pasajları yapılabilir. Örneğin: WI-38, MRC-5 vb.

Sürekli hücre kültürü: Teorik olarak sonsuz pasajları yapılabilir. Genellikle habis tümörlerden elde edilirler. Laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar ve

kromozom sayıları sabit değildir. Örneğin: İnsan larenks epidermoit karsinomu (Hep-2), insan nazofarenks karsinomu (KB), insan serviks karsinomu (HeLa), yeşil maymun böbreği (Vero).

2.8.2. Uygulama Alanları

Hücre kültürünün bir çok uygulama alanı vardır :

- Hücrelerin normal fizyoloji ve biyokimyasını araştırmak için kullanılır. Örn; hücre metabolizmalarının çalışılmasında kullanılır.
- Spesifik hücre tiplerinde (normal ya da kanser hücresi gibi) çeşitli kimyasal bileşiklerin ya da ilaçların etkisini test etmek için kullanılır.
- Suni deri gibi yapay dokular oluşturmak için çeşitli hücre tiplerinin paralel ya da sıralı kombinasyonlarının çalışılmasında kullanılır (transplantasyon).
- Büyük ölçekli hücre kültürlerinde önemli biyolojik maddeleri sentezlemek için kullanılır. Biyolojik ürünler çeşitli hücre ürünleridir ve üremek için hayvan hücrelerine ihtiyaç duyan virüsler veya spesifik proteinleri içerir. Örneğin; büyük ölçekli kültürlerde büyüyen genetiği değiştirilmiş hücrelerde terapötik proteinler büyük ölçeklerde üretilebilir. Bu gibi biyolojik maddelerin sayısı son on yılda hızla artmıştır ve hayvan hücre kültür teknolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.
- Somatik gen tedavisinde kullanılır.
- Tümör aşılı geliştirilmede kullanılır.

Hücre kültürünün kullanılmasının temel avantajı uygulamaların kararlılık göstermesi ve tekrarlanabilirliği klonal hücre topluluğu kullanarak elde edilebilir. Dezavantajı ise sürekli bir büyümeden bir süre sonra, hücre özellikleri değişebilir ve başlangıçtaki hücrelere göre oldukça farklı olabilirler. Hücreler ayrıca çeşitli enzimlerin aktivasyonu ile farklı kültür ortamlarına (örn; farklı besin maddeleri, farklı sıcaklık, farklı tuz konsantrasyonu vb.) adapte olabilirler (Alberts, B. ve ark., 2002).

2.8.3. Sitotoksitite Çalışmaları

Sitotoksitite çalışmaları, formülasyonlar hücrelere uyguladıktan sonra, hücrelerin canlı kalabilmelerine dayanır. Sitotoksitite çalışmalarında hücresel canlılık ya da metabolik değişkenlikler ölçülmektedir. Metabolik değişkenlikler genellikle MTT, XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) ya da WST-1 yöntemleri ile tayin edilir (Berridge, M.V. ve ark., 1996) .

Hücrelerin canlılık oranlarının değerlendirilmesinde en yaygın kullanılan metot MTT testidir. MTT testi kolorimetrik bir yöntemdir. MTT testinin esası, sarı renkli çözünebilir özellikteki MTT boyasının (3-(4,5-dimetitiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum boromür), metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat dehidrogenaz (SDH) enzimi ile koyu mavi renkli çözünmez özellikteki formazan kristallerine dönüşmesidir. Oluşan formazan ürünü çözünür hale getirilir ve oluşan mor renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

3. DENEYSEL

3.1. Araçlar ve Gereç

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

| | |
|---|--|
| Aseton | Merck, Almanya |
| Asetonitril (HPLC grade) | Merck, Almanya |
| Diklorometan (HPLC grade) | Merck, Almanya |
| di-Sodyum hidrojen fosfat | Merck, Almanya |
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) | Biochrom, Almanya |
| Paklitaksel | AppliChem, Almanya |
| Metanol (HPLC grade) | Sigma Aldrich, ABD |
| Metiltiyazoliltetrazolium (MTT) | Sigma, Almanya |
| Orto fosforik asit (% 85) | Merck, Almanya |
| PLGA (50:50) (Resomer RG 502 H) | Boehringer Ingelheim, Almanya |
| Polivinil alkol (Mw:30 000-70 000 Da) | Sigma, ABD |
| Potasyum dihidrojen fosfat | Riedel-de Haën, Almanya |
| Sodyum klorür | Riedel-de Haën, Almanya |
| Tripsin EDTA | Biochrom, Almanya |
| Biyolojik Materyal | |
| Caco-2 insan kolon karsinoma hücre hattı | ATTC (American Type Tissue Cell Culture Collection, ABD) |

3.1.2. Kullanılan Aletler

| | |
|---|---|
| ELISA okuyucu | ASYS-UVM 304, Avusturya |
| Etüv | Dedeoğlu, Türkiye |
| Hassas Terazi | Shimadzu, Japonya Mettler Toledo, İsviçre |
| HPLC Sistemi | Agilent Technologies 1200 Series, ABD |
| İnkübatör (MCO-18AIC) | Sanyo, Japonya |
| Kolon (Nucleodur 100 C18, 5µm, 250x4,6 mm) | Macherey- Nagel, Almanya |
| 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 |
| Ultrasonik Banyo | Branson B 220 Smith Kline, ABD |
| Vorteks | Nüvemix, Türkiye |
| Yüksek hızlı homojenizatör | Ultraturrax T25 Basic, IKA, Almanya |

3.2. Yöntem

3.2.1. Paklitakselin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

Paklitakselin miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar Çizelge 3.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1. Paklitakselin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşulları

| Sabit faz | Hareketli faz | A | B | Enjeksiyon hacmi | Akış hızı | Kolon fırını sıcaklığı | Dedektör, Dalga boyu |
|---|-------------------------------------|-------------------|------|------------------|-----------|------------------------|----------------------|
| Nucleodur 100 C ₁₈ Por büyüklüğü 5µm, 250x4.6mm (Macherey-Nagel) | %55 Asetonitril (HPLC grade, Merck) | % 45 Ultra saf su | 10µl | 1 ml/dk | 40°C | UV 227 nm | |

3.2.1.1. Kalibrasyon doğrusu

HPLC analizleri sonucunda, Paklitaksel’in kalibrasyon doğrusunun elde edilmesi için ilacın metanol içerisinde 0.1 mg/ml konsantrasyonda ana stok çözeltisinden hareketle seyreltmeler yapılmıştır. Çözeltilere, 1, 2, 5, 10, 15, 20 µg/ml konsantrasyonda paklitaksel içerecek şekilde metanol ile gerekli seyreltmeler yapılarak 3 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı elde edilen pik alanları kullanılarak çizilmiştir.

3.2.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Yöntem validasyonu, ilacın miktar tayini için seçilen yöntemin, güvenilirliğini göstermek için yapılması gereken bütün işlemleri kapsar. Analitik yöntem validasyonu, belirlenen analiz yönteminin kesin ve doğru bir şekilde her defasında

beklenen sonuca ulaştığını kanıtlayan bir yöntemdir (van Iterson, R. A., Aarons, L. ve ark., 1987).

Analitik yöntem validasyonu için incelenen parametreler aşağıda sıralanmıştır:

- Doğrusallık (“Linearity”)
- Doğruluk (“Accuracy”)
- Kesinlik (“Precision”)
- Duyarlılık (“Sensitivity”)
- Özgünlük (“Specificity”)
- Stabilite (“Stability”)

3.2.1.2.1. Doğrusallık (“Linearity”)

Analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının orantılı olmasıdır (Shabir, G. A., 2003). Tez çalışmasında, ilacın metanol içindeki 0.1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan stok çözeltisinin, çeşitli seyreltme oranları ile seyreltilmesi ile 1, 2, 5, 10, 15, 20 µg/ml konsantrasyonlarında 3 farklı seri oluşturulmuştur. Çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı hesaplanan pik alanları kullanılarak doğru denklemi hesaplanmış ve kalibrasyon doğrusu çizilmiştir.

3.2.1.2.2. Doğruluk (“Accuracy”)

Doğruluk, yöntem ile elde edilen sonuçların gerçek değere yakınlığıdır (Ertaş, Ö. S. ve Kayalı, A., 2005). Bir yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade eder. Standart sapma (SS) veya varyasyon katsayısı (VK) ile değerlendirilir. Paklitaxelin miktar tayini için kullanılan yöntemin günler içi (intra-assay) ve günler arası (inter-assay) doğruluğunun değerlendirilmesinde aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Formül 3.1).

$$\% \text{ Bağıl Hata} = \frac{\text{Konsantrasyon} - \text{Tayin edilen konsantrasyon}}{\text{Konsantrasyon}} \times 100 \quad (3.1)$$

Deney içi doğruluğun tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 2, 10, 20 µg/ml), her bir konsantrasyondan üç 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; 2, 10, 20 µg/ml), her bir konsantrasyondan üç adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden üç gün tayin edilmiştir.

3.2.1.2.3. Kesinlik (“Precision”)

Kesinlik, normal çalışma koşullarında analitik yöntemin tekrar edilebilirlik (repeatability) veya tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) derecesinin bir ölçüsüdür (Shabir, G. A., 2003). Yöntemin kesinliği, herhangi bir değer için tekrarlanabilme kabiliyeti veya bireysel test sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir. Sayısal bir değere sahip değildir. Bir analitik yöntemin kesinliğini göstermek için, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, belli konsantrasyona sahip örnekler sırayla ölçülerek ortalama, % bağıl hata, VK hesaplanır. Kesinlik, tekrarlanabilirlik (“repeatability”) ve tekrar elde edilebilirlik (“reproducibility”) olarak ifade edilir.

3.2.1.2.3.1. Tekrarlanabilirlik (“Repeatability”)

Kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır. Tekrarlanabilirliğin tespitinde, kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 2, 10, 20 µg/ml) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile üçer kez ayrı ayrı analiz edilmiştir. Pik alanlarına karşılık gelen derişimler için % VK değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için VK'nın % 2'den küçük olması gerekmektedir (Shabir, G. A., 2003, Taylor, J. ve ark., 2008).

3.2.1.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik (“Reproducibility”)

Aynı laboratuvar, aynı analist ve aynı cihaz kullanılarak, aynı konsantrasyondaki çözelti ile gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluk incelenir. Üç farklı konsantrasyonda aynı gün ve farklı günlerde çalışmalar gerçekleştirilir.

Deney içi tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 2, 10, 20 µg/ml) her bir konsantrasyondan üç adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Deneyler arası tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon doğrusunda yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 2, 10, 20 µg/ml) her bir konsantrasyondan üç 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.

3.2.1.2.4. Duyarlılık (“Sensitivity”)

3.2.1.2.4.1. Saptama Sınırı (“Limit of Detection”)

Analitik başarımların göstergelerindedir. Tayin sınırı; analitin, analitik bir işlemle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur (van Iterson, R. A.). Bu değer, sinyal:gürültü oranınının 3:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir (Ertaş, Ö. S. ve Kayalı, A., 2005).

3.2.1.2.4.2. Miktar Tayin Sınırı (“Limit of Quantification”)

Miktar tayin sınırı, yöntemin belirlenen şartlarında 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 (van Iterson, R. A.).

3.2.1.2.5. Özgünlük (“Specificity”)

Yöntemin özgünlüğü, analiti, örnekte varlığı tespit edilmiş analit ile etkileşimde bulunabilen diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneğidir (Ertaş, Ö. S. ve Kayalı, A., 2005). Özgünlük çalışmasında, ortamda bulunan ilaç dışındaki yardımcı maddelerin, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında, ilacın spesifik olarak analiz edebilme yeteneğini gösterilir (van Iterson, R. A.). Bu ölçütlerin değerlendirilmesine yönelik olarak formülasyonda kullanılan diğer maddelerin (PLGA, PVA) formülasyonda buldukları konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve ilaç ile aynı şartlarda pik verip vermediklerinin incelenmesi için HPLC kromatogramları alınmıştır.

3.2.1.2.6. Stabilite (“Stability”)

Paklitakselin analiz boyunca stabilitesini göstermek amacıyla 10 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan çözeltisi +37°C’de 8 saat bekletilmiş ve analiz edilmiştir. Sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak gösterilmiştir.

3.2.2. Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları

3.2.2.1. Boş PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

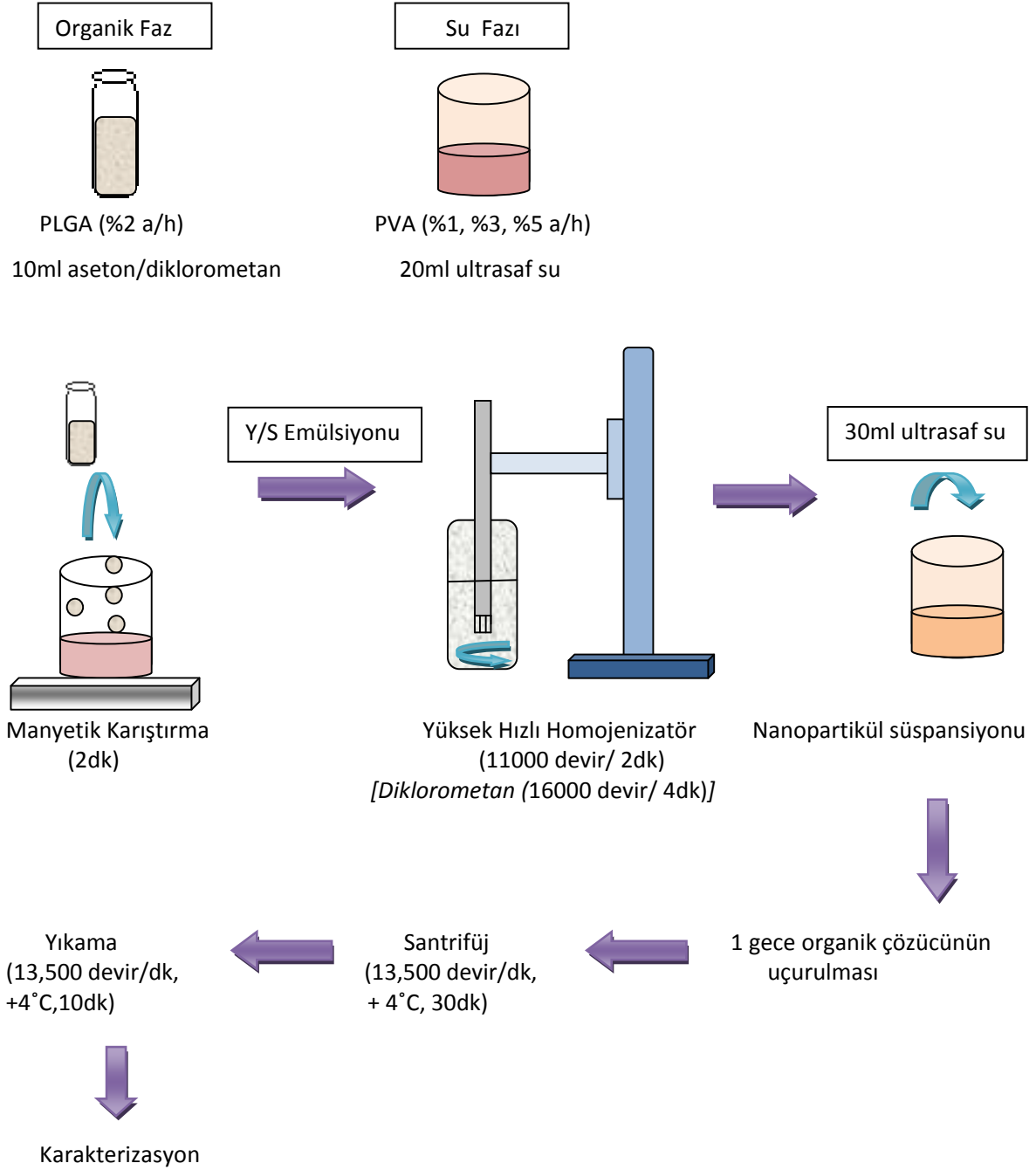
Biyoparçalanabilir sentetik polimer olan PLGA ile emülsifikasyon/çözücü buharlaştırma yöntemine uygun olarak nanopartiküller hazırlanmıştır.

Tez çalışmasında formülasyon parametrelerinin etkisi incelenmiştir. PVA konsantrasyonu, organik çözücü değiştirilerek, nanopartikül karakterizasyonuna etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda ilaç yüklemek için en uygun formülasyon seçilmiştir. Çizelge 3.2’de seçilen formülasyon parametreleri görülmektedir.

Çizelge 3.2. Formülasyon parametreleri

| Parametreler | |
|---------------------------|-----------------------|
| PVA konsantrasyonu | Organik çözücü |
| %1 (a/h) | Aseton |
| %3 (a/h) | Diklorometan |
| %5 (a/h) | |

10ml aseton/diklorometan içinde manyetik karıştırıcıda, %2 (a/h) konsantrasyonda PLGA (RG 502H) çözülerek, organik faz hazırlanır. 20ml %1, 3, 5 (a/h) konsantrasyonda polivinil alkol (PVA, ort. moleküler ağırlığı 30000-70000) ile ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda sulu faz hazırlanır. PLGA ve PVA çözeltileri aynı sıcaklığa getirilir. Emülsiyon oluşturmak için, manyetik karıştırıcıda 20ml PVA çözeltisi üzerine 10ml PLGA çözeltisi hızlıca eklenir, 2 dakika karıştırılır. Karışım, yüksek hızlı homojenizatör ile, 11000 devir/dk'da 2 dakika (diklorometan için, 16000 devir/dk'da 4 dk) örneklerin karışması ile homojenizasyon sağlanır. Üzerlerine ultra saf su eklenir. Y/S emülsiyonu oluşturulur. Bir gece boyunca organik solvan uçurulur. Oluşan nanopartiküllerin çökmesi için 13500 devir/dk'da 30 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatant ayrılır. Nanopartiküllerin üzerine artık PVA'yı uzaklaştırmak için, 30 ml ultra saf su eklenir ve 10 dakika 13500 devir/dk'da santrifüj yapılır. Santrifüj sonrasında süpernatant ayrılır ve çöken nanopartiküllerin üzerine 30ml ultra saf su eklenerek, bu nanopartiküllerin suda tamamen dağılması sağlanır. Şekil 3.1'de boş PLGA nanopartiküllerin hazırlanması şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. Boş PLGA nanopartiküllerin hazırlanması

3.2.2.2. Paklitaksel Yüklü PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküller, emülsifikasyon/solvan buharlaştırma yöntemine uygun olarak hazırlanmıştır Tez çalışmasında kullanılan ilacın organik

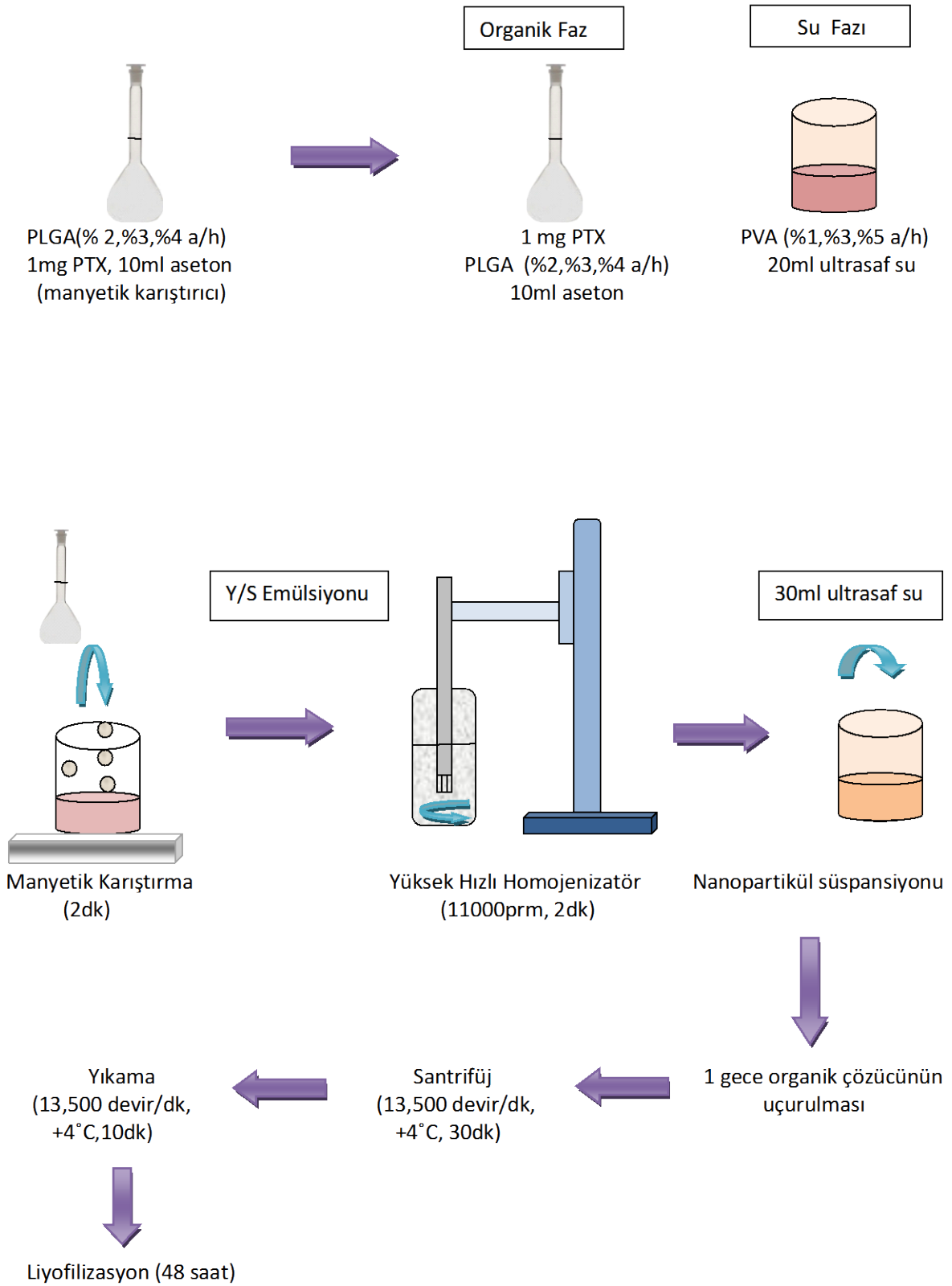
fazda (etil asetat, aseton, vb.) kolaylıkla çözünebilen lipofilik bir madde olmasından dolayı Y/S basit emülsiyon oluşturulmuştur.

Organik faz; PLGA (RG 502H, %2, %3 ,%4 a/h) ve 1mg paklitaksel, 10 ml asetonunda 30dk manyetik karıştırıcıda çözündürülür.

Su fazı ; 20ml %1, %3, %5 (a/h) konsantrasyonda polivinil alkol (PVA, ort. moleküler ağırlığı 30000- 70000), ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözündürülür.

PLGA ve PVA çözeltileri aynı sıcaklığa getirilir. Y/S Emülsiyonu oluşturmak için, manyetik karıştırıcıda 20ml PVA çözeltisi üzerine 10ml PLGA - Paklitaksel çözeltisi hızlıca eklenir, 2 dakika karıştırılır. Karışım, yüksek hızlı homojenizatörde, 11000 devir/dk'da 2 dakika karıştırılır. Üzerlerine difüzyon için ultra saf su eklenir. Bir gece boyunca organik solvan uçurulur. Oluşan nanopartiküllerin çökmesi için 13500 devir/dk'da 4°C'de 30dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatant ayrılır. 1 kez yıkama için, nanopartiküllerin üzerine 30 ml ultra saf su eklenir ve 10 dakika 13500 devir/dk'da santrifüj yapılır. Santrifüj sonrasında süpernatant ayrılır ve çöken nanopartiküllerin üzerine 30ml ultra saf su eklenerek, bu nanopartiküllerin suda tamamen dağılması sağlanır. Hazırlanan örnek behere konup, 48 saat liyofilize edilir. In vitro salım çalışmaları ve liyofilize nanopartiküllerde karakterizasyon çalışması yapmak üzere +4 °C'de saklanmıştır.

Şekil 3.2'de paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllerin hazırlanması şematize edilmiştir.



Şekil 3.2. Paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllerin hazırlanması

3.2.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri foton korelasyon spektroskopisi ve dinamik ışık saçılması esasına göre çalışan Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Her formülasyon için ardarda üç ölçüm yapılmıştır. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C ve ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.3.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi

Yükleme etkinliği direkt olarak nanopartiküllerin içindeki ilaç miktarı ile ya da indirekt olarak serbest haldeki ilaç miktarının tayini ile hesaplanabilir.

Süpernatanda serbest halde bulunan yüklenmemiş ilaç miktarının tayininde Bölüm 3.2.1'de '*Paklitakselin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini*' başlığı altında anlatılan HPLC tekniği kullanılmıştır. Toplam süpernatant hacmi tespit edildikten sonra, yeterli miktarı 0,45 µm por açıklığına sahip enjektör filtresinden süzülerek analiz gerçekleştirilmiştir.

Santrifüj sonrası elde edilen nanopartiküllere yüklenen paklitaksel miktarının direkt tayininde ise, ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Nanopartiküller, ilacın kolaylıkla çözündüğü metanol içinde yeniden süspand edildikten sonra 15 dakika ultrasonik banyoda tutulmuştur. Bu sırada, nanopartiküllerin parçalanması, ilacın ise metanol fazına geçmesi beklenmektedir. 15 dakika sonunda, elde edilen örnek 0,45 µm por açıklığına sahip enjektör filtresinden süzülüp, ilaç miktar tayini için Bölüm 3.2.1'de '*Paklitakselin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini*' başlığı altında anlatılan HPLC tekniği kullanılmıştır.

Yükleme etkinliğinin tayini, ortama eklenen ilaç ile nanopartikül formülasyonuna yüklenmeyen ilaç miktarları kullanılarak hesaplanır. İlacın yüklenme etkinliği (% YE) ve yükleme kapasitesi (% YK) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır (Formül 3.2, 3.3).

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

3.2

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

3.3

3.2.3.3. İn Vitro Salım Deneyleri

İlaç yüklü nanopartiküllerde salım deneyleri, 37 °C'de ve yatay çalkalayıcı su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Salım ortamı olarak pH 7,4 %0.5 SLS içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) kullanılmıştır (Chawla, J. S. ve Amiji, M. M., 2002).(Chawla, J. S. ve Amiji, M. M., 2002)

Her bir ependorf tüpe 10 mg liyofilize toz örneği tartılıp, üzerlerine 1 ml tampon eklenmiştir. Formülasyonlar, 37°C'de yatay çalkalayıcı su banyosunda 50 devir/dk'da 1 hafta boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ependorf tüpler belirli örnek alma aralıklarında (0. dk, 1. sa, 4. sa, 8. sa, 12.sa, 24. sa, 48.sa, 72.sa, 96.sa, 120.sa, 144.sa, 168.sa), 13 500 devir/dk'da 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Salınan ilaç için süpernatant kısmından 0.5'er ml alınarak yerine 0.5'er ml PBS eklenir. Örnekler 0.45 µm por açıklığına sahip enjektör filtresinden süzül müştür. Bölüm 3.2.1'de '*Paklitakselin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini*' başlığı altında anlatılan HPLC tekniği ile nanopartikül formülasyonundan salınan ilaç miktarı tayin edilmiştir.

3.2.4. Sitotoksitesite Çalışmaları

İlaç içeren ve içermeyen nanopartikül formülasyonlarında sitotoksitesite çalışmaları, insan kolon adenokarsinoma (Caco-2) hücre hattı kullanılarak yapılmıştır. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının sitotoksitesitesini tayin etmek amacıyla

literatürde sıklıkla kullanılan bir yöntem olan Metil-tiyazol-tetrazolyum (MTT) boyama yöntemi kullanılmıştır.

Hücreler için ortam olarak %10 FBS (föetal bovin serum), %1 penisilin G sodyum (100 ünite/ml) ve streptomisin sülfat (100 ünite/ml) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kullanılmıştır. Hücreler, -180°C sıvı azot tankından alınarak, steril santrifüj tüplerine konulmuştur. Üzerlerine 10 ml hücre ortamı eklenmiş ve 2000 rpm'de 2dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılıp, üzerlerine 5ml yeni ortam eklenerek süspansiyon edilmiştir. 25cm²'lik hücre kültürü flasklarında, 37°C'de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücre ortamı her 2-3 günde bir değiştirilmiştir.

Flasktan, ortam uzaklaştırılıp, tripsinizasyon işlemi yapılmıştır. Tripsinizasyon için, tripsin-EDTA (%0.005 tripsin, % 0.002 EDTA) çözeltisi flasklara eklenmiş, 2dk inkübatörde tutulmuştur. İnkübasyon sonrası santrifüj tüpüne aktarılan hücrelerin üzerine taze ortam eklenip, 2 dk 2000 rpm'de santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlanmıştır. Çöken hücreler, taze ortamla süspansiyon edilmiştir ve 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Caco-2 hücreleri hücre kültür ortamı içerisinde 37°C'de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde 24 ve 48 saat bekletilmiştir.

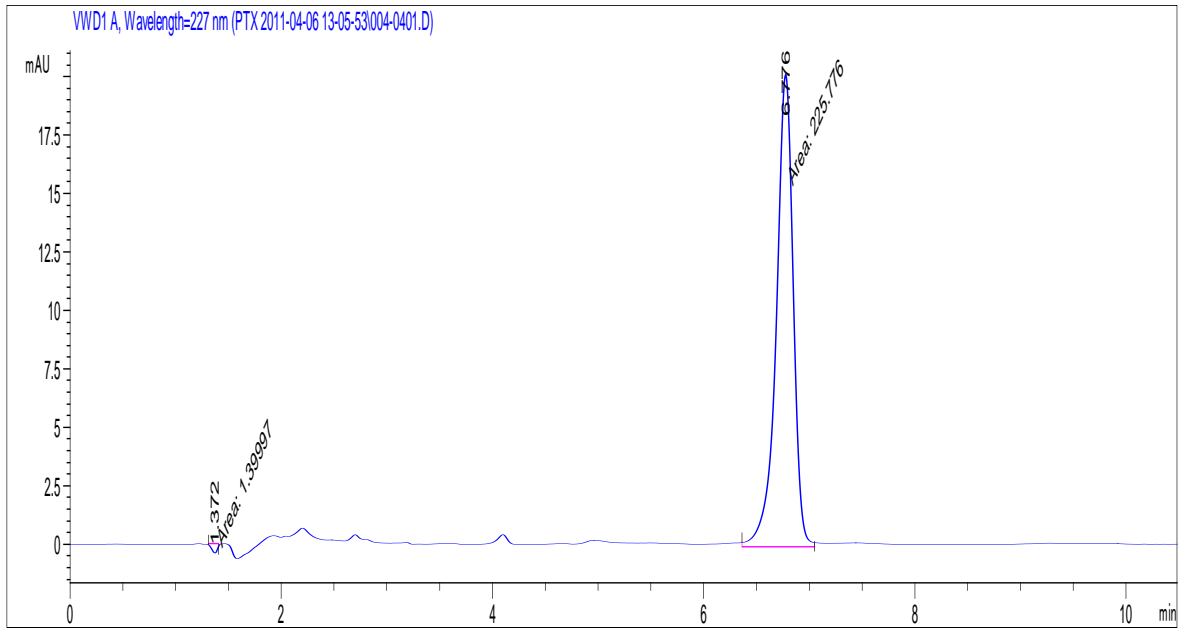
Paklitakselin yapılan literatür araştırmalarında ortalama öldürücü dozu (LD₅₀) 1000nM olarak bulunmuştur (Gibb, R. K. ve ark., 1997). Sitotoksite çalışmasında ilacın sitotoksitesinin incelenmesi amacı ile 250nM konsantrasyondaki paklitaksel çözeltisi kullanılmıştır.

Sitotoksite çalışmasında ilaç içermeyen ile ilaç içeren %2 (a/h) PLGA %3 (a/h) PVA nanopartikül formülasyonu kuyucuklara ilave edilmiş ve 37°C'de %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatörde 24 ve 48 saat bekletilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa 20 µL MTT çözeltisi (5mg/ml) eklenmiş ve plaklar 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra MTT pipet ile uzaklaştırılıp, hücrelerin üzerine 200µl DMSO eklenmiştir. Mikroplak okuyucu ile 570nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüştür. Kültür ortamında formülasyon ilave edilmeden inkübe edilen hücreler hücre canlılığının ölçülmesinde kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Hücre canlılığı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüzde olarak ifade edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Paklitakselin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

Paklitakselin HPLC ile miktar tayini Bölüm 3.2.1'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiş ve paklitaksele ait aşağıdaki pik elde edilmiştir (Şekil 4.1). Kromatogramdan da görüldüğü gibi paklitaksele ait pik düzgün bir şekilde elde edilmiş ve alıkonma zamanı 6.7 dakika olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. Paklitaksele ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$) ait HPLC kromatogramı. *Enjeksiyon Hacmi:* 10 μl , *Akış hızı:* 1ml/dk, *Kolon fırını sıcaklığı:* 40°C, *Mobil faz:* Ultra saf su: Asetonitril (45:55), *Kolon:* Nucleodur 100 C₁₈ Macherey- Nagel, *Partikül iriliği:* 5 μm *Uzunluk:* 250mm *İç çap:* 4.6mm, *Dalga boyu:* 227nm, *Dedektör:* UV dedektör

10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda paklitaksel çözeltisi ile yapılan sistem uygunluk testleri sonucunda aşağıdaki değerler elde edilmiştir (n=5).

Alıkonma süresi: 6.776 dk

Pik simetrisi: 1.197

Kapasite faktörü: 3.9

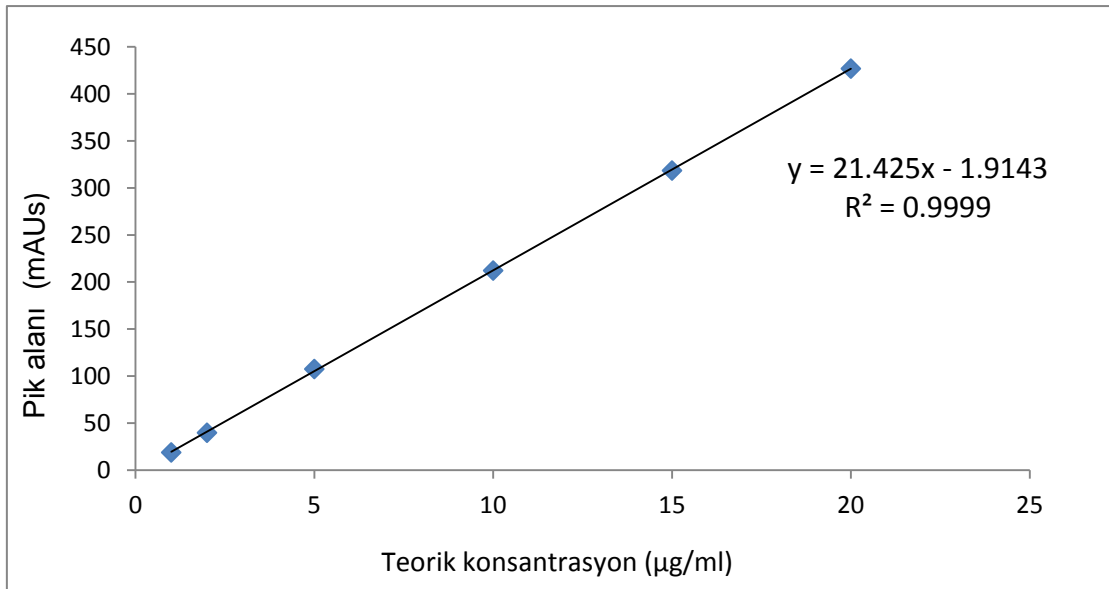
Teorik tabaka sayısı: 21166

4.1.1. Kalibrasyon Doğrusu

Paklitakselin kalibrasyon doğrusu, Bölüm 3.2.1.1'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Paklitakselin metanol içinde 100 µg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmış ve bu stoktan, 1, 2, 5, 10, 15, 20 µg/ml paklitaksel içerecek şekilde metanol ile seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonu sonucunda paklitaksele ait pik alanı hesaplanmış ve çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı hesaplanan pik alanlarının grafiği çizilerek kalibrasyon doğrularına ait denklemler lineer regresyon ile bulunmuştur. Paklitakselin HPLC ile miktar tayininde doğrusal regresyon verileri Çizelge 4.1'de gösterilmekte olup, kalibrasyon doğrusu ve denklemi ise Şekil 4.2'de yer almaktadır.

Çizelge 4.1. Paklitakselin HPLC ile miktar tayininde elde edilen regresyon verileri (n=3).

| Parametre | Sonuç |
|-----------------------|---------------------------|
| Konsantrasyon aralığı | 1-20 µg. ml ⁻¹ |
| Eğim | 21.425 |
| İntersept | 1.9143 |
| Korelasyon katsayısı | 0.9999 |



Şekil 4.2. Paklitakselin kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=3).

4.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu

4.1.2.1. Doğrusallık

Deneysel kısımda anlatıldığı gibi (Bölüm 3.2.1.2.1), HPLC spektrofotometresinde okunan absorban değerleri grafiğe geçirilmiştir. Hazırlanan stok çözeltilerden hareketle yapılan seyreltmeler sonucunda 1, 2, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ konsantrasyondaki standart çözeltilerin HPLC analizi yapılmıştır. Tanımlayıcılık katsayısı $R^2 = 0,9999$ olarak bulunarak denklemin doğrusallığı gösterilmiştir (Şekil 4.2).

4.1.2.2. Doğruluk

Kullanılan analitik yöntemin gün içi (intra-assay) ve günler arası (inter-assay) doğruluğuna ilişkin veriler, Bölüm 3.2.1.2.2'de anlatıldığı şekilde, % ortalama bağıl hatalar hesaplanarak elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusunda yer alan üç farklı konsantrasyonda (1, 10, 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) hazırlanmış olan üç adet çözeltinin absorbanları ölçülmüş ve ölçülen konsantrasyon ile % bağıl hatalar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Paklitakselin günler içi ve günler arası doğruluğu

| | Teorik Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) | Gerçek Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$) \pm SS | % Ortalama Bağıl Hata (Doğruluk) |
|--------------|---|--|----------------------------------|
| Gün içi | 2 | 1.98 \pm 0.01 | 1.0 |
| | 10 | 9.95 \pm 0.01 | 0.3 |
| | 20 | 20.05 \pm 0.03 | 0.25 |
| Günler arası | 2 | 1.974 \pm 0.02 | 1.3 |
| | 10 | 10.10 \pm 0.14 | 1.09 |
| | 20 | 20.18 \pm 0.4 | 0.9 |

4.1.2.3. Kesinlik

4.1.2.3.1. Tekrarlanabilirlik

Analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi için Bölüm 3.2.1.2.3.1'de anlatıldığı gibi, hazırlanan standart çözeltinin absorbanları altışar kez arka arkaya HPLC'de okunarak kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ilaç

konsantrasyonları arasındaki varyasyon katsayısı hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Hesaplanan varyasyon katsayılarının hepsi %2'den küçük bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Paklitaksel için analitik yöntemin tekrarlanabilirlik sonuçları

| Teorik Konsantrasyon (µg/ml) | Pik Alanı | Gerçek Konsantrasyon (µg/ml) | X ± SS | VK (%) |
|------------------------------|-----------|------------------------------|---------------|--------|
| 2 | 41.8 | 1.96 | 1.974 ± 0.02 | 1.31 |
| | 41.7 | 1.96 | | |
| | 42.7 | 2.00 | | |
| 10 | 212.8 | 9.94 | 10.109 ± 0.14 | 1.44 |
| | 218.6 | 10.21 | | |
| | 217.7 | 10.17 | | |
| 20 | 436.2 | 20.37 | 20.181 ± 0.40 | 1.98 |
| | 438.0 | 20.45 | | |
| | 422.3 | 19.72 | | |

4.1.2.3.2. Tekrar Elde Edilebilirlik

Kullanılan analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliğinin incelenmesi için Bölüm 3.2.1.2.3.2'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. Paklitakselin gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları (n=3)

| | Teorik Konsantrasyon (µg/ml) | Gerçek Konsantrasyon (µg/ml) | %VK (Kesinlik) |
|--------------|------------------------------|------------------------------|----------------|
| Gün içi | 2 | 1.98 ± 0.01 | 0.62 |
| | 10 | 9.95 ± 0.01 | 0.14 |
| | 20 | 20.05 ± 0.03 | 0.16 |
| Günler arası | 2 | 1.974 ± 0.02 | 1.30 |
| | 10 | 10.10 ± 0.14 | 1.44 |
| | 20 | 20.18 ± 0.40 | 1.98 |

4.1.2.4. Duyarlılık

Paklitakselin HPLC ile miktar tayininde kullanılan yntemin duyarlılığı Bolum 3.2.1.2.4'de belirtildiği gibi tespit edilmiştir.

a) Saptama Sınırı ("Limit of Detection")

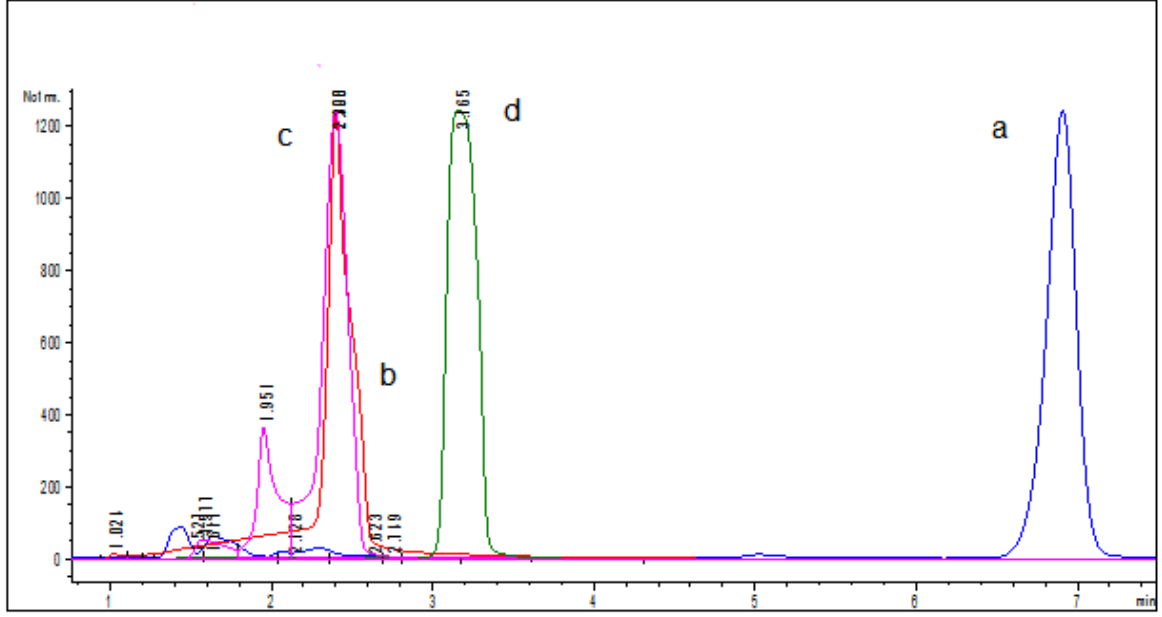
Saptama sınırı, analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en dűřük konsantrasyondur. Paklitakselin saptama sınırı 0.057201 µg/ml olarak bulunmuştur.

b) Miktar Tayin Sınırı ("Limit of Quantification")

Paklitakselin kabul edilebilir kesinlik ve dođruluk ile tayin edilebildiđi en dűřük konsantrasyon 0.173337 µg/ml saptanmıřtır.

4.1.2.5. Özgünlük

Bolum 3.2.1.2.5'de açıklanığı 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, paklitaksel ile aynı şartlarda pik vermediği görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Yükleme etkinliği ve in vitro salım çalışmalarında elde edilen, etkin madde yüklü ve boş PLGA nanopartiküllerine ait HPLC kromatogramları.

a: Yükleme etkinliği çalışmalarında elde edilen paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllere ait kromatogram

b: Yükleme etkinliği çalışmalarında elde edilen boş PLGA nanopartiküllere ait kromatogram

c: PVA çözeltisine ait kromatogram

d: PLGA çözeltisine ait kromatogram

4.1.2.6. Stabilite

Paklitakselin deney süresince dayanıklı kaldığının gösterilmesi için, 10µg/ml konsantrasyondaki çözeltiler hazırlanıp, 0. dk ve 8. saat sonra analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Analitik yöntem validasyonunda paklitaksele ait stabilite sonuçları

| Ölçüm Zamanı (saat) | Teorik Konsantrasyon (µg/ml) | Gerçek Konsantrasyon (µg/ml) | Geri Kazanım (%) |
|---------------------|------------------------------|------------------------------|------------------|
| 0 | 10 | 10.00 | 100 |
| 8 | 10 | 10.12 | 101.2 |

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

Boş PLGA nanopartiküllerinin partikül boyutları, zeta potansiyelleri Çizelge 4.6 ve 4.7 'de verilmiştir.

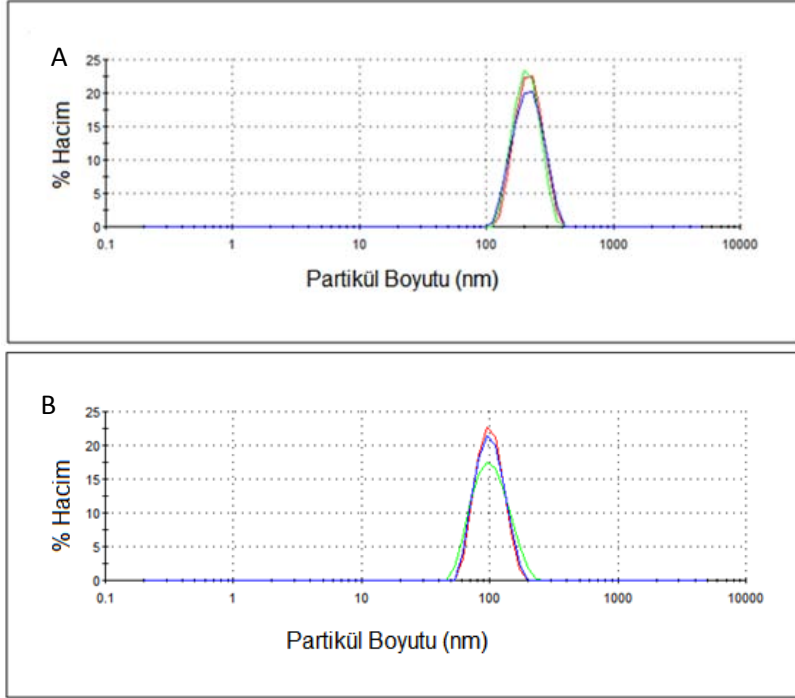
Çizelge 4.6. Diklorometan ile hazırlanan %1, 3 ve 5 (a/h) PVA konsantrasyonu ve %2 (a/h) PLGA konsantrasyonundaki nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri (n=3)

| DCM | Partikül Boyutu (nm) | | PDI | Zeta Potansiyel (mV) | |
|--------|----------------------|--------|-----------|----------------------|--------|
| | Seri | Ort±SS | | % VK | Ort±SS |
| %1 PVA | 140±5 | 2.3 | 0.22±0.03 | -12.7±1.4 | -2.6 |
| %3 PVA | 230±6 | 1.5 | 0.35±0.03 | -17.3±0.7 | -1.75 |
| %5 PVA | 173±7 | 1.3 | 0.23±0.02 | -19.0±0.7 | -4.0 |

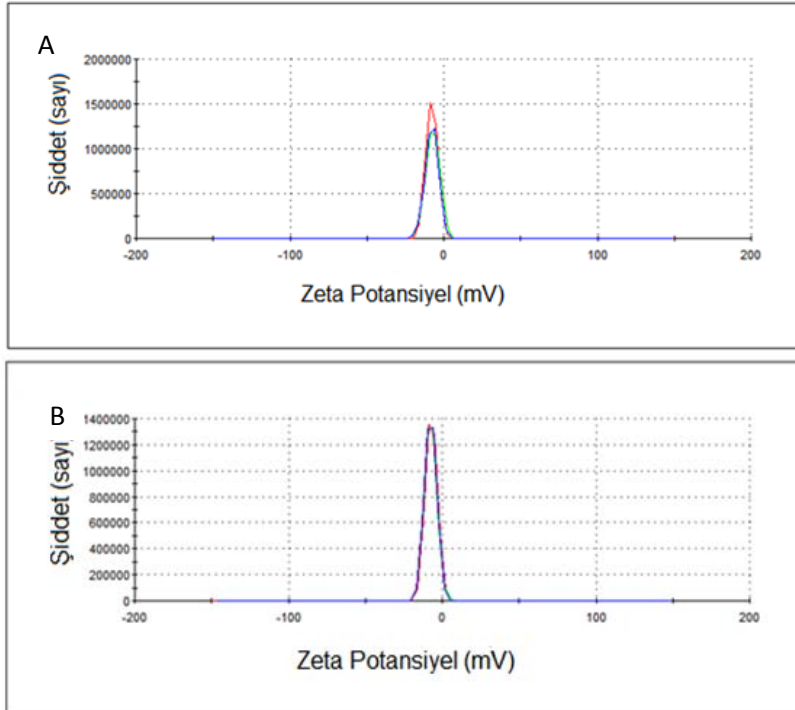
Çizelge 4.7. Aseton ile hazırlanan %1, 3 ve 5 (a/h) PVA konsantrasyonu ve %2 (a/h) PLGA konsantrasyonundaki nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri (n=3)

| ASETON | Partikül Boyutu (nm) | | PDI | Zeta Potansiyel (mV) | |
|--------|----------------------|--------|-----------|----------------------|--------|
| | Seri | Ort±SS | | % VK | Ort±SS |
| %1 PVA | 91±0.9 | 1.1 | 0.07±0.03 | -14.1±2.0 | -1.8 |
| %3 PVA | 111±2.0 | 1.4 | 0.06±0.02 | -19.2±0.7 | -1.6 |
| %5 PVA | 104±1.7 | 1.35 | 0.02±0.10 | -18.2±0.2 | -1.1 |

Boş PLGA nanopartiküllerin Şekil 4.4'de partikül dağılımları, Şekil 4.5'de zeta potansiyel dağılım grafikler görülmektedir (n=3).



Şekil 4.4. Boş PLGA nanopartikül boyutu dağılım grafikleri (A) Diklorometan, (B) Aseton



Şekil 4.5. Boş PLGA nanopartiküllerine ait zeta potansiyel dağılım grafikleri (A) Diklorometan, (B) Aseton

4.2.1.2. Paklitaksel Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli

1mg paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllerinin partikül boyutları, zeta potansiyelleri Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. %1, 3 ve 5 (a/h) PVA konsantrasyonu ve %2, 3 ve 4 (a/h) PLGA konsantrasyonundaki paklitaksel yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli değerleri

| Formülasyonlar | Partikül Boyutu (nm) | | PDI | Zeta Potansiyel (mV) | | |
|----------------|----------------------|-------------|--------|----------------------|-------------|-------|
| | Ort±SS | % VK | Ort±SS | Ort±SS | % VK | |
| % 2 PLGA | % 1 PVA | 219.7 ± 8.2 | 2.5 | 0.2 ± 0.05 | -13.9 ± 1.4 | -5.3 |
| | % 3 PVA | 191.3 ± 0.3 | 0.15 | 0.06 ± 0.01 | -21.9 ± 0.4 | -1.9 |
| | % 5 PVA | 190.9 ± 1.7 | 0.89 | 0.08 ± 0.03 | -16.1 ± 1.6 | -4.9 |
| % 3 PLGA | %1 PVA | 195.1 ± 10 | 3.1 | 0.09 ± 0.07 | -16.4 ± 0.2 | -1.5 |
| | %3 PVA | 235.4 ± 6.8 | 1.8 | 0.15 ± 0.03 | -16.5 ± 1.7 | -10.4 |
| | % 5 PVA | 223.7 ± 5.4 | 1.5 | 0.13 ± 0.03 | -17.2 ± 0.2 | -1.4 |
| % 4 PLGA | %1 PVA | 214.1 ± 4.3 | 1.1 | 0.12 ± 0.02 | -14.4 ± 0.4 | -2.1 |
| | %3 PVA | 234.9 ± 5.0 | 1.3 | 0.14 ± 0.03 | -15.0 ± 0.3 | -2.1 |
| | %5 PVA | 224.6 ± 3.5 | 1.5 | 0.17 ± 0.01 | -16.6 ± 0.5 | -1.6 |

4.2.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular

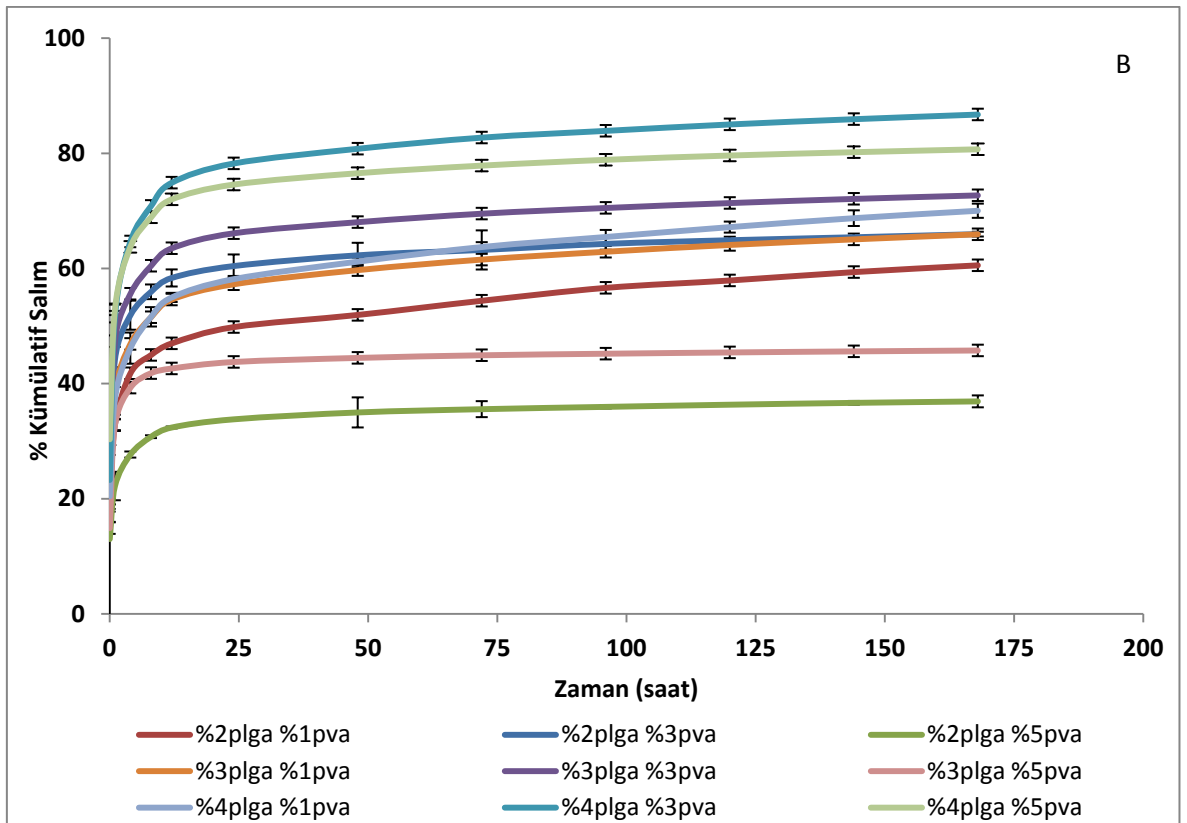
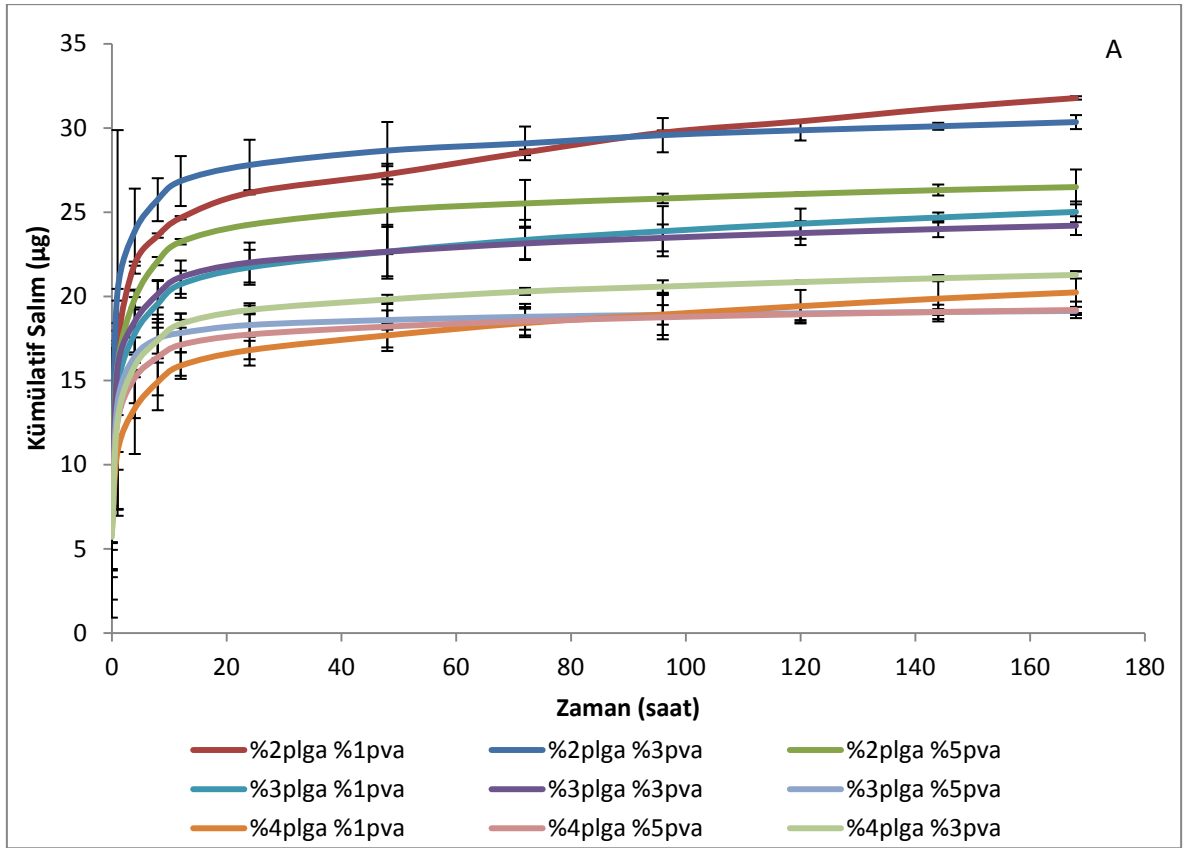
Bölüm 3.2.3.3'te "Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi" başlığı altında anlatıldığı şekilde, PLGA nanopartiküllerine yüklenen paklitaksel miktarı tayin edilmiştir. Yükleme etkinliği, yükleme kapasitesi ve yüklenen miktarlara ilişkin elde edilen sonuçlar, Çizelge 4.9'da özetlenmektedir.

Çizelge 4.9. PLGA nanopartiküllerine ait yükleme etkinliği sonuçları

| Formülasyon | Yükleme Etkinliği (% YE) | Yüklenen Miktar (μ g) | Yükleme Kapasitesi (%) |
|--------------|--------------------------|----------------------------|------------------------|
| %2PLGA %1PVA | %82.6 | 826.7 | %52.5 |
| %2PLGA %3PVA | %53.0 | 530.2 | %41.7 |
| %2PLGA %5PVA | %62.7 | 627.0 | %71.8 |
| %3PLGA %1PVA | %86.6 | 866.9 | %37.9 |
| %3PLGA %3PVA | %79.6 | 796.7 | %33.2 |
| %3PLGA %5PVA | %71.4 | 714.4 | %19.0 |
| %4PLGA %1PVA | %89.0 | 890.6 | %28.9 |
| %4PLGA %3PVA | %85.4 | 854.7 | %24.5 |
| %4PLGA %5PVA | %68.6 | 686.8 | %23.5 |

4.2.3. İn Vitro Salım Çalışmalarına İlişkin Bulgular

İn vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.3.4'te "İn Vitro Salım Deneyleri" başlığı altında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Zamanın fonksiyonu olarak % kümülatif salım miktarının gösterildiği grafik Şekil 4.6'da verilmiştir.

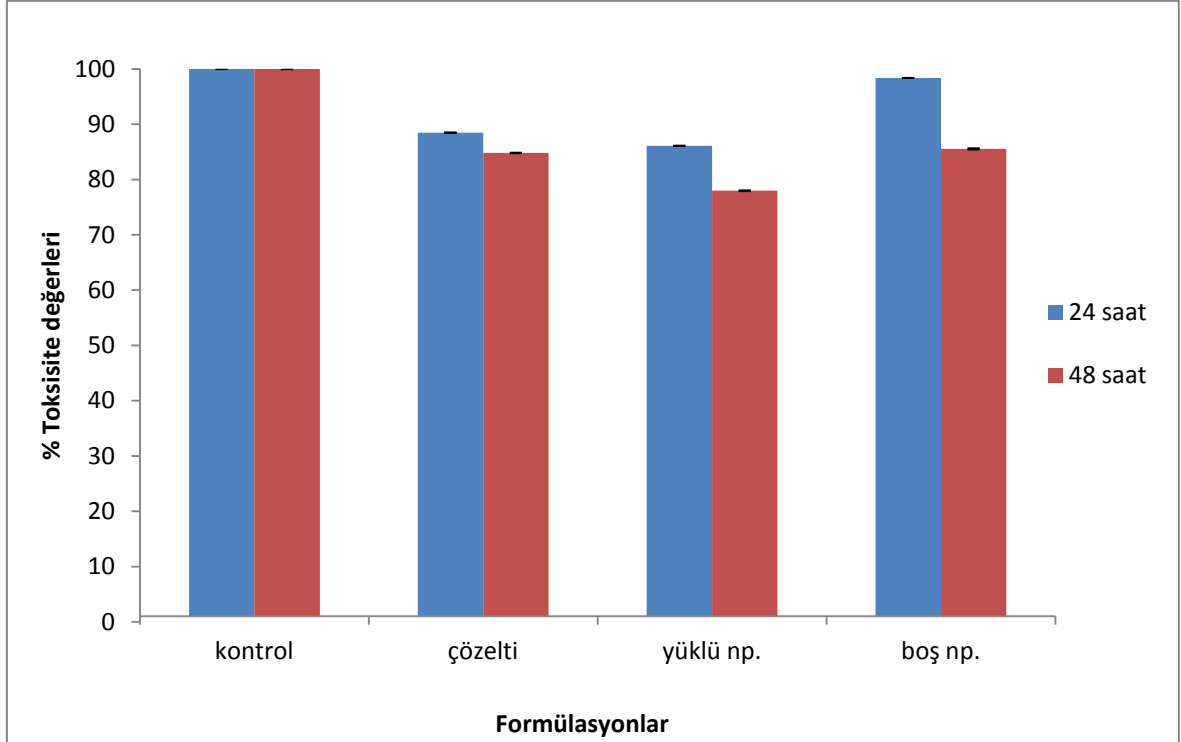


Şekil 4.6. 1mg dozda paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllerinin in vitro salım profilleri (n=3) (A) Kümülatif salım miktarı (μg), (B) % Kümülatif salım.

4.3. Sitotoksisite Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Sitotoksisite çalışmaları Bölüm 3.2.4' te "Sitotoksisite Çalışmaları" başlığı altında anlatıldığı gibi yapılmıştır. Bu kapsamda, paklitaksel çözeltisi, ilaç içermeyen ve içeren nanopartikül formülasyonları Caco-2 hücrelerine uygulanmıştır.

Paklitaksel çözeltisi, boş ve paklitaksel yüklü nanopartikül formülasyonlarının 24 saat ve 48 saat sonundaki hücre canlılığına ait bulgular Şekil 4.7'de görülmektedir.



Şekil 4.7. Paklitaksel formülasyonlarının Caco-2 hücreleri üzerinde 24 ve 48 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksisite sonuçları (n=3)

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Tartışma

5.1.1. Paklitakselin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

Tez çalışmasında, paklitakselin miktar tayininde UV dedektörlü yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) sistemi kullanılmıştır. Literatürlerde paklitakselin analitik yöntem validasyonu için kullanılan yöntemler arasından Jin ve ark. (Jin, C. ve ark., 2009) tarafından kullanılan yöntemde bazı değişiklikler yapılarak HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Paklitakselin miktar tayini bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı gibi bir yöntemle 227 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak ultra saf su : asetonitril (45:55) ve kolon olarak Nucleodur 100 C₁₈ Macherey- Nagel (5µm, 250mm x 4.6mm) kolonu kullanılmıştır.

Şekil 4.1'deki kromatogramda da görüldüğü gibi elde edilen paklitaksel pikinin alıkonma zamanı 6.7dk olarak bulunmuştur. Pik simetrisi 1.197 olarak elde edilmiş, teorik tabaka sayısı ise 21166 olarak bulunmuştur. Bu değerler Avrupa Farmakopesi'nde (Pharmacopoeia, B., 2003) belirtilen değerler aralığındadır.

Paklitakselin kalibrasyon doğrusunun elde edilmesinde, 6 farklı konsantrasyon çalışılarak yapılmıştır. Yöntem validasyonunda kalibrasyon doğrusu çizilmiş olup, konsantrasyon aralığı 1 ile 20 µg/ml arasında tutulmuştur. Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2'de regresyon analiz sonuçları verilmiştir. Validasyon parametrelerinden doğrusallık için regresyon katsayısı (r^2) 0,9999 olarak hesaplanmıştır. Bu sayının 1'e yakın olması bağıntının doğrusallığını göstermektedir.

Doğruluk çalışmasında, gün içi ve günler arası üç farklı konsantrasyonda (2, 10, 20 µg/ml) çalışılmış ve % bağıl hata değerleri hesaplanmıştır. Gün içi için bu değerler %1 ile %0.25 arasında, günler arası için % 1.3 ile 0.9 arasında değişmektedir (Çizelge 4.2). Validasyon çalışmalarında % bağıl hata değerlerinin %2'den küçük olması gerekmektedir (Shabir, G. A., 2003). Hesaplanan % bağıl hata değerlerinin %2'nin altında olması ile kullanılan analitik yöntemin deney içi ve deneyler arası doğruluğu gösterilmiştir.

Keskinlik çalışmaları üç farklı konsantrasyonda (2, 10, 20 µg/ml) çalışılıp, tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik % VK olarak hesaplanmış ve bu değerler %2'den az bulunmuştur. Tekrar elde edilebilirliğin değerlendirilmesinde, pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için varyasyon katsayısı değerleri 1.3 ile 1.98 arasındadır.

Yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir konsantrasyon 0.173337 µg/ml olup, saptama sınırı 0.057201 µg/ml olarak bulunmuştur.

Özgünlük ölçütünün değerlendirilmesi Bölüm 3.2.1.2.5.'de belirtildiği şekilde incelenmiştir. Nanopartikül formülasyonuna giren maddelerin, paklitaksel ile aynı koşullarda ve aynı alıkonma zamanında pik verip vermediği değerlendirilmiş ve sonuçta herhangi bir girişime rastlanmamıştır (şekil 4.3).

Paklitakselin analiz süresi boyunca stabilitesinin değerlendirilmesine yönelik olarak yapılan çalışma sonucunda 10 µg/ml konsantrasyondaki paklitaksel çözeltisi + 37°C 8 saat bekletilip analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda %VK değerleri %2'nin altında bulunmuştur (Çizelge 4.5). Bu şekilde paklitakselin nanopartiküllere hapsedilmesi sırasında stabilitesinin etkilenmediği gösterilmiştir.

Elde edilen değerler analizlerin tekrarlanabilir ve salım çalışmaları sırasında kullanılabilir olduğunu kanıtlamıştır.

5.1.2. Nanopartikül Formülasyon Çalışmaları

Tez çalışmasında nanopartiküllerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan, FDA'den onaylı, biyoparçalanır, sentetik bir polimer olan PLGA kullanılmıştır. PLGA nanopartikül formülasyonlarının hazırlanışı Bölüm 3.2.2.'de anlatılmıştır. Nanopartikül hazırlama ve ilaç yüklenmesi esnasında Ozturk ve ark. (Ozturk, K. ve ark., 2010) geliştirdiği yöntem kullanılmıştır. Kullanılan konsantrasyonların belirlenmesi yapılan ön çalışmalar doğrultusunda gerçekteştirilmiştir.

PLGA tipleri, ilacın salım hızı, parçalanma hızı ve yükleme etkinliği PLA ve PGA oranına göre değişiklik gösterir. Paklitakselin öncelikle patlama (burst effect)

özelliğinde salım ve devamında kontrollü bir şekilde salım profili göstermesi istenen bir durumdur. Laktik asitce zengin PLGA daha az hidrofilik özellikte olmakta, daha az su absorbe etmekte ve böylece daha yavaş parçalanmaktadır. Yani, polimerde PLA oranı arttıkça salım süresi uzamaktadır (Gopferich, A., 1997). Bu yüzden polimerin hızlıca parçalanıp, ilacın salımının hızlıca gerçekleşmesi için PLA:PGA oranı 50:50 olarak seçilmiştir.

Nanopartiküllerin partikül boyutu az oranda da olsa polimerin moleküler ağırlığından etkilenmektedir. Molekül ağırlığı azaldıkça partikül boyutu da azalmaktadır (Gopferich, A., 1997) . Ayrıca, ilacın salım hızını etkileyen polimerle ilgili diğer bir parametre de polimerin viskozitesidir. Viskozitenin düşük olması, salım profilinin hızlı olmasını sağlayacağından 0.16-0.24dl/g viskoziteye sahip "RG 502 H" seçilmiştir.

PLGA zincirinde serbest karboksil uç grupların varlığı, polimeri daha hidrofilik hale getirir. Gasper ve ark. yapmış olduğu çalışmada da (Gasper, M. M. ve ark., 1998), hidrofobik yapıda olan bütül sefaroza sabit fazından nanopartiküllerin elüsyonu gerçekleşmiştir ve bunun sonucunda PLGA zincirlerindeki serbest karboksil-uç grupların varlığı bu kopolimer daha hidrofilik özellik verdiğini göstermişlerdir. Sabit faz ile nanopartiküllerin etkileşimi hidrofobik özelliğin bir fonksiyonudur. Bu yüzden hidrofobik nanopartiküller genellikle kolonda alıkonurken, hidrofilik özellikteki nanopartiküller kolaylıkla sabit fazdan ayrılırlar.

PLGA nanopartikül hazırlama yöntemlerine bakacak olursak, emülsifikasyon-difüzyon, emülsiyon-çözücü buharlaştırma, ara yüzeylere birikme, nanoçöktürme gibi farklı birçok hazırlama yöntemi bulunmaktadır. Tez çalışmasında, PLGA nanopartikül hazırlama yöntemi olarak, Öztürk ve ark.'nın (Ozturk, K. ve ark., 2010) kullandığı ve literatürlerde PLGA nanopartiküllerin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan bir yöntem olan emülsifikasyon-çözücü difüzyon metodu kullanılmıştır.

PLGA polimeri diklorometan, etil asetat, aseton gibi organik solvanlarda çözülebilmektedir (Dinarvand, R. ve ark., 2011). Yapılan formülasyon çalışmalarında polimer hem diklorometan hem de aseton içinde çözülmüştür.

Diklorometan ile hazırlanan formülasyonların partikül boyutu ve poli dispersite indeksleri, aseton ile hazırlananlardan daha yüksek çıkmıştır.

Aseton su ile tamamen karışabilen bir çözücü olmasına karşın, diklorometan su ile karışmayan bir çözücüdür. Formülasyona su eklenmesi dengeyi destabilizasyonuna yol açar. Bu durum, organik çözücünün dış faza difüze olmasını sağlar. Çözücülerin geçişi süresince PLGA nanopartiküller oluşur ve boyutları organik fazdaki çözücülerin tipine bağlıdır. Songa ve ark. (Songa, K. C. ve ark., 2006) PLGA nanopartiküllerinin hazırlanmasında çeşitli organik çözümlerin etkisini incelemişlerdir. Asetonun PLGA için iyi bir çözücü olduğunu ve su ile tamamen karışabildiğini, buna karşın, diklorometanın su ile karışmadığını ve PLGA için mükemmel bir çözücü olduğunu söylemişlerdir. Yapmış oldukları çalışmada, su ile karışabilen çözümler (etil asetat) kullanarak 70 nm civarında partikül boyutu elde etmelerine karşın, su ile hiç karışmayan diklorometanı çözücü olarak kullandıklarında partikül boyutunu 290 nm bulmuşlardır. Sonuç olarak, organik çözücünün tipi, partikül boyutu üzerinde önemli etkiye sahiptir. Organik fazda çözücü olarak diklorometan kullanıldığında, neredeyse tüm formülasyonlarda belirgin şekilde agregasyon olduğu görülmüştür. Çünkü diklorometan su ile karışmamaktadır ve dispersiyon ajanı olarak kullanılan DMAB (didesil dimetil amonyum bromür) emülsiyon damlacıklarındaki agregasyonu tamamen engelleyememiştir ve 390 nm gibi büyük partikül boyutuna sahip nanopartiküller elde edilmiştir. Buna karşın, aseton ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutu 250-400 nm arasında bulunmuştur.

Aseton sulu faza hızlıca difüze olup, polimerin çökmesine ve nanopartikül oluşmasına yol açar. Bu yüzden aseton ile hazırlanan nanopartiküller, diklorometan ile hazırlanan nanopartiküllere göre polimer konsantrasyonundan ve homojenizasyon parametrelerinden daha az duyarlılık gösterir. Birnbaum ve ark. (Birnbaum, D. T. ve ark., 2000a) yapmış olduğu çalışmada, PLGA nanopartikülleri için aseton ve diklorometanın nanopartikül karakterizasyonuna etkisi benzer sonuçlar doğurmuştur (Vandervoort, J. ve Ludwig, A., 2002) .

Bu yüzden tez çalışmasında paklitaksel yüklü nanopartikül formülasyonlarında organik çözücü olarak aseton kullanılmıştır.

PVA emülsiyonların stabilitesini sağlayarak, küçük partiküllerin boyutları ve tekdüze boyut dağılımını sağlayan, nanopartikül hazırlamada da sıklıkla kullanılan emülsifiye edici bir ajandır. Sahoo ve ark.(Sahoo, K. S. ve ark., 2002) yapmış olduğu çalışmada çeşitli stabilizörler kullanmışlardır. Bu çalışmada, noniyonik stabilizör (PVA ve Pluronik F68) kullanarak, nanopartikülleri sterik engel ile stabilize edilirken, iyonik stabilizör (DMAB) ile partiküller elektrostatik itme ile stabilize edilirler. PVA molekülleri damlacık yüzeyine adsorbe olarak damlacıkların birbirine yapışmasını engellemekte ve bu şekilde emülsiyon stabilitesini artırmaktadır (Ozturk, K. ve ark., 2010). Tez çalışmasında stabilize edici ajan olarak PVA kullanılmıştır.

5.1.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

5.1.3.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

5.1.3.1.1. Boş PLGA Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Tez çalışması kapsamında hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyellerinin ölçümüne ait bilgiler Bölüm 3.2.2.1'de ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Ölçümler sonucunda elde edilen bulgular Bölüm 4.2.1.1'de verilmiştir ve bu değerler Çizelge 4.6 ve 4.7'de özetlenmiştir. Paklitaksel içermeyen nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyel dağılımlarına ait grafikler Şekil 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.

PLGA nanopartiküllerinin partikül boyut dağılımları incelendiğinde diklorometan ile hazırlanan nanopartiküllerin poli dispersite indeksleri 0.22 ile 0.35 arasında bulunmuştur. Buna karşın, aseton ile hazırlanan boş nanopartiküllerin poli dispersite indeksleri 0.02 ile 0.07 arasında bulunmuş ve dağılım grafiklerinden monodispers bir sistem oldukları görülmektedir.

Diklorometan ile hazırlanan nanopartiküllerin yüksek hızlı homojenizatörde karıştırma hızı 16000devir/dk iken, aseton ile hazırlanan nanopartiküllerin karıştırma hızı 11000devir/dk'dır. Çünkü, diklorometan ile hazırlanan nanopartikülleri 11000devir/dk'da yüksek hızlı homojenizatörde karıştırdığımızda ortalama 1112 nm boyutunda partiküller elde edilmiştir. Yüksek hızlı

homojenizatörde karıştırma hızının artması, partikül boyutunu belirgin boyutta düşürmüştür. Diklorometan ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının 16000devir/dk karıştırma hızındaki partikül boyutu 140-230 nm arasında bulunurken, aseton ile 11000devir/dk karıştırma hızında hazırlanan nanopartiküller daha düşük partikül boyutunda bulunmuştur (91-111 nm). Bunun nedeni, asetonun su ile karışabilen bir organik solvan olması, emülsifikasyon sırasında su fazına hızlı bir şekilde difüze olması, polimerin çökmesini sağlayarak nanopartikül oluşumunu hızlandırması ve oluşan partiküllerin agregasyonu minimuma indirmesidir.

Aseton ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlar incelendiğinde, %3 (a/h) PVA konsantrasyonundaki nanopartiküllerin partikül boyutu (111 ± 2 nm), %5 (a/h) PVA içeren formülasyonun partikül boyutundan (104 ± 1.7 nm) daha yüksek bulunmuştur. Sulu fazdaki PVA konsantrasyonu arttıkça daha küçük partikül boyutu ve daha dar partikül boyut dağılımına yol açmıştır. Çünkü, sulu fazdaki PVA agregasyona karşı, su damlalarının stabilizasyonunu sağlayarak, tekdüze partikül elde edilmesini sağlamıştır (Ozturk, K. ve ark., 2010). %1 (a/h) PVA konsantrasyonundaki nanopartikül formülasyonun partikül boyutunun en yüksek olması beklenirken, en düşük partikül boyutu (91 ± 0.9 nm) elde edilmiştir. Bunun sebebinin de %1 konsantrasyondaki PVA'nın nanopartikül oluşumu için yeterli olmadığı düşünülmektedir. Diklorometan ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarında da %1 (a/h) PVA içeren formülasyonun partikül boyutu (140 ± 5 nm), %3 ve %5 (a/h) PVA içeren formülasyonlardan daha düşüktür. %5 (a/h) PVA içeren formülasyonun partikül boyutu (173 ± 7 nm), %3 (a/h) PVA içeren formülasyona (230 ± 6 nm) kıyasla daha düşük değerdedir. Hazırlanan boş nanopartiküllerin partikül boyutları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (tek yönlü anova testi $p < 0.05$).

Partiküller 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 (Zambaux, M. F. ve ark., 1998) ve PVA'nın sahip olduğu negatif yükten dolayı negatif değerde olup -12.7 mV ile -19.2 mV arasında değişmektedir. Diklorometan ve aseton ile hazırlanan formülasyonlar incelendiğinde, %3 PVA içeren formülasyonun zeta potansiyeli (diklorometanda -17.3 ± 0.7 mV, asetonda -18.2 ± 0.2 mV) %5 PVA içeren formülasyonun zeta potansiyelinden (diklorometanda -19.0 ± 0.7 mV, asetonda -19.2 ± 0.7 mV) daha yüksektir. %1 PVA konsantrasyonu ile hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri (diklorometanda -12.7 ± 1.4 mV, asetonda -14.1 ± 2 mV) en yüksek değerde bulunmuştur. PVA oranının artması, zeta potansiyeli negatif yönde artırmıştır. Zeta potansiyelinin yüksek değerde olması partiküller arasında etkileşimin az olduğunu gösterir. Partiküller arasındaki etkileşimin az olması da formülasyonun stabil olduğunun göstergesidir.

Aseton ile hazırlanan boş nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutunun daha düşük olması, poli dispersite indekslerinin sıfıra daha yakın olması, agregasyon göstermemeleri ve diklorometana göre daha az toksik bir solvan olmasından dolayı, paklitaksel yüklü nanopartikül formülasyonları da aseton ile hazırlanmıştır.

5.1.3.1.2. Paklitaksel Yüklü PLGA Nanopartiküllerin Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Tez çalışması kapsamında hazırlanan paklitaksel yüklü nanopartiküllerin partikül boyutu ve zeta potansiyellerinin ölçümüne ait bilgiler Bölüm 3.2.2.2'de ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Ölçümler sonucunda elde edilen bulgular Bölüm 4.2.1.2'de verilmiştir ve bu değerler Çizelge 4.8'de özetlenmiştir.

Tez çalışmasında formülasyonlar, farklı PVA ve PLGA konsantrasyonları ile hazırlanmıştır. Dış sulu fazdaki PVA konsantrasyonları değiştirilmiş ve sırasıyla %1, %3 ve %5 (a/h) konsantrasyonlarında çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca PLGA konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla %2, %3 ve %4 (a/h) konsantrasyonlarında PLGA çalışılmıştır.

Paklitaksel yüklü nanopartikül formülasyonlarının partikül boyutları ve poli dispersite indeks değerleri, boş nanopartikül formülasyonlarına kıyasla daha

yüksek bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Çünkü, nanopartikül içine hapsolan ya da yüzeyine adsorbe olan ilaç, partikül boyutunun artmasına yol açmıştır. Karataş ve ark.'nın elde ettiği bulgular da aynı yöndedir (Karatas, H. ve ark.,2009).

PVA miktarındaki artış, partikül boyut dağılımını daraltır. Bu olgu, bir emülgatörün stabilize edici özelliğinden kaynaklanır. Yetersiz miktardaki emülsifiye edici ajan, tüm nanopartiküllerin stabilizasyonunu sağlayamaz ve bu yüzden agregasyonlar oluşabilir. Sonuç olarak da daha büyük partikül boyutları elde edilir.

Emülsiyon-çözücü buharlaştırma yönteminde, globüllerinin emülsifikasyonu ve stabilitesi çok önemli faktörlerdir. Dispersiyon ajanının miktarı, emülsiyon işleminde ve damlacıkların korunmasında önemli rol oynar. Çünkü dispersiyon ajanları, partiküllerin agregasyonunu önlemektedir (Murakami, H. ve ark., 1999, Kwon, H. Y. ve ark., 2001, Mainardes, R. M. ve Evangelista, R. C., 2005).

Elde edilen tüm formülasyonların poli dispersite indeksleri 0,2'den küçük bulunmuştur. Bu da formülasyonların tekdüze dağılım gösterdiğini bize açıklamaktadır.

Hazırlanan PLGA nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklükleri,%2 PLGA %1 PVA formülasyonu için 219.7 ± 8.2 nm , %2 PLGA %3 PVA formülasyonu için 186.9 ± 2.6 nm, %2 PLGA %5 PVA formülasyonu için 197.8 ± 3.8 nm, %3 PLGA %1 PVA formülasyonu için 195.1 ± 10 nm , %3 PLGA %3 PVA formülasyonu için 235.4 ± 6.8 nm, %3 PLGA %5 PVA formülasyonu için 223.7 ± 5.4 nm, %4 PLGA %1 PVA formülasyonu için 214.1 ± 4.3 nm , %4 PLGA %3 PVA formülasyonu için 234.9 ± 5 nm, % 4 PLGA %5 PVA formülasyonu için 239 ± 7.4 nm bulunmuştur.

%2 PLGA içeren formülasyonları, %3 ve %4 PLGA içeren formülasyonlarla kıyaslanacak olursa, en düşük partikül boyutu %2 PLGA içeren formülasyonlarda elde edilirken, en yüksek partikül boyutu %4 PLGA içeren formülasyonlarda sağlanmıştır. %3 ve %5 PVA oranlarındaki formülasyonları incelendiğinde, %5 PVA içeren formülasyonların partikül boyutu, %3 PVA içeren formülasyonlardan daha küçüktür. %2 PLGA %3 PVA formülasyonunun partikül boyutu, %2 PLGA %5 PVA formülasyonunun partikül boyutundan daha büyüktür ($p > 0.05$). %3 PLGA

%3 PVA formülasyonunun partikül boyutu, %3 PLGA %5 PVA formülasyonunun partikül boyutundan daha büyüktür ($p < 0.05$). %4 PLGA %3 PVA formülasyonunun partikül boyutu, %4 PLGA %5 PVA formülasyonunun partikül boyutundan daha büyüktür. Fakat bu büyüklük, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Bu çalışma ile PVA konsantrasyonundaki artışın nanopartikül boyutunda azalmaya, aynı zamanda PLGA oranındaki artış partikül boyutunu artırmaya neden olduğu saptanmış olup, elde edilen bulgular literatürle uyumludur (Ozturk, K. ve ark., 2010, Gopferich, A., 1997). PVA konsantrasyonunun artması ile daha stabil emülsiyon oluşmakta ve bunun sonucu olarak daha küçük partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküller elde edilmektedir. Literatürlerde PVA konsantrasyonunun bu etkisinin ara yüzeydeki PVA viskozitesi, yüzey gerilimi üzerindeki azaltıcı etkisi ve üç boyutlu yapısından dolayı olduğu düşünülmektedir. İç fazdaki polimer konsantrasyonu önemli bir diğer faktördür. Çünkü polimer konsantrasyonu arttıkça, partikül boyutu da artmaktadır. Bunun sebebi ise, iç fazın (polimer çözeltisinin) viskozitesinin artışından dolayı, PLGA çözeltisinin dispersiyon ortamında dağıtılması zorlaşır ve bu yüzden de partikül boyutunun artmasına neden olmaktadır (Quintanar-Guerrero, D., 1996, Mainardes, R. M. ve Evangelista, R. C., 2005). Emülsifikasyon sırasında, koparma kuvvetlerine karşı yüksek viskoz direnç oluşur. Yüksek polimer konsantrasyonunda, büyük boyutlarda emülsiyonlar oluşur. Bu da difüzyon boyunca partiküllerin daha büyük boyutlarda oluşmasına yol açabilir (Mainardes, R. M. ve Evangelista, R. C., 2005). %1 PVA içeren formülasyonlar en düşük partikül boyutuna sahiptir. Bunun sebebi ise, boş PLGA formülasyonlarında olduğu gibi PVA'nın nanopartikül oluşumu için yeterli olmamasından kaynaklanması olabilir.

Paklitaksel yüklü nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri -13.9 ± 1.4 mV ile -21.9 ± 0.4 mV arasında değişmektedir. Boş PLGA nanopartiküllerin zeta potansiyeli (-17.7 ± 0.4 mV) ile ilaç yüklü %2 PLGA %3 PVA formülasyonu (-21.9 ± 0.4 mV) kıyaslandığında, zeta potansiyelinde negatif değerde bir artış gözlenmektedir. Bunun sebebi ise paklitakselin negatif değerde yüke sahip olması, paklitaksel yüklü nanopartikül formülasyonunda zeta potansiyel değerinde negatif yönde bir artışa yol açmıştır. Bu sonuçta paklitaksel yüklü nanopartikül

formülasyonlarının bir araya gelme eğilimlerini daha aza indirgemiş olmaktadır. Nanopartiküllerin partikül boyutları gibi PVA konsantrasyonu arttıkça, zeta potansiyel değerleri de negatif yönde artmaktadır. %4 PLGA %3 PVA içeren formülasyonun zeta potansiyel değeri -15.0 ± 0.3 mV iken, %4 PLGA %5 PVA içeren formülasyonun zeta potansiyel değeri -16.6 ± 0.5 mV bulunmuştur.

5.1.3.2. Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi

Bölüm 3.2.3.3'te "*Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi*" başlığı altında anlatıldığı gibi PLGA nanopartiküllerine yüklenen paklitaksel miktarı tayin edilmiştir. Bölüm 4.2.2'de "*Enkapsülasyonun Değerlendirilmesine İlişkin Bulgular*" başlığı altında da yükleme etkinlikleri verilmiştir. Çizelge 4.9'da % yükleme etkinlikleri, yüklenen miktar ve % yükleme kapasiteleri özetlenmiştir.

İdeal olarak başarılı bir nanopartiküler sistem, yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olmalıdır. İlaç yükleme miktarı ve etkinliği matris materyalinde ilacın çözünürlüğüne ya da polimer bileşimi ile ilişkili polimerin özelliklerine (molekül ağırlığı, ilaç-polimer etkileşimi ve polimer fonksiyonel uç grubun çeşidine (ester-karboksil)) bağlıdır (Mohanraj, V. J. ve Chen, Y., 2006).

PLGA nanopartiküllerinin yükleme etkinliği ve yükleme kapasitesi değerlendirildiğinde, PLGA konsantrasyonu arttıkça yükleme etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. Formülasyonlardaki PVA oranı arttıkça, yükleme etkinliğinde azalma gözlenmiştir. Bunun sebebi, PLGA konsantrasyonunun artması ve PVA konsantrasyonunun azalması partikül boyutunu artırmış, böylece yüklenen ilaç miktarı artmıştır. Tüm formülasyonlar arasında en yüksek yükleme etkinliğine sahip olan formülasyon %4 PLGA %1 PVA konsantrasyonlarını içeren formülasyon iken, en düşük yükleme etkinliğine sahip formülasyon %2 PLGA %3 PVA içeren formülasyondur. PLGA konsantrasyonu arttıkça, yükleme kapasitesinin azaldığı gözlenmiştir.

5.1.3.3. İn Vitro Salım Çalışmaları

İn vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.3.4'de "*İn Vitro Salım Deneyleri*" başlığı altında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Zamanın fonksiyonu olarak kümülatif salım ve % kümülatif salım miktarlarının gösterildiği grafik Şekil 4.6'da verilmiştir. Paklitakselin suda düşük çözünürlüğünden dolayı, paklitakselin çözünürlüğünü arttırmak amacı ile salım ortamına %0,5 SLS eklenmiştir (Chawla, J. S. ve Amiji, M. M., 2002).

Salım profilleri incelendiğinde, tüm formülasyonlarda ilaç salımının başlangıçta patlama etkisi gösterdiği görülmektedir. Bunun nanopartiküllerin yüzeyine yakın ya da yüzeye adsorbe olmuş ilaca bağlı olarak gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Patlama salımını, daha yavaş salım profili takip etmektedir.

Farklı PLGA konsantrasyonları içeren formülasyonların Şekil 4.6'daki % salım profillerine bakacak olursak, PLGA konsantrasyonundaki artış salım hızının artmasına yol açmıştır. Buna karşın PVA konsantrasyonundaki azalma, salım hızını artırmaktadır. Çünkü PLGA konsantrasyonunun artışı ve PVA konsantrasyonunun azalması partikül boyutunu artırmaktadır.

İlaç salımı partikül boyutundan etkilenir. Küçük partikül boyutuna sahip nanopartiküller, büyük yüzey alanına sahiptirler. Bu yüzden partikül yüzeyindeki ya da yüzeyine yakın bulunan ilaç hızlıca salınır. Buna karşın, partikül içinde enkapsüle olmuş ilaç yavaşça difüze olmaktadır. Çok küçük partikül boyutuna sahip nanopartiküllerin, saklama süresince agregasyon oluşturma riski vardır. Küçük boyutlarda ve maksimum stabiliteye sahip nanopartikülleri formüle etmek her zaman bir sorun oluşturmaktadır. Polimer parçalanması partikül boyutundan etkilenir. Partikül boyutu arttıkça, PLGA polimer parçalanması artmaktadır (Budhian, A. ve ark., 2005). Küçük partiküllerde, PLGA parçalanma ürünleri partiküllerden kolaylıkla difüze olurken, büyük partiküllerde parçalanma ürünleri uzun süreler boyunca polimer matriksinde kalmakta ve polimer maddesinin otokatalitik parçalanmasına yol açmaktadır. Bu yüzden, büyük partiküller polimerin hızlı parçalanmaya uğramasını ve dolayısıyla da salım hızının artmasını sağlamaktadır (Mohanraj, V. J. ve Chen, Y., 2006). Salım hızı PLGA uç grubu ile

PLGA kopolimer bileşimlerinden yüksek oranda etkilenmektedir (Budhian, A. ve ark., 2005). Başlangıçta hızlı "burst" (patlama) salım, yüzeye zayıf bir şekilde bağlı bulunan ilacın salımıdır ve yüzey alanı ne kadar büyükse salım o kadar fazla olur.

5.1.4. Sitotoksosite Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında hazırlanan paklitaksel yüklü nanopartiküllerin sitotoksosite çalışmalarına ilişkin bilgiler Bölüm 3.2.4'de ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Ölçümler sonucunda elde edilen bulgular Bölüm 4.3'de verilmiştir ve bu değerler Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre paklitaksel yüklü PLGA nanopartikül formülasyonu kontrol grubuna göre toksik bulunmuştur. PLGA çözeltisinin Caco-2 hücreleri üzerinde oluşturduğu toksisite ile paklitaksel yüklü PLGA nanopartiküllerinin oluşturduğu toksisite birbirine yakın olup, boş formülasyon ve kontrol grubuna göre daha toksik etki oluşturmaya meyillidir. Ancak bu toksisite değerleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0.05$). 24 saat ve 48. saatteki toksisite incelendiğinde, zaman geçtikçe dolu formülasyonun toksik etkisinin arttığı görülmektedir. 48. saat sonunda boş formülasyonun, paklitaksel çözeltisine yakın toksik etki göstermesinin sebebi, formülasyonun hazırlanması sırasında kullanılan organik solvandan kaynaklı olabilir. Sonuçta hazırlanmış olan nanopartikül formülasyonun ilaç çözeltisine göre hücre canlılığını azaltma eğilimi göstermesi, oluşturulan formülasyonun toksik etki oluşturduğunun göstergesidir. Formülasyonun toksisite özelliklerinin daha iyi anlaşılması için daha yüksek dozlarda uygulama yapılabilir.

5.2. Sonuç

Bu tez çalışması kapsamında, kanser tedavisi amacı ile paklitaksel yüklü PLGA nanopartikül formülasyonları geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir.

Emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi, yüklü biyoparçalanabilir PLGA taşıyıcıları hazırlanmasını sağlamaktadır.

Sulu fazdaki PVA oranı arttıkça, organik fazdaki PLGA konsantrasyonu arttıkça ve homojenizasyon hızı arttıkça partikül boyutu azalmaktadır. PLGA ve PVA'nın negatif zeta potansiyel yükü olduğu bilindiğinden, PLGA ve PVA oranının artması nanopartiküllerin zeta potansiyelinin azalmasına yol açmaktadır (Vandervoort, J. ve Ludwig, A., 2002) .

Nanopartiküllerin partikül boyutu, 190.9 nm ile 235.4 nm arasında değişirken, çözücünün su ile karışabilirliğine ve organik fazdaki polimer konsantrasyonundan yüksek oranda etkilenmektedir. Elde edilen tüm formülasyonların poli dispersite indeksleri 0,2'den küçük bulunmuş olup, formülasyonlar tekdüze dağılım göstermektedir.

Partikül boyutunun kontrolünde, emülsifikasyon süreci ve emülsiyon damlacıklarının stabilitesi önemli rol oynar. Partikül boyutu ve şekli üzerinde homojenlik önemli karakteristik özelliklerdir.

Stabilizör ve polimer konsantrasyonu, sonikasyon süresi, organik çözücünün sulu faza difüze oranı, dış faz ile iç fazın oranı PLGA nanopartiküllerinin oluşmasında önemli faktörlerdir (Mainardes, R. M. ve Evangelista, R. C., 2005).

Nanopartikül formülasyonlarına paklitaksel yükleme oranları yüksek değerlerde elde edilmiştir.

Paklitakselin ilaç salımı, önce bir hızlı (patlama) salım, daha sonra bunu takip eden kontrollü salıma bırakmıştır.

Sitotoksisite çalışmaları sonucunda, paklitaksel yüklü nanopartikül formülasyonlarının Caco-2 hücreleri üzerindeki canlılık etkisi, paklitaksel çözeltisine yakın bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Aarons, L., Toon, S., Rowland, M., 1987, Validation of assay methodology used in pharmacokinetic studies, *Journal of Pharmacological Methods*, 17 (4), 337-346.
- Adams, J. D., Flora, K., Goldspiel, B. R., Wilson, J. W., Finley, R., 1993, Taxol: a history of pharmaceutical development and current pharmaceutical concerns, *Journal National Cancer Institute Monographs*, 15, 141-147.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002, *Molecular Biology of the Cell*, (4th edition bs.), New York: Garland Science.
- Allard, E., Passirani, C., Benoit, J. P., 2009, Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors, *Biomaterials*, 30 (12), 2302-2318.
- Arellano, M., Moreno, S., 1997, Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29 (4), 559-573.
- Bayındır, Z. S., Yuksel, N., 2009, Characterization of niosomes prepared with various nonionic surfactants for paclitaxel oral delivery, *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 99 (4), 2049-2060.
- Bell, S., Dutta, A., 2002, DNA replication eukaryotic cells, *Annual Review of Biochemistry*, (71), 333-374.
- Berridge, M.V., Tan, S., McCoy, K.D., Wang R., 1996, The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts, *Biochemica*, 4, 14-19.
- Birnbaum, D. T., Kosmala, J. D., Brannon-Peppas, L., 2000a, Optimization of preparation techniques for poly(lactic acid-co-glycolic acid) nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research* 2, 173-181.
- Brewer, E., Coleman, J., Lowman, A., 2010, Emerging Technologies of Polymeric Nanoparticles in Cancer Drug Delivery, *Journal of Nanomaterials*, 2011.
- Brusa, P., Dosio, F., Coppo, S., Pacchioni, D., Arpicco, S., Crosasso, P., 1997, In vitro and in vivo antitumor activity of immunoconjugates prepared by linking 5-fluorouridine to antiadenocarcinoma monoclonal antibody, *Farmaco*, 52 (2), 71-81.
- Budhian, A., Winey, K. I., Siegel, S. J., 2005, Production of haloperidol loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol, *Journal of Microencapsulation*, 22 (7), 773-785.

- Byrappa, K., Ohara, S., Adschiri, T., 2008, Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology - towards biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (3), 299-327.
- Byrne, J. D., Betancourt, T., Brannon-Peppas, L., 2008, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (15), 1615-1626.
- Calvo, P., Remuñan-López, C., Vila-Jato, J. L., Alonso, M. J., 1997, Chitosan and chitosan/ ethylene oxide–propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines, *Pharmaceutical Research*, (14), 1431–1436.
- Chakravarthi, S. S., De, S., Miller, D. W., Robinson, D. H., 2010, Comparison of anti-tumor efficacy of paclitaxel delivered in nano- and microparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 383 (1-2), 37-44.
- Chakravarthi, S. S., Robinson, D. H., 2011, Enhanced cellular association of paclitaxel delivered in chitosan-PLGA particles, *International Journal of Pharmaceutics*, 111-120.
- Chawla, J. S., Amiji, M. M., 2002, Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor targeted delivery of tamoxifen, *International Journal of Pharmaceutics*, 249, 127-138.
- Chen, Y., McCulloch, R.K., Gray, B.N., 1994, Synthesis of albumin-dextran sulfate microspheres possessing favourable loading and release characteristics for the anticancer drug doxorubicin, *Journal of Controlled Release*, (31), 49–54.
- Chen, Y., Mohanraj, V. J., Parkin, J. E., 2003, Chitosan-dextran sulfate nanoparticles for delivery of an antiangiogenesis peptide, *The International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, (10), 621–629.
- Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P., Vauthier, C., 2002, Nanocapsule technology: a review, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19 (2), 99-134.
- Couvreur, P., Kante, B., Roland, M., Guiot, P., Bauduin, P., Speiser, P., 1979, Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 31 (5), 331-332.
- Couvreur, P., Vauthier, C., 2006, Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease, *Pharmaceutical Research*, 23 (7), 1417-1450.
- Cragg, G. M., 1998, Paclitaxel (Taxol®): A Success Story With Valuable Lessons for Natural Product Drug Discovery and Development, *Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment, Diagnosis and Centers, National Cancer Institute*, 18 (5), 315-331.

- Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jerome, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O., Preat, V., 2009, Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation, *Journal of Controlled Release*, 133 (1), 11-17.
- Davies, J. C., 2006, *Managing the Effects of Nanotechnology*, Project on Emerging Nanotechnologies, 1-31.
- De Jaeghere, F., Allemann, E., Leroux, J. C., Stevels, W., Feijen, J., Doelker, E., Gurny, R., 1999, Formulation and lyoprotection of poly(lactic acid-co-ethylene oxide) nanoparticles: influence on physical stability and in vitro cell uptake, *Pharmaceutical Research*, 16 (6), 859-866.
- Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H., Atyabi, F., 2011, Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 877-895.
- Erkoç, Ş., 2008, *Nanobilim ve Nanoteknoloji*, 2007, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş., 1-16.
- Ertaş, Ö. S., Kayalı, A., 2005, Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış 'An Overview On Analytical Method Validation', *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 34 (1), 41-57.
- European Pharmacopoeia, 2008, *Chromatographic separation techniques*, 1, 72-76.
- Fan, Y. F., Wang, Y. N., Fan, Y. G., Ma, J. B., 2006, Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption, *International Journal of Pharmaceutics*, (324), 158–167.
- Feng, S., Chien, S., 2003, Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases, *Chemical Engineering Science*, (58), 4087 – 4114.
- Feng, S., Huang, G., 2001, Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers, *Journal of Controlled Release*, 71 (1), 53-69.
- Feng, S. S., 2004, Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy, *Expert Review of Medical Devices*, 1 (1), 115-125.
- Ferrari, M., 2005, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nature Reviews Cancer*, 5 (3), 161-171.
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N., Benita, S., 1989, Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement, *International Journal of Pharmaceutics*, 55 (1), R1-R4.

- Fresta, M., Puglisi, G., Giammona, G., Cavallaro, G., Micali, N., Furneri, P. M., 1995, Pefloxacin mesilate- and ofloxacin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: characterization of the colloidal drug carrier formulation, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84 (7), 895-902.
- Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S., Couvreur, P., 2005, Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: a way to deliver drugs to the brain?, *International Journal of Pharmaceutics*, 298 (2), 274-292.
- Gasper, M. M., Blanco, D., Cruz, M. E., Alonso, M. J., 1998, Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release, *Journal of Controlled Release*, 52 (1-2), 53-62.
- Gibb, R. K., Taylor, D. D., Wan, T., O'Connor, D. M., Doering, D. L., Gercel Taylor, C., 1997, Apoptosis as a measure of chemosensitivity to cisplatin and taxol therapy in ovarian cancer cell lines, *Gynecologic Oncology*, 65 (1), 13-22.
- Goldburg, W. I., 1999, Dynamic light scattering, *American Journal of Physics*, 67 (12), 1152-1160.
- Gopferich, A., 1997, Erosion of composite polymer matrices, *Biomaterials*, 18 (5), 397-403.
- Gursoy, N., Garrigue, J. S., Razafindratsita, A., Lambert, G., Benita, S., 2003, Excipient effects on in vitro cytotoxicity of a novel paclitaxel self-emulsifying drug delivery system, *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 92 (12), 2411-2418.
- Guterres, S. S., Beck, R. C. R., Pohlmann, A. R., 2009, Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview, *Brazilian Journal of Physics*, 39 (1A), 205-209.
- Haley, B., Frenkel, E., 2008, Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment, *Urologic Oncology*, 26 (1), 57-64.
- Hans, M. L., Lowman, A. M., 2002, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, (6), 319-327.
- Houchin, M. L., Topp, E. M., 2008, Chemical degradation of peptides and proteins in PLGA: a review of reactions and mechanisms, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 (7), 2395-2404.
- <http://globocan.iarc.fr> , 2008, Most frequent cancers, Ağ
- <http://www.britannica.com/blogs/2010/12/nanotechnology-the-science-of-miniaturization-picture-essay-of-the-day/>, Ağ
- <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01229>, Ağ

<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/AC/06/slides/2006-4235S2-01-01-AbraxisBioscienc.ppt>, Ağ

<http://www.medhelp.org/tags/show/120983/Abraxane> , Ağ

<http://www.who.int/>. 2011.Cancer, Ağ

Huang, H. H., He, C. L., Wang, H. S., Mo, X. M., 2009, Preparation of core-shell biodegradable microfibers for long-term drug delivery, *Journal of Biomedical Materials Research A*, 90 (4), 1243-1251.

Huh, K. M., Cho, Y. W., K., P., 2003, PLGA-PEG Block Copolymers for Drug Formulations, *Drug Delivery Technology*, 3.

Jackson, J. K., Hung, T., Letchford, K., Burt, H. M., 2007, The characterization of paclitaxel-loaded microspheres manufactured from blends of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and low molecular weight diblock copolymers, *International Journal of Pharmaceutics*, 342 (1-2), 6-17.

Jain, N. K., 2007, *Pharmaceutical Nanotechnology*, National Science Digital Library, 1-19.

Jennewein, S., Croteau, R., 2001, Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57 (1-2), 13-19.

Jin, C., Bai, L., Wu, H., Song, W., Guo, G., Dou, K., 2009, Cytotoxicity of paclitaxel incorporated in PLGA nanoparticles on hypoxic human tumor cells, *Pharmaceutical Research*, 26 (7), 1776-1784.

Kang, F., Singh, J., 2001, Effect of additives on the release of a model protein from PLGA microspheres, *AAPS PharmSciTech*, 2 (4), 30.

Kaparrissides, C., Alexandridou, S., Kotti, K., Chaitidou, S., 2006, Recent Advances in Novel Drug Delivery Systems, *Journal of Nanotechnology Online*, 2, 1-11.

Karatas, H., Aktas, Y., Gursoy-Ozdemir, Y., Bodur, E., Yemisci, M., Caban, S., Vural, A., Pinarbasli, O., Capan, Y., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Riguera, R., Andrieux, K., Couvreur, P., Dalkara, T., 2009, A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood-brain barrier and provides neuroprotection, *Journal of Neuroscience*, 29 (44), 13761-9.

Kaş, H. S., 2002. İlaç taşıyıcı partiküler sistemler 'Kontrollü Salım Sistemleri', İstanbul: Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti., 65-102.

Kaufman, R.J., Richard, T.J., Fuhrhop, R.W., 1997, Stable O/W emulsion incorporating a taxine (taxol) and method of making same, USA Patent 5,616,330.

- Kaur, I. P., Bhandari, R., Bhandari, S.,Kakkar, V., 2008, Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting, *Journal of Controlled Release*, 127 (2), 97-109.
- Klug, W. S., Cummings, M. R./ Editör: Öner, C., 2002, *Genetik Kavramlar*, Palme Yayınevi.
- Knowles, M. A., Selby, P., 2005, *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, Oxford University Press, Oxford.
- Konan, Y. N., Gurny, R., Allemann, E., 2002, Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 233 (1-2), 239-252.
- Kumar, R., 2000, Nano and Microparticles as Controlled Release Drug Delvices, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3 (2), 234-258.
- Kumari, A., Yadav, S. K.,Yadav, S. C., 2010, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75 (1), 1-18.
- Kwon, H. Y., Lee, J. Y., Choi, S. W., Jang, Y.,K., 2001, Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 182, 123-130.
- Lacroix, M., 2008, Persistent use of “false” cell lines, *International Journal of Cancer*, 122 (1), 1-4.
- Lemoine, D., Preat, V., 1998, Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins, *Journal of Controlled Release*, (54), 15–27.
- Limayem, I., Charcosset, C., Sfar, S., Fessi, H., 2006, Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use, *International Journal of Pharmaceutics*, (325), 124-131.
- Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A.,Hutchins, G. M., 2009, Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination, *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133 (9), 1463-1467.
- Magenheim, B., Levy, M.Y., Benita, S., 1993, A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers — ultrafiltration technique at low pressure, *International Journal of Pharmaceutics*, (94), 115–123.
- Mainardes, R. M., Evangelista, R. C., 2005, PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution, *International Journal of Pharmaceutics*, 290 (1-2), 137-144.

- Miele, E., Spinelli, G. P., Tomao, F., Tomao, S., 2009, Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer, *International Journal of Nanomedicine*, 4, 99-105.
- Miwa, A., Ishibe, A., Nakano, M., Yamahira, T., Itai, S., Jinno, S., Kawahara, H., 1998, Development of novel chitosan derivatives as micellar carriers of taxol, *Pharmaceutical Research*, 15, 1844–1850.
- Mohanraj, V. J., Chen, Y., 2006, Nanoparticles – A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (1), 561-573.
- Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H., Kawashima, Y., 1999, Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method, *International Journal of Pharmaceutics*, 187 (2), 143-152.
- Musyanovych, A., Schmitz-Wienke, J., Mailander, V., Walther, P., Landfester, K., 2008, Preparation of Biodegradable Polymer Nanoparticles by Miniemulsion Technique and Their Cell Interactions, *Macromolecular Bioscience* (8), 127-139.
- National Cancer Institute, U. S. <http://www.cancer.gov/>, Ağ
- Nehilla, B. J., Bergkvist, M., Popat, K. C., Desai, T. A., 2008, Purified and surfactant-free coenzyme Q10-loaded biodegradable nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 348 (1-2), 107-114.
- Nie, S., Xing, Y., Kim, G. J., Simons, J. W., 2007, Nanotechnology applications in cancer, *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9, 257-288.
- Ochekpe, N., Olorunfemi, P., Ngwuluka N., 2009, Nanotechnology and Drug Delivery Part 1 : Background and Applications, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8 (3), 265-274.
- Ozturk, K., Caban, S., Kozlu, S., Kadayifci, E., Yerlikaya, F., Capan, Y., 2010, The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles, *Pharmazie*, 65 (9), 665-669.
- Panchagnula, R., 1998, Pharmaceutical aspects of paclitaxel, *International Journal of Pharmaceutics*, (172), 1-15.
- Panyam, J., Williams, D., Dash, A., Leslie-Pelecky, D., Labhasetwar, V., 2004, Solid-state solubility influences encapsulation and release of hydrophobic drugs from PLGA/PLA nanoparticles, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93 (7), 1804-1814.

- Peracchia, M. T., Gref, R., Minamitake, Y., Domb, A., Lotan N., Langer R., 1997, PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics, *Journal of Controlled Release*, (46), 223–231.
- Perugini, P., Simeoni, S., Scalia, S., Genta, I., Modena, T., Conti, B., Pavanetto, F., 2002, Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate, *International Journal of Pharmaceutics*, 246 (1-2), 37-45.
- Pharmacopeia, U. S., 2007. (c. 3). Rockville, MD, USA: The United States Pharmacopeial Convention Inc, 2844-2845.
- Pillai, O., Panchagnula, R., 2001, Polymers in drug delivery, *Current Opinion in Chemical Biology*, 5 (4), 447-451.
- Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., Veiga, F., 2006, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine*, 2 (1), 8-21.
- Quellec, P., Gref, R., Dellacherie, E., Sommer, F., Tran, M. D., Alonso, M. J., 1999, Protein encapsulation within poly(ethylene glycol)-coated nanospheres. II. Controlled release properties, *Journal of Biomedical Materials Research*, 47 (3), 388-395.
- Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., All'emann, E., Doelker, E., 1996, Influence of stabilizing agents and preparatives variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique, *International Journal of Pharmaceutics*, 143, 133–141.
- Ommaty, R., 2006, *Vademekum Modern İlac Rehberi*, Ankara, 29. Baskı, 1218-1219.
- Ramaswamy, M., Zhang, X., Burt, H.M., Wasan, K.M., 1997, Human plasma distribution of free paclitaxel and paclitaxel associated with diblock copolymers, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 460–464.
- Rao, J. P., Geckelera, K. E., 2011, Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, (36), 887-913.
- Rowinsky, E. K., 1997, The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents, *The Annual Review of Medicine*, 48, 353-374.
- Rowinsky, E. K., Donehower, R. C., 1993, The clinical pharmacology of paclitaxel (Taxol), *Seminars in Oncology*, 20 (4 Suppl 3), 16-25.

- Sahoo, K. S., Panyam, J., Prabha, S., Labhasetwar, V., 2002, Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake, *Journal of Controlled Release*, 82, 105–114.
- Sampedro, F., Patrika, J., Santalo, P., Molins-Pujol, A.M., Bonal, J., Perez-Soler, R., 1993, Liposomes as carriers of different new lipophilic antitumor drugs: a preliminary report, *Journal of Microencapsulation*, 11, 309–318.
- Seyler, I., Appel, M., Devissaguet, J. P., Legrand, P., Barratt, G., 1999, Macrophage Activation by a Lipophilic Derivative of Muramyl dipeptide within Nanocapsules: Investigation of the Mechanism of Drug Delivery, *Journal of Nanoparticle Research*, (1), 91-97.
- Shahir, G. A., 2003, 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, *Journal of Chromatography A*, 987 (1-2), 57-66.
- Siepmann, J., Gopferich, A., 2001, Mathematical modeling of bioerodible, polymeric drug delivery systems, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48 (2-3), 229-247.
- Singh, R., Lillard, J. W. Jr., 2009, Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Experimental and Molecular Pathology*, 86 (3), 215-223.
- Singla, A. K., Garg, A., Aggarwal, D., 2002, Paclitaxel and its formulations, *International Journal of Pharmaceutics*, 235 (1-2), 179-192.
- Song, C. X., Labhasetwar, V., Murphy, H., Qu, X., Humphrey, W. R., Shebuski, R. J., Levy, 1997, Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery, *Journal of Controlled Release*, (43), 197-212.
- Songa, K. C., Lee, H. S., Choung, Y., In Choa, K., Ahn, Y., Choi, E. J., 2006, 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*, 276, 162–167.
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. E., 2001, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of Controlled Release*, 70 (1-2), 1-20.
- Sparreboom, A., Scripture, C. D., Trieu, V., Williams, P. J., De, T., Yang, A., Beals, B., Figg, W. D., Hawkins, M., Desai, N., 2005, Comparative preclinical and clinical pharmacokinetics of a cremophor-free, nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-007) and paclitaxel formulated in Cremophor (Taxol), *Clinical Cancer Research*, 11 (11), 4136-4143.

- Taylor, J., Raval, A., Engineer, C., Kotadia, H., Kothwala, D., 2008, Development and validation of a reversed-phase HPLC method for in-vitro loading and release analysis of Paclitaxel coated stent, *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 22 (2), 79-86.
- Tarr, B.D., Yalkowsky, S.H., 1987, A new parenteral vehicle for the administration of some poorly soluble anti-cancer drugs, *Journal of Parenteral Science and Technology*, 41, 31.
- Thrall, J. H., 2004, Nanotechnology and medicine, *Radiology*, 230 (2), 315-318.
- Tyson, J., Novak, B., 2001, Regulation of the Eukaryotic Cell Cycle: Molecular Antagonism, Hysteresis, and Irreversible Transitions, *Journal of Theoretical Biology*, (210), 249-263.
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., Shakesheff, K. M., 1999, Polymeric systems for controlled drug release, *Chemical Reviews*, 99 (11), 3181-3198.
- Van Iterson, R. A., 2005, A Guide to Validation in HPLC, Drenthe College Emmen Holland.
- Vandervoort, J., Ludwig, A., 2002, Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study, *International Journal of Pharmaceutics*, 238, 77-92.
- Vandorpe, J., Schacht, E., Stolnik, S., Garnett, M. C., Davies, M. C., Illum, L., Davis, S. S., 1996, Poly(organo phosphazene) nanoparticles surface modified with poly(ethylene oxide), *Biotechnology and Bioengineering*, 52 (1), 89-95.
- Vert, M., 2005, Aliphatic polyesters: great degradable polymers that cannot do everything, *Biomacromolecules*, 6 (2), 538-546.
- Vicari, L., Musumeci, T., Giannone, I., Adamo, L., Conticello, C., De Maria, R., 2008, Paclitaxel loading in PLGA nanospheres affected the in vitro drug cell accumulation and antiproliferative activity, *BMC Cancer*, 8, 212.
- Villano, J. L., Mehta, D., Radhakrishnan, L., 2006, Abraxane induced life-threatening toxicities with metastatic breast cancer and hepatic insufficiency, *Invest New Drugs*, 24 (5), 455-456.
- Wang, C., Wang, Y., Fan, M., Luo, F., Qian, Z., 2011, Characterization, pharmacokinetics and disposition of novel nanoscale preparations of paclitaxel, *International Journal of Pharmaceutics*, 414 (1-2), 251-259.
- Weiss, R. B., Donehower, R. C., Wiernik, P. H., Ohnuma, T., Gralla, R. J., Trump, D. L., 1990, Hypersensitivity reactions from taxol, *Journal of Clinical Oncology*, 8 (7), 1263-1268.

- Wheeler, J.J., Wong, K.f., Ansell, S.M., Masin, D., Ball, M.B., 1994, Polyethylene glycol modified phospholipids stabilize emulsions prepared from triacylglycerol, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 1558–1564.
- Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M., Chauhan, S. C., 2010, Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells, *Journal of Colloid and Interface Science*, 351 (1), 19-29.
- Yan, H., 2004, Materials science, Nucleic acid nanotechnology, *Science*, 306 (5704), 2048-2049.
- Yordanov, G. G., Dushkin, C. D., 2010, Preparation of poly(butylcyanoacrylate) drug carriers by nanoprecipitation using a pre-synthesized polymer and different colloidal stabilizers, *Colloid and Polymer Science*, (288), 1019–1026.
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., Vigneron, C., 1999, MPEO-PLA nanoparticles: effect of MPEO content on some of their surface properties, *Journal of Biomedical Materials Research*, 44 (1), 109-115.
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Maincent, P., Dellacherie, E., Alonso, M. J., 1998, Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method, *Journal of Control Release*, 50 (1-3), 31-40.
- Zhang, Z., Grijpma, D. W., Feijen, J., 2006, Poly(trimethylene carbonate) and monomethoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(trimethylene carbonate) nanoparticles for the controlled release of dexamethasone, *Journal of Controlled Release*, (111), 263–270.
- Zili, Z., Sfar, S., Fessi, H., 2005, Preparation and characterization of poly-epsilon-caprolactone nanoparticles containing griseofulvin, *International Journal of Pharmaceutics*, 294 (1-2), 261-267.
- Zweers, M. L., Engbers, G. H., Grijpma, D. W., Feijen, J., 2006, Release of anti-restenosis drugs from poly(ethylene oxide)-poly(DL-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, *Journal of Control Release*, 114 (3), 317-324.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gözde AYGÜL

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1986

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : 2000 -2004 Çankaya Lisesi, Ankara

Lisans : 2004 -2009 Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji
Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce