

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTİ-VEGFR-1 MONOKLONAL ANTİKOR İLE KONJUGE
EDİLMİŞ GEMSİTABİN YÜKLÜ DENDRİMERLERİN
PANKREAS KANSERİNE AKTİF HEDEFLENDİRİLMESİ VE İN
VİTRO/İN VİVO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Kıvılcım ÖZTÜRK

**Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2015

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTİ-VEGFR-1 MONOKLONAL ANTİKOR İLE KONJUGE
EDİLMİŞ GEMSİTABİN YÜKLÜ DENDRİMERLERİN
PANKREAS KANSERİNE AKTİF HEDEFLENDİRİLMESİ VE İN
VİTRO/İN VİVO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzm. Ecz. Kıvılcım ÖZTÜRK

Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ

ANKARA
2015

Anabilim Dalı :Farmasötik Teknoloji
 Program :Farmasötik Teknoloji Doktora
 Tez Başlığı :Anti-VEGFR-1 Monoklonal Antikor ile Konjuge Edilmiş
 Gensitabin Yüklü Dendrimerlerin Pankreas Kanserine Aktif
 Hedeflendirilmesi ve İn Vitro/Vivo Olarak Değerlendirilmesi
 Öğrenci Adı-Soyadı :Kıvılcım Öztürk
 Savunma Sınavı Tarihi :24.11.2015

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı ve Tez Danışmanı :

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
 (Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. İ. Tuncer DEĞİM
 (Gazi Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Betül ARICA YEGİN
 (Hacettepe Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Metin TÜLÜ
 (Yıldız Teknik Üniversitesi)

Üye: Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI
 (Hacettepe Üniversitesi)

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, karşılaştığımız sorunlar karşısında her zaman yol gösteren, bu süreçte desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilimsel çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için her türlü olanağı sağlayan, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Sema ÇALIŞ'a, çalışmalarım süresince, bilgi, deneyim ve değerlendirmelerini benimle paylaşan, hücre kültürü ve in vivo deneylerin yürütülebilmesi için her türlü olanağı sağlayan emeğine ve bilgisine her zaman saygı duyduğum değerli hocam Sayın Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya, dendrimerlerin sentezi ve karakterizasyonunda bilgisini ve emeğini esirgemeyen, her türlü sorunu birlikte aştığımız değerli hocam Prof. Dr. Metin TÜLÜ'ye ve doktora öğrencisi Mustafa Ulvi GÜRBÜZ'e değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca destekleri, emekleri ve dostlukları ile hep yanımda olan Ecz. (B.U.) Seçil ÇABAN, Ecz. (B.U.) Elif SARIGÖL, Ecz. Selin Seda DOĞAN, Ecz. (B.U.) Serhat KOZLU, Ecz. (B.U.) Tuğba GÜLSÜN, Ecz. (B.U.) Nurten ÇELEN TEZEL, Ecz. Dilara ÖRGÜL, Ecz. Yağmur AKDAĞ ÇAYLI ve Dr. Ecz. (B.U.) Burçin YAVUZ'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimin hücre kültürü ve hayvan deneylerini gerçekleştirdiğim H.Ü. Kanseri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına bilimsel destekleri ve arkadaşlıkları için teşekkürlerimi sunarım.

İn vivo görüntüleme çalışmalarım sırasında verdikleri değerli katkılardan dolayı, H.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Sevdâ Müftüoğlu ve araştırma görevlisi Uzm.Dr. Elif Bilgiç'e teşekkürlerimi sunarım.

Eczacılık Teknolojisi Bölümü'ndeki değerli hocalarıma, yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, idari personelimize, teknisyenlerimize değerli katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Hayatıma anlam katan ve varlıkları ile benim her zaman güçlü olmamı ve her zorluğu kolaylıkla aşmamı sağlayan değerli aileme ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyip, doktora tezimi başarılı bir şekilde tamamlamamı en az benim kadar isteyen nişanlım Onur ATAR'a en derin sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Öztürk, K., Anti-VEGFR-1 Monoklonal Antikor ile Konjuge Edilmiş Gemsitabin Yüklü Dendrimerlerin Pankreas Kanserine Aktif Hedeflendirilmesi ve *İn vitro/İn vivo* Olarak Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2015.

Pankreas kanseri ABD’de kansere bağlı ölümler arasında dördüncü sıradadır. Antimetabolit nükleozit analogu olan gemsitabin, insan solid tümörlerine karşı geniş bir sitotoksosite spektrumuna sahiptir. Ancak bu etkisi kandaki kısa yarılanma ömründen dolayı sınırlanmaktadır. Gemsitabinin *in vivo* stabilitesini artırmak ve toksisitesini azaltmak için, sudaki yüksek çözünürlükleri, monodispers partikül boyut dağılımları ile özellikle antikanser ilaçların taşınmasında çok uygun taşıyıcılar olan dendrimerler kullanılmıştır. Tez çalışmasında orijinal olarak sentezlenen PAMAM dendrimerlerine gemsitabin HCl yüklenmiş, dendrimerin yüzeyi PEG 2000 ile modifiye edilmiş ve tümöre hedeflendirme sağlamak amacıyla anti-VEGFR-1 ile konjuge edilmiştir. Sentezlenen dendrimerler, ATR, NMR ve MALDI-TOF analizleri ile doğrulanmıştır. Gemsitabin HCl için modifiye edilen HPLC miktar tayin yöntemi valide edilmiştir. Gemsitabin HCl’ün dendrimerler ile inklüzyon kompleksleri hazırlanmıştır. Hazırlanan kompleksler, DSC, partikül boyutu, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, *in vitro* salım açısından değerlendirilmiştir. Sitotoksosite deneyleri, hücre içine alım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İmmün sistemi baskılanmış farelerde pankreas kanseri geliştirilmiş ve bu fareler tümöre hedeflendirilmiş dendrimerler ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. Floresan işaretleyici olarak rodamin 123 kullanılarak, hücre içine alımları izlenmiştir. Hücre kültürü deneyleri sonucunda anti-VEGFR-1 ile hedeflendirilmiş dendrimerlerin hedeflendirilmemiş olanlara göre hücre içine daha çok alındığı akış sitometri ve floresan mikroskopu ile gösterilmiştir. *İn vivo* deneyler sonucunda ise tümöre hedeflendirilen dendrimerlerin tümörün küçültülmesinde, gemsitabinle yapılan standart tedavi yaklaşımına ve hedeflendirilmemiş dendrimerlere göre daha etkili olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Dendrimer, Nanoteknoloji, Gemsitabin, Pankreas kanseri, hücre kültürü, CFPAC-1, nude fare

Destekleyen Kurumlar: TÜBİTAK, Bilimsel ve Teknolojik Araşt. Pro. Destekleme Pr.

ABSTRACT

Öztürk, K. Active Targeting of Anti-VEGFR-1 Monoclonal Antibody Conjugated, Gemcitabine Loaded Dendrimers to Pancreatic Cancer and In Vitro-In Vivo Evaluation, Hacettepe University Institute of Health, Doctorate Thesis in Pharmaceutical Technology, Ankara 2015.

Pancreatic cancer is the forth most deadliest cancer in the USA. Gemcitabine, a nucleoside analog, has a wide cytotoxicity spectrum against human solid tumor. However, this impact is typically limited, due to its short half-life in blood. In order to increase the in vivo stability and decrease the toxicity of gemsitabin, dendrimers were used. Due to their high solubility in water, monodisperse particle size distribution, dendrimers are very suitable carriers especially for anticancer drugs. Gemsitabin HCl was encapsulated into PAMAM dendrimers, which were originally synthesized within the scope of the thesis study. The surface of the dendrimer was modified by PEG2000 and conjugated with anti-VEGFR-1, in order to target pancreatic tumor. Synthesized dendrimers were characterized by ATR and NMR techniques, and antibody conjugation was verified by NMR and MALDI-TOF analyses. Quantification method with HPLC for gemsitabin HCl, was modified and the developed analytical method was validated. Prepared complexes were evaluated in terms of DSC analysis, particle size, zeta potential, encapsulation efficiency, and in vitro release. Cytotoxicity experiments of cells and cellular uptake studies were performed. Furthermore, pancreatic carcinogenesis was applied to nude mice and it is attempted to cure these mice with tumor-targeted drug carrier systems. Rodamin 123 was encapsulated to dendrimers as fluorescent probe, and cellular uptake was observed. As a result of cell culture experiments, it was showed by flow cytometry and fluorescent microscope that cellular uptake by VEGFR-1 positive cells of dendrimers targeted by anti-VEGFR-1 was more than that of non-targeted dendrimers. As a result of in vivo experiments, it was found that dendrimers targeted to tumors were more effective in shrinking the tumors than standard cure approach and non-targeted dendrimers.

Keywords: Dendrimer, Nanotechnology, Gemcitabine HCl, Pancreas cancer, cell culture, CFPAC-1, nude mice

Supported by: TUBITAK 1001, Scientific and Technological. Res. Projects Funding Pr.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	4
2.1.1. Dendrimerler	5
2.2. Tümöre İlaç Hedeflendirilmesi	17
2.2.1. Pasif Hedeflendirme	18
2.2.2. Aktif Hedeflendirme	20
2.3. Anjiyogenez İlişkili Hedeflendirme ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü-1 (Anti-VEGFR-1)	28
2.3.1. Anti-VEGFR-1 (Flt-1) Antikoru	31
2.4. Kanser	31
2.4.1. Pankreas Kanseri	32
2.5. Gemcitabin Hidroklorür	35
2.6. Hücre Canlılığın Test Edilmesi	37
2.6.1. (3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolyum bromid) (MTT) Testi	37
2.7. Akış Sitometrisi	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1. Araç ve Gereçler	39
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	39
3.1.2. Biyolojik Materyal	40
3.1.3. Kullanılan Aletler	40

3.2. Metot	42
3.2.1. Dendrimer Sentezi	42
3.2.2. Antikor Konjugasyonu	49
3.2.3. Dendrimerlerin Karakterizasyonu	50
3.2.4. Gemitabin HCl'ün Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	50
3.2.5. Gemitabin-Dendrimer İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması	55
3.2.6. Gemitabin HCl-Dendrimer İnküzyon Komplekslerinin İn Vitro Karakterizasyonu	57
3.2.7. Hücre Kültürü Deneyleri	59
3.2.8. İn Vivo Hayvan Deneyleri	65
4. SONUÇLAR	70
4.1. Dendrimerlerin Karakterizasyonu	70
4.1.1. PEG Çekirdek Yapısına Sahip Dendrimerlerin Sentezi	70
4.1.2. EDA Çekirdekli Dendrimer Sentezi	77
4.1.3. Antikor Konjugasyonu	83
4.2. Gemitabin HCl Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal Çalışmalar	86
4.2.1. Gemitabin HCl'ün UV Spektrumu	86
4.2.2. Gemitabin HCl'ün Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini	86
4.3. Dendrimer-Gemitabin HCl İnküzyon Komplekslerinin Karakterizasyonu	93
4.3.1. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	93
4.3.2. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	93
4.3.3. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli	94
4.3.4. İn Vitro Salım Deneyleri	95
4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	96
4.4.1. CFPAC-1 Hücrelerinde VEGFR-1 Ekspresyonunun Gösterilmesi	97
4.4.2. Sitotoksite Çalışmaları	98

4.4.3. Hücre İçine Alım Çalışmaları	101
4.5. İn Vivo Deneyler	104
4.5.1. Pankreas Tümör Modelinin Geliştirilmesi	104
4.5.2. Antitümör Etkinlik Çalışması	104
4.5.3. Biyodağılım Çalışmaları	111
4.5.4. İn Vivo Görüntüleme	114
5. TARTIŞMA	116
5.1. Dendrimer Sentezi	116
5.1.1. Antikor Konjugasyonu	118
5.2. Gemsitabin HCl Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal Çalışmalar	119
5.2.1. Gemsitabin HCl'ün UV Spektrumu	120
5.2.2. Gemsitabin HCl'ün Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	120
5.3. Gemsitabin HCl'ün Dendrimere Fiziksel Yolla Enkapsülasyonu	122
5.3.1. Gemsitabin HCl-Dendrimer İnküzyon Komplekslerinin Karakterizasyonu	122
5.4. Hücre Kültürü Deneyleri	127
5.4.1. CFPAC-1 Hücrelerinde VEGFR-1 Ekspresyonunun Gösterilmesi	127
5.4.2. Hücre Canlılığı Deneyleri	128
5.4.3. Hücre İçine Alım Çalışmaları	130
5.5. İn Vivo Deneyler	133
5.5.1. Tümör Modeli Geliştirme	133
5.5.2. Antitümör Etkinliğin Değerlendirilmesi	134
5.5.3. Biyodağılım Çalışmaları	135
5.5.4. İn Vivo Görüntüleme	135
6. SONUÇ	137
KAYNAKLAR	139
EK 1 Etik Kurul Onayı	
EK 2 Özgeçmiş	
EK 3 Tez ile ilgili yayının ilk sayfası	

SİMGELER VE KISALTMALAR

5-FU	5-florourasil
anti-VEGFR-1 (anti-Flt-1)	Vasküler endotelyal büyüme faktörü-1 reseptör antikoru
APC	Allofikosiyanin
ATR	Azaltılmış toplam yansıma
dFdU	2', 2' - diflorodeoksiüridin
DMF	Dimetilformamit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
EDA	Etilendiamin
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EPR etkisi	Artan geçirgenlik ve tutulma etkisi
GEM	Gemsitabin HCl
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPMA	N-(2-hidroksipropil)metakrilamid
IMDM	Iscove'un modifiye edilmiş Dulbecco ortamı
iv	İntravenöz
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LPR	Sıvı faz polimer alıkonma
MALDI-TOF	Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometresi
MTT	Metil-tiyazol-tetrazolyum
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PAMAM	Poliamidoamin
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
PDI	Çok dağılımlılık indeksi
PEG	Poli(etilen glikol)
PLL	Poli-l-lizin
PPI	Poli(propilenimin)
Rho	Rodamin 123
RTPCR	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SANS	Dar açılı nötron saçılım

SAXS	Dar açılı X ışını saçılımı
SF	Serum fizyolojik
TGF- α	Dönüştürücü büyüme faktörü- α
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VK	Varyasyon katsayısı

ŞEKİLLER

ŞEKİL		SAYFA
2.1	Dendrimer ve dendronun yapısı	6
2.2	Dendrimerlerin ıraksak yöntemle sentezinin şematik olarak gösterilmesi.	7
2.3	Yakınsak yöntemle dendrimer sentezinin şematik gösterimi.	8
2.4	Terapötik madde, görüntüleme maddesi, nükleik asit ve yüzey modifiye edici gruplarla fonksiyonelleştirilmiş dendrimer bazlı ilaç taşıyıcı sistemin şematik gösterimi	9
2.5	PAMAM dendrimerin yapısı	10
2.6	İlaç-dendrimer etkileşimlerinin farklı tipleri.	11
2.7	Katyonik makromoleküllerin biyolojik membranlarla etkileşim mekanizması	16
2.8	Faz 1 klinik çalışma evresindeki dendrimer-dosetaksel molekülünün yapısı	17
2.9	Artan geçirgenlik ve tutulma etkisinin veya pasif hedeflendirmenin şematik gösterimi	19
2.10	Farklı nanopartiküllerin tümör lokalizasyonu ve kanda kalış süreleri	23
2.11	Reseptör aracılı endositozun şematik gösterimi	26
2.12	Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) sinyalinin inhibe etmek için çeşitli stratejiler.	30
2.13	Pankreasın konumu ve anatomisi	33
2.14	Gemsitabin HCl'ün kimyasal şekli	36
3.1	Dendrimer sentezinin aşamaları	42
3.2	Tam jenerasyonlu dendrimer sentezine ilişkin akış sırası	44
3.3	Ultra Filtrasyon düzeneği	45
3.4	Dendrimer yüzeyinin PEG 2000 ile modifikasyonu	49
3.5	Hücre içine alımın mikroskop tekniği ile gösterilmesinde kullanılan odacıklı lam.	64
3.6	CD1 Nude fare	65

3.7	Tümör oluşturmak amacıyla farelere subkütan CFPAC-1 enjeksiyonu	66
3.8	Biyodağılım çalışması öncesinde kurban edilen farenin tümörünün çıkarılması	67
3.9	Ficoll ile kan hücrelerinin ayrılması	68
4.1	(a) 0,5 (b) 1 (c) 1,5 (d) 2 (e) 2,5 (f) 3 (g) 3,5 (h) 4 (i) 4,5. jenerasyona sahip polietilen glikol çekirdek yapısına sahip dendrimerlerin ATR spektrumları	73
4.2	PEG-PAMAM 4,5. jenerasyon dendrimerin PEG 2000 ile modifikasyonundan sonra elde edilen ATR spektrumu	74
4.3	PEG-PAMAM 4,5 + PEG 2000'in ¹ H NMR spektrumu	75
4.4	PEG-PAMAM 4,5 + PEG 2000'in yüzey gruplarının karboksilik aside dönüştürülmesinden sonra elde edilen ATR spektrumu	76
4.5	PEG-PAMAM 4,5 + PEG asitin ¹ H NMR spektrumu	76
4.6	0,5 (b) 1 (c) 1,5 (d) 2 (e) 2,5 (f) 3 (g) 3,5 (h) 4 (i) 4,5. jenerasyona sahip etilendiamin çekirdek yapısına sahip dendrimerlerin ATR spektrumları	80
4.7	EDA-PAMAM 4,5. jenerasyon dendrimerin PEG 2000 ile modifikasyonundan sonra elde edilen ATR spektrumu	81
4.8	EDA-PAMAM 4,5-PEG 2000'in yüzey gruplarının karboksilik aside dönüştürülmesinden sonra elde edilen ATR spektrumu	82
4.9	EDA-PAMAM 4,5 + PEG'in ¹ H NMR spektrumu	83
4.10	EDA-PAMAM 4,5 + PEG asitin ¹ H NMR spektrumu	83
4.11	PEG-PAMAM 4,5 + PEG'in ¹ H NMR spektrumu	84
4.12	PEG-PAMAM-Flt1'in ¹ H NMR spektrumu	84
4.13	PEG çekirdekli dendrimere Flt-1 konjugasyonunun gerçekleştiğini gösteren kütle spektrumu	85
4.14	Gemcitabin HCl'ün su içerisindeki UV spektrumunun üç boyutlu görüntüsü	86
4.15	Gemcitabin HCl'ün 25 µg/mL konsantrasyonuna ait HPLC kromatogramı	87

4.16	Gemsitabin HCl'ün geliştirilen HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi	88
4.17	GEM, PEG-PAMAM, PEG-PAMAM-GEM inklüzyon kompleksi ve PEG-PAMAM+GEM fiziksel karışımına ait DSC termogramları	93
4.18	PEG-PAMAM dendrimerlerine ait partikül boyut ve zeta potansiyel dağılım grafikleri	95
4.19	İn vitro salım profilleri (n=3).	96
4.20	CFPAC-1 insan pankreas hücrelerinin çoğaltma işleminden sonra ışık mikroskop altındaki görüntüsü	96
4.21	CFPAC-1 hücrelerinin izotipik kontrol boyama (boş) ve APC işaretli Flt-1 spesifik antikor ile boyama sonucu (gri) elde edilen akış sitometri histogram grafiği	97
4.22	CFPAC-1 hücrelerinin izotipik kontrol boyama (sol) ve APC işaretli Flt-1 spesifik antikor ile boyama sonucu (sağ) elde edilen akış sitometri saçılım grafiği	98
4.23	EDA-PAMAM, EDA-PAMAM-Flt-1 ve EDA-PAMAM-Iso dendrimerlerinin CFPAC-1 hücrelerine 24 ve 48 saat süreli maruziyetten sonra elde edilen hücre canlılıkları	99
4.24	PEG-PAMAM, PEG-PAMAM-Flt-1 ve PEG-PAMAM-Iso dendrimerlerinin CFPAC-1 hücrelerine 24 ve 48 saat süreli maruziyetten sonra elde edilen hücre canlılıkları	99
4.25	EDA-PAMAM-GEM, EDA-PAMAM-Flt1-GEM, EDA-PAMAM-Iso-GEM'in CFPAC-1 hücrelerine 24 ve 48 saat süreli maruziyetten sonra elde edilen hücre canlılıkları	100
4.26	PEG-PAMAM-GEM, PEG-PAMAM-Flt1-GEM, PEG-PAMAM-Iso-GEM'in CFPAC-1 hücrelerine 24 ve 48 saat süreli maruziyetten sonra elde edilen hücre canlılıkları	100
4.27	Farklı molar oranlarda rodamin içeren (a) 20 nM (b) 40 nM formülasyonların uygulandığı CFPAC-1 hücrelerinin 8 saat	101

	sonunda gösterdikleri akış sitometrik histogram profilleri	
4.28	Rho çözeltisi ve PEG-PAMAM-Rho formülasyonların artan konsantrasyonuna karşı hücrelerin akış sitometri sonucuna göre gösterdiği floresan intensite değişimi	102
4.29	PEG-PAMAM-Iso-Rho PEG-PAMAM-Flt1-Rho formülasyonlarının artan konsantrasyona karşı hücrelerin akış sitometri sonucuna göre gösterdiği floresan intensite değişimi	102
4.30	PEG-PAMAM-Flt1-Rho'nun artan konsantrasyona karşı düşük ve yüksek floresan intensite gösteren hücrelerin intensite değişimi	103
4.31	PEG-PAMAM-Iso-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho uygulanan CFPAC-1 hücrelerine ait floresan mikroskop görüntüleri	104
4.32	Tümör oluşturulmuş farelerde 4 kür tedavi sonrasında elde tümör görüntüleri	105
4.33	Dört kür tedavi sonrası farelerden çıkarılan tümörler	106
4.34	Uygulanan tedavi ile birlikte tümör çaplarında görülen değişim	111
4.35	4 kür tedavi sonrası farelerden çıkarılan dalak dokuları	112
4.36	PEG-PAMAM-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho uygulanan farelere ait biyodağılım sonuçları	113
4.37	PEG-PAMAM-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho uygulanan farelerin tümör dokularına ait floresan intensite grafikleri	113
4.38	Tümör dokularına ait UV kamera görüntüsü	114
4.39	PEG-PAMAM-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho uygulanan farelerin tümör doku kesitlerine ilişkin floresan mikroskop görüntüsü	115

4.40	Pankreas doku kesitlerinin floresan mikroskop görüntüleri	115
------	---	-----

TABLOLAR

TABLO		SAYFA
3.1	Dendrimer sentezi	49
3.2	Gemcitabin HCl'ün HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar	51
3.3	EDA çekirdek yapısındaki dendrimerlerle hazırlanan formülasyonlar	55
3.4	PEG çekirdek yapısındaki dendrimerlerle hazırlanan formülasyonlar	55
3.5	Formülasyon kodları	56
3.6	Hücre içine alım çalışmalarında kullanılan formülasyonlar	64
3.7	Tümör geliştirilen ve sağlıklı farelerden oluşan deney grupları ve bu gruplara uygulanan formülasyonlar	66
4.1	Gemcitabin HCl'ün HPLC ile miktar tayininde elde edilen regresyon verileri (n=6)	88
4.2	Deney içi ve deneyler arası doğruluk	89
4.3	Tekrarlanabilirlik sonuçları	90
4.4	Gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları	91
4.5	Stabilite sonuçları	92
4.6	Enkapsülasyon etkinliği sonuçları	94
4.7	Dendrimerler, inklüzyon kompleksleri ve dendrimer antikör konjugatlarının partikül boyutu ve zeta potansiyeli sonuçları	95
4.8	Tedavi uygulanmayan kontrol grubundaki farelere ait	107

ağırlık ve tümör çapı verileri

4.9	GEM uygulanan farelere ait ağırlık ve tümör çapı verileri	108
4.10	PEG-PAMAM-GEM inklüzyon kompleksi uygulanan farelere ait ağırlık ve tümör çapı verileri	109
4.11	PEG-PAMAM-Flt1-GEM uygulanan farelere ait ağırlık ve tümör çapı veriler	110

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Pankreas kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölümler arasında dördüncü sıradadır ve 2020 yılında ikinci sıraya yükselmesi öngörülmektedir. En ölümcül kanser türü olan pankreas kanserinde hastaların beş yıl hayatta kalma oranı % 6'dır, öte yandan hastaların % 73'ü teşhis edildikleri ilk yıl içinde kaybedilmektedir.

Pankreasın ya da diğer bir organın kanseri, kontrolsüz hücre çoğalması olarak karakterize edilmektedir. Kanser hücreleri apoptozisten kaçınabilen, kendi çoğalma sinyallerini üretebilen ve çoğalmanın inhibe edileceği sinyallere karşı dirençli hücrelerdir. Kanser 2-3 mm³'ten daha büyük bir boyuta erişebilmesi için anjiyogenez olarak isimlendirilen yeni damar oluşumu gerekmektedir. Fakat oluşan bu tümör damarlanması yapısal ve fonksiyonel olarak normal olmayan organizasyonu bozuk bir damarlanmadır. İnsan pankreas kanseri, teşhisinin zorluğu ve tedavi seçeneklerinin azlığı nedenleriyle tüm kanser türleri arasında 5 yıllık hayatta kalma oranı en düşük olan kanser türüdür. Bu nedenden dolayı pankreas kanseri tedavileri seçenekleri geliştirilmelidir.

Pankreas kanserinin birincil tipi pankreatik adenokarsinomadır ve tüm vakalar arasında % 95'lik bir orana sahiptir. Pankreatik adenokarsinoma pankreasın ekzokrin fonksiyonunu etkilemektedir. Tümörün pankreas içerisinde nerede geliştiği teşhis edilme evresi ve tedavi sonucu ile yakından ilintilidir.

Sentetik, pirimidin nükleozid ve antineoplastik etkili bir madde olan, gempitabin (2',2'-diflorodeoksisitidin), lokal ileri pankreas kanseri ve metastatik pankreas kanserinde günümüzde standart tedavide tercih edilen en önemli antikanser molekül durumundadır. Gempitabin HCl'ün (GEM), Eli Lilly Firması'nın GEMZAR® isimli ticari ürünü, ilk onayını 1996 yılında FDA (Amerika İlaç ve Gıda Kurumu) tarafından kanser tedavisindeki kullanımı için almıştır. Gempitabin çok hızlı ve yaygın bir şekilde, kanda, karaciğerde, böbrekte ve diğer dokularda, sitidin deaminaz tarafından deaminasyona uğrayarak inaktif formu olan 2', 2'- diflorodeoksiüridin (dFdU)'e dönüşür ve idrarla atılır. Gempitabinin kanda kalış süresi çok kısadır (8-17 dakika). Terapötik ilaç seviyesine ulaşmak için, gempitabin günümüzde 1000 mg/m² olacak şekilde ve 30 dakikalık intrevenöz (iv) infüzyonu şeklinde uygulanmaktadır. Gempitabin tek başına kullanıldığında pankreas kanseri ve küçük hücreli akciğer

kanserinin tedavisinde endikedir, aynı zamanda birçok solid tümöre karşı etkin olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda, solid tümörlere karşı geniş bir sitotoksosite spektrumuna sahip olan, suda çözünen antimetabolit nükleozid analogu olan gempitabinin antikanser etkinliği kısa yarı ömrü nedeniyle kısıtlıdır. Düşük molekül ağırlıklı antikanser ilaçların yüksek dozlarda kullanımı, vücutta kontrolsüz ve rastgele dağılacığı için, hastalarda spesifik olmayan toksisitelere neden olmaktadır.

Dendrimerler, monodispers (polimer gibi ortalama molekül ağırlığından değil, aslında büyük olmalarına rağmen küçük bir molekül gibi tek bir molekül ağırlığına sahip olmaları biyolojik çalışmalar için çok önemli bir üstünlüktür), üç boyutlu, yüksek oranda dallanmış, makromoleküler olarak tanımlanırlar (1-100 nm). Yüksek yükleme kapasitesi, kolay sentezlenebilir olmaları, stabiliteleri, istenildiği şekilde fonksiyonelleştirilebilir olmaları, aktif hedeflendirmedeki etkinlikleri, parenteral, transdermal ve oral uygulanabilirlikleri dendrimerlerin en önemli üstünlükleri olarak görülmektedir. Dendrimerler; gerektiğinde suda çözünürlüğü olmayan etkin maddelerin çözünürleştirilmesinde, teşhis işleminde, bunların yanı sıra kontrollü ve sürekli salım sağlayan sistemlerin hazırlanması ve diğer nanomedikal amaçlar için başarılı bir şekilde kullanılabilirler. Bu nanotaşıyıcılar son zamanlarda, yüzeylerinin fonksiyonelleştirilmesi, antikanser ilaçların ve anti-HIV ilaçların hedeflendirilmesi için yoğun olarak araştırılmaktadırlar.

Aktif hedeflendirme stratejisi, tanıma ligandları kullanılarak etki bölgesine etkin madde-nanotaşıyıcı konjugatının taşınmasına dayanır. Konjugatların yüzeyine antikorlar, düşük moleküllü ligandlar, örneğin folik asitler ve peptidler bağlanır. Aktif hedeflendirme stratejisi, fiziksel uyarıların (örneğin sıcaklık, pH, manyetik alan) kullanılmasıyla da elde edilebilir. Tümördeki reseptöre ya da antijene spesifik olarak hedeflendirmede terapötik maddenin direkt tümör hücrelerine yönlendirilmesi amaçlanmaktadır. Tümör hücreleri bir takım reseptör ya da antijenleri normal seviyede ya da çok yüksek seviyede ekspres etmektedir. Bu yapılar aydınlatıldığı için antikorlar, küçük moleküller ya da hedef bölgeyi tanıyıp oraya bağlanabilecek peptidler kullanılarak tümöre hedeflendirme yapılabilir.

Kanserin en önemli ayırıcı özelliği olan anjiyogenez, onkolojide terapötik yaklaşımların odağı haline gelmiştir. Pro- ve antianjiyogenik faktörlerin kompleks sistemleri arasında, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) tümör

anjyogenezinde anahtar bir aracı olarak ve klinik uygulamalarda tanıtılmış antianjiyogenik maddelerin hedefi olarak göze çarpmaktadır. Yapılan çalışmalar, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve VEGF yollarının insan pankreas kanserinde büyük miktarda aktive olduğunu göstermektedir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörlerinin ekspresyonları pankreas kanserinin tanısında kullanılabilir.

Yoğun araştırmalara konu olan pankreas kanserinin tedavisindeki zorluklar ve gemcitabinin antitümör etkinliğinin, biyoyararlanımının artırılması ve toksik yan etkilerini azaltılması tez çalışması kapsamında da araştırılmış ve çözüm sunulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmanın amacı, kandaki yarılanma ömrü ve in vivo stabilitesi düşük gemcitabin HCl'ün hem in vivo stabilitesini artırmak hem de toksik yan etkilerini azaltarak antitümör etkinliğini artırmak amacıyla, gemcitabini tümöre aktif olarak hedeflendirmektir. Bunu başarabilmek için ilaç taşıyıcı sistem olarak 4,5. jenerasyon poli(etilen glikol) (PEG) çekirdek yapısına sahip dendrimerler kullanılmıştır. Dendrimerlerin, retikulo endotelial sistem tarafından alımını azaltmak, hedeflendirme ligandı ve hedef bölgedeki reseptör ile bağlanma etkinliğini artırmak amacıyla yüzeyleri PEG 2000 ile modifiye edilmiştir. Bu modifikasyonun ardından yüzeydeki PEG moleküllerinin uç kısımlarında yer alan serbest amin grupları aracılığı ile dendrimer yapısına vasküler endotelial büyüme faktörü-1 reseptör antikor (anti-VEGFR-1, anti-Flt-1) konjuge edilmiştir. Anti-VEGFR-1 hem çalışmada kullanılan insan pankreas kanser hücrelerinde yüksek seviyede eksprese edilmesi hem de antianjiyogenik hedeflendirme stratejisinden faydalanmak için seçilmiştir. Hücre kültürü ve in vivo hayvan deneyleri geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemin pankreas kanseri tedavisine önemli bir katkı sağlayacağını göstermektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknoloji, günümüzde fiber, tekstil, tarım, elektronik, adli tıp, uzay ve tıp alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyoparçalanabilir nanopartiküller, ilaç araştırmalarında sıklıkla suda çözünen ya da çözünmeyen etkin maddelerin biyoyararlanımını, çözünürlüğünü, kanda kalış süresini uzatarak terapötik etkinliklerini artırmak için kullanılır. Nanopartikül ilaç formülasyonları hastaların harcamalarını ve toksisite riskini azaltır. Etkin maddelerin nanoenkapsülasyonu onların etkinliğini, özgünlüğünü, tolere edilebilirliğini ve ilaca bağlı terapötik indeksini artırır. Nanotıp, etkin maddenin erken degradasyonunun önlenmesi, biyolojik çevre ile etkileşiminin azaltılması, istenen doku tarafından absorpsiyonunun artırılması, biyoyararlanımının, kanda kalış süresinin iyileştirilmesi ve hücre içine penetrasyonunun artırılması gibi birçok amaca hizmet etmektedir. Kanseri, AIDS, diyabet, malarya, prion hastalığı, tüberküloz gibi tedavisi zor olan hastalıklar için geliştirilen ve araştırmaları süren birçok nanopartikül formülasyonu bulunmaktadır. Bu formülasyonların bazıları onaylanıp klinikte kullanım şansı bulmuşken, büyük bir çoğunluğu da faz çalışmalarının farklı evrelerinde test edilmektedir. Nanopartikül formülasyonunun başarısı, yüksek enkapsülasyon etkinliğinin elde edilmesini sağlayan, etkin maddenin biyoyararlanımını ve kanda kalış süresini artırıcı polimerin seçimine bağlıdır (2).

Nanopartiküllerin genel özellikleri; ortalama 1-1000 nm boyutunda olmalı, moleküllerin fiziksel veya kimyasal özelliklerini kontrol amacıyla tasarlanmalı, moleküllerle kompleks oluşturabilmelidir. Bu kompleksler, ilacın polimerik yüzeye tutturulması ya da içinde çözündürülmesi veya hapsedilmesi ile elde edilir. Lipozomlar, katı lipid partiküller, miseller, küreler, dendrimerler, konjugatlar, hidrojel vb. olmak üzere çeşitli nanotaşıyıcı sistemler vardır.

İdeal bir makromoleküler ilaç taşıyıcı sistemin ya da biyomedikal taşıyıcının taşımaya gereken özellikler (3):

- Etkin madde veya görüntüleme maddesinin yük hacminin şekli ve boyutu üzerindeki yapısal kontrol
- Biyoyumlu ve toksik olmayan polimer fonksiyonu

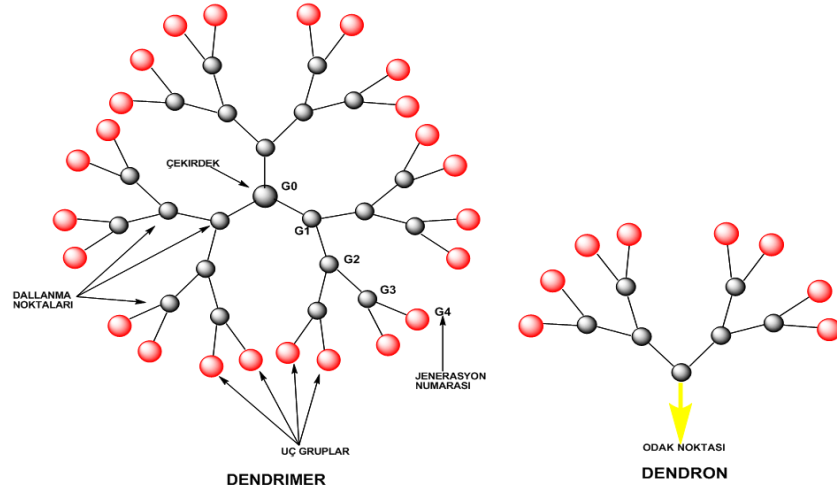
- Yüksek etkin madde ve görüntüleme maddesi kapasitesi ile kesin, nano boyutta taşıyıcı ve/veya yapı iskelesi oluşturabilme özelliği
- İmmünojenik olmama
- Terapötik taşıyıcı veya görüntüleme maddesinin sitoplazma veya çekirdekte uygun bir şekilde hücresel adezyon, endositoz ve hücreler arası hareket özelliklerinin olması
- Kabul edilebilir biyoeliminasyon veya biyoparçalanma
- Kontrollü veya harekete geçirilebilir ilaç salımı
- İlacın hedef hücrelere geçişi sırasında moleküler düzeyde izole edebilmesi ve inaktivasyona karşı koruyabilmesi
- Spesifik olmayan hücresel ve kan proteinlerine bağlanma özelliğinin minimum seviyede olması
- Klinikte kullanım için sentezinin kararlı ve tekrarlanabilir olması.

Polimerik sistemler; çok sayıda tekrarlanan birimlerden oluşan makromoleküllerdir. Bu sistemlerde ilaç salımında kullanılan en yaygın mekanizmalar; çözünme, difüzyon ve erozyondur (4). Nanotaşıyıcı sistemlerde doğal sentetik polimerler kullanılabilir. Polimerlerin biyolojik uyumlu olması gerekir. İlaç salınımını değiştirebilmek için polimerlerin özellikleri iyi bilinmelidir.

2.1.1. Dendrimerler

Dendrimerler, birbirini ardışık olarak tekrarlayan monomerlerin basamak basamak eklenmesiyle merkezden (çekirdekten) yüzeye doğru büyütülerek sentezlenen küresel makromoleküllerdir (5). Polimer kimyası açısından dendrimerler, ağaç şeklinde, üç boyutlu yapıda, monodispers makromoleküllerdir. Dendrimerler çekirdek, dallar ve reaktif fonksiyonel gruplar olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. Terminoloji olarak, dendrimer, Yunanca'da ağaç anlamına gelen "dendron" sözcüğünden gelmektedir. Arborollar ve kademeli moleküller de dendrimer teriminin eş anlamlıları olmasına rağmen, uluslararası terminolojide kabul edilen terim "dendrimer"dir. Dendrimerler karakteristik olarak çekirdek etrafında simetrik ve küre biçiminde üç boyutlu bir şekil oluştururlar (Şekil 2.1.) (6). Dendron terimi ise dendrimerden farklı olarak; genellikle kimyasal olarak belirlenebilen bir odak noktası içerir (7).

Dendritik moleküller adım adım ilerleyen, düzenli ve yenilenen reaksiyon adımları ile sentezlenirler. Her yenilenme daha büyük dendrimerik yapının oluşmasını sağlar. Özel olarak geliştirilmiş reaksiyonlar ile üretilen dendrimerlerin sentezi kontrollü reaksiyonlara iyi bir örnektir. Her yeni tabaka uç grup olarak adlandırılan aktif kısım sayısını iki veya üç katına çıkararak yeni bir jenerasyon oluşturur (8).



Şekil 2.1. Dendrimer ve dendronun yapısı

Dendrimerler üç ana kısma ayrılabilirler; çekirdek, iç boşluk, dış yüzey grubu. Bir dendrimerde, bu üç ana parça kontrollü bir şekilde değiştirilerek çözünürlük, termal stabilite ve ilaç taşınmasında ligand bağlama gibi farklı fonksiyonlar kazandırılabilir. Sentetik proseslerle dendrimerlerin büyüklüğü ve dallanma sayıları kesin olarak belirlenebilir. Dendrimer sentezi için tanımlanan iki sentez yöntemi vardır; ıraksak (divergent) sentez, yakınsak (convergent) sentez. Ancak asıl reaksiyon aktif bölgeleri korumak için birçok adımdan oluşur. Bu yüzden bu iki metotla da dendrimer sentezlemek zordur. Bu da dendrimerleri yapımı zor ve pahalı ürünler yapmaktadır (9).

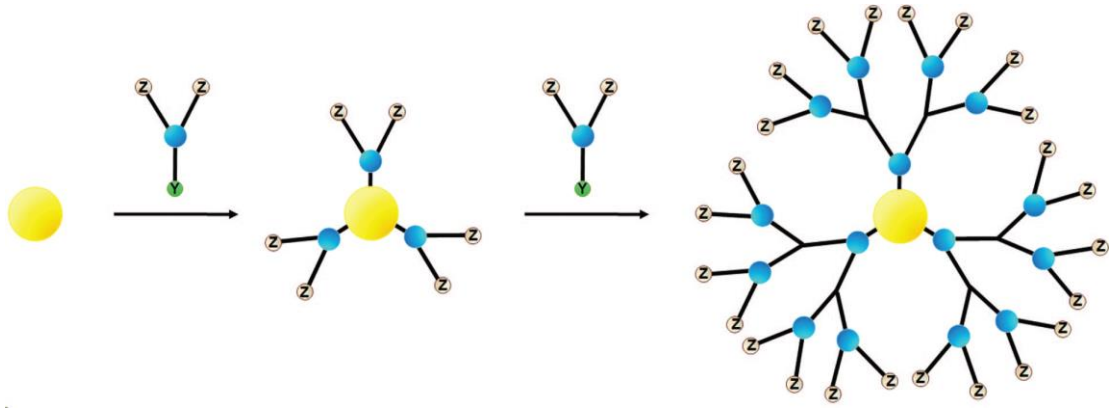
Dendrimerlerin Sentezlenme Stratejileri

İraksak Sentez

İraksak dendrimer sentezi dendrimer yapısının etkin bir biçimde çekirdekten periferik doğru monomer ünitelerinin basamak basamak eklenerek oluştuğu bir

yöntemdir. Spesifik olarak ıraksak sentez çok fonksiyonlu öncü çekirdek bölgesine monomer ünitelerinin bağlanmasıyla başlatılır ki burası ana dendrimerin yüzeyine yapı taşlarının ardışık bir biçimde eklenmesiyle dendrimer jenerasyonunun arttığı yerdir (Şekil 2.2). Tomalia ve diğ. N-(2-aminoetil) akrilamid monomerlerini amonyak çekirdek yapısına bağlayarak poliamidoamin (PAMAM)-NH₂ elde etmek amacıyla bu stratejiyi kullanmışlardır (10).

Her bir dallanma ünitesi akrilat esterin amonyak çekirdeğine Michael ekleme yöntemi ile eklenmesini takiben etilendiaminin fazlasıyla amidasyon işlemi yapılmak üzere iki basamaklı seri şeklinde sentezlenir. İlk basamak yarım jenerasyon dendrimer elde edilmesini sağlarken etilendiaminin eklenmesiyle tam jenerasyona geçilir.



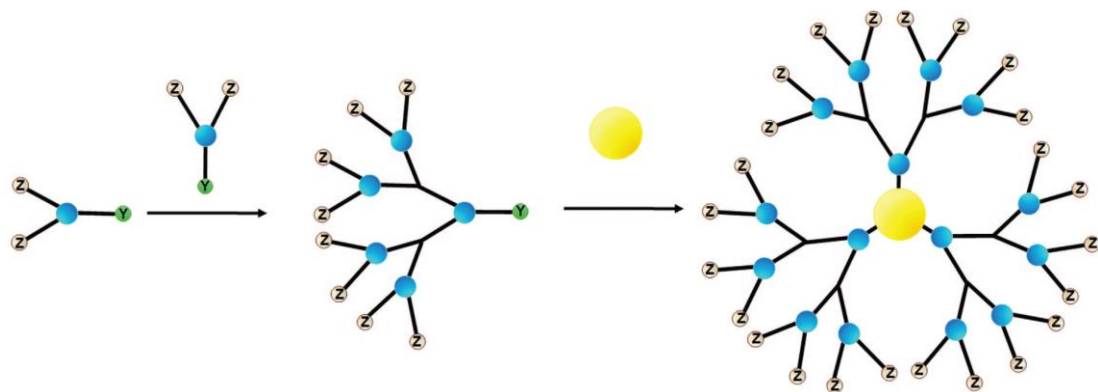
Şekil 2.2. Dendrimerlerin ıraksak yöntemle sentezinin şematik olarak gösterilmesi.

Şekil 2.2’de görüldüğü gibi bu sentez çok fonksiyonlu bir çekirdek (11) ile başlatılır, bu çekirdek dallanmış monomerin (mavi) kimyasal olarak aktive edilmiş odak noktası (Y) ile birinci jenerasyon dendrimer elde etmek üzere reaksiyona girer. Yüksek jenerasyonlar fonksiyonel kimyasal grupla (Z) sonlanan bir dendrimer üretmek üzere dallanmış monomerlerin tekrarlı bir şekilde eklenmesiyle sentezlenir.

Yakınsak Sentez

Yakınsak dendrimer sentezi ıraksak yöntemin eksikliklerini gidermek amacıyla geliştirilmiştir. Reaksiyon küçük moleküllerle başlayarak kürenin yüzeyinden iç kısımlarına doğru devam eder, son olarak bir çekirdeğe bağlanır ve son bulur (Şekil 2.3). Bu metotta safsızlıkları gidermek ve hataları yok etmek çok

daha kolaydır, bu metotla üretilen dendrimer daha simetrik ve tek tip dallanmış şekilde elde edilir. Ancak, dendrimer sentezinde bu yöntem pek kullanılmamaktadır. Bunun nedeni, bu yöntemde çekirdek etrafında toplanmalar ve sterik etkiden dolayı sınırlı olmasıdır (12). Yakınsak yönteminin kullanılmasındaki sakınca, dendrimerin büyük dendronlardan izole edilmesi için gerçekleştirilen saflaştırma işlemlerinin zor olmasıdır. Bunun sebebi sentezlenen molekül ve başlangıç dendronlarının arasındaki molekül ağırlıkları farkının az olmasıdır. İraksak yöntemde bu farklılığın çok olması diyaliz gibi basit saflaştırma yöntemlerine imkan verirken, yakınsak yöntemde bu imkandan yeterince faydalanılamamaktadır; geriye en önemli yöntem olarak kolon kromatografisi kalmaktadır (duruma göre çöktürme ve yeniden kristallendirme gibi yöntemler de sıklıkla başvurulacak tekniklerdir). Sentez basamaklarının sayısının hem yakınsak hem de ıraksak yöntemde benzer olmasına rağmen, yakınsak yaklaşımda sonuç dendrimer ürününün daha homojen bir dağılıma sahip olduğu görülmektedir (12). 1990 yılında Hawker ve Frechet işbirliği içinde polieter dendrimer sentezlemek üzere yakınsak yaklaşımla bir sentez yayınlamışlardır. Bu yaklaşımda 3,5-dihidrobenzil alkol ünitelerinin aktive edilmiş benzil bromide bağlanmasıyla birbirini izleyen jenerasyonların elde edilmesi amaçlanmıştır (13).



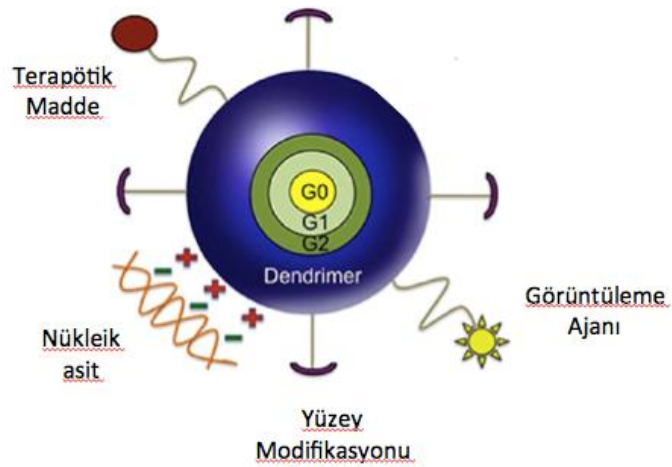
Şekil 2.3. Yakınsak yöntemle dendrimer sentezinin şematik gösterimi.

Şekil 2.3'te görüldüğü gibi, dendrimer yüzeyi başka bir monomerin fonksiyonel grubuna (Z) dallanmış monomerin kimyasal olarak aktif odak noktasının (Y) reaksiyonu ile oluşur. Dendronlardan bir dendrimer oluşturmak üzere dendronun odak noktasını çok fonksiyonel başlangıç çekirdeğine (11) bağlayarak istenilen büyüklüğe erişinceye kadar ana dendrona monomerlerin tekrarlı bir şekilde

bağlanmasıyla büyütülür.

Dendrimerlerin Üstünlükleri

Dendrimerler, monodispers (polimer gibi ortalama molekül ağırlığından değil, aslında büyük olmalarına rağmen küçük bir molekül gibi tek bir molekül ağırlığına sahip olmaları biyolojik çalışmalar için çok önemli bir üstünlüktür), üç boyutlu, yüksek oranda dallanmış, makromoleküler olarak bilinmektedir. Yüksek yükleme kapasitesi, kolay sentezlenebilir olmaları, stabiliteleri, istenildiği şekilde fonksiyonelleştirilebilir olmaları, aktif hedeflendirmedeki etkinlikleri, parenteral, transdermal ve oral uygulanabilirlikleri dendrimerlerin en önemli üstünlükleri olarak görülmektedir (Şekil 2.4). Ayrıca, dendrimerlerin kendi içinde hidrofobik bölge ve hidrofilik grupları arasında kovalan bağları bulunduğu için misel yapısı oluşturup, bu yapıyı her konsantrasyonda koruyabilmeleri dendrimerlerin üstünlükler arasında yer almaktadır.



Şekil 2.4. Terapötik madde, görüntüleme maddesi, nükleik asit ve yüzey modifiye edici gruplarla fonksiyonelleştirilmiş dendrimer bazlı ilaç taşıyıcı sistemin şematik gösterimi (14).

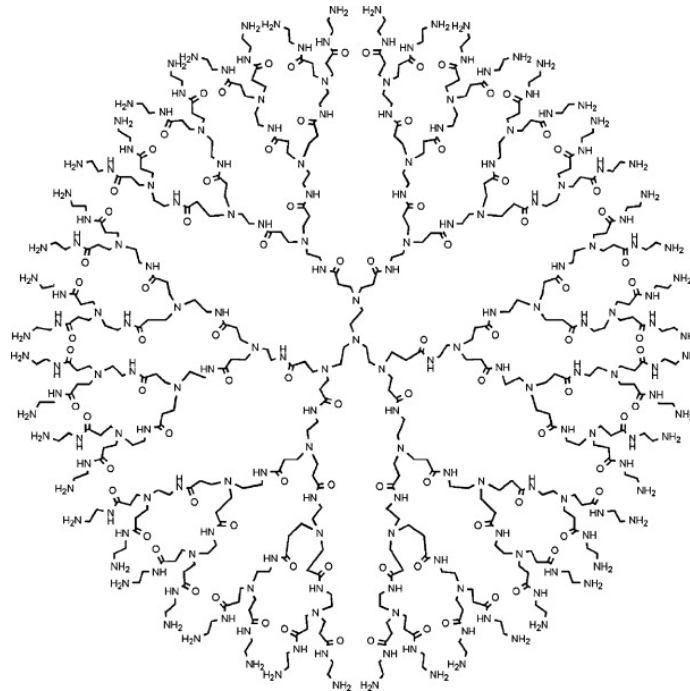
Dendrimerler; gerektiğinde suda çözünürlüğü olmayan etkin maddelerin çözünürlleştirilmesinde, teşhis işleminde, bunların yanı sıra kontrollü ve sürekli salım sağlayan sistemlerin hazırlanması ve diğer nanomedikal amaçlar için başarılı bir

şekilde kullanılabilirler. Bu nanotaşıyıcılar son zamanda, yüzeylerinin fonksiyonelleştirilmesi, antikanser ilaçların ve anti-HIV ilaçların hedeflendirilmesi için yoğun olarak araştırılmaktadırlar.

Poli(amidoamin) (PAMAM) Dendrimerleri

Poli(amidoamin) (PAMAM) dendrimerleri ilk sentezlenen ve ticari olarak bulunan dendrimer türüdür. PAMAM dendrimerlerinin sentezi bir alkildiamid çekirdeği (örneğin, etilendiamin (EDA)) kullanılarak başlatılır. Çekirdeğe Michael ekleme yoluyla metil akrilat monomerleri eklenerek dallanmış bir ara ürün elde edilir ve ardından bu ürün yüzeyinde NH_2 , OH veya COOH bulunan en küçük jenerasyon numarasına sahip dendrimere dönüştürülür (12).

PAMAM dendrimerleri tek düze, immünojenik olmayan, toksik olmayan, biyoyoumlu bir taşıyıcı sistem olarak karşımıza çıkmaktadır. Farklı moleküler yapıları içermeye elverişli dallanmış yapıları mevcuttur (Şekil 2.5). Bu yapılar yüzeye kovalan bağ ile de bağlanabilmektedir (15).



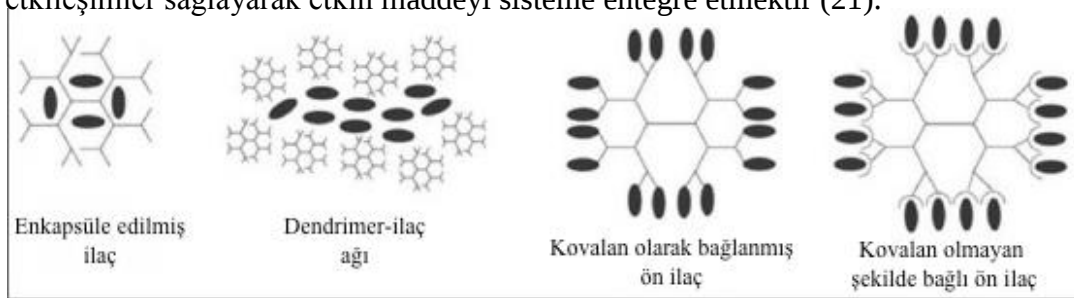
Şekil 2.5. PAMAM dendrimerin yapısı (16)

Dendrimer-İlaç Etkileşimleri

Dendritik yapının açık şekli birçok araştırmacıyı dendrimerin dalları arasına

etkin maddenin enkapsüle edilmesine yönelik çalışmalar yapmaya yöneltmiştir. Bu durum stabil olmayan ve düşük çözünürlüğe sahip olan etkin maddelerle dendrimerlerin etkileşimini sağlamak için bir potansiyel sunmaktadır. Bu gibi sistemler ilacın stabilitesini ve biyoyararlanımını artırabilmektedir. Bir etkin maddenin dendrimer içine enkapsüle edilmesi aynı zamanda etkin maddenin salımının kontrol edilmesini de sağlamaktadır. Salımın harekete geçirilmesini içeren, etkin maddenin enkapsüle edildiği çeşitli dendrimerler üzerinde araştırmalar yapılmıştır. Bu alanda yapılan birçok çalışma dendrimerlerin derin bir çekirdek ve yoğun bir kabuk kısmı olduğunu varsaymaktadır. Fakat 1990 yılından beri yapılan bazı teorik çalışmalar dendrimerlerin merkezinin maksimum yoğunlukta olduğunu, periferik doğru gidildikçe yoğunluğun azaldığını göstermektedir (17,18). Bu teorik modeller, dar açılı nötron saçılım (SANS) ve dar açılı X ışını saçılımı (SAXS) ile desteklenmiştir (19).

Dendrimerler farklı sınıftaki etkin maddelerle çeşitli etkileşim mekanizmaları sunmaktadır. Farklı tipteki ilaç dendrimer etkileşimleri Şekil 2.6'da gösterilmiştir (20). En genel anlamda bu etkileşimler fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki başlık altında sınıflandırılabilirler. Bunlardan ilki dendrimerin dalları arasındaki internal boşluklara etkin maddenin elektrostatik etkileşimi ile bağlanması diğeri ise etkin maddenin dendrimer yüzeyine bağlanması. Etkin maddenin dendrimer yüzeyinde bulunması iki yaklaşımla gerçekleştirilebilmektedir. Bunlardan ilki kimyasal olarak güçlü kovalant bağların kurulması, diğeri ise, yüzeyde elektrostatik ve iyonik etkileşimler sağlayarak etkin maddeyi sisteme entegre etmektir (21).



Şekil 2.6. İlaç-dendrimer etkileşimlerinin farklı tipleri. Koyu renkli oval simgeler etkin maddeyi temsil etmektedir (22).

Etkin maddenin molekül ağırlığının artmasıyla, dendrimer ilaç etkileşiminden dolayı, hidrodinamik hacim artar, bu da inklüzyon kompleksinin kan dolaşımında

daha uzun süre kalmasını, ilacın yavaş elimine olmasını sağlar. Bu sayede sitotoksiste düzeyi azalır, etkin maddenin dozu azaltılabilir (23).

Fiziksel Etkileşimler

Küçük organik moleküllerin dendrimere enkorpore edilmesi dendrimer yapısı içerisindeki spesifik gruplarla bağ kurulmadan sadece fiziksel olarak hapsedilmesi sonucunda gerçekleşebilir. Dendrimerler, çekirdek bölgesinin etrafında bulunan boş kaviterlerinin içerisine konuk-konakçı etkileşimleri ile hidrofobik/hidrofilik moleküllerin enkorporasyonunu sağlamak üzere dendritik kutular ve tek molekül miseller olarak kullanılabilirler (24,25).

Jansen ve diğ. ilk olarak poli(propilenimin) (PPI) dendrimerlerine tert-butiloksikarbonil gruplarını kullanarak ve Bengal gülü boyasını enkapsüle ederek yüzeyde çok sayıda amino gruplarına sahip olan stabil dendritik kutu (dendritic box) üretmişlerdir (26). Dendritik tek molekül miseller hidrofobik bir çekirdek bölgesini çevreleyen hidrofilik kabuk kısmından meydana gelirler. Bu yapıları onlara konvansiyonel polimerik misellerden daha üstün olmalarını sağlar. Bu üstünlükler arasında en önemlisi dendrimerlerin kendi içinde hidrofobik bölge ve hidrofilik grupları arasında kovalan bağları bulunduğu için misel yapısını her konsantrasyonda koruyabilmeleri yer almaktadır.

Kimyasal Etkileşimler

Fiziksel etkileşimlere alternatif teşkil etmek üzere, dendrimerlerin çok değerlikli yapıları dendrimerlere perifer bölgelerinden ilaç moleküllerinin bağlanmasını sağlayarak kompleks yapısı oluşturmasını sağlar. Sonuçta oluşan kompleksler ilaç ve dendrimer arasındaki elektrostatik etkileşimler veya ilacın dendrimere konjugasyonu yolu ile oluşabilmektedir. Elektrostatik etkileşimler aracılığı ile birçok iyonlaşabilen etkin madde dendrimerlerin yüzeyinde bulunan çok sayıdaki iyonlaşabilen grup ile kompleks oluşturabilir. PAMAM dendrimerlerinin yüzeyinde primer; çekirdek bölgesinde ise tersiyer amin grupları yer alırken her iki bölge de titre edilebilmektedir ve pKa değerleri sırasıyla 10,7 ve 6,5'tir (19). Hem yüzeyde hem de çekirdek bölgesinde iyonlaşabilen gruplara sahip olduğu için bu dendrimerler ilaç etkileşimleri için imkanlar sunmaktadır. İbuprofen (27), piroksikam

(28), indometazin (29), benzoik asit (30) elektrostatik etkileşimler aracılığı ile stabil kompleksler oluşturmuştur.

Etkin maddeler ya da hedeflendirme ligandları dendrimerlere PEG, p-amino benzoik asit, p-amino hippürik asit ve lauril zincirleri gibi ara parçalar ile ya da amid ve ester bağları gibi biyoparçalanabilir bağlarla kovalan olarak konjuge edilebilmektedir. Bu ön ilaç yaklaşımının ilaçların stabilitesini artırdığı ve onların salım kinetiklerini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir. Birçok araştırmacı penisilin V'yi (31), venlafaksini (32), 5-aminosalisilik asidi (33), naprokseni (34), propranololu (35) PAMAM dendrimerleri ile başarılı bir şekilde konjuge etmiştir. Kompleksler etkin maddelerin saf halleri ile karşılaştırıldığında çözünürlüklerinin artırıldığı ve kontrollü salımın iyileştirildiği görülmüştür. Bunların yanı sıra sisplatin (36), doksorubisin (37), epirubisin (38), metotreksat (39) ve paklitaksel (40) gibi birçok antikanser ilaç da dendrimerlere konjuge edilmiş ve hedeflendirme amacıyla kullanılmıştır. Örneğin epirubisin ön ilaç olarak dallarında aminoadipik asit içeren PEG dendrimerleri ile konjuge edilmiştir. Bu konjugatların kanda kalış süreleri ve terapötik etkileri artmıştır. Bu çalışma PEG dendrimerlerinin kimyasal degradasyona karşı etkin maddelerin stabilitesini artırdığı için büyük moleküllerin ön ilaç formunun geliştirilmesinde kullanılabileceğini ortaya koymuştur (38).

İnklüzyon Kompleksleri

İnklüzyon kompleksi; hidrofobik bir konuk molekülün ya da parçasının, konakçı molekül tarafından herhangi bir kovalan bağ oluşturmaksızın lipofilik iç boşluğunda hapsetmesi ile oluşan bileşiklerdir. İnklüzyon kompleksi oluşturarak çözünürlüğü az moleküllerin çözünürlüğünü artırma, ısı, ışık ve oksidasyona karşı dayanıksız olan moleküllerin stabilizasyonunu sağlama, süblimleşme kontrolü, geçimsizliği olan bileşiklerin fiziksel izolasyonu, kromatografik ayrımlar, hoş olmayan koku ve kötü tatları maskeleyen, kontrollü ilaç salımı gibi çeşitli fizikokimyasal özellikleri iyileştirilip konuk molekülün kullanımını kolaylaştırmaktadır. Başta eczacılık ve gıda olmak üzere kozmetik, kimya, tarım ve tekstil gibi birçok endüstriyel alanda kullanılabilmektedir (41).

Tez çalışmasında kullanılan etkin madde olan gemsitabin HCl dendrimerin dalları arasına enkapsüle edilerek inklüzyon kompleksi hazırlanmıştır. İnklüzyon

komplekslerinin kimyasal konjugasyon yolu ile hazırlanan sistemlere üstünlükleri bulunmaktadır. Bu üstünlükler, etkin maddenin çözünürlüğünün artırılması ve hedef bölgeye ulaştığında etkin maddenin kolay salımı söz konusu olmaktadır. Kimyasal yolla etkin maddenin konjuge edildiği sistemlerde, hedef bölgeye kadar hiçbir kayıp olmadan etkin maddenin taşınması her ne kadar bir üstünlük olarak görülse de, yapılan çalışmalar hedef bölgeye ulaşan sistemden etkin maddenin ayrılması ile ilgili sorunlar yaşandığını göstermektedir. Kurulan bağın kırılması için enzimlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Ozturk ve diğ.'nin 2014 yılında yayınlanan bir çalışmada Jeffamine çekirdek yapısında 2,5-4,5 jenerasyon aralığında anyonik özellikte PAMAM dendrimerler kullanılarak naproksen baz ile inklüzyon kompleksleri hazırlanmıştır. Bu çalışmada suda çözünmeyen bir etkin madde olarak naproksen model ilaç olarak seçilmiş olup, naproksenin çözünürlüğünü artırarak oral kullanımına olanak sağlayacak bir sistem geliştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, hazırlanan inklüzyon komplekslerinin suda çözünürlüğü düşük etkin maddelerin oral kullanımı için umut verici olduğunu göstermiştir (11).

İnklüzyon Komplekslerinin Kullanım Alanları

İnklüzyon kompleksinin 1970'lerden beri ilaç, gıda, kozmetik gibi birçok alanda kullanımları araştırılmakta ve geliştirilmektedir. Bunlara olan ilgi Japonya'da daha erken başlamış ve hızlı ilerlemişken, Avrupa ve Amerika'daki gelişmeler biraz daha yavaş kalmıştır (18).

İnklüzyon kompleksleri molekülün aşağıdaki özelliklerinde değişiklik yapabilmekte ve kullanımı açısından avantaj sağlamaktadır.

- Işığa veya oksijene duyarlı maddelerin stabilizasyonunda
- Konuk moleküllerin kimyasal reaktivite modifikasyonunda
- Çok uçucu maddelerin bağlanması
- Maddelerin çözünürlüğünün artırılmasında
- Sıvı maddelerin modifikasyonu ile katı hale getirilmesinde
- Mikroorganizmalar tarafından maddelerin parçalanmasına karşı korunmasında
- Kötü koku ve tatları maskelemede

- Pigment veya renk maddelerinin maskelenmesinde
- Konuk molekül ile siklodekstrinin katalitik aktivitesinde

Bu özellikler ile inklüzyon kompleksleri eczacılık, gıda, kozmetik, analitik kimya, tarım alanındaki uygulamalar için konuk molekülün uygun hale gelmesini sağlamaktadır.

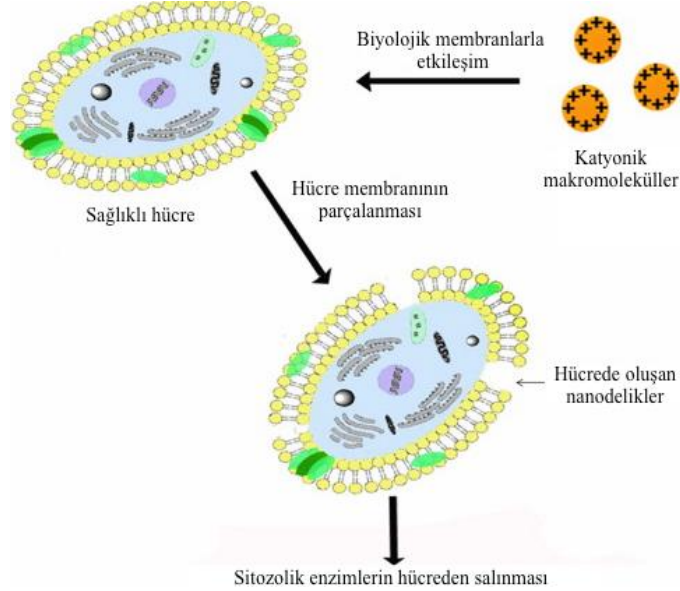
Dendrimerlerin Toksisitesi

Dendrimerler teşhis ve tedavi amaçlı kullanım için oldukça umut verici nanomateriyallerdir. Ağaç benzeri eşsiz yapıları onlara istenen birçok özelliği sunmaktadır. Özellikle monodispers olmaları ve ayarlanabilir/modifiye edilebilir yüzey gruplarının olması, dendrimerleri biyomedikal uygulamalar için oldukça cazip hale getirmektedir.

Dendrimerlerin biyomedikal uygulama alanındaki potansiyelinin doğru kullanılabilmesi için iyi bir optimizasyon gerekmektedir. Çünkü nanoboyutundaki taşıyıcılar kendileri de nanoskalada yer alan plazma membranı, hücre organelleri (endozom, mitokondri, nükleus) gibi hücre komponentleri ve proteinler, enzimler ile etkin ve spesifik bir şekilde etkileşebilmektedir (42). Bilim adamları birçok nanopartikülü spesifik olmayan bir şekilde geliştirmektedir. Nanopartiküllerin nanoskaladaki boyutları, onların hücre zarından geçmesini ya da hücre zarı ile etkileşmesini sağlamaktadır. Nanotaşıyıcılara ilişkin bu durum onların hücre transfeksiyon stratejisinde kullanımında ve in vivo gen taşınmasında kullanılmasında önemli bir yer teşkil etmektedir (43). Ancak, nanotaşıyıcıların hücre tarafından spesifik olmayan alımları sitotoksikite konusunu gündeme getirmektedir.

Dendrimerlerin ilaç ve biyomedikal alandaki geniş çaplı uygulama çalışmalarına rağmen, terminal $-NH_2$ grubu ve çoklu katyonik yüke sahip olması, dendrimerlerin klinikte kullanımını sınırlayan bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır (44). PPI, PAMAM ve PLL gibi dendrimerler katyonik yüzey yükünden dolayı in vitro sitotoksikite göstermektedirler (45). Uç kısımlarında serbest amin grupları yer alan dendrimerlerin konsantrasyon ve jenerasyonuna bağlı toksisitesine ilişkin çalışmalar yer almaktadır (46). Chen ve diğ. 2004 yılında, guanidin, karboksilat, sülfonat, fosfat gibi gruplar taşıyan katyonik özellikteki dendrimerlerin, anyonik ya da PEGlenmiş dendrimerlere göre daha toksik olduğu sonucuna varmıştır.

Sadece dendrimerler değil, diğer katyonik makromoleküller de hücrenin lizisi ile sonuçlanan hücre membranında destabilizasyona neden olmaktadır (47,48). Bu buluş benzer alanlarda çalışan bilim adamları için önemli bir yer tutmaktadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Katyonik makromoleküllerin biyolojik membranlarla etkileşim mekanizması (16).

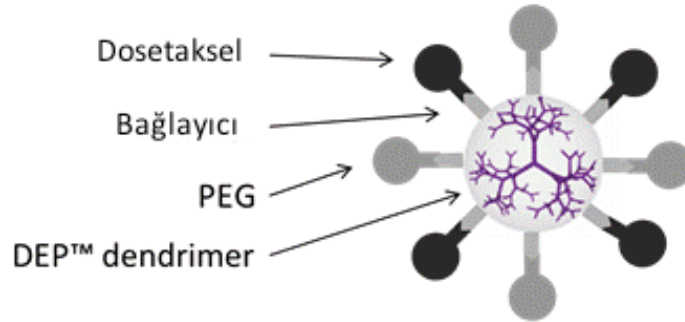
Malik ve diğ. (44) karboksilik asit son gruplu PAMAM dendrimerlerin 2 mg/mL'ye kadar hemolitik etki göstermediğini, ancak amin son gruplu tam jenerasyon PAMAM dendrimerlerin 1 mg/mL'nin üzerinde litik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Jevprasesphant ve diğ.'nin (49) yaptığı bir diğer sitotoksosite çalışmasında ise tam jenerasyon (katyonik) ve yarı jenerasyon (anyonik) PAMAM dendrimerlerin sitotoksiteleri Caco-2 hücreleri üzerinde incelenmiş ve katyonik olanlar daha toksik bulunmuştur.

Dendrimerlerin Piyasa Preparatları

Vivagel® Starpharma firmasına ait antimikrobiyal ajan olarak çeşitli cinsel hastalıklarda kullanılmak üzere geliştirilmiş yenilikçi bir üründür. SPL7013 ya da diğer adıyla astodrimmer sodyumun, laboratuvar çalışmalarında antiviral ve antibakteriyel etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Çeşitli klinik çalışmalarda ise, güvenilirliği ve etkinliği başarılı bir şekilde test edilmiştir. Vivagel, mukoadesiv bir jel olarak geliştirilmiş olup, Vivagel'in vajinal olarak uygulandığında bakteriyel

vajinozisin belirti ve semptomlarını rahatlattığı aynı zamanda tekrar oluşma riskini azalttığı klinik olarak gösterilmiştir. Bir nanoteknoloji ürünü olan SPL7013 HIV ve HSV'ye karşı antiviral etki gösterebilmesi ve insanlarda kullanımının güvenli olabilmesi için özel olarak tasarlanmış bir dendrimerdir.

Starpharma firmasının geliştirmekte olduğu bir diğer dendrimer formülasyonu ise, dosetaksel'in dendrimer-dosetaksel formu olarak bilinen DEPTTM'nin faz 1 klinik denemeleri devam etmektedir. Dosetaksel meme, akciğer ve prostat kanserlerinin de aralarında yer aldığı geniş çaptaki solid tümörler için kullanılmaktadır. Dosetaksel Sanofi Avnetis firması tarafından Taxotere® ismiyle pazara sunulmuş olup, 2010 yılındaki satışı 3 milyar Amerikan Dolarını bulmuştur. DEPTTM'nin klinik öncesi denemeleri etkinlik ve toksisite açısından Taxotere®'e göre daha başarılı bulunmuştur. Taxotere®'in en önemli doz kısıtlayıcı toksisitelerinden birisi olan nötropeni DEPTTM'de gözlenmemiştir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Faz 1 klinik çalışma evresindeki dendrimer-dosetaksel molekülünün yapısı (50).

Şekil 2.8'de yapısı verilen her bir DEPTTM dosetaksel (dendrimer-dosetaksel) molekülü, dendrimer yapı iskelesine bağlı dosetaksel içermektedir. Dosetaksel ile dendrimer arasındaki bağlayıcı dosetakselin kontrollü salımı için tasarlanmıştır.

2.1. Tümöre İlaç Hedeflendirilmesi

Hedeflendirme, etkin maddeyi etki bölgesindeki hücre ya da dokuya yönlendirme stratejisidir. Kanser tedavisinde, sağlıklı dokuları, kemoterapötik maddenin toksik etkilerinden korumak amacıyla, hedeflendirme oldukça faydalı bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır (51). İlaç hedeflendirmesinin amacı, etkin

maddenin, doğru zaman periyodunda, doğru konsantrasyonda, doğru yere taşınmasıdır (52).

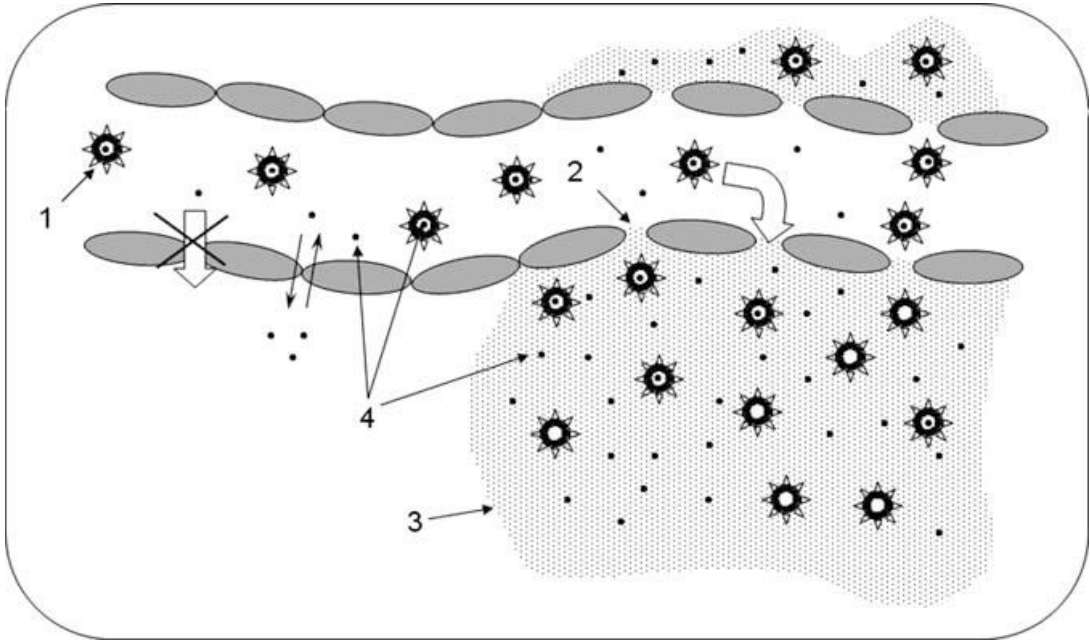
Geçtiğimiz birkaç on yıllık süreçte, birçok farklı hastalığın moleküler düzeyde anlaşılmasına yönelik ilerlemeler kaydedilmiştir. Kanserde, malign dönüşüm ve tümör oluşumuna yönelik genetik ve (pato-)fizyolojik süreçlerdeki yeni bilgiler, yeni kemoterapötik ilaçların geliştirilmesi ile sonuçlanmıştır. Büyüme faktörü reseptör inhibitörü Herceptin, proteazom inhibitörü Velcade, histon deasetilaz inhibitörü Vorinostat ve antianjiyogenik ajan Avastin gibi moleküler düzeyde hedeflendirilmiş terapötikler, aşırı miktarda büyüme faktörü ekspresyonu, büyüme faktörlerinin apoptozis ve antiapoptozis arasında gösterdiği dengenin bozulması gibi kanserin ayırıcı özellikleri ile daha selektif olarak etkileşmektedir (53,54). Moleküler düzeyde hedeflendirilmiş terapötiklerin farmakolojik ve/veya fizyolojik olarak daha etkin bir etki mekanizmasına sahip olması, kanser hücrelerini hem in vitro hem de in vivo ortamda seçici olarak daha fazla öldürmesini sağlamaktadır. Böylece sistemik antikanser tedavinin toksisitesi ve etkinliği arasındaki denge geliştirilmiş olur (55-57).

Etkin maddelerin tümöre nanotaşıyıcılar aracılığı ile hedeflendirilmesi konusunda yıllar içinde çeşitli yaklaşımlar benimsenmiştir. Bunlar kanser hücrelerine pasif ve aktif hedeflendirme, endotel hücrelerine aktif hedeflendirme olarak sınıflandırılabilir (58).

2.2.1. Pasif Hedeflendirme

Kanser tedavisinde tümöre hedeflendirmeyi amaçlayan çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlardan ilki artan geçirgenlik ve tutulma (EPR) etkisidir (Şekil 2.9). EPR etkisinde tümör damarları moleküllerin girişine izin verirken, lenfatik drenajın olmamasından dolayı tümör dokusuna taşınmış olan maddenin tutulması ve tümör dokusunda birikimi söz konusudur (51). Bu durum birçok tümörde (59,60) ve infarktüs geçirmiş bölgede (61,62) açıkça gösterilmiştir. Sonuç olarak, bu bölgelerde 10-500 nm partikül boyut aralığındaki miseller, nanopartiküller, lipozomlar damar yatağında kalıp, doku içinde birikebilirler. Bu büyük (polimerik) moleküllerin/partiküllerin terapötik madde ile yüklü olduğunu varsayarsak, bu

partiküller etkin maddeyi geçirgenliği artmış bir damar ile hedef bölgeye taşırlar ve ardından etkin maddenin salımı gerçekleşir.



Şekil 2.9. Artan geçirgenlik ve tutulma etkisinin veya pasif hedeflendirmenin şematik gösterimi (1) İlaç yüklü nano taşıyıcı; normal endotelden geçemez, sadece küçük moleküller ve serbest etkin madde (4) geçebilir, normal endotelden belirli bir miktarda her iki yönde de hareket edebilir; (2) tümör, infarkt ya da inflamasyon gibi (3) patolojik durumlarda gözlenen endotelial hücreler arasındaki boşluklar, bu boşluklar aracılığıyla nanopartiküller taşınabilir ve burada birikebilirler böylece yüksek ilaç konsantrasyonu elde edilir (63).

Artan geçirgenlikteki damarın açıklığı farklı durumlar için değişkenlik gösterdiği için, hazırlanacak olan nanopartiküllerin boyutu pasif hedeflendirme de ya da diğer bir deyişle EPR etkisinde kontrol edilmesi gereken bir parametre olarak bilinmektedir. Ayrıca, pasif hedeflendirmeden faydalanılarak ilaç taşınmasının gerçekleştirileceği durumlarda nanopartikülün kan dolaşımında uzun süre kalabilecek özellikte olması gerekmektedir. Nanopartiküllere kan dolaşımında uzun süre tutmayı sağlayabilmek için genellikle PEG gibi suda çözünen, esnek zincir yapısına sahip polimerler kullanılarak nanopartiküllerin yüzeyi maskeleyme amacıyla modifiye edilmektedir.

Pasif ilaç hedeflendirilmesinde kullanılmak üzere onay almış Myocet (doksorubisin içeren lipozom formülasyonu), Daunoxome (daunorubisin içeren lipozom formülasyonu), Abraxane (albumin bazlı paklitaksel), Genexol-PM (paklitaksel içeren polimerik misel), Doxil (doksorubisin içeren PEGlenmiş lipozom), Oncaspar (PEG-L-Asparaginaz) formülasyonları klinikte kullanılmaktadır. Ayrıca faz çalışmaları süren nanotaşıyıcıların sayısı da oldukça fazladır (58).

Dendrimerlerin Pasif Hedeflendirilmesi

Dendrimer bazlı ilaç taşıyıcı sistemleri de içeren terapötik makromoleküller damar dışına çıkabilmek ve tümör dokusunda akümüle olabilmek için tümör dokusunun patofizyolojik özelliği olan sızıntılı damar yapısını kullanır. Tümör dokusunda akümüle olan dendrimer bazlı ilaç taşıyıcı sistemin miktarı, sistemin boyutu, molekül ağırlığı, yüzey yüküne bağlıdır. Yüzey yükü ayrıca sistemik dolaşımda kalma süresine, endotel bariyerlerden geçişine, spesifik olmayan tanınmasına ve RES tarafından alınmasına etki eder. El-Sayed ve diğ., partikül boyutu, molekül ağırlığı ve yüzey yükünün floresan olarak işaretlenmiş PAMAM-NH₂ (G0-G4) dendrimerinin epitel ve endotel bariyerlerden geçişi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre dendrimerin boyutunda ve molekül ağırlığındaki artış, mikrovasküler endotelden geçiş zamanını uzatmıştır. Kobayashi ve diğ.'nin yaptığı bir diğer çalışmada ise, gadolinyum ile fonksiyonelleştirilmiş 2. jenerasyon amin son gruplu dendrimerlerden başlanarak 10. jenerasyona kadar deneyler yapılmıştır. İntravenöz uygulamayı takiben 2-4. jenerasyon aralığındaki dendrimerler 3 dakika sonra idrarla atılırken, büyük hidrodinamik hacimlerinden dolayı 5. jenerasyondan daha büyük olanlar sınırlı renal sekresyona uğramışlardır. Tüm bu sonuçlar, dendrimerlerin boyut ve hidrodinamik çaplarının onların mikrovasküler endotelden geçişi üzerine etkili olduğunu ortaya koymaktadır (12).

2.2.2. Aktif Hedeflendirme

Polimer-ilac konjugatlarının kanser hücrelerine aktif hedeflendirilmesi genellikle, vitaminler, karbonhidrat artıkları, peptidler ve antikorlar gibi bilhassa kanser hücresinin yüzeyinde fazla miktarda eksprese edilen tümöre spesifik ligandların konjugasyonu ile başarılmaktadır. Kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan

bu reseptörlere hedeflendirme ligandlarının bağlanması reseptör aracılı endositozu ve konjugatın tamamının kanser hücresi içine alınmasını tetikler (12).

Aktif hedeflendirme stratejisi, tanıma ligandları kullanılarak etki bölgesine etkin madde-nanotaşıyıcı konjugatının taşınmasına dayanır. Konjugatların yüzeyine antikorlar, düşük moleküllü ligandlar, örneğin folik asidler ve peptidler bağlanır. Aktif hedeflendirme stratejisi, fiziksel uyarıların (örneğin sıcaklık, pH, manyetik alan) kullanılmasıyla da elde edilebilir (64). Tümördeki reseptöre ya da antijene spesifik olarak hedeflendirmede terapötik maddenin direkt tümör hücrelerine yönlendirilmesi amaçlanmaktadır. Tümör hücreleri bir takım eşsiz reseptör ya da antijenleri normal seviyede ya da çok yüksek seviyede eksprese etmektedir. Bu yapılar aydınlatıldığı için antikorlar, küçük moleküller ya da hedef bölgeyi tanıyıp oraya bağlanabilecek peptidler kullanılarak tümöre hedeflendirme yapılabilir. Bu yaklaşımda, azalan özgünlük, azalan çözünürlük ve sınırlı ilaç taşınması gibi bir takım sınırlamalar yer almaktadır. Bu durum, araştırmacıları bu sorunların üstesinden gelip, uzun süre kan dolaşımında kalacak ve etkin maddeyi yüksek miktarda taşıma imkanı sunan yeni taşıyıcı sistemler bulmaya teşvik etmektedir. Makromoleküler taşıyıcının çözünür halde kalması, taşıyıcı sistemin terapötik maddeyi hedef bölgeye ulaşmaya kadar salmaması bu uygulamanın amaçları arasında yer almaktadır. Taşıyıcı sistemde hedef bölgeye ulaşmadan önce oluşabilecek herhangi bir degradasyon ya da erken salım, sistemin hedeflendirme etkinliğini azaltır ve etkin maddeye bağlı yan etkilerin artmasına neden olur. Bu nedenle, hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistem için makromoleküler sistemin stabilitesi öncelikli bir hal almaktadır.

İlaç piyasasında tümöre aktif hedeflendirme sağlayan onay almış antikör temelli nanotaşıyıcılar yer almaktadır. Bunlara örnek olarak, Ontak (CD25'e hedeflendirilmiş difteri toksin-IL2 füzyon protein), Mylotarg (CD33'e hedeflendirilmiş ozogamisin-gemtuzumab), Zevalin CD20'ye hedeflendirilmiş yttrium-90-ibritumomab tiuksetan), Bexxar (CD20'ye hedeflendirilmiş iyot-131-tositumomab) verilebilir. Bunlara ilave olarak faz çalışmaları süren (SGN-35, AGS-5ME) tümöre hedeflendirilmiş nanotaşıyıcılar da bulunmaktadır (58).

Aktif Hedeflendirmede PEGilasyonun Önemi

PEG toksik, immünojenik ve antijenik olmayan, suda yüksek çözünürlüğe sahip, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylı bir polimerdir. Günümüzde ilaç taşınmasında önemli bir yeri bulunan PEGilasyon ile peptit ve proteinlerin terapötik kullanım potansiyelleri artmıştır (65). 1950’li yılların sonlarına doğru proteinlerin modifikasyonuna yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Protein moleküllerinin yapı-etki ilişkisinin analizini kolaylaştırmak amacıyla teknikler geliştirilmiştir. 1970’li yıllardan itibaren PEG gibi sentetik makromoleküllerin proteinlere konjugasyonu ile ilgili çalışmalar yayınlanmaya başlamıştır. Protein modifikasyonlarında amaç immünoreaktivliğin veya immünojenliğin azaltılması yani bağışıklık sisteminin hedef proteine verdiği cevabı azaltmak ve medikal işlemlerde immünoglobulin E (Ig-E) üretiminin baskılanması olmuştur. İlk kez 1977 yılında serum albümini ve katalaz enzimine PEG’in kovalan olarak bağlanması antikorlara karşı immünoreaktivliği azalttığı gösterilmiştir. PEGilasyon basitçe protein, peptit veya bunların dışındaki moleküllerin bir veya birden çok PEG zincirinin bağlanması ile modifikasyona uğramaları olarak tanımlanmaktadır.

Aktif hedeflendirmede PEGilasyonun öneminin vurgulandığı bir derlemede tümöre spesifik ilaç taşınmasının, hazırlanan komplekse RDG peptit, epidermal büyüme faktörü (EGF), folat, transferrin (Tf) ya da antikor veya antikor fragmanı ilave edilerek başarılabileceğini bildirmektedir. Birçok durumda, ligand-reseptör etkileşimi kompleksin tümör hücreleri tarafından reseptör aracılı endositoz etkin bir biçimde alınmasıyla sonuçlanmaktadır. Şekilde de görüldüğü gibi, polimer kompleksinde ligandın varlığı kompleksi tümöre yönlendirmektedir (66) (Şekil 2.10), PEG’in varlığı ise kanda kalış süresini artırdığı için hedeflendirmenin etkinliği PEG’in varlığında artmaktadır. Barlett ve diğ. (67), Kirpotin ve diğ. (68) yaptıkları çalışmalarda, ligandın tümör lokalizasyonunu artırmadığını, nanopartiküllerin tümör hücreleri tarafından alımını artırdığını ortaya koymuşlardır. Bunun tam tersi, Wu ve diğ.’nin (69) ve diğer araştırmacıların yaptığı çalışmalar (70,71), hedeflendirme ligandının her ne kadar nanokompleksi tümöre yönlendirmese de, ligandın varlığının tümör lokalizasyonunu artırdığı yönündedir.

Partikül	Partikülün Tanımı	Kandan temizlenme hızı	Tümör Lokalizasyonu
	Çıplak nanopartikül (Hedeflendirme ligandı ya da PEG içermiyor)	Hızlı temizlenme	Düşük
	Hedeflendirme ligandı ile modifiye edilmiş nanopartikül (PEG içermiyor)	Hızlı temizlenme	EPR etkisinden ve tümör hücrelerine ligandın bağlanmasından dolayı yüksek
	PEGlenmiş nanopartikül (Hedeflendirme ligandı içermiyor)	Uzun kalış süresi	EPR etkisinden ve kan dolaşımında uzun kalış süresinden dolayı yüksek
	Hedeflendirilmiş ve PEGlenmiş nanopartikül	Uzun kalış süresi	EPR etkisinden, kan dolaşımında uzun süre kalmasından ve tümör hücrelerindeki reseptörlere bağlanmasından dolayı yüksek

Şekil 2.10. Farklı nanopartiküllerin tümör lokalizasyonu ve kanda kalış süreleri (66).

Dendrimerlerin sitotoksitesini ve hemolitik toksisitesini azaltmanın en önemli yolu, yüzeydeki amin ya da katyonik grupları nötral ya da anyonik gruplarla modifiye etmektir. Dendrimerlerin hücre membranları ile elektrostatik etkileşimini engellemek taşıyıcı sistemin endotele vereceği hasarı önlemek açısından önemli bir adımdır (72). Örnek verilecek olursa, dendrimerin yüzeyine PEG ile bağlamak ya da konjuge etmek toksisiteyi önemli ölçüde azaltır (49,72).

Biyoyumlu PEG, PAMAM dendrimerlerinin modifikasyonunda muhtemel sitotoksite, hemolitik toksisite sorunlarının üstesinden gelmek, etkin maddenin ve taşıyıcı sistemin çözünürlüğünü artırmak, partiküllerin agregasyonunu minimize etmek, retiküloendotelial sistem tarafından opsonizasyonu azaltmak ve EPR etkisi ile tümöre alımı artırmak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (73).

Etkin madde ve PEGlenmiş PAMAM dendrimeri arasına aside duyarlı bağ kurmak ideal bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirmek açısından önemlidir. Bu sayede ilaç taşıyıcı sistem kan dolaşımında stabil kalırken, tümör bölgesine ulaştığında etkin maddenin asit ortamda salımı gerçekleşebilecektir (74).

Aktif Hedeflendirme Stratejileri

Aktif hedeflendirme, hasta hücrelerde fazla miktarda bulunan moleküllerin tanınmasıyla başılır. Bu tanınma ligand reseptör, antijen-antikor etkileşimleriyle ya da aptamerler aracılığı sağlanarak hedeflendirme gerçekleştirilir. Terapötik madde hücre veya dokuya spesifik ligand taşıyan taşıyıcıya konjuge edilerek aktif olarak hedeflendirilebilir. Bu sayede etkin maddenin istenilen bölgede akümüasyonu sağlanmaktadır. Mikronaltı boyuttaki nanosistemlerin farklı hedeflendirme ligandları ile konjuge edilebiliyor olması fizyolojik bariyerlerin aşılması ve farklı dokulara giriş sağlaması için önemli bir fırsat sunmaktadır. Bu sayede nanosistem etkin hücre alım ve hücre içi internalizasyona uğrar. Choi ve diğ.'nin (75) PEGlenmiş ve farklı miktarda insan Tf ile hedeflendirilmiş altın nanopartikülleri yaptıkları aktif hedeflendirme çalışmasında hedeflendirilmiş nanopartiküllerin hedeflendirilmemiş olanlara göre solid tümör içerisindeki kanser hücrelerine yüksek miktarda alındıkları gösterilmiştir. Kocbek ve diğ.'nin (76) yaptığı bir diğer çalışmada ise, monoklonal antikorlar kullanılarak PLGA nanopartiküllerinin yüzeyi modifiye edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, yüzeyi modifiye edilmiş nanopartiküllerin aktif tanınmasının ve hücrelere bağlanmasının modifiye edilmemiş olanlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (77).

Hücre İçine Alım Mekanizmaları

Ökaryotik hücreler, makromolekülleri ve partikülleri, hücreyi çevreleyen ortamdan endositoz olarak isimlendirilen bir proses ile alabilme yeteneğindedirler. Endositozda, hücre içine alınacak olan materyal plazma membranı tarafından çevrelenir, ardından hücre içine doğru sindirilen materyali içeren vezikül şeklinde bir yapı oluşur. Endositoz kavramı, 1963 yılında Christian de Duve tarafından hem bakteri gibi büyük partiküllerin sindirimini hem de küçük veziküller içinde sıvıların ve makromoleküllerin alımını içerecek şekilde türetilmiştir. Bu aktivitelerden ilki fagositoz (hücrenin yemesi), ikincisi ile pinositoz (hücrenin içmesi) olarak bilinmektedir.

Fagositoz esnasında, hücreler bakteri, hücre atıkları ve hatta bütün bir hücreyi içine alır. Fagositik hücrenin yüzeyindeki reseptörlere partiküllerin bağlanması hücre zarının aktin bazlı bir hareketi olan yalancı ayak oluşumunu tetikler. Yalancı ayak

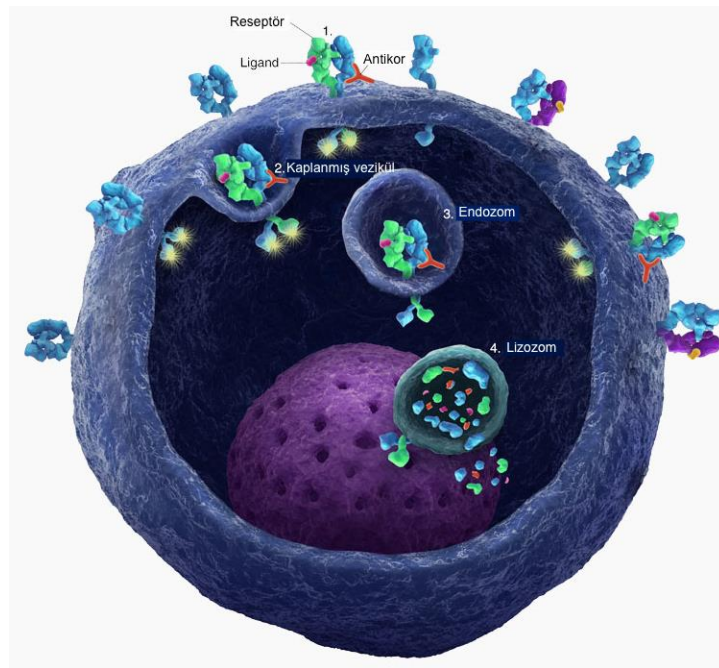
partikülü çevreledikten sonra, membranı eriyerek birleşir ve hücre içinde fagozom isimli büyük bir vezikül ($> 0,25 \mu\text{m}$) oluşmasını sağlar. Fagozom daha sonra lizozomlar ile birleşerek fagolizozomları oluşturur, bu aşamadan sonra içeri alınan materyal lizozomal asit hidrolazlar ile sindirilir. Fagolizozomun olgunlaşması sırasında, hücre içine alınmış olan bazı membran proteinleri tekrar plazma membranına döner.

Sadece özelleşmiş durumlarda rol oynayan fagositozun aksine pinositoz ökaryotik hücreler arasında oldukça yaygındır. Bu prosesin en iyi karakterize edilmiş formu ise reseptör aracılı endositozudur. Bu yolak, spesifik makromoleküllerin seçici alımını sağlayan bir mekanizma sunmaktadır. Hücre içine alınacak olan makromolekül öncelikle hücre yüzeyindeki spesifik reseptöre bağlanır. Bu reseptörler, plazma membranının klatrin kaplı çukurlar olarak isimlendirilen bölgesinde yoğunlaşmıştır. Bu çukurlar, reseptörleri ve onlara bağlı makromolekülleri (ligand) içeren küçük klatrin kaplı veziküller oluşturmak üzere membrandan tomurcuklanırlar. Ardından klatrin kaplı veziküller erken endozomlarla birleşirler. Endozomun içeriği lizozomlara ya da tekrardan plazma membranına gidecek şekilde sınıflandırılır.

Memeli hücreleri tarafından kolesterolün alımı, moleküler düzeyde reseptör aracılı endositozu anlayabilmek için anahtar bir model olarak karşımıza çıkmaktadır. Kolesterol, kan dolaşımı aracılığı ile en yaygını düşük dansiteli lipoprotein (LDL) olarak bilinen lipoprotein partikülleri formunda taşınmaktadır. Michael Brown ve Joseph Goldstein'in laboratuvarlarında yapılan çalışmalar, memeli hücreleri tarafından LDL'nin alımı için, LDL'nin klatrin kaplı çukurlarda yoğunlaşmış spesifik yüzey reseptörüne bağlanması gerekmektedir, bu basamaktan sonra endositoz ile hücre içine alınabilmektedir. Hücre içine alımda rol oynayan reseptör, plazma membranına giderken, LDL ise sonrasında hücrenin kolesterolü kullanabilmesi için lizozomlara gönderilir.

Reseptör aracılı endositoz, ökaryotik hücrelerin plazma membranlarının en önemli aktivitesidir (Şekil 2.11). Bu yolak ile hücre içine alınan 20'den fazla reseptör gösterilmiştir. Kaplı veziküllerin içerisine hücre dışı sıvılar da inkorpore olmaktadır. Bu nedenle reseptör aracılı endositoz, spesifik makromoleküllerin yanı sıra, hücre dışı sıvıların ve onların içeriklerinin de selektif olmayan bir şekilde hücre içine

girmesine neden olur. Kaplanmış çukurlar hücrenin membranının % 1-2'sini oluştururken, yaklaşık 1-2 dakikalık bir ömre sahiptirler.



Şekil 2.11. Reseptör aracılı endositozun şematik gösterimi (50).

Yapılan birçok çalışma, hücrelerin klatrinden bağımsız endositoz yollarına da sahip olduğunu göstermektedir. Örneğin, klatrin kaplı çukurlara bağlı endositoz inhibe edilerek düzenlenen bir deney koşulunda, sıvıların ve membrana bağlı bazı moleküllerin endositozunun devam ettiği gösterilmiştir. Klatrinden bağımsız endositoz yollarından birisi kalveol olarak isimlendirilen plazma membranının küçük invajinasyonları (50-80 nm çapında) ile moleküllerin alımını içermektedir. Kalveol, kolesterolün lipit parçalarından ve sfingolipitlerden zengindir ve kalveolin olarak isimlendirilen bir protein ile kaplıdır. Kalveoller, endositozu da içeren çeşitli taşıma proseslerinde ve hücre sinyalizasyonunda yer almaktadır. Buna ek olarak, büyük veziküller (0,15-5 µm çapında) makropinositoz olarak bilinen bir proses ile sıvıların alımında rol oynayabilirler. Sonuç olarak, kaltrin bağımlı endositoz hem sıvıların hem de spesifik makromoleküllerin alımı için önemli bir yolak iken, bunun yanı sıra hücreler klatrinden bağımsız farklı yolları da kullanabilmektedir.

Dendrimerlerin Tümöre Aktif Hedeflendirilmesi

Etkili bir hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistem; hedeflendirme ligandı, etkin madde, kanser görüntüleme ajanı, floresan prop gibi birçok komponenti, komponentlerin fonksiyonunu azaltmadan taşıyabilecek bir platforma gereksinim duyar. PAMAM dendrimerleri homojenliği, immünojenik olmaması, toksik olmaması, biyouyumlu olması nedeniyle bu taşıyıcı sistem özelliklerine sahiptir. Dendrimerler, yapılan araştırmalarda, etkin madde, DNA, radyonüklid, manyetik rezonans görüntüleme kontrast ajanı ve nötron yakalama tedavisinde boron olmak üzere çeşitli maddelerle konjuge edilmiştir (15). Dendrimerler, tümör yerine spesifik hedeflendirme yapabilmek için bir ligand ile de konjuge edilebilir. Ligandlar ilgili bölgedeki hücrelerin reseptörü tarafından tanınır ve etkin madde hedef bölgede yoğunlaşmış olur.

Dendrimerler, sudaki yüksek çözünürlükleri, monodispers partikül boyut dağılımları ve tek tip yapıları sayesinde özellikle antikanser ilaçların ve görüntüleme ajanlarının taşınması için çok uygun taşıyıcılardır. Bu da dendrimer bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin antikanser aktivitesinin her üretimde tutarlı olmasını sağlar. Dendrimerlerin eşsiz dallı yapısına ek olarak, yüzeyinde bulunan çok sayıdaki fonksiyonel grup terapötik maddenin direkt konjugasyonuna ya da dalları arasına enkapsüle olmasına olanak sağlar. Dendrimer bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin hücre alımının N-(2-hidroksipropil)metakrilamid (HPMA) ve PEG gibi lineer polimerlere göre önemli ölçüde fazla olduğu kanıtlanmıştır. Bu da dendrimerlerin nano boyutu ve çözelti içindeki küresel şeklinden ileri gelmektedir. Jelinkova ve diğ. antikor ile hedeflendirilmiş lineer ve dallanmış HPMA-doksorubisin konjugatlarının T-hücre lenfoması ve insan kolorektal kanser hücreleri üzerindeki toksik etkilerini karşılaştırmak üzere bir çalışma yapmışlardır (78). Dallanmış HPMA polimerleri, lineer HPMA'nın yarısı kadar bir molekül ağırlığına sahipken aynı zamanda hedeflendirme antikorunun 1,5-2 katı ağırlıktayken eşit yüzdelerde doksorubisini enkapsüle edebilmiştir. Aynı zamanda HPMA-doksorubisin konjugatları her iki hücre hattında da lineer formuna göre 3-11 kat daha fazla toksik bulunmuştur. Dahası, her iki tip polimer konjugatının da erkek Balb/c farelere tek bir intravenöz enjeksiyon uygulama sonrasında, enkorpore edilmiş doksorubisinin kan dolaşımında kalış süresi dallanmış HPMA polimer ile önemli ölçüde arttırılmıştır.

Minko ve diğ. tarafından yapılan bir başka çalışmada ise aynı miktarda paklitaksel içeren 4. jenerasyon dendrimer-paklitaksel konjugatının lineer PEG-paklitaksel konjugatı ile antikanser aktivitesi karşılaştırılmıştır. Dendrimer-paklitaksel konjugatları serbest paklitaksele göre 10 kat daha fazla toksik bulunmuştur. PEG-paklitaksel konjugatları ise serbest paklitaksele göre 25 kat daha az toksiktir (79). Minko ve diğ. aynı zamanda peptit ile hedeflendirilmiş lipozomlara enkapsüle edilmiş paklitaksel, aynı miktarda paklitaksel içeren hedeflendirilmiş 4. jenerasyon dendrimerler ve hedeflendirilmiş lineer PEG-paklitaksel konjugatlarını da antikanser aktiviteleri açısından insan akciğer kanseri üzerinde karşılaştırılmıştır. Her üç formülasyon da birbirine benzer in vitro sitotoksikite göstermiştir ve tümör hacmini azaltmıştır.

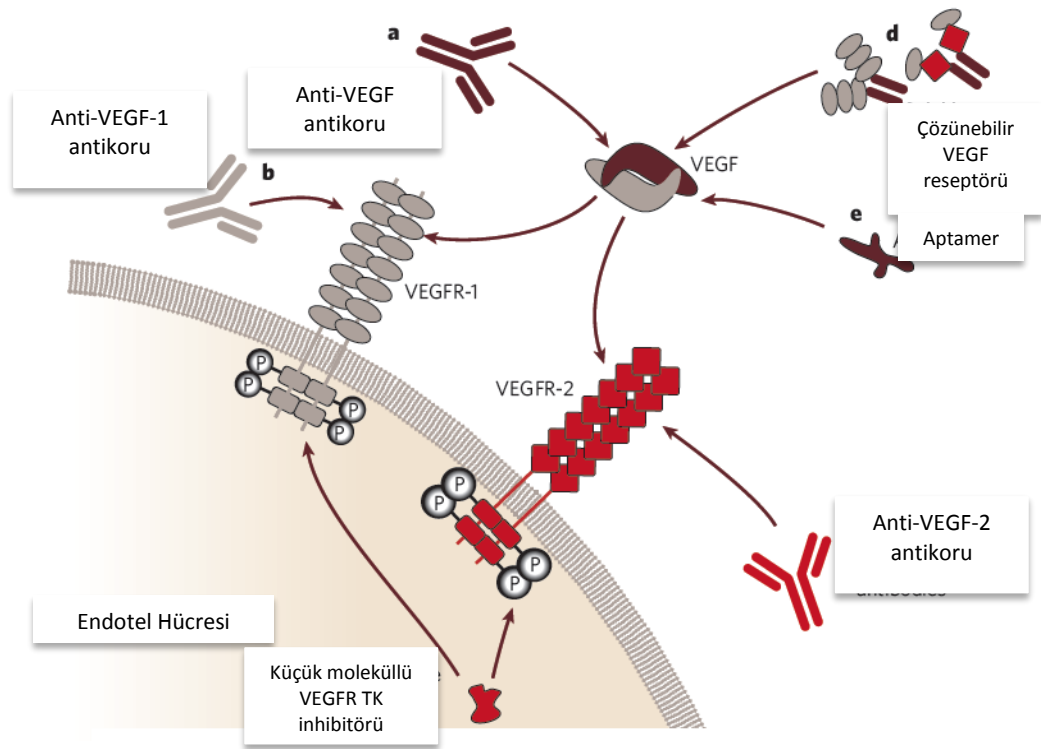
2.2. Anjiyogenez İlişkili Hedeflendirme ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-1 (Anti-VEGFR-1)

Anjiyogenez veya anjiyogenez; fizyolojik bir süreç olup, mevcut olan damarlardan filizlenme yolu ile yeni damarların oluşması, gelişmesi anlamına gelir. Anjiyogenez, büyüme ve gelişme ile yara iyileşmesi gibi süreçlerde olması beklenen bir olaydır. Bununla beraber bazı durumlarda patolojik de olabilmektedir (80-82). Anjiyogenezi tetikleyen ve önleyen faktörler arasındaki denge bozulduğu takdirde denge kimin tarafına bozulduysa ona göre anjiyogenezde eksiklik yahut fazlalık görülebilir. Kanserde, artrit, inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi inflamatuvar hastalıklarda; ve çeşitli göz hastalıklarında (makula dejenerasyonu gibi) anjiyogenez patolojik olarak meydana gelmektedir.

Tanımlanan anjiyogenik faktörler arasında vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A) sadece fizyolojik anjiyogenezde değil, patolojik anjiyogenezde de önemli rol oynamaktadır. VEGF-A iki adet tirozin kinaz reseptörüne bağlanarak onları aktive eder. Bu reseptörler VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (Flk-2)'dir. İnsan VEGFR-1'ı 1338 aminoasitten oluşur ve dört bölüme ayrılır. Bunlar, hücre dışı bölümü, transmembran bölümü, tirozin kinaz bölümü ve karboksi terminal bölgesidir. Hücre dışı bölümü 7 tane immünoglobulin benzeri bölüm taşır ve ligandlara bağlanma yeteneği 2. ve 3. bölümlerde lokalize olmuştur.

VEGF-A'nın VEGFR-1'e afinitesi çok yüksektir ve VEGFR-2'ye göre 10 kat daha fazladır.

Kanserin en önemli ayırıcı özelliği olan anjiyogenez, onkolojide terapötik yaklaşımların odağı haline gelmiştir (83). Yapılan çalışmalar, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve VEGF yollarının insan pankreas kanserinde büyük miktarda aktive olduğunu göstermektedir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörlerinin ekspresyonları pankreas kanserinin tanısında kullanılabilir. Elde edilen bir rapora göre, IV. evre pankreas kanseri olan bir hasta başta gemsitabin, 5-FU, irinotekan ve sisplatin tedavisine yanıt vermezken, VEGF-A'yı hedef alan, rekombinant humanize edilmiş monoklonal antikor olan bevacizumabın eklenmesiyle kemoterapiye yanıt göstermiştir. Bu çalışma, pankreas kanserinde önceden başarısızlığa uğramış kemoterapiye kombine olarak kullanılan bevacizumabın (anti-VEGF-A monoklonal antikor) yararlı olacağını göstermiştir (84). Solid tümörlerin gelişimi, yeterli kan akımı sağlama yeteneklerine bağlıdır. Kan desteğinin kesilmesi ile tümörün metastazı ve boyutu regüle edilebilir. Anjiyogenez, düz kasların ve endotel hücrelerinin invazyonu, migrasyonu ve proliferasyonu ile karakterize edilir ki bu durumda temel membran bozulur, yeni bir lümen yapısı oluşur. Tümör hücreleri ve konakçı hücreler, yeni oluşan lümen yapısından sızarlar ve VEGF, platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), interlekin-8 (IL-8), anjiyogenin, anjiyotropin, platelet kökenli endotel hücre büyüme faktörü (PD-ECGF), dönüştürücü büyüme faktörü- α (TGF- α), TGF- β , epidermal büyüme faktörü (EGF) ve tümör nekrozis faktör gibi çeşitli pro-anjiyogenik faktörlerin salınmasına neden olurlar. Bunlar arasında, VEGF-A anjiyogenez gelişiminde rol oynayan en önemli faktörlerdendir. Birçok araştırmacı tümör anjiyogenezinde VEGF-A'nın büyük bir role sahip olduğunu ortaya koymuştur. VEGF-A etkisini vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1 (VEGFR-1) ve VEGFR-2'ye bağlanarak gösterir. VEGFR-2, VEGF-A'nın anjiyogenik, mitojenik ve permeabilite artırıcı etkilerinin major aracısıdır. VEGFR-1'in anjiyogenezdeki önemi daha kompleksir.



Şekil 2.12. Vasküler endotel büyüme faktörü sinyalinin inhibe etmek için çeşitli stratejiler. VEGF-A (a) veya VEGF reseptörlerini (b,c) hedefleyen monoklonal antikorlar yer almaktadır. VEGF-trap gibi, şimerik çözünebilen reseptörler (d) için klinik çalışmalar devam etmektedir (85).

Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü-1, VEGF için üç reseptör kinazdan birisi olup, kanserde anjiyogenezin regülasyonunda önemli yere sahiptir. Her ne kadar, başlangıçta VEGFR'ların sadece endotel hücrelerinde eksprese edildiğine inanılsa da, son yapılan çalışmalar, VEGFR-1'in endotel olmayan hücre tiplerinde de bulunduğunu göstermiştir. Araştırmacıların hipotezi, VEGFR-1'in pankreatik kanser hücrelerinde bulunduğu, fonksiyonel olduğu ve malign fenotipe katkı sağladığı yönündedir. Bu hipotezi test etmek için, Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve/veya Western blot analizlerini kullanarak, VEGFR-1'in ve ligandlarının mRNA ve/veya protein ekspresyonlarının tüm pankreas hücre hatlarında gösterilmesi amaçlanmıştır. VEGFR-1 ligandı olan VEGF-B ile stimülasyon sonucunda, mitojen aktive eden protein kinaz sinyal iletimi, migrasyon ve invazyonun VEGFR-1 antikorlu ile nötralize edilerek inhibe edildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, tümör anjiyogenezinin, dolaşımdaki VEGF ailesinin

üyeleri tarafından, sadece endotelial hücrelerde bulunan VEGF reseptörlerinin aktive edilerek değil, aynı zamanda VEGF reseptörlerine sahip olan tümör hücrelerindeki otokrin etki sonucu oluştuğunu göstermiştir (86). Pankreas tümör hücrelerinde VEGFR-1 reseptörünün varlığının saptanması, tez konusuna ışık tutan bir araştırma niteliği taşımaktadır. Pankreas tümör hücrelerinde ve tümörü çevreleyen damar endotelinde VEGFR-1 reseptörünün varlığı, tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemin pankreas tümörüne taşınması için hedef nokta oluşturmaktadır. Aynı zamanda, ilaç taşıyıcı sistemin hedeflendirme ligandı olan anti-VEGFR-1 monoklonal antikor ile tümör anjiyogenezinin önüne geçilmesi planlanmaktadır.

Itakura ve diğ.'nin 1997 yaptığı bir çalışmada insan pankreas hücre hatlarında VEGF'in aşırı miktarda eksprese edildiğini göstermiştir. Bu durum, tümör gelişiminde anjiyogenik süreçlerin aktive olmasını da kanıtlamaktadır (87).

2.3.1. Anti-VEGFR-1 (Anti-Flt-1) Antikoru

Flt-1 olarak da bilinen VEGFR-1 ve Flk-1 olarak da bilinen VEGFR-2 (KDR) VEGF reseptör tirozin kinazlardır. VEGFR-1 bazı şartlar altında, tuzak reseptör olarak rol oynar, VEGF'i ayrı tutar ve VEGFR-2 ile etkileşmesini engeller. Fakat gelişen kanıtlar, matriks metalloproteinazların ve endotelial hücrelerden büyüme faktörlerinin salımının indüksiyonunun yanı sıra, VEGFR-1'in hematopoezde, tümör damarlanmasında rol oynayan monositlere ve diğer kemik iliği kökenli hücrelere gereksinim olduğu durumlarda önemli role sahip olduğunu desteklemektedir (88). Şu anda, VEGF yolağının inhibitörleri klinik olarak en ileri seviyededir. Farelere ait anti-VEGF-A monoklonal antikorun humanize edilmiş varyantı olan "bevacizumab" kanser tedavisinde antianjiyogenik tedavi yaklaşımı için FDA tarafından onay almıştır (85). VEGF ve onun reseptörleri VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 parakrin anjiyogenik ve otokrin mitojenik yollar aracılığı ile tümörün gelişmesini tetikler. İlerlemiş pankreas kanseri tedavisi için, VEGF yollarının hedeflendirilmesi umut vaat etmektedir (89) (Şekil 2.12).

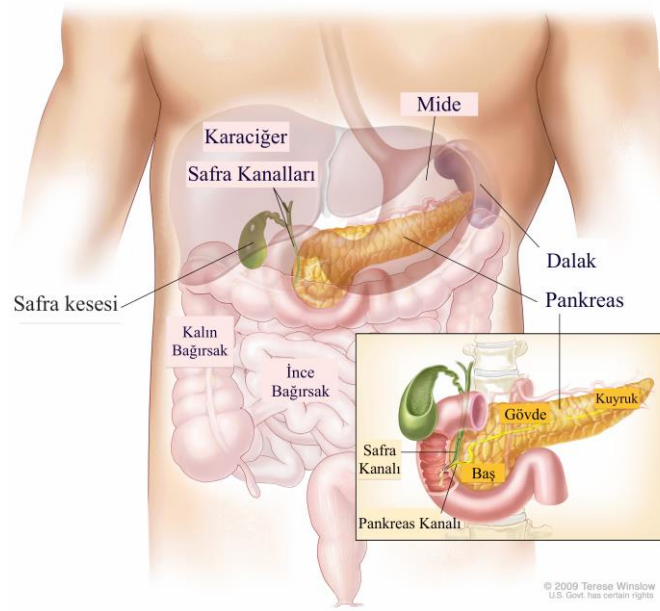
2.4. Kanser

Her geçen gün kanser ile ilgili çalışmalar daha da yoğunlaşırken, kanser daha anlaşılır hale gelmekte ve bu hastalığın karmaşıklığı daha görünür hale gelmektedir.

Hücresel düzeyde kanser ve tümör kontrol edilemeyen hücre çoğalması olarak anlaşılmaktadır. Bu hücre çoğalması, hücre ölümü ve apoptozisten kurtularak tümör gelişmesine neden olmaktadır. Kontrolsüz çoğalmasının nedeni hücrelerin mutasyona uğramış olmasıdır. Bu mutasyonlar genellikle proto-onkogenler olarak bilinen genlerde meydana gelir. Bu genler, farklılaşmayı ve hücre büyümesini kontrol eden proteinleri kodlayarak hücre siklusunu kontrol etmektedir. Mutasyon sonucunda bu genler onkogenlere dönüşür, bu durumda hücre çoğalması kontrol edilemez. Böylece, öncesinde kanser olmayan bir hücre onkogene dönüşmüş olur. Onkogen, çoğalır ve normal bir genden köken alan mutasyona uğramış sinyal proteininden dolayı hücre yaşlanması gözlenmez. Çünkü tümörün çoğalması kontrolsüzdür, kütle, artan damarlanma ihtiyacını karşılayabildiği sürece büyümeye devam edebilir. Tümörler, aniden yeni damar oluşması ya da önceden var olan damarların düzensiz bir hale gelmesine neden olur. Tümörün bir diğer karakteristiği ise, hücre membranının düzensiz bir şekilde gelişmesine neden olmasıdır. Bu düzensizlik hücrenin endotelial bağlantılar arasında genişlemesine neden olacak şekildedir. Bu şekilde daha kısa damarlar oluşur ve besin alımını kolaylaştıracak şekilde hücreler daha poröz yapıda konumlanırlar. Her ne kadar antikanser ilaçları (metotreksat, paklitaksel vb.) geliştirilmiş olsa da ve in vitro olarak tümör çapını küçülttüğü gösterilmiş ve vücuttan tümörü uzaklaştırabileceği düşünülse de, bu ilaçların yeterliliği, ilaçların tümörle etkileşimi konusunda dolayı endişe yaratmaktadır. Bazı antikanser ilaçlarının yarılanma ömrü ve spesifik olarak tümör hücreleri ile etkileşiminin az olması sorunları bu ilaçların yönetilmesini zorlaştırmaktadır (90).

2.4.1. Pankreas Kanseri

Pankreas, karın boşluğunda, omurganın bel bölümünün önünde yer alan bir salgı bezi olup, ortalama 15-20 cm uzunluğunda, kadınlarda 55 gr, erkeklerde 70 gr ağırlığındadır. Şişkin olan sağ ucuna baş, daha dar olan orta bölümüne gövde, gövde ile başın birleştiği ince bölüme boyun, ince uzun olan son ucuna da kuyruk denir (Şekil 2.13). Pankreas endokrin ve ekzokrin olmak üzere iki ayrı salgı fonksiyonuna sahiptir. Pankreas kanseri, malign hücrelerin pankreas dokusunda bulunduğu bir hastalıktır (50).



Şekil 2.13. Pankreasın konumu ve anatomisi (50).

Pankreas kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölümler arasında dördüncü sıradadır ve 2020 yılında ikinci sıraya yükselmesi öngörülmektedir. En ölümcül kanser türü olan pankreas kanserinde hastaların beş yıl hayatta kalma oranı % 6'dır, öte yandan hastaların % 73'ü teşhis edildikleri ilk yıl içinde kaybedilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2014 yılında 46420 adet pankreas teşhisi konulmuş olup, tahminlere göre bunlarda 39590'ı bu hastalıktan ölecektir. Amerika Birleşik Devletleri nüfusundaki demografik değişimler ve görülme sıklığı ve ölüm oranındaki değişiklikler baz alındığında 2030 yılında yeni pankreas kanseri vaka sayısının 2 kat, buna bağlı ölümlerin ise 2,4 kat artacağı tahmin edilmektedir (50).

Pankreasın ya da diğer bir organın kanseri kontrolsüz hücre çoğalması olarak karakterize edilmektedir. Kanser hücreleri apoptozisten kaçınabilen, kendi çoğalma sinyallerini üretebilen ve çoğalmanın inhibe edileceği sinyallere karşı dirençli hücrelerdir (53). Kanser 2-3 mm³'ten daha büyük bir boyuta erişebilmesi için anjiyogenez olarak isimlendirilen yeni damar oluşumu gerekmektedir. Fakat, oluşan bu tümör damarlanması yapısal ve fonksiyonel olarak olmayan organizasyonu bozuk bir damarlanmadır (91). Tümör dokusunun boyutu büyüdükçe, tümörün içindeki doku içi basınç da artmaya devam ettiğinden, kemoterapötiklerin tümörün iç bölgelerine taşınması zor olmaktadır. İnsan pankreas kanseri, teşhisinin zorluğu ve tedavi seçeneklerinin azlığı nedenleriyle tüm kanser türleri arasında 5 yıllık hayatta

kalma oranı en düşük olan kanser türüdür (92,93). Bu nedenden dolayı pankreas kanseri tedavileri seçenekleri geliştirilmelidir.

Pankreas kanserinin birincil tipi pankreatik adenokarsinomadır ve tüm vakalar arasında % 95'lik bir orana sahiptir (94). Pankreatik adenokarsinoma pankreasın ekzokrin fonksiyonunu etkilemektedir. Tümörün pankreas içerisinde nerede geliştiği teşhis edilme evresi ve tedavi sonucu ile yakından ilintilidir. 0. evre hiç yaşanmamıştır. 1. evre kanserin köken aldığı organda lokalize olduğu durumdur. 2. evre iki koşula ayrılmaktadır. Birincisi kanser komşu organlara yayılmıştır ancak lenf nodlarına yayılmamıştır, ikincisi durumda ise kanser komşu organlara yayılmakla birlikte bazı bölgesel lenf nodlarına da metastaz yapmıştır. 3. evrede ise kanser lenf nodlarına yayılmış ya da yayılmamış olabilir ancak çok yakın olmayan diğer organlara (mide, dalak, kolon, komşu damarlar) sıçramıştır. 4. evrede ise tümör lenf nodlarına yayılmış ya da yayılmamış olabilir ancak uzak organlara sıçramıştır. 0., 1. ve 2. evre tümörler cerrahi olarak çıkarılabilirken, evre 3 ve 4 tümörler çıkarılamazlar (95). 5 yıllık hayatta kalma oranları hastalığın ciddiyetine bağlıdır. Lokalize olmuş tümörlerde hayatta kalma oranı % 20 iken, bölgesel tümörlerde % 8, uzak organ metastazında % 2'dir. Maalesef, hastaların ancak % 7'sine lokalize tümör tanısı konulurken, % 26'sına bölgesel, % 52'sine ise uzak organ metastazı olan pankreas kanser tanısı konmaktadır (96).

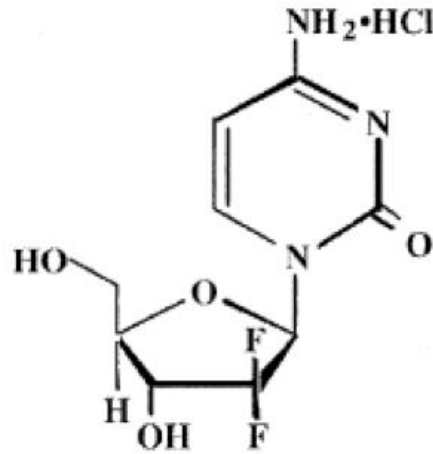
Amerikan Kanser Topluluğunun 2012 yılında yayınlanan yıllık raporuna göre pankreas kanserinde bir artış göze çarpmaktadır, raporda bu durumun obezitedeki artış ile ilişkilendirilebileceği yönünde bir görüşe yer verilmiştir. Pankreas kanserinin erken teşhis edilememesinden dolayı, bu kanser tipi tahrip gücü çok yüksek bir hastalık olmaktadır. Erken teşhis durumunda ise o anki metastaz riski gibi ciddi zorluklar nedeniyle hastaların ancak % 20'sinden azında cerrahi işlem şansı bulunabilmektedir. Söz konusu hastaların ise sadece yarısında tümörler başarılı bir şekilde rezeke edilebilmektedir (97). İlk teşhiste metastaz oranı yüksek bir hastalık olması, agresif klinik süreci ve sistemik tedavideki başarısızlıklar yüksek mortalitenin nedenleridir. İlerlemiş hastalığın tedavisinde sitotoksik ilaçların kullanımı başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Günümüzde, araştırmacılar hedeflendirilmiş tedavinin rolünü değerlendirebilmek amacıyla moleküler yollar üzerine yoğunlaşmıştır (98). Gemsitabin lokal ileri pankreas kanseri ve metastatik pankreas

kanserinde standart tedavi yaklaşımı haline gelmiştir. Yumurtalık, küçük hücreli akciğer ve pankreas kanserini içeren solid tümörler için, tek başına veya diğer sitotoksik ilaçlarla birlikte kullanımı günümüzde önemli bir tedavi seçeneği olarak uygulanmaktadır. Oluşturduğu kısmi antitümör etkiyle birlikte, ağrı ve ilaç kullanım gereksinimini azaltması ve ayrıca beslenme durumunda meydana getirdiği iyileşme ile yaşam kalitesini artırması gemsitabine olan ilginin en önemli temel sebepleridir. Ancak, kanser hücrelerine karşı umut vaat eden etkinliğine karşın, pankreas kanserinde gemsitabine olan yanıt molekülün hedef bölgeye etkin ulaşamamasından dolayı düşük seviyelerde kalmaktadır, tedavide başarısı klinik değerlendirmelere göre % 20 düzeyindedir (97,99) .

2.5. Gemsitabin Hidroklorür

Gemsitabin HCl $C_9H_{11}F_2N_3O_4.HCl$ kimyasal formüle sahip, 299,66 g/mol molekül ağırlığına sahip, pKa'sı 3,6 olan bir antikanser moleküldür. Suda 1 kısmı 10-30 kısımda çözünürken, metanolde 1 kısmı 100-1000 kısım aralığında çözünmektedir.

Sentetik, pirimidin nükleozid ve antineoplastik etkili bir madde olan, gemsitabin (2',2'-diflorodeoksisitidin), lokal ileri pankreas kanseri ve metastatik pankreas kanserinde günümüzde standart tedavide tercih edilen en önemli antikanser molekül durumundadır. Gemsitabin HCl'ün, Eli Lilly Firması'nın GEMZAR® isimli ticari ürünü ilk onayını 1996 yılında FDA tarafından kanser tedavisindeki kullanımı için almıştır. Gemsitabin bir ön ilaç olup, hücre içine girmesi ve aktif metabolitine dönüşmesi için fosforilasyona uğraması gerekmektedir (98). Gemsitabin, antimetabolit sınıfı bir antineoplastik olup, yapısal ve farmakolojik açıdan sitarabine (1-β-D-arabinofuranosilsitozin, ara-C) benzer (Şekil 2.14). Ara-C'den sadece 2' konumundaki hidroksil gruplarını içeren geminal florinlerin süstitüsyonları açısından farklılık gösterir ve hematolojik olmayan malignitelerde ara-C'nin etkinliğini artırmak için geliştirilmiştir.



Şekil 2.14. Gemcitabin HCl'ün kimyasal şekli

Gemsitabinin aktivasyonu için, hücre içinde aktif olan 5' trifosfat formuna dönüşmesi gerekir. Bu dönüşüm deoksistidin kinazlar aracılığı ile sağlanır. Dolayısıyla bu enzim gemsitabin aktivasyonu için hız sınırlayıcıdır. Gemsitabinin etki mekanizması şu şekildedir, deoksinekleotidin DNA zincirine eklenmesini takiben, gemsitabin trifosfatın uzatılmış DNA zincirinin en sonuna katılması sonucunda, DNA sentezi durur ve ribonükleotid redüktaz enzimi inhibe olur. Gemsitabin çok hızlı ve yaygın bir şekilde, kanda, karaciğerde, böbrekte ve diğer dokularda, sitidin deaminaz tarafından deaminasyona uğrayarak inaktif formu olan 2', 2'- diflorodeoksiüridin (dFdU)'e dönüşür ve idrarla atılır. Gemsitabinin kanda kalış süresi çok kısadır (8-17 dakika). Terapötik ilaç seviyesine ulaşmak için, gemsitabin günümüzde 1000 mg/m² olacak şekilde ve 30 dakikalık intrevenöz infüzyonu şeklinde uygulanmaktadır. Gemsitabin monoterapi şeklinde kullanıldığında pankreas kanseri ve küçük hücreli akciğer kanserinin tedavisinde endikedir, aynı zamanda birçok solid tümöre karşı etkin olduğu gösterilmiştir (100). İnsanlarda, solid tümörlere karşı geniş bir sitotoksikite spektrumuna sahip olan, suda çözünen antimetabolit nükleozid analogu olan gemsitabinin antikanser etkinliği kısa yarı ömrü nedeniyle kısıtlıdır. Düşük molekül ağırlıklı antikanser ilaçların yüksek dozlarda kullanımı, vücutta kontrolsüz ve rastgele dağılacağı için, hastalarda spesifik olmayan toksisitelere neden olmaktadır. Gemsitabinle birlikte görülen bu etkilere örnek olarak, kemik iliğinin baskılanması ve geri dönüşümlü transaminaz yükselmesi verilebilir. Bugüne kadar, gemsitabinin in vivo stabilitesinin artırılmasına ve toksisitesinin azaltılmasına yönelik olarak birçok yaklaşım denenmiştir. Bu yaklaşımlar,

gemsitabinin lipozomlara enkapsüle edilmesi ve gemsitabinin hem doymuş hem de doymamış C18 ve C20 açıl zincirlerine bağlanmasıdır. Gemsitabinin lipozomlara ve kısa zincirli hidrokarbonlara yüklenmesi, plazma tarafından hızlı bir şekilde gerçekleştirilen inaktivasyona karşı kısmi bir koruma sağlarken, vücuttaki rastgele biyodağılımı ve hızlı böbrek atılımını engelleyememiştir (101).

Pankreas kanserinin tedavisine ilişkin olarak, hastalar üzerinde yapılan araştırmalarda, gemsitabin ve 5-florourasil (5-FU) tedavileri değerlendirilmiştir. Klinik yanıtlar incelendiğinde, gemsitabine % 23,8 oranında yanıt alınırken 5-FU'da bu oranın % 4,8 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, bir yıl boyunca hayatta kalma oranları incelendiğinde, gemsitabinle tedavi edilenlerde bu oran % 18 iken, 5-FU'da % 2 seviyesindedir. Klinik düzeyde yapılan bu araştırma, pankreas kanserinde tedavi yaklaşımının gemsitabin ile yürütülmesinin doğru bir seçenek olduğunu göstermektedir (98).

2.6. Hücre Canlılığın Test Edilmesi

2.6.1. (3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolyum bromid) (MTT) Testi

Çoğalma ve sitotoksisite çalışmalarında canlı hücre sayısını tespit için kullanılan, enzim aktivitesine dayalı kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntem yaşayan hücrelerin renksiz ya da az renkli MTT (3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolyum bromid)'yi, renkli formazan türevlerine dönüştürmesi temeline dayanır. MTT yöntemi ilk kez 1983 yılında Mosmann tarafından immünolojik çalışmalar için hızlı bir kolorimetrik yöntem olarak tanımlanmıştır (102). MTT (11) mitokondriyal süksinik dehidrogenaz enzimi tarafından çoğalan hücrelerde formazana (kırmızı-mor) dönüşür. Sadece indirgenen şekil (formazan) spektrofotometrik olarak ölçülebilir, bu nedenle orijinal boya ile herhangi bir girişim gözlenmemektedir.

2.7. Akış Sitometrisi

Akış sitometrisi (aynı zamanda akış mikroflorimetri ya da akış sitoflorimetrisi olarak da adlandırılabilir), hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Akış sitometrisi ile bir süspansiyon

halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir. Görünür ya da floresan dalga boylarında tek tek hücreler tarafından yapılan yayılım hücrelerin antijenik, biyokimyasal ya da biyofiziksel özellikleri hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Akış sitometrisi genel olarak iki amaç için kullanılır; kantitatif analiz ya da hücrelerin ayrılması. Akış sitometrisi yardımıyla tek tek kaynak önünden geçen hücreler özelliklerine göre genellikle elektrostatik olarak birbirlerinden ayrılırlar. Tek başına incelenen hücreler üzerinde yapılan ölçümlerin grafiksel olarak ifadesine histogram denir. Histogramdaki veriler hücre sayısını ve tek başına olan hücreler üzerinde yapılan ölçüm ya da ölçümlerin değerlerini içerir. Analizlerde genel olarak üç aşama bulunmaktadır. İlk aşama akış sitometrisi öncesi fazdır. Bu aşamada hücreler hazırlanırlar, protokoller geliştirilir ve daha sonrasında hücrelerin floresan proplar ile boyanmaları gerçekleştirilir. İkinci aşama akış sitometrisi aşamasıdır. Her bir hücre cihazda bulunan kapillerden ve eksitasyon kaynağı önünden tek tek geçerler ve bu sırada yapılan ölçümler kaydedilir. Son aşama ise elde edilen verilerin incelenmesi ve değerlendirilmesidir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

APC işaretli sekonder antikor (Goat anti-rabbit IgG, F(ab') ₂ -APC)	Santa Cruz/ ABD
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Carlo Erba/ İtalya
Diyaliz membranı (2000, 10000 Da)	Millipore/Almanya
Etilendiamin	Merck/ Almanya
Fetal sığır serumu (FBS)	Biochrom AG / Almanya
Fikol	Sigma Aldrich/ABD
Flt-1 (C-17) antikor (tavşan)	Santa Cruz/ ABD
Flt-1 (H-225) antikor (sc-9029)	Santa Cruz/ ABD
Gemcitabin HCl	Sigma Aldrich/ ABD
Iscove'un modifiye edilmiş Dulbecco ortamı (IMDM)	Biowest The Serum Specialist, Nuaille/ Fransa
LPR ultrafiltrasyon membranı	Millipore/Almanya
Metanol (HPLC grade)	Sigma Aldrich/ ABD
Metilakrilat	Merck/ Almanya
Metiltiyazoliltetrazolyum (MTT)	Sigma/ ABD
n-Butanol	Merck/Almanya
N,N-Dimetilformamid	Applchem GmbH / Almanya
Normal tavşan antikor (IgG)	Santa Cruz/ ABD

PEG bisamin HCI (MA: 2000)	JemKem Technology/ ABD
Penisilin / Streptomisin	Biochrom AG / Almanya
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich/ ABD
Tetra-amin PEG (MA: 5000) (PEG tetrakisamin)	JemKem Technology/ ABD
Tripan mavisi	Sigma/ ABD
Tripsin – EDTA çözeltisi	Biochrom AG/ Almanya

3.1.2. Biyolojik Materyal

CFPAC-1 Hücre hattı	ATCC/ ABD
CD1 Nude Fare	Charles River/ Almanya

3.1.3. Kullanılan Aletler

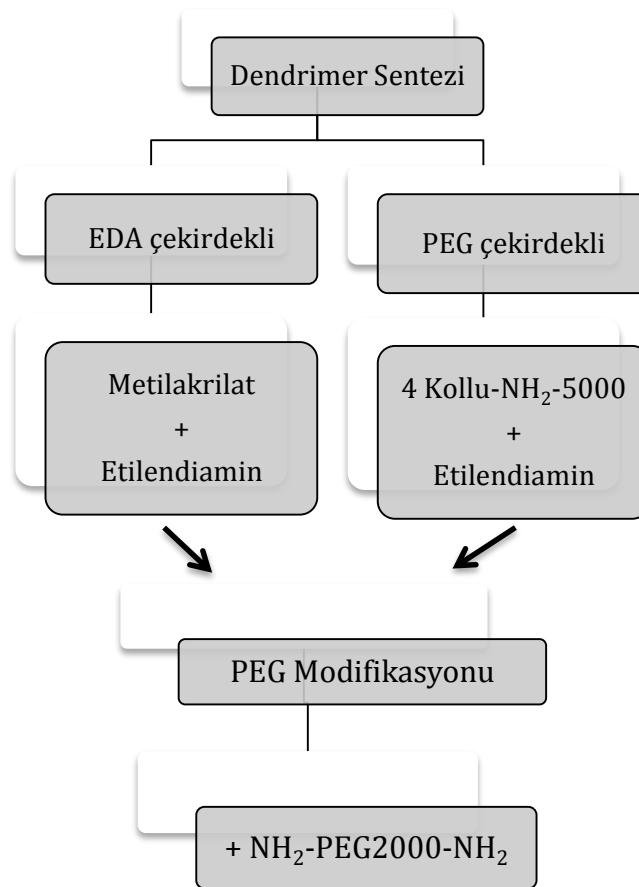
Akış sitometri cihazı	BD FACSAria II/ ABD
ATR Spektroskopisi	Perkin Elmer Spectrum One in ATR
Basınçlı Azot Tüpü	Linde, Türkiye
Mikrodalga sentez sistemi	CEM Corporation, North Carolina, USA
Doku Kesiti Alma Cihazı	Leica/ Almanya
ELISA Okuyucu	Molecular Devices, Spectra Max Plus/ ABD
Floresan Mikroskop	Leica, Wetzlar/ Almanya
Hassas Terazî	Mettler Toledo, İsviçre
HPLC Sistemi, DAD Dedektörlü	Agilent Technologies 1200 Series, ABD

İnkübatör	Heracell 150 i, Thermo Scientific/ ABD
Işık Mikroskobu	Olympus, Japonya
Kolon (C18 5µm, 150x4,6 mm)	Clipeus, Higgins Analytical Inc., ABD
Karıştırmalı küvet (Amicon 8000)	Millipore/Almanya
Laminar hava akımlı kültür kabini	HERA Safe, Thermo Scientific/ ABD
Liyofilizatör	Heto PowerDry PL3000, Jouan, Danimarka
Manyetik Karıştırıcı	Variomag Telesystem, Almanya
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
NMR Spektroskopisi	Bruker Avance 500 MHz Spectrometer
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
Şırınga Filtresi	Advantec, MFS, Inc., Japonya
Ultra Saf Su Sistemi	Simplicity 185-Milipore, ABD
Ultrasonik Banyo	Branson B 220 Smith Kline, ABD
UV Görüntüleme Sistemi	Gel Logic 1500, Imaging Systems, Kodak /ABD
Vorteks	Nüvemix, Türkiye

3.2. Metod

3.2.1. Dendrimer Sentezi

Tez çalışması kapsamında sentezlenen EDA ve PEG çekirdekli PAMAM dendrimerlerinin sentezi, PEG ile modifikasyonu ve antikor ile konjugasyonu ve karakterizasyonları Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü'nde Prof.Dr. Metin Tülü ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmaları kapsamında sentezlenecek olan dendrimerler anyonik karboksilik asit son gruplu 4,5. jenerasyon, EDA ve PEG tetrakisamin çekirdekli PAMAM tipi dendrimerlerdir. Bu dendrimerlerin sentezi ıraksak yöntem esasına göre gerçekleştirilmiş olup, Şekil 3.1'de özetlenmeye çalışılmıştır. Sentezlenen dendrimerler, sahip oldukları üstünlüklerinden dolayı PEG 2000 ile modifiye edilmiştir. % 2 oranında gerçekleştirilmesi planlanan modifikasyonun ardından tümöre hedeflendirme amacıyla anti-VEGFR-1 ile konjuge edilmiştir.



Şekil 3.1. Dendrimer sentezinin aşamaları.

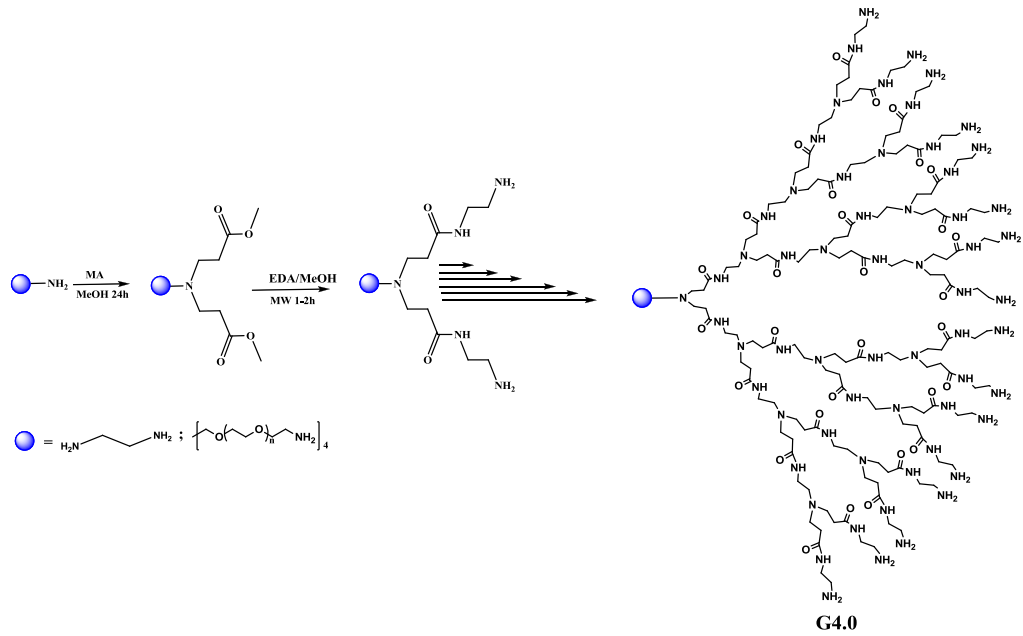
Mikrodalga Destekli PAMAM Türü Dendrimerlerin Sentezi

Yarım Jenerasyonlu PAMAM Dendrimerlerin Genel Sentez Yöntemi (0,5-4,5)

Oda sıcaklığında metanol içerisindeki PAMAM çözeltilerinin (0-4) üzerine klasik Michael ekleme reaksiyon yöntemiyle stokiyometrik oranda en az 10 kat fazla metilakrilat ilavesi yapılmıştır. 24 saatlik bir karıştırmadan sonra reaksiyon durdurulup, çözücü ve ihtiyaç fazlası metilakrilat döner buharlaştırıcı yardımıyla uzaklaştırılmıştır.

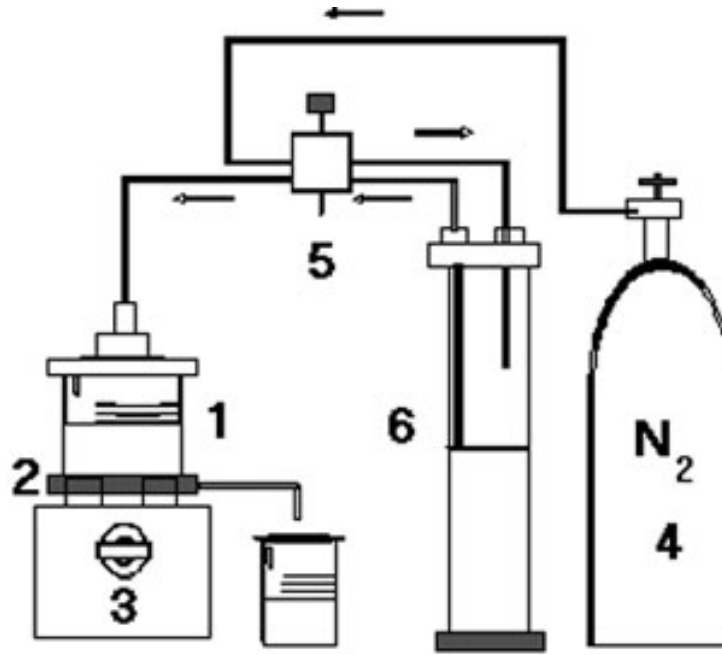
Tam Jenerasyonlu PAMAM Dendrimerlerin Genel Sentez Yöntemi (1-4.NH₂)

Metanol (1-5 mL) içerisindeki ester sonlu PAMAM çözeltilerinin (0,5 - 3,5) üzerine etilendiamin (ester sayısının 10 katı) ilave edilmiştir. Mikrodalga ortamında 200-250 W, 30-80 dk, 120-130 °C arasında reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Reaksiyon bittikten sonra çözücü ve etilendiaminin fazlası döner buharlaştırıcı yardımıyla uzaklaştırıldıktan sonra olası etilendiaminin fazlası n-butanol ile azeotrop oluşturularak uzaklaştırılmıştır. Bunun için bir ultra filtrasyon tekniği olan LPR (Liquid Phase Polymer Retention) tekniğinden faydalanılmıştır (Şekil 3.3). LPR yönteminde 15 psi N₂ basınçta, % 50 metanol çözeltisi ve 1-3 kDA membranlar kullanılarak yüksek saflıkta ve yüksek verimde dendrimerler elde edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.2. Tam jenerasyonlu dendrimer sentezine ilişkin akış sırası

Şekil 3.3'te ayrıntılı olarak verilen LPR diyaliz sisteminin çalışma prensibi, 6 numaralı kısımda saf su bulunmaktadır. Basınç (4 numaralı kısım) yardımıyla 6 numaralı kısımdaki su 1 numaralı kısma iletilir. Karıştırıcı yardımıyla 1 numaralı kaptaki dendrimer-su karışımı karıştırılır. Basınç yardımıyla 1 numaralı kabın üstünden gelen su miktarı 1 numaralı kabın çıkış yerinden dışarı çıkar. 2 numaralı kısımda ise membran bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 1000, 3000, 10000 olan maddeleri ayırmak olmak çeşitli por açıklığına sahip membranlar bulunmaktadır. Örneğin, jenerasyonu 4,0, molekül ağırlığı 8000 g/mol olan bir dendrimeri molekül ağırlığı 3000 olan membranla diyaliz yaparak reaksiyona fazla miktarda ilave ettiğimiz etilendiamini rahatlıkla uzaklaştırabiliriz. Bu işlemi tam jenerasyon dendrimer üretiminde yapılmaktadır (1, 2, 3, 4 gibi), yarım jenerasyonlarda kullanılmamaktadır, çünkü yarım jenerasyonlarda metilakrilat ilave ederek yarım jenerasyon yapılmaktadır ve metilakrilat uçucu bir kimyasal olduğu için diyaliz yapmaya gerek kalmamaktadır.



Şekil 3.3. Ultra Filtrasyon düzeneği (1) filtrasyon hücresi, (2) Ultra filtrasyon membranı, (3) manyetik karıştırıcı (4) basınç kaynağı (5) selektör (6) rezervuar.

PEG tetrakisamin Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin (PEG-PAMAM) Sentezi

PEG tetrakisamin çekirdekli dendrimerlerin (PEG-PAMAM) 0,5. jenerasyondan 4,5. jenerasyona kadar olan sentez basamakları sırasıyla açıklanmıştır.

- PEG-PAMAM 0,5: Metanol (20 mL) içerisindeki metilakrilat (0,244 g, 2,83 mmol) çözeltisi üzerine, metanolde (20 mL) çözülmüş olan 4-kollu-NH₂-5000 (1,454 g, 0,28 mmol) çözeltileri ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.
- PEG-PAMAM 1,0: Metanol (5 mL) içerisindeki PEG-PAMAM 0,5 (1,51 g, 0,25 mmol) çözeltisi ile EDA (81,31 g, 20,74 mmol) maddesi mikrodalga ortamında 200 W, 75 dk ve 122 °C karıştırılmıştır.
- PEG-PAMAM 1,5: Metanol (20 mL) içerisindeki metilakrilat (0,384 g, 4,46 mmol) çözeltisi üzerine, metanolde (20 mL) çözülmüş olan PEG-PAMAM 1,0 (1,35 g, 0,22 mmol) çözeltileri ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.

- PEG-PAMAM 2,0: Metanol (5 mL) içerisindeki PEG-PAMAM 1,5 (1,44 g, 0,19 mmol) çözeltisi ile EDA (1,869 g, 31,09 mmol) maddesi mikrodalga ortamında 200 W, 75 dk ve 126 °C karıştırılmıştır.
- PEG-PAMAM 2,5: Metanol (20 mL) içerisindeki metilakrilat (0,586 g, 6,80 mmol) çözeltisi üzerine, metanolde (20 mL) çözünmüş olan PEG-PAMAM 2,0 (1,34 g, 0,17 mmol) çözeltileri ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.
- PEG-PAMAM 3,0: Metanol (5 mL) içerisindeki PEG-PAMAM 2,5 (1,66 g, 0,15 mmol) çözeltisi ile EDA (3,0 g, 49,91 mmol) maddesi mikrodalga ortamında 200 W, 75 dk ve 123 °C karıştırılmıştır.
- PEG-PAMAM 3,5: Metanol (20 mL) içerisindeki metilakrilat (0,943 g, 10,95 mol) çözeltisi üzerine, metanolde (20 mL) çözünmüş olan PEG-PAMAM 3,0 (1,58 g, 0,13 mmol) çözeltileri ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.
- PEG-PAMAM 4,0: Metanol (4 mL) içerisindeki PEG-PAMAM 3,5 (2,22 g, 0,13 mmol) çözeltisi ile EDA (5,01 g, 83,36 mol) maddesi mikrodalga ortamında 200 W, 90 dk ve 126 °C karıştırılmıştır.
- PEG-PAMAM 4,5: Metanol (20 mL) içerisindeki metilakrilat (1,148 g, 13,33 mmol) çözeltisi üzerine, metanolde (20 mL) çözünmüş olan PEG-PAMAM 4,0 (1,57 g, 0,08 mmol) çözeltileri ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.

EDA Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin (EDA-PAMAM) Sentezi

EDA çekirdekli dendrimerlerin (EDA-PAMAM) 0,5. jenerasyondan 4,5. jenerasyona kadar olan sentez basamakları sırasıyla açıklanmıştır.

- EDA-PAMAM 0,5: Metanol (20 mL) içerisindeki metilakrilat (21,487 g, 0,249 mol) çözeltisi üzerine, metanolde (20 mL) çözünmüş olan EDA (3,0 g, 49,91 mmol) çözeltileri ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.
- EDA-PAMAM 1,0: Metanol (5 mL) içerisindeki EDA-PAMAM 0,5 (13,68 g, 33,81 mmol) çözeltisi ile EDA (81,31 g, 1,35 mol) maddesi mikrodalga ortamında 200 W, 60 dk ve 124 °C karıştırılmıştır.

- EDA-PAMAM 1,5: Metanol (20 mL) içerisindeki metilakrilat (18,30 g, 0,212 mol) çözeltisi üzerine, metanolde (20 mL) çözünmüş olan EDA-PAMAM 1,0 (10,99 g, 21,26 mmol) çözeltileri ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.
- E 2,0: Metanol (5 mL) içerisindeki E 1,5 (19,12 g, 15,85 mmol) çözeltisi ile EDA (76,253 g, 1,26 mol) maddesi mikrodalga ortamında 200 W, 70 dk ve 128 °C karıştırılmıştır.
- EDA-PAMAM 2,5: Metanol (20 mL) içerisindeki metilakrilat (18,82 g, 0,218 mol) çözeltisi üzerine, metanolde (20 mL) çözünmüş olan EDA-PAMAM 2,0 (15,64 g, 10,93 mmol) çözeltileri ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.
- EDA-PAMAM 3,0: Metanol (5 mL) içerisindeki E 2,5 (20,05 g, 7,14 mmol) çözeltisi ile EDA (68,66 g, 1,14 mol) maddesi mikrodalga ortamında 150 W, 60 dk ve 124 °C karıştırılmıştır.
- EDA-PAMAM 3,5: Metanol (20 mL) içerisindeki metilakrilat (15,43 g, 0,179 mol) çözeltisi üzerine, metanolde (20 mL) çözünmüş olan EDA-PAMAM 3,0 (14,60 g, 4,48 mmol) çözeltileri ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.
- EDA-PAMAM 4,0: Metanol (4 mL) içerisindeki EDA-PAMAM 3,5 (15,85 g, 2,63 mmol) çözeltisi ile EDA (50,70 g, 0,84 mol) maddesi mikrodalga ortamında 200 W, 60 dk ve 120 °C karıştırılmıştır.
- EDA-PAMAM 4,5: Metanol (20 mL) içerisindeki metilakrilat (10,563 g, 0,122 mol) çözeltisi üzerine, metanolde (20 mL) çözünmüş olan EDA-PAMAM 4,0 (10,60 g, 1,53 mmol) çözeltileri ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.

Asit Sonlu PAMAM Dendrimerlerin Genel Sentez Yöntemi

Metanol çözeltisi içerisindeki yarım jenerasyonlu PAMAM çözeltileri (PEG-PAMAM 4,5- EDA-PAMAM 4,5) NaOH ortamında 24 saat karıştırılmıştır. Çözücü döner buharlaştırıcı yardımıyla uzaklaştırılmıştır.

PEG tetrakisamin Çekirdekli Asit Sonlu PAMAM Dendrimerlerin Sentezi

Metanol (2 mL) içerisindeki NaOH (0,171 g, 4,27 mmol) çözeltisi üzerine, metanolde (2 mL) çözünmüş olan PEG-PAMAM 4,5 maddesini (1,19 g, 0,024 mmol) ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.

EDA Çekirdekli Asit Sonlu PAMAM Dendrimerlerin Sentezi

Metanol (2 mL) içerisindeki NaOH (0,169 g, 4,22 mmol) çözeltisi üzerine, metanolde (2 mL) çözünmüş olan EDA-PAMAM 4,5 maddesini (1,27 g, 0,049 mmol) ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır.

PEG Bisamin Sonlu PAMAM Dendrimerin Genel Sentez Yöntemi

20 mL metanol içerisindeki ester sonlu PAMAM çözeltilerin (PEG-PAMAM 4,5, EDA-PAMAM 4,5) üzerine metanolde çözünmüş olan PEG 2000 (ester sayısının %10'u) maddesi argon atmosferi altında 0 °C sıcaklıkta 5 saat boyunca damla damla ilave edilmiştir. 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Reaksiyon bittikten sonra ortamdaki çözücü döner buharlaştırıcı yardımıyla uzaklaştırılmıştır. LPR yönteminde 15 psi N₂ basınçta, metanol çözücüsü içerisinde, 10 kDA membranlar kullanılarak saflaştırma işlemi yapılmıştır, ardından son çözelti döner buharlaştırıcı ile uçurulmuştur.

PEG tetrakisamin Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin (PEG-PAMAM) PEG ile Yüzey Modifikasyonu

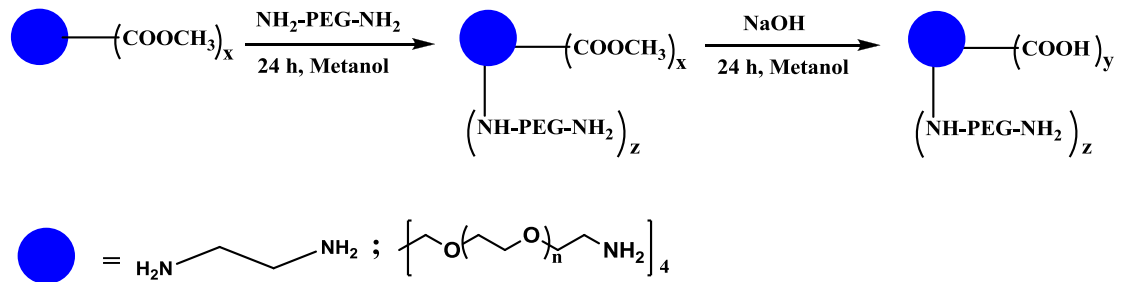
20 mL metanol içerisindeki PEG-PAMAM 4,5 (1,71 g, 0,05 mmol) çözeltisinin üzerine soğuk ortanda metanolde çözülmüş olan PEG 2000 (1,943 g, 0,99 mmol) maddesi argon atmosferi altında 0 °C sıcaklıkta 5 saat boyunca damla damla ilave edilmiştir. Bir gece oda sıcaklığında karıştırılarak ürün elde edilmiştir.

EDA Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin (EDA-PAMAM) PEG ile Yüzey Modifikasyonu

20 mL metanol içerisindeki E 4,5 (1,487 g, 0,119 mmol) çözeltisinin üzerine soğuk ortamda metanolde çözülmüş olan PEG 2000 (2,028 g, 1,04 mmol) maddesi argon atmosferi altında 0 °C sıcaklıkta 5 saat boyunca damla damla ilave edilmiştir. Bir gece oda sıcaklığında karıştırılmıştır (Şekil 3.4).

Tablo 3.1. Dendrimer sentezi

Dendrimer	x	y	z
EDA-PAMAM 0,5 - 4,5	4-64	-	-
PEG-PAMAM 0,5 - 4,5	8-128	-	-
EDA-PAMAM 5	-	56	8
PEG-PAMAM 5	-	118	10
EDA-PAMAM 5.COOH	-	56	8
PEG-PAMAM 5.COOH	-	118	10



Şekil 3.4. Dendrimer yüzeyinin PEG2000 ile modifikasyonu

3.2.2. Antikor Konjugasyonu

PEG-PAMAM Dendrimerlerine Antikor Bağlama Reaksiyonu

1 mL dimetilformamit (DMF) içerisindeki Flt-1 (8 mg, 0,044 mmol) çözeltisinin üzerine BOP (29 mg, 0,066 mmol) maddesi ilave edilir. 1 mL DMF içerisindeki P 5,0 (200 mg, 0,0041 mmol) ve TEA (15 mg, 0,176 mmol) maddeleri çözeltinin üzerine ilave edilir. Argon atmosferi altında 5 gün oda sıcaklığında karıştırılır. LPR yöntemi kullanılarak saflaştırılır.

PEG-PAMAM-Flt1 Dendrimerin Hidrolizi

Metanol (2 mL) içerisindeki NaOH (19 mg, 0,48 mmol) çözeltisi üzerine, metanolde (2 mL) çözünmüş olan PEG-PAMAM-Flt1'i (138 mg, 0,0027 mmol) ilave edilerek oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırıldıktan sonra ürün elde edilmiştir.

3.2.3. Dendrimerlerin Karakterizasyonu

Sentezlenen dendrimerler, her bir jenerasyon basamağında (yarım ve tam) ATR spektrumu, ^{13}C NMR ve ^1H NMR ile analiz edilmiştir. PEG 2000 ile modifiye edilen dendrimerler de ATR ve NMR ile analiz edilmişlerdir. Antikor ile konjuge edilen dendrimerlerden sadece PEG çekirdeklielerde NMR ve Matris Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF) ile karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrumu, örnekteki bileşiklerin kolaylıkla hareket edebilen iyonlara dönüştürülmesi ve bu iyonların kütle/yük oranına göre sıralanmasıyla elde edilmektedir. İyonizasyon işleminde, çoğunlukla kütle dağılımı ana maddeye göre özel olan, bir pozitif tanecikler serisi meydana gelir. Kütle spektrometresi bu gerçek üzerine kurulmuştur. Bir kütle spektrumu kimyasal yapı hakkında önemli bilgiler vermektedir. Spektral veriler, infrared ve NMR spektrallardan daha kolay tanımlanır; çünkü bilgiler, bir örneğin, yapısal bileşiminin moleküler kütlesi cinsinden ifade edilir. Ayrıca verilerden analitin molekül ağırlığı da doğru olarak saptanabilmektedir (50).

3.2.4. Gempitabin HCl'ün Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

UV Spektrumu

Gempitabin HCl'ün su içerisinde hazırlanan 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyondaki çözeltisinin UV spektrumu 1x1 cm'lik kuartz kuvvetler içerisinde 200 - 400 nm arasında taranmış ve çözeltinin λ_{maks} değeri tespit edilmiştir.

Gemsitabin HCl'ün Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

Gemsitabin HCl $C_9H_{11}F_2N_3O_4 \cdot HCl$ kimyasal formüle sahip, 299,66 g/mol molekül ağırlığına sahip, pKa'sı 3,6 olan bir antikanser moleküldür. Suda 1 kısım 10-30 kısımda çözünürken, metanolde 1 kısım 100-1000 kısım aralığında çözünmektedir. Gemsitabin HCl'ün suda ve metanoldeki çözünürlükleri ve pKa değeri göz önünde bulundurularak, Seshagiri Rao ve diğ.'nin kullanmış olduğu yöntem modifiye edilerek, aşağıda ayrıntılı olarak sunulan koşullarda miktar tayini gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.2) (103).

Tablo 3.2. Gemsitabin HCl'ün HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar.

Kolon	C ₁₈ (150x4,6mm, por büyüklüğü 5 µm)
Mobil faz	Fosfat Tamponu (NaH ₂ PO ₄) (pH 5,5) : Metanol (60:40)
Enjeksiyon Hacmi	20 µL
Akış Hızı	1 mL/dk
Dedektör	Diode array dedektör
Dalga Boyu	270 nm
Kolon Fırını Sıcaklığı	25 °C ± 1

Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, miktar tayini yapılacak olan maddenin tayininde kullanılacak analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, tekrarlanabilir ve özgün olduğunu garanti etmek için uygulanan protokoldür. Yöntem validasyonu, kullanılan analitik yöntemin güvenilirliğinin teminatıdır. HPLC analitik yönteminin değerlendirilmesinde aşağıdaki parametreler incelendikten sonra ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

- Doğrusallık (Linearity)
- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precision)
- Duyarlılık (Sensitivity)

- Özgünlük (Specificity)
- Stabilité (Stability)

Doğrusallık (Linearity)

Doğrusallık, analitik bir yöntemin belirli bir konsantrasyon aralığında, analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının direkt olarak orantılı olmasını sağlama yeteneğidir. Bu amaçla etkin maddenin su içindeki 1 mg/mL konsantrasyonda ana stok çözeltisi hazırlanmıştır (n=6). Bu stok çözelti kullanılarak 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonda gemsitabin içerecek şekilde su ile gerekli seyreltmeler yapılarak 7 farklı seri oluşturulmuştur. Kalibrasyon doğrusu, standart çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı pik alanları kullanılarak çizilmiştir.

Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığını ifade etmek için kullanılmaktadır. Gemsitabinin miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (intra-assay) ve deneyler arası (inter-assay) doğruluğunun değerlendirilmesinde aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır (Formül 3.1).

$$\text{Doğruluk} = \frac{\text{Ortalama tayin edilen konsantrasyon} - \text{İlave edilen}}{\text{İlave edilen konsantrasyon}} \times 100 \quad (3.1)$$

Deney içi doğruluğun tespit edilebilmesi için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5, 5, 50 µg/mL), her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arda arda ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Deneyler arası doğruluğun tespit edilebilmesi için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5, 5, 50 µg/mL), her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve birbirini takip eden üç gün tayin edilmiştir.

Kesinlik (Precision)

Kesinlik, analitik yöntemin tekrarlanabilirlik derecesinin ölçümü olarak tanımlanır. Spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir. Bir analitik yöntemin kesinliği, istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda, aynı konsantrasyonda numune ardı ardına ölçülerek, örnekler için varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak değerlendirilir. Kesinlik, tekrarlanabilirlik (repeatability) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) olarak ifade edilir.

Tekrarlanabilirlik (Repeatability)

Kullanılan analitik yöntemin farklı deney zamanlarında güvenilirliğinin kanıtlanması için yapılmaktadır.

Tekrarlanabilirliğin tespiti için, kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5, 5, 50 µg/mL) standart çözeltiler hazırlanmıştır. Aynı konsantrasyondaki çözeltilerin pik alanları HPLC ile altı kez ayrı ayrı analiz edilip, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için VK değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin uygunluğunun gösterilmesi için VK'nın % 2'den küçük olması beklenmektedir.

Tekrar Elde Edilebilirlik (Reproducibility)

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

Deney içi tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5, 5, 50 µg/mL) her bir konsantrasyondan altı adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Deneyler arası tekrar elde edilebilirliğin tespiti için kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5, 5, 50 µg/mL) her bir

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

Tekrar elde edilebilirliği değerlendirebilmek için, pik alanlarına karşılık gelen derişimler için varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Tekrar edilebilirlik parametresinin uygunluğunun gösterilmesi için gün içi ve günler arası kesinlik çalışmalarında VK % 2'den küçük olması önerilmektedir.

Duyarlılık (Sensitivity)

Saptama Sınırı (Limit of Detection)

Analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir.

Miktar Tayin Sınırı (Limit of Quantification)

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

Özgünlük (Specificity)

Analitik bir yöntemin özgünlüğü; ortamda bulunan etkin madde dışındaki ekşiyanların, safsızlıkların veya parçalanma ürünlerinin varlığında, analiz edebilme yeteneğini göstermektedir. Bu ölçütlerin değerlendirilmesine yönelik olarak formülasyonda kullanılan diğer maddelerin (dendrimer) formülasyonda bulundukları konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromatogramları incelenmiştir.

Stabilite (Stability)

Gemsitabinin analiz boyunca stabilitesini göstermek amacıyla 0,5, 5, 50 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri (PBS pH 7,4 ortamındaki) 37 °C'de 24

saat bekletilmiş ve analiz edilmiştir. Sonuçlar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak gösterilmiştir.

3.2.5. Gempitabin-Dendrimer İnküzyon Komplekslerinin Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında yüzeyi PEGlenmiş iki farklı çekirdek yapısına sahip yüzeyi karboksilik asit grupları ile anyonik özellik kazandırılmış, 4,5. jenerasyon dendrimerlerin gempitabin HCl'ün ile inküzyon kompleksleri hazırlanmıştır. Gempitabin HCl, PEG tetrakisamin çekirdekli dendrimer ve EDA çekirdekli dendrimerin moleköl ağırlıkları sırasıyla, 299,66 g/mol, 47369,32 g/mol, 25014 g/mol'dür.

Her bir dendrimer grubu için üç farklı mol oranında yükleme denemesi yapılarak, ilerleyen çalışmalar için optimum mol oranına karar verilmesi amaçlanmıştır. Tablo 3.3 ve 3.4'de verilen mol oranları doğrultusunda 6 farklı kompleks hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. EDA çekirdek yapısındaki dendrimerlerle hazırlanan formülasyonlar

Dendrimer (EDA) (μM)	Gempitabin HCl (μM)	Formülasyon Kodu
100	200	EDA1G2
100	400	EDA1G4
100	600	EDA1G6

Tablo 3.4. PEG çekirdek yapısındaki dendrimerlerle hazırlanan formülasyonlar

Dendrimer (PEG) (μM)	Gempitabin HCl (μM)	Formülasyon Kodu
100	200	PEG1G2
100	400	PEG1G4
100	600	PEG1G6

Her bir formülasyon için cam flakonlara 1'er mL belirlenen molar konsantrasyondaki dendrimerin metanol içerisindeki çözeltisinden eklenmiştir. Daha sonra manyetik karıştırıcı üzerinde her birine belirlenen molar konsantrasyonda gempitabin HCl'ün sudaki çözeltisinden 1'er mL eklenmiştir. 24 saat boyunca ışıktan korunmalı olarak karışmaları sağlanmıştır. Bu süreç içerisinde gempitabinin

dendrimerin dalları arasına elektrostatik olarak tutunması sağlanmıştır. Yüklenemeyen gemitabinin ise suda çözeltisi halinde kalması beklenmektedir. 24 saat sonunda metanol azot gazı altında uçurulmuştur. Metanol uçtuktan sonra geriye kalan sulu kısım partikül boyutu, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

Tablo 3.5. Formülasyon kodları

Formülasyon içeriği	Formülasyon Kodu
Gemitabin HCl	GEM
Rodamin 123	Rho
PEG çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş dendrimer	PEG-PAMAM
EDA çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş dendrimer	EDA-PAMAM
İzotip kontrol antikor ile konjuge edilmiş, PEG çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş dendrimer	PEG-PAMAM-Iso
İzotip kontrol antikor ile konjuge edilmiş, EDA çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş dendrimer	EDA-PAMAM-Iso
AntiVEGFR-1(anti-Flt-1) antikor ile konjuge edilmiş, PEG çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş dendrimer	PEG-PAMAM-Flt1
AntiVEGFR-1(anti-Flt-1) antikor ile konjuge edilmiş, EDA çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş dendrimer	EDA-PAMAM-Flt1
AntiVEGFR-1 (anti-Flt-1) antikor ile konjuge edilmiş, PEG çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş gemitabin HCl enkapsüle edilmiş dendrimer	PEG-PAMAM-Flt1-GEM
İzotip kontrol antikor ile konjuge edilmiş, PEG çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş gemitabin HCl enkapsüle edilmiş dendrimer	PEG-PAMAM-Iso-GEM
AntiVEGFR-1(anti-Flt-1) antikor ile konjuge edilmiş, EDA çekirdekli 4,5. jenerasyon	EDA-PAMAM-Flt1-GEM

yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş gemitabin HCl enkapsüle edilmiş dendrimer	
İzotip kontrol antikor ile konjuge edilmiş, EDA çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş gemitabin HCl enkapsüle edilmiş dendrimer	EDA-PAMAM-Iso-GEM
AntiVEGFR-1 (anti-Flt-1) antikor ile konjuge edilmiş, PEG çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş rodamin 123 enkapsüle edilmiş dendrimer	PEG-PAMAM-Flt1-Rho
İzotip kontrol antikor ile konjuge edilmiş, PEG çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş rodamin 123 enkapsüle edilmiş dendrimer	PEG-PAMAM-Iso-Rho
AntiVEGFR-1(anti-Flt-1) antikor ile konjuge edilmiş, EDA çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş rodamin 123 enkapsüle edilmiş dendrimer	EDA-PAMAM-Flt1-Rho
İzotip kontrol antikor ile konjuge edilmiş, EDA çekirdekli 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG2000 ile modifiye edilmiş rodamin 123 enkapsüle edilmiş dendrimer	EDA-PAMAM-Iso-Rho

Etkin madde yüklü olmayan dendrimerlerin değerlendirilebilmesi için, 100 µM konsantrasyondaki metanol içindeki PEG ve EDA çekirdekli dendrimerlerin de metanolü azot gazı altında uçurulmuş ve saf suda dağıtılarak partikül boyutu, zeta potansiyel ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Gemitabin HCl-Dendrimer İnküzyon Komplekslerinin İn Vitro Karakterizasyonu

Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

Diferansiyel taramalı kalorimetri yöntemi (Differential scanning calorimetry, DSC) kimyasal maddelerin termodinamikleri, stabiliteyi ile moleküler yapılarının tayini ve incelenmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Tez çalışması kapsamında gemitabin HCl, PEG çekirdekli dendrimer, gemitabin HCl-PEG-PAMAM dendrimeri inküzyon kompleksi ve gemitabin HCl ile PEG-PAMAM'ların fiziksel karışımlarının termal özelliklerinin incelenmesi için DSC termogramı çekilerek

erime dereceleri tayin edilmiştir. Termogramların çekilebilmesi için standart küçük hacimli alüminyum örnek kaplarına tam tartılmış örnekler, kabın bütün yüzeyine temas edecek ve boşluk kalmayacak şekilde doldurulmuştur. Örnek kabının kapağı, kapatma aletinin yardımıyla sıkıca ve tam olarak kapatılmıştır. Elde edilen preslenmiş plaka, aletin analiz bölmesine yerleştirilerek analiz başlatılmıştır. DSC çalışmalarında kullanılan analiz şartları aşağıda verilmiştir;

- Cihaz: DSC Q100 TA (100)
- Atmosfer: Azot (50 mL/dk)
- Başlangıç ve bitiş sıcaklıkları: -100 - 300 °C
- Sıcaklık yükseltme ve soğutma hızı (Ramp time): 10 °C/dk
- Standart: Alüminyum pan

Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Analizleri

Etkin madde içermeyen ve etkin madde yüklü olan her iki çekirdek yapısındaki dendrimer formülasyonu için de partikül boyutu ve zeta potansiyel analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda etkin madde içermeyen dendrimerler 100 µM konsantrasyonda metanol içerisinde hazırlandıktan sonra metanol azot gazı altında uçurulmuş, saf su eklenerek dendrimerlerin homojen dağılması sağlanmıştır. Etkin madde ile inklüzyon kompleksi hazırlanan formülasyonların da metanolü uçurulduktan sonra su içindeki dispersiyonlarından analizler gerçekleştirilmiştir. Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli ölçümleri foton korelasyon spektroskopisi ve lazer dopler anemometri temeline göre çalışan Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) kullanılarak yapılmıştır. Her formülasyon için artarda üç ölçüm yapılmıştır. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C ve ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır. Formülasyonlar arasındaki partikül boyutu ve zeta potansiyeli farklılıkları istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi ile test edilmiştir.

Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Üç farklı seviyede etkin madde yüklenen dendrimerlere yüklenen gemitabin miktarını tayin etmek için, inklüzyon kompleksleri hazırlandıktan sonra 13500 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant 0,22 µm por açıklıklı selüloz asetat filtreden süzülerek HPLC'de gemitabin HCl miktar tayini yapılmıştır.

İn Vitro Salım Deneyleri

Tez kapsamında in vitro salım çalışmaları, in vitro hücre kültürü sonuçlarına göre daha az toksik bulunan PEG çekirdek yapısındaki dendrimer ile yapılmıştır. Bu kapsamda, yüzeyi % 2 oranında PEG ile modifiye edilmiş dendrimerler ve antikor ile konjuge edilmiş dendrimerler gempitabin HCl ile yüklenmiştir. İn vitro salım tekniği olarak diyaliz membran yöntemi kullanılmıştır. Gempitabinin geçişine izin verecek ancak dendrimerin geçişine izin vermeyecek şekilde 2000 Da por açıklığına sahip diyaliz membranı kullanılmıştır. Tez çalışmasında pankreas kanserine hedeflendirme amaçlandığı için salım çalışmalarında tümör çevresini simüle edebilmek için pH 7,4 tamponuna ek olarak pH 5,5 tamponu da kullanılmıştır (104). Salım çalışmasında önceden belirlenen zaman aralıklarında en son 24. saat olmak üzere örnekler alınmış, bu örnekler 0,22 µm por açıklığına sahip selüloz asetat filtreden süzülerek HPLC’de valide edilmiş analitik yöntem ile analiz edilmiştir.

3.2.7. Hücre Kültürü Deneyleri

Tez çalışması kapsamındaki hücre kültürü deneyleri, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları’nda Doç. Dr. Güneş Esendağlı’nın kontrolünde yürütülmüştür.

Tez çalışması kapsamında hücre kültürü çalışmalarında CFPAC-1 isimli insan pankreas duktal adenokarsinomu kullanılmıştır. Hedeflendirme ligandı olarak kullanılan anti-VEGFR-1 antikorunun CFPAC-1 hücrelerinde eksprese edilip edilmediği analiz edilmiştir. Ardından EDA-PAMAM ve PEG-PAMAM dendrimerlerinde ve gempitabin HCl ile kompleks oluşturmuş formülasyonlarda sitotoksitenin değerlendirilmesi yapılmıştır. Son olarak sitotoksitenin deneyi sonucunda elde edilen verilere göre, seçilen çekirdek yapısındaki dendrimer ve uygun konsantrasyondaki gempitabin HCl ile insan pankreas hücrelerine alım çalışması yapılmıştır.

CFPAC-1 Hücrelerinin Açılması ve Çoğaltılması

Literatürden elde edilen verilere göre CFPAC-1 hücreleri % 10 oranında fetal sığır serumu ve % 1’lik penisilin/streptomisin içeren Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) ortamında çoğaltılmıştır. Hücrelerin ilk açılma aşamasında, 1 mL

içindeki hücreler azot tankından alınarak 37 °C’de su bulunan behere alınmıştır. Hızlı bir şekilde laminar kabine getirilen hücreler 10 mL’lik ortam ile seyreltilmiştir. 50 mL’lik falkon tüpe alınan hücre süspansiyonu 2000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek tüp dibinde hücre pelleti oluşumu sağlanmıştır. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant atılarak yerine 10 mL ortam ilave edilmiş ve pipetaj yapılarak hücreler dağıtılmıştır. Hücreler 75 cm²’lik yüzey alanına sahip hücre kültürü kabı olan T75’lik flasklara ekilmiştir, üzerine 15 mL ortam ilave edilmiştir. 7 gün sonunda % 80 konfluense ulaşan hücreler mikroskopta incelenmiştir. Hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır. Yapılan denemeler sonucunda hücreleri bulundukları flaskın yüzeyinden kaldırabilmek için 1 dakikalık öntripsinizasyon işleminin ardından 4 dakikalık tripsinizasyon işlemine tabi tutulmasına karar verilmiştir. Bu amaçla öncelikle 900 µL Tripsin/EDTA eklenmiştir 1 dk’lık beklemenin ardından 6 mL PBS eklenip yıkanma sağlanmış ve PBS atılmıştır. Ardından tekrar 900 µL Tripsin/EDTA eklenmiştir ve 37 °C’lik inkübatörde 4 dk tripsinizasyon işlemi sürdürülmüştür. 4 dakikanın sonunda 5 mL ortam eklenerek pipetaj yapılmış ve hücre süspansiyonu falkon tüpe aktarılmıştır. Bu aşamadan sonra gerekli deneylerde kullanılacak hücre sayısını tespit edebilmek için hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayım işlemi sadece ölü hücrelere girebilen tripan mavisi ile ölü hücrelerin boyanmasını takiben mikroskop altında Thoma lamı kullanılarak yapılmıştır.

CFPAC-1 Hücrelerinde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-1’in (VEGFR-1) Sentezinin Gösterilmesi

VEGFR-1 reseptörünün CFPAC-1 hücrelerinde eksprese edilip edilmediğini, eksprese ediliyorsa bunun toplam hücre sayısı üzerinden oranını tespit etmek hücre kültürü çalışmalarının devamı için oldukça büyük önem taşımaktadır. Bu deney kapsamında, öncelikle hücrelerin anti-VEGFR-1 ile inkübasyonu sağlanıp, bağlanmayan antikorun uzaklaştırılmasının ardından sekonder antikor ile işaretleme yapılarak akış sitometri cihazında analiz gerçekleştirilmiştir.

Akış sitometrisi (aynı zamanda akış mikroflorimetri ya da akış sitoflorimetrisi olarak da adlandırılabilir), sulu bir ortamda bir eksitasyon kaynağı önünden tek tek geçen hücrelerin taranması esasına dayanır. Görünür ya da floresan dalga boylarında tek tek hücreler tarafından yapılan yayılım hücrelerin antijenik, biyokimyasal ya da

biyofiziksel özellikleri hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Akış sitometrisi genel olarak iki amaç için kullanılır; kantitatif analiz ya da hücrelerin ayrılması. Akış sitometrisi yardımıyla kaynak önünden geçen hücreler özelliklerine göre genellikle elektrostatik olarak birbirlerinden ayrılırlar. Tek başına incelenen hücreler üzerinde yapılan ölçümlerin grafiksel olarak ifade edilmesine histogram denir. Histogramdaki veriler hücre sayısını ve tek başına olan hücreler üzerinde yapılan ölçüm ya da ölçümlerin değerlerini içerir. Analizlerde genel olarak üç aşama bulunmaktadır. İlk aşama akış sitometrisi öncesi fazdır. Bu aşamada hücreler hazırlanırlar, protokoller geliştirilir ve daha sonrasında hücrelerin floresan proplar ile boyanmaları gerçekleştirilir. İkinci aşama akış sitometrisi aşamasıdır. Her bir hücre cihazda bulunan kapillerden ve eksitasyon kaynağı önünden tek tek geçerler ve bu sırada yapılan ölçümler kaydedilir. Son aşama ise elde edilen verilerin incelenmesi ve değerlendirilmesidir (105).

Akış sitometride yapılacak deneyler için T75'e 2000000 hücre ekimi yapılması planlanmıştır. Bu amaçla tripsinizasyon aşamasından sonra 10 mL'ye seyreltilen hücre süspansiyonundan 3,5 mL alınmıştır. T75 flaskında çoğalan hücreler kazınarak toplanmıştır. 70 μm 'lik filtreden süzülen hücreler, 1800 rpm'de 4 °C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine 200 μL PBS eklenmiş ve 2 sn vortekslenmiştir. CFPAC-1 hücrelerinin yüzeyinde VEGFR-1 ekspresyonunun olup olmadığını göstermek amacıyla, anti-VEGFR-1 (anti-FLT-1) ve izotip kontrol antikoru ile çalışılacaktır. Bu doğrultuda her bir tüpe 100'er μL hücre süspansiyonu eklenmiş, üzerlerine 0,5 μg antikor içerecek şekilde 2,5 μL FLT-1, 1,25 μL izotip kontrol antikoru eklenmiştir. Antikor ilavesinden sonra pipetaj yapılarak homojen karışımları sağlanmıştır. 2-3 sn vorteks işleminin ardından 4 °C'de 40 dk inkübasyona bırakılmıştır. 40 dakikanın sonunda yıkama amacıyla 2,8 mL PBS eklenmiş ardından 4 °C'de, 5 dk, 1800 rpm'de bağlanmayan antikorları ayırmak amacıyla santrifüj işlemi uygulanmıştır. Hücrelere bağlanan antikor akış sitometri cihazında görüntüleyebilmek amacıyla floresan işaretli bir antikor olan goat anti-rabbit IgG ile ikincil bir bağlanma yapılmıştır. Bu amaçla süpernatantı atılan hücrelerin üzerine 100 μL PBS eklenip 3 sn vortekslenmiştir. 1 μg antikor içermesi için stoktan 2,5 μL alınarak tüplere eklenmiş ve 3 sn vortekslenmiştir. Bağlanmanın yavaş ve etkin olarak gerçekleşmesi için

4 °C’de 35 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 3’er mL PBS eklenerek 4 °C’de, 5 dk, 1800 rpm’de santrifüjlenmiştir. Bağlanmayan antikoru ayırmak amacıyla süpernatant ayrılmıştır, 100 µL PBS eklenip 3 sn vorteks yapıldıktan sonra akım sitometri cihazında okuma yapılmıştır.

Sitotoksosite Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında sentezlenen dendrimerlere, antikanser etkin madde olarak kullanılan gempitabin HCl ve gempitabin enkapsüle edilmiş dendrimerlere sitotoksosite testi yapılmıştır. Bu amaçla canlılık testi olarak bilinen ve literatürde sıklıkla kullanılan metil-tiyazol-tetrazolyum (MTT) boyama yöntemi kullanılmıştır (106).

Tez çalışması kapsamında hücre içine alım çalışmaları ve hayvan deneylerinde kullanılacak optimum dendrimer ilaç kompleksini seçmek amacıyla sitotoksosite deneyleri yapılmıştır. Farklı çekirdek yapısı ve ilaç-dendrimer oranı kullanılarak yürütülen MTT deneylerinden elde edilen verilere göre, kendi başına sitotoksitesini en düşük olan ve gempitabin yüklendiği zaman gempitabinin sitotoksitesini devam ettirebilen en etkili oranı seçmeyi hedefledik. Bu amaçla öncelikle literatürden elde edilen veriler ışığında gempitabin HCl için sitotoksosite deneyi gerçekleştirildi ve toksik olduğu en küçük konsantrasyon (LD50) tayin edilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan dendrimerler her ne kadar PAMAM tipi olsa da çekirdek yapısındaki farklılık ve ilk kez sentezleniyor olması nedeniyle geniş bir konsantrasyon aralığı seçilerek sitotoksiteleri tayin edilmiştir, bu kapsamda her iki çekirdek yapısına sahip dendrimer için subtoksik konsantrasyonlar belirlenmiştir.

Gempitabin HCl ve dendrimerler için yapılan bu tespitlerin ardından gempitabin yüklü dendrimerler sitotoksosite deneyine tabi tutulmuş ve gempitabinin toksitesini devam ettirip ettirmediği gözlenmiştir. Bu deneyin ardından antikor ile modifiye edilmiş dendrimerler gempitabin yüklü ve gempitabin yüklenmeden sitotoksosite deneyine tabi tutularak hücre canlılığında azalma olup olmadığı irdelenmiştir. Bu amaçla öncelikle 75’lik flasklara hücrelerin ekim işleminin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bunun için çözündürülen CFPAC-1 insan pankreas kanser hücreleri önce T 25’lik flask içerisinde çoğaltılmış, ardından T 75’e

aktarılarak hücrelerin çoğalması sağlanmıştır. % 80 oranında konflüense ulaşan hücreler tripsinizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Tripsinizasyon ile flasktan ayrılan hücreler 96'lı kuyucuklu platelere ekilerek 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda formülasyonlar uygulanmış ve 24-48 saat süre ile paralel iki deney başlatılmıştır. 24 ve 48 saatlik maruziyetlerin hücre canlılığına etkisini görmek amacıyla yürütülen testte, 24 ve 48 saat sonunda her bir kuyucuğa 25 µL MTT eklenmiştir, MTT eklendikten sonra 4 saat inkübasyona bırakılan hücrelere 4 saatin sonunda canlı hücrelerin içerisinde oluşan formazan kristallerini çözmesi için % 45'lik dimetil formamid çözeltisi içerisindeki % 22'lik sodyum dodesil sülfat çözeltisi eklenmiştir. Bu işlemin ardından gece boyu inkübasyona bırakılan platelerde plate okuyucu aracılığı ile kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Aynı işlemler 48 saatlik platelere de uygulanmıştır. Hücre canlılığının tayininde aşağıda verilen formül kullanılmıştır (Formül 3.2):

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \frac{(\text{İlaç uygulanan hücrelerin optik dansitesi} / \text{İlaç uygulanmamış hücrelerin optik dansitesi}) \times 100}{(3.2)}$$

Hücre İçine Alım Çalışmaları

Antikor ile hedeflendirilmiş dendrimerlerin pankreas kanser hücresi olan CFPAC-1'a alımının arttığını göstermek amacıyla yürütülen bu çalışmada, öncelikli amacımız, PEG-PAMAM dendrimere floresan bir boya olan rodamin 123 ile farklı dozlarda yükleme yapılarak, bu dendrimerleri hem izotip kontrol antikoruna ile hem de anti-VEGFR-1 ile konjuge olanları hücrelere uygulayarak, anti-VEGFR-1 ile konjuge edilen sistemin bu VEGFR-1 reseptörünü eksprese eden hücreler tarafından hücre içine alındığını göstermektir. İzotip kontrol antikoruna (normal rabbit IgG) ile kontrolün yapılmasının nedeni, anti-VEGFR-1 antikoruna ile dendrimerlerin hücre içine alımı artırılırsa bunun anti-VEGFR-1'den mi yoksa spesifik olmayan bir alımdan mı kaynaklandığını göstermektir.

Bu deney kapsamında, 6 kuyucuklu platelere, her bir kuyucuğa 350000 hücre olacak şekilde 1 mL hücre süspansiyonu ekilmiştir. 16 saat sonunda floresan boya olarak kullanılan rodamin 123 ile yüklenmiş PEG çekirdek yapısına sahip dendrimerler hücrelere uygulanmıştır. Bu çalışma kapsamında PEG-PAMAM, PEG-PAMAM-Iso ve PEG-PAMAM-Flt1 dendrimerler kullanılmıştır (n=2) (Tablo 3.6).

Formülasyonlar uygulandıktan 8 saat sonra hücrelerin üzerindeki ortam atılıp bir miktar PBS eklenmiştir ve hücreler kuyucuklardan kazınarak kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreler 0,4 µm'lik filtrelerden süzülerek tüplere alınmıştır. Tüpler 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

Tablo 3.6. Hücre içine alım çalışmalarında kullanılan formülasyonlar

Dendrimer (40 µM)	Floresan boya (20 nM)	Formülasyon Kodu
PEG-PAMAM	Rodamin 123	PEG40Rho20
PEG-PAMAM-Iso	Rodamin 123	PEG-iso40Rho20
PEG-PAMAM-Flt1	Rodamin 123	PEG-Flt40Rho20

Santrifüj işleminden sonra süpernatantlar atılmıştır. Hücre pelletleri kontrol edildikten sonra hücrelerin üzerine 100 µL hücre yıkama solüsyonu eklenmiştir. 10 sn vorteks uygulandıktan sonra üzerine 4 µL (200 µg/mL) anti-Flt-1 antikor eklenmiştir. 30 dk 4 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra üzerine 1,5 mL hücre yıkama solüsyonu eklenmiştir. 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra, süpernatantlar atılmıştır. 100 µL hücre yıkama solüsyonu elde edildikten sonra üzerine sekonder antikor olarak 1,2 µL goat anti-rabbit IgG F(ab')-2-APC (0,2 g/0,5 mL) eklenmiştir. 3 saniyelik vorteks işleminin ardından 30 dk 4 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından 1,5 mL hücre yıkama solüsyonu eklendikten sonra 1800 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatantı atılıp, 100 µL hücre yıkama solüsyonu eklenen tüpler 10 saniye vortekslelendikten sonra akış sitometride okuma yapmak için hazırdır.



Şekil 3.5. Hücre içine alımın mikroskop tekniği ile gösterilmesinde kullanılan odacıklı lam.

Akış sitometri cihazı ile hücre içine alım kantitatif olarak tayin edilmiştir. Hücre içine alım ayrıca floresan mikroskop ile tayin edilmiştir. Bu amaçla, hücreler görüntü alabilmek için odacıklı lamlara (Şekil 3.5) ekilmiştir. Hücrelerin odacıklı slaytlar içine tutunup çoğalması için 24 saat geçmesi beklenmiştir. 24 saatin sonunda

floresan yüklü dendrimerler hücrelere uygulanmıştır. Uygulamanın ardından 8 saat sonra odacıklı slaytlara floresan mikroskop altında bakılmıştır. CFPAC-1 hücrelerine rodamin yüklü hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş dendrimerlerin girişi kalitatif olarak incelenmiştir.

3.2.8. İn Vivo Hayvan Deneyleri

Tez çalışması kapsamındaki tümör geliştirme, farelere tedavi uygulanması ve farelerin tümör takibi Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Biyodağılım çalışmaları Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda Doç. Dr. Güneş Esendağlı'nın kontrolünde yürütülmüştür.

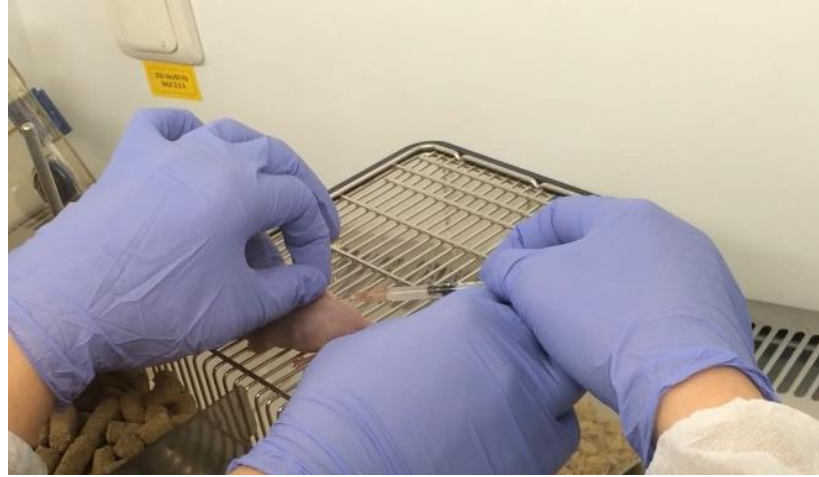
İn vivo hayvan deneyleri kapsamında CD1 nude fareler kullanılmıştır. Nude farelerin özelliği timus bezlerinin olmamasıdır. Timus bezleri olmadığı için T hücresi üretemezler bu nedenle immün sistemleri yoktur. Nude farelerin fenotipi vücut tüylerinin olmamasıdır, bu nedenle nude fare olarak isimlendirilmektedirler (Şekil 3.6). Nude fareler araştırma yapmak için çok idealdirler, çünkü çeşitli türdeki dokuları ya da tümörleri vücutları reddetmez. İn vivo tümör geliştirilmesinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için bu fareler kullanılmıştır. Bu ksenograftlar yeni tümör tedavi teknikleri ve görüntüleme tekniklerini araştırmak amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Nude farelerdeki mutasyonun genetik temeli FOXN1 genindeki bozulmadır. İnsan pankreas kanserinin etkin bir şekilde tedavi edilmesine ilişkin olarak tasarlanan anti-VEGFR-1 ile hedeflendirilmiş, gemsitabin yüklü dendrimerler, insan pankreas kanser hücrelerinin nude farelerin deri altına enjekte edilerek geliştirilen heterotopik insan pankreas tümörü tedavi edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.6. CD1 Nude fare

Pankreas Tümör Modelinin Geliştirilmesi

CD-1 Nude farelerde insan pankreas tümörü geliştirebilmek için farelerin kendi tümörlerini yiyememeleri için sırt bölgelerine subkütan uygulama ile CFPAC-1 hücreleri 15000000 hücre/200 μ L şeklinde uygulanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Tümör oluşturmak amacıyla farelere subkütan CFPAC-1 injeksiyonu

Antitümör Etkinlik Çalışması

Heterotopik olarak nude farelerin sırtında geliştirilen insan pankreas kanseri tez çalışması kapsamında hazırlanan tümöre hedeflendirilmiş gemitabin yüklü dendrimerle tedavi edilmeye çalışılmıştır. Bu kapsamda farelerin tümör çapları ve ağırlıkları takip edilmiştir. Tablo 3.7’de farelerin ayrıldığı gruplar ve bu gruplara uygulanan formülasyonlar verilmiştir.

Tablo 3.7. Tümör geliştirilen ve sağlıklı farelerden oluşan deney grupları ve bu gruplara uygulanan formülasyonlar

Hayvan Grupları	Uygulanan Formülasyonlar
Tümörlü grup (hasta) (n=6)	Gemitabin HCl solüsyonu
Tümörlü grup (hasta) (n=6)	PEG-PAMAM-GEM
Tümörlü grup (hasta) (n=7)	PEG-PAMAM-Flt1-GEM
Tümörlü grup (hasta) (n=6)	Serum fizyolojik
Sağlıklı grup (sağlıklı) (n=3)	Serum fizyolojik

Yapılan literatür tarama çalışmaları sonucunda, gemsitabinin farelerde 80-125 mg/kg dozda uygulandığı görülmüştür (107-109). Bu bilgiler ışığında *in vivo* çalışmalarda gemsitabin HCl dozu olarak 100 mg/kg kullanılmaya karar verilmiştir. Farelere uygulanan 100 mg/kg dozu 1 mg/150 µL olacak şekilde uygulanmıştır. Örnek verilecek olursa, 20 g'lık bir fareye steril serum fizyolojik içerisindeki 2 mg gemsitabin çözeltisi ya da dendrimer formülasyonu 2 mg/300 µL olacak şekilde intraperitoneal yoldan uygulanmıştır. Tablo'da belirtildiği şekilde ayrılan farelere 4 gün ara ile uygulamalar yapılmıştır. Başlangıçta ve her uygulama sonunda tümör çapları ve farelerin ağırlıkları kaydedilmiştir.

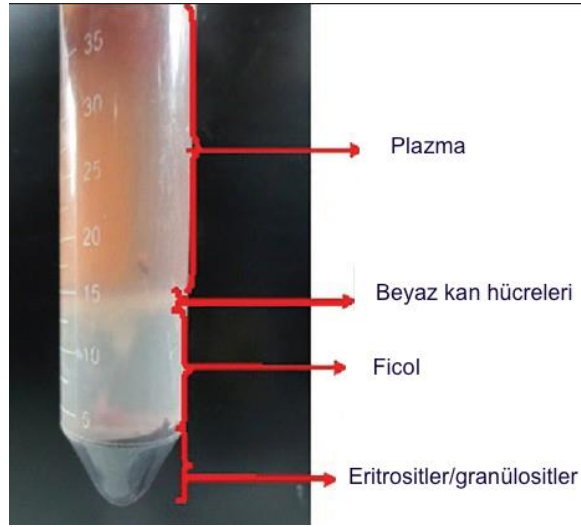
Biyodağılım Çalışmaları

Hedeflendirilmemiş ve hedeflendirilmiş dendrimerlerin biyodağılımını kıyaslamak amacıyla aynı miktarda rodamin 123 içeren dendrimerler iki gruba ayrılan farelere uygulanmıştır. 12 saat bekletilen fareler sakrifiye edilmişlerdir. Kan, karaciğer, tümör, dalak, periton sıvısı ve kemik ilikleri çıkarılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Biyodağılım çalışması öncesinde sakrifiye edilen farenin tümörünün çıkarılması.

Kan örneği falkon tüpe alındıktan sonra üzerine ficoll eklenmiştir. Tüpler 25 dk 1800 rpm'de santrifüj edildikten sonra oluşan beyaz hareden hücreler pastör pipeti ile dikkatli bir şekilde toplanmıştır (Şekil 3.9). Hücreler yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra işaretlenerek akış sitometride analiz edilmiştir.



Şekil 3.9. Fikol ile kan hücrelerinin ayrılması.

Karaciğer dokusu tartılıp, 1/3'lük kısmı ayrılmıştır. Ayrılan kısım homojenize edildikten sonra 2 kere 0,4 μ m por açıklıklı filtreden süzölmüştür. Falkon tüpe alınan karaciğer homojenatının üzerine ficoll eklenip 25 dk 1800 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tıpkı kan hücrelerinde olduğu gibi beyaz kan hücreleri toplanmıştır. Yıkama solüsyonu ile bir kez daha santrifüje tabi tutulan hücreler, bu işlemin ardından antikor ile işaretlenip, akım sitometride analiz edilmiştir. Aynı işlemler, dalak, tümör, periton sıvısı ve kemik iliği dokuları için de tekrarlanmıştır. Tüm bu işlemlerin ardından iki farklı formülasyon uygulanan farelerin farklı organlarına ve vücut sıvılarına ait hücrelerdeki floresan intensitesi tespit edilmiştir.

İn Vivo Görüntüleme

Tümörlü fareler iki farklı deney grubuna ayrılmıştır. Bir gruba PEG-PAMAM-Flt1-Rho, diğer gruba ise PEG-PAMAM-Rho, 10 mg dendrimer başına 0,07 mg Rho 400 μ L SF içerisinde intraperitoneal olarak uygulanmıştır. 16 saat karanlıkta bekletilen farelerin bu sürenin sonunda tümör, dalak, karaciğer, pankreas, böbrek, barsakları çıkarılarak ve UV kamera altında görüntüleri alınmıştır (n=4).

PEG-PAMAM-Flt-Rho ve PEG-PAMAM-Rho'nun uygulandığı diğer deney grubunda ise tümör, karaciğer, pankreas, dalak ve böbrekler çıkarılıp, sıvı azot içerisinde dondurulmuştur. Dondurulmuş dokular sıvı azot içerisinde Histoloji Laboratuvarına götürölmüş ve orada 5 μ m kalınlığında kesitleri alınmıştır. Kesiti

alınan dokular floresan mikroskop altında incelenmiştir. Dokularda görülen floresan şiddeti hücre içine alımın bir sonucu olarak değerlendirilmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. Dendrimerlerin Karakterizasyonu

4.1.1. PEG Çekirdek Yapısına Sahip Dendrimerlerin Sentezi

PEG çekirdekli dendrimer sentezi, "PEG tetrakisamin Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin Sentezi" başlığı altında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. PEG çekirdekli dendrimerler için sentezlenen her bir jenerasyon basamağına ait ATR spektrum, ^{13}C NMR ve ^1H NMR sonuçları aşağıda sırasıyla verilmiştir. ATR spektrumları ayrıca grafik şeklinde de sunulmuştur (Şekil 4.1). Dendrimerlerin PEG ile modifikasyonuna ve yüzey gruplarının karboksilik aside dönüştürülmesine ilişkin ATR ve NMR spektrum sonuçları ve grafikleri de sunulmuştur (Şekil 4.2-4.5).

- PEG-PAMAM 0,5: Sentez basamakları sonucunda 1,61 g sarımsı sıvı şekilde 0,5.

jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 97,7 olarak bulunmuştur. ATR-IR spektrumundan, (cm^{-1}) 1736 ($\text{C}=\text{O}$) elde edilmiştir. ^1H -NMR sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.50 (16H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.69 (16H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.84 (8H, t, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3)_2$), 3.66 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.68 (24H, s, COOCH_3), ^{13}C -NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 33.29 (8C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 50.98 (8C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 52.26 (8C, COOCH_3), 54.24 (4C, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 70.30, 70.84, 70.95, 71.49, 71.63, 72.17, 72.71 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 174.69 (8C, COOCH_3) şeklinde bulunmuştur.

- PEG-PAMAM 1,0: Sentez basamakları sonucunda 1,52 g sarımsı sıvı şekilde 1. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 97,4 olarak bulunmuştur. ATR-IR spektrum sonuçları, (cm^{-1}) 3290 (NH), 1644 ($\text{HNC}=\text{O}$), 1565 ($\text{HNC}=\text{O}$); ^1H -NMR spektrum sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.44 (16H, t, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.79 (16H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.91 (16H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.29 (16H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.66 (m $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); ^{13}C -NMR sonuçları ise δC (125 MHz; CD_3OD) 34.63 (8C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 36.52 (8C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 41.93 (8C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 51.52 (4C, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 54.19 (8C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 70.35, 70.89, 71.00, 71.55, 71.67, 72.11, 72.22, 72.76 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 174.85, 175.35 (CONH) şeklinde bulunmuştur.

- PEG-PAMAM 1,5: Sentez basamakları sonucunda 1,56 g sarımsı sıvı şekilde 1,5. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 94,2 olarak bulunmuştur. ATR-IR spektrum sonuçları, (cm^{-1}) 1734 (C=O); $^1\text{H-NMR}$ sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.49 (32H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.57 (32H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.79 (16H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.27 (16H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.66 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.69 (48H, s, COOCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 33.58 (16C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 45.53 (16C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 50.52 (16C, COOCH_3), 51.63 (8C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 70.34, 70.91, 71.01, 71.56, 71.68, 72.12, 72.23, 72.78 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 174.74 (16C, COOCH_3) şeklinde bulunmuştur.

- PEG-PAMAM 2,0: Sentez basamakları sonucunda 1,52 g sarımsı sıvı şekilde 2. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 99,3 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları (cm^{-1}) 3283 (NH), 1645 (HNC=O), 1563 (HNC=O); $^1\text{H-NMR}$ sonuçları δH (500 MHz; CD_3OD) 2.41 (32H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.76 (32H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.87 (32H, t, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.28 (32H, t, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.66 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); $^{13}\text{C-NMR}$ sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 34.71 (16C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 36.52 (16C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 41.95 (16C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 51.44 (16C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 70.37, 70.93, 71.02, 71.58, 71.69, 72.14, 72.24, 72.79 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 174.85, 175.17 (CONH) şeklinde bulunmuştur.

- PEG-PAMAM 2,5: Sentez basamakları sonucunda 1,74 g sarımsı sıvı şekilde 2,5. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 96,3 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları (cm^{-1}) 1733 (C=O), $^1\text{H-NMR}$ sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.48 (64H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.58 (64H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.78 (32H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.28 (32H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.65 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.68 (96H, s, COOCH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ sonuçları ise δC (125 MHz; CD_3OD) 33.69 (32C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$) 45.43 (32C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 50.53 (32C, COOCH_3), 51.66 (16C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 70.40, 70.95, 71.05, 71.60, 71.71, 72.16, 72.27, 72.81 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 174.67 (32C, COOCH_3) şeklinde bulunmuştur.

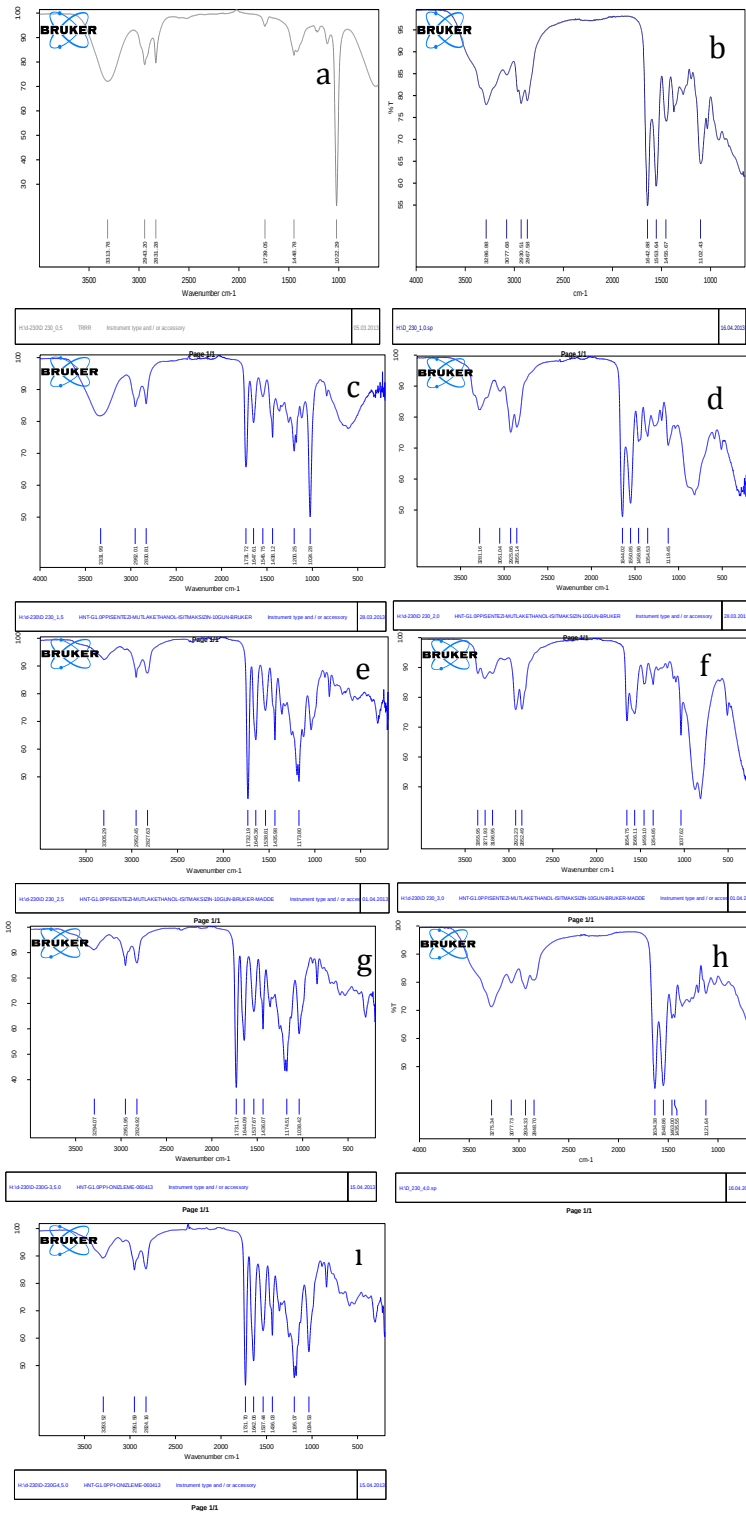
- PEG-PAMAM 3,0: Sentez basamakları sonucunda 1,76 g sarımsı sıvı şekilde 3. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 97,8 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, (cm^{-1}) 3292 (NH), 1645 (HNC=O), 1558 (HNC=O); $^1\text{H-NMR}$ sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.39 (64H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.75 (64H, m,

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.88 (64H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.28 (64H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.66 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); ^{13}C -NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 34.82 (32C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 36.57 (32C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 41.97 (32C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 51.13 (32C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 70.37, 70.92, 71.03, 71.58, 71.70, 72.14, 72.25, 72.79 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 174.82, 175.17 (CONH) şeklinde bulunmuştur.

- PEG-PAMAM 3,5: Sentez basamakları sonucunda 2,31 g sarımsı sıvı şekilde 3,5. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 99 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, (cm^{-1}) 1733 ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.39 (128H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.57 (128H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.79 (64H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.29 (64H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.66 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.69 (192H, s, COOCH_3); ^{13}C -NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 33.38 (64C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$) 45.50 (64C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 50.52 (64C, COOCH_3), 51.33 (32C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 70.42, 71.01, 71.63, 72.25, 72.84 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 174.73 (64C, COOCH_3) şeklinde bulunmuştur.

- PEG-PAMAM 4,0: Sentez basamakları sonucunda 2,32 g sarımsı sıvı şekilde 4. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 95 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, (cm^{-1}) 3289 (NH), 1642 ($\text{HNC}=\text{O}$), 1558 ($\text{HNC}=\text{O}$); ^1H -NMR sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.39 (128H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.76 (128H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.88 (128H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.28 (128H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.66 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$); ^{13}C -NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 34.82 (64C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 36.59 (64C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 42.05 (64C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 51.14 (64C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 70.39, 70.94, 71.05, 71.60, 71.72, 72.16, 72.28, 72.82 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 174.77, 175.16 (CONH) şeklinde bulunmuştur.

- PEG-PAMAM 4,5: Sentez basamakları sonucunda 1,82 g sarımsı sıvı şekilde 4,5. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 73,7 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, (cm^{-1}) 1732 ($\text{C}=\text{O}$); ^1H -NMR sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.40 (256H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.58 (256H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.78 (128H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.28 (128H, m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.65 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.68 (384H, s, COOCH_3); ^{13}C -NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 33.62 (128C, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 50,52 (128C, COOCH_3), 51,43 (64C, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 70.45, 70.96, 71.07, 71.62, 71.71, 72.18, 72.28, 72.83 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 174.73 (128C, COOCH_3) şeklinde bulunmuştur.

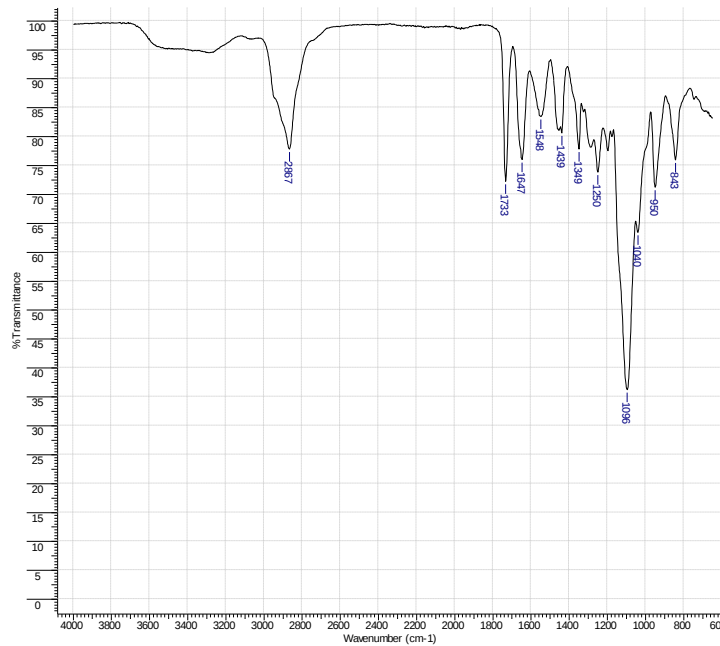


Şekil 4.1. (a) 0,5 (b) 1 (c) 1,5 (d) 2 (e) 2,5 (f) 3 (g) 3,5 (h) 4 (i) 4,5. jenerasyona sahip poli(etilen glikol) çekirdek yapısına sahip dendrimerlerin ATR spektrumları.

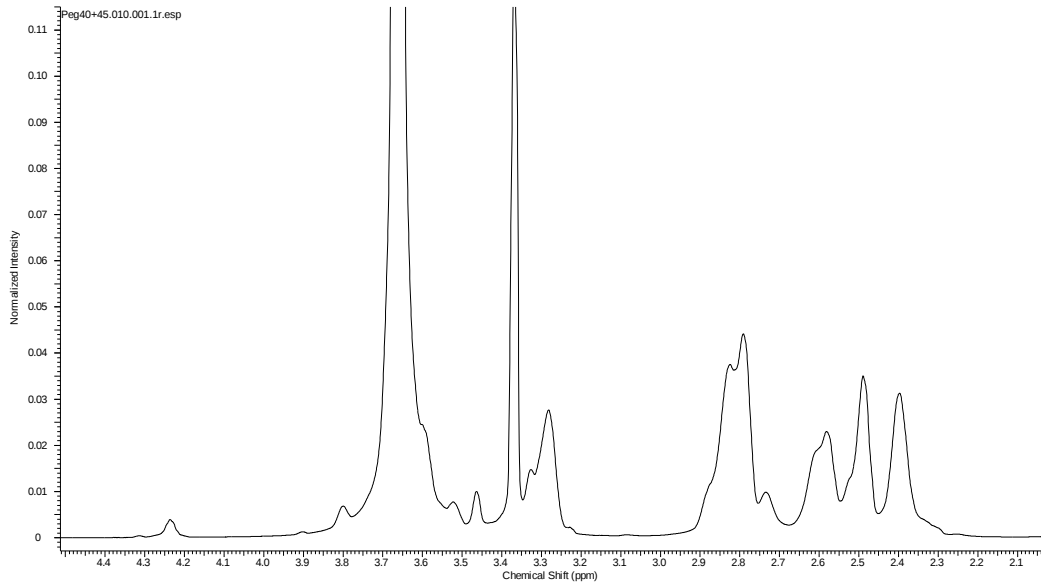
PEG Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin PEG-2000 ile Modifikasyonu

“PEG tetrakisamin Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin PEG ile Yüzey Modifikasyonu” başlığı altında yürütülen sentez basamakları sonucunda 2,28 g sarımsı sıvı şekilde 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG 2000 ile modifiye edilmiş dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 70 olarak bulunmuştur.

ATR-IR sonuçları, (cm^{-1}) 3434, 3367 (NH_2), 1733 (C=O), 1647 (HNC=O), 1548 (HNC=O); ^1H -NMR sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.39 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.58 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.79 (m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 2.88 (s, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.28 (m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.37 (s, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.52-3.65 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CH_2OCH_2), 3.68 (s, COOCH_3), 4.23 (s, CH_2NH_2); ^{13}C -NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 33.64 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$) 39.91 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 40.43 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) 45.76 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 50.52 (COOCH_3), 51.43 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 70.27, 70.74, 70.87, 71.43, 71.52, 72.09, 72.61, ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 169.19 (CONH), 174.69 (COOCH_3) şeklinde bulunmuştur.



Şekil 4.2. PEG-PAMAM 4,5. jenerasyon dendrimerin PEG 2000 ile modifikasyonundan sonra elde edilen ATR spektrumu.

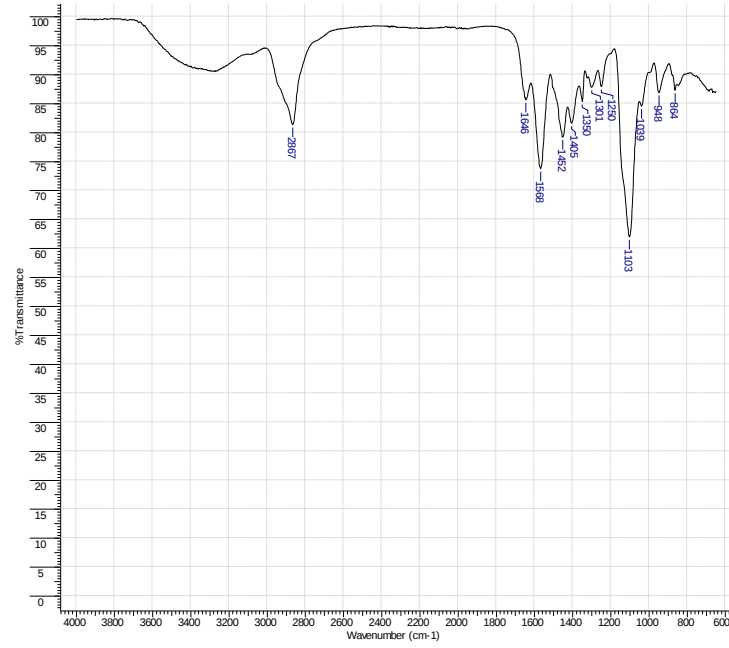


Şekil 4.3. PEG-PAMAM 4,5 + PEG 2000'in ^1H NMR spektrumu.

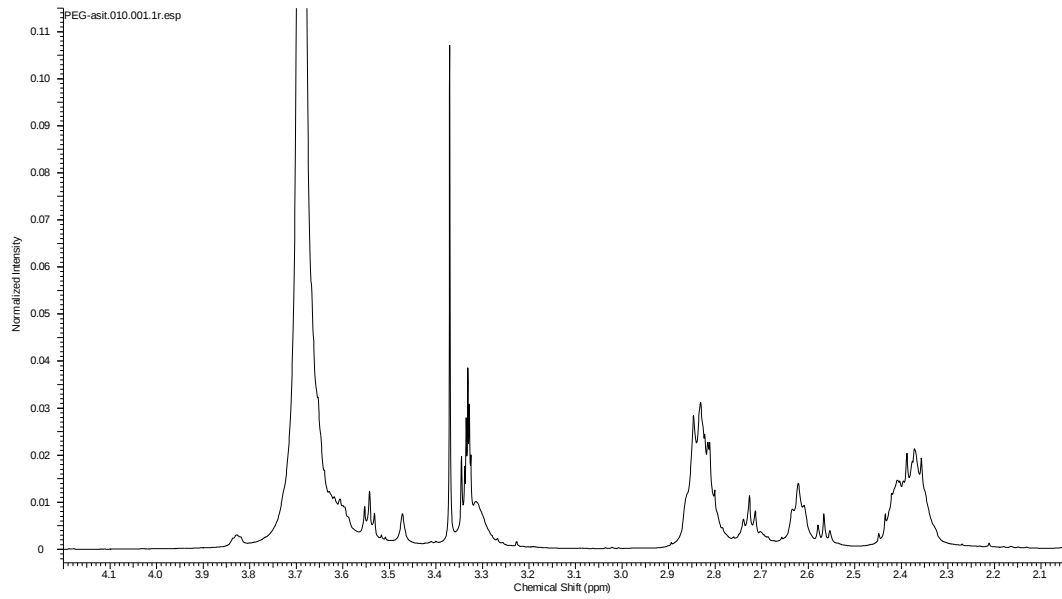
Yüzey Gruplarının Karboksilik Aside Dönüştürülmesi (Asit Reaksiyonu)

Sentez basamakları sonucunda 1,19 g sarımsı sıvı şekilde 4,5. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 100 olarak bulunmuştur.

ATR-IR sonuçları, (cm^{-1}) 3400-3100 (COOH), 1652 (HNC=O), 1568 (HNC=O); ^1H -NMR sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.38 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.62 (m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.83 (m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 2.86 (s, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.31 (m, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.37 (s, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.52-3.65 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CH_2OCH_2); ^{13}C -NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 36.41 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$) 40.00 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 40.14 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) 46.74 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 51.27 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 69.82, 70.31, 70.53, 71.05, 71.27, 71.55, 71.75, 72.29, ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 174.77 (CONH), 181.33 (COOH) şeklinde bulunmuştur.



Şekil 4.4. PEG-PAMAM 4,5 + PEG 2000'in yüzey gruplarının karboksilik aside dönüştürülmesinden sonra elde edilen ATR spektrumu.



Şekil 4.5. PEG-PAMAM 4,5 + PEG asitin ^1H NMR spektrumu

4.1.2. EDA Çekirdekli Dendrimer Sentezi

“EDA Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin Sentezi” başlığı altında yürütülen deneyler sonucunda, EDA çekirdekli dendrimerler için sentezlenen her bir jenerasyon basamağına ait ATR spektrum, ^{13}C NMR ve ^1H NMR sonuçları aşağıda sırasıyla verilmiştir. ATR spektrumları ayrıca grafik şeklinde de sunulmuştur (Şekil 4.6). Dendrimerlerin PEG ile modifikasyonuna ve yüzey gruplarının karboksilik aside dönüştürülmesine ilişkin ATR ve NMR spektrum sonuçları ve grafikleri de sunulmuştur (Şekil 4.7-4.10).

- EDA-PAMAM 0,5: Sentez basamakları sonucunda 20,08 g sarımsı sıvı şekilde 0,5. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 99,5 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 1730 (C=O); ^1H NMR sonuçları, $\delta\text{H}(500 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 2.29 (8H, t, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.41 (4H, s, $\text{R}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 2.63 (8H, t, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 3.61 (12H, s, COOCH_3); ^{13}C NMR sonuçları ise, $\delta\text{C}(125 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 33.06 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 50.38 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 51.35 (COOCH_3), 52.6 ($\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 172.06 (COOCH_3) şeklinde bulunmuştur.

- EDA-PAMAM 1,0: Sentez basamakları sonucunda 16,60 g sarımsı sıvı şekilde 1. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 95 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3282 (NH), 1641 (HNC=O), 1548 (HNC=O); ^1H NMR sonuçları, $\delta\text{H}(500 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 2.25 (8H, bm, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.57 (8H, t, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.71 (8H, t, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.31 (8H, bm, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); ^{13}C NMR sonuçları ise, $\delta\text{C}(125 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 33.14 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 40.60 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 41.10 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 49.50 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 172.0 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$) olarak bulunmuştur.

- EDA-PAMAM 1,5: Sentez basamakları sonucunda 23,58 g sarımsı sıvı şekilde 1,5. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 92 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3296 (NH), 1730 (C=O), 1653 (HNC=O), 1535 (HNC=O); ^1H NMR sonuçları, $\delta\text{H}(500 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 2.34 (16H, bm, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.49 (16H, t, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.69 (8H, bm, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.19 (8H, bm, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.65 (24H, s, COOCH_3); ^{13}C NMR sonuçları ise, $\delta\text{C}(125 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 31.42 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 47.50

(CH₂CH₂COOCH₃), 48.7 (CH₂CH₂NR₂), 50.01 (COOCH₃), 171.1 (NCH₂CH₂CONH), 171.8 (COOCH₃) şeklinde bulunmuştur.

- EDA-PAMAM 2,0: Sentez basamakları sonucunda 23,97 g sarımsı sıvı şekilde 2. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 94,6 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3280 (NH), 1635 (HNC=O), 1549 (HNC=O); ¹H NMR sonuçları, $\delta\text{H}(500 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 2.25 (16H, bm, NR₂CH₂CH₂CONH), 2.55 (16H, bm, NR₂CH₂CH₂CONH), 2.66 (16H, bm, CONHCH₂CH₂NH₂), 3.12 (16H, bm, CONHCH₂CH₂NH₂); ¹³C NMR sonuçları ise, $\delta\text{C}(125 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 33.64 (NCH₂CH₂CONH), 40.12 (CONHCH₂CH₂NH₂), 42.32 (CONHCH₂CH₂NH₂), 50.10 (NCH₂CH₂CONH), 170.8, 171.12 (NCH₂CH₂CONH) olarak bulunmuştur.

- EDA-PAMAM 2,5: Sentez basamakları sonucunda 29,16 g sarımsı sıvı şekilde 2,5. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 95 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3294 (NH), 1731 (C=O), 1644(HNC=O), 1544 (HNC=O); ¹H NMR sonuçları, $\delta\text{H}(500 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 2.37 (32H, bm, NR₂CH₂CH₂COOCH₃), 2.45 (32H, t, NR₂CH₂CH₂COOCH₃), 2.64 (16H, bm, CONHCH₂CH₂NR₂), 3.15 (16H, bm, CONHCH₂CH₂NR₂), 3.61 (48H, s, COOCH₃); ¹³C NMR sonuçları ise, $\delta\text{C}(125 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 31.96 (CH₂CH₂COOCH₃), 47.67 (CH₂CH₂COOCH₃), 48.18 (CH₂CH₂NR₂), 49.54 (COOCH₃), 170.56, 170.87 (NCH₂CH₂CONH), 171.56 (COOCH₃) şeklinde bulunmuştur.

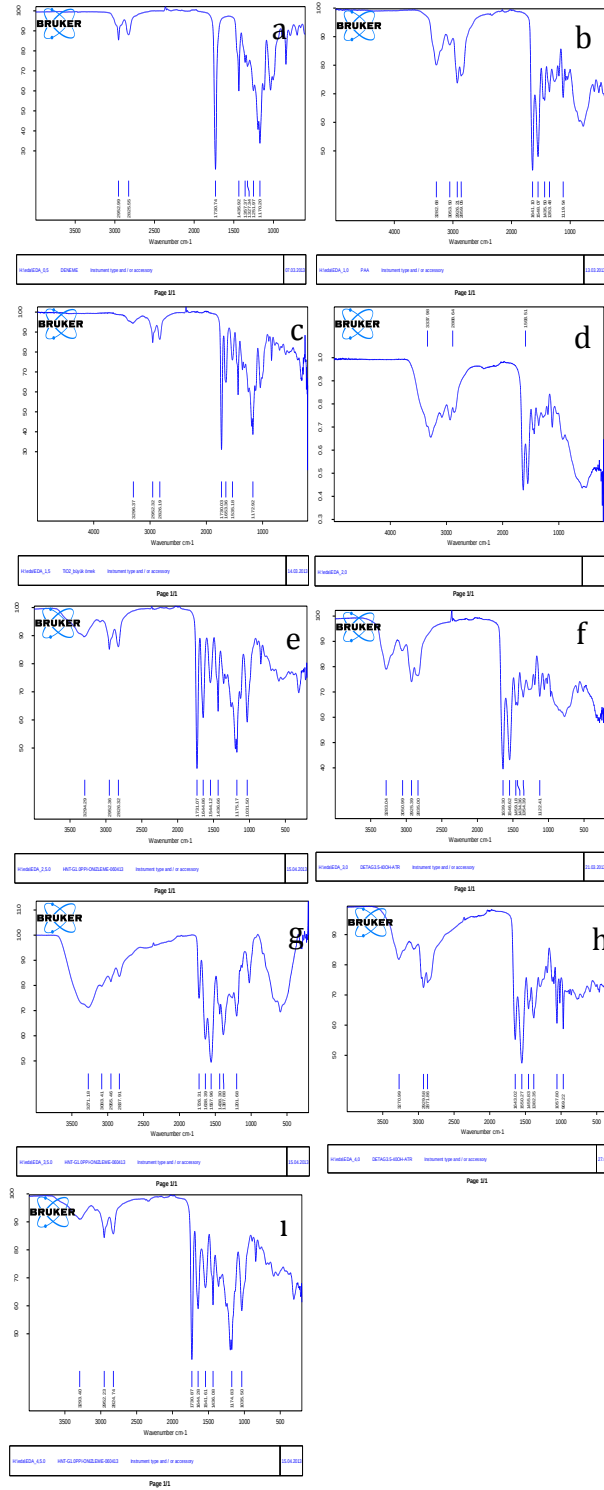
- EDA-PAMAM 3,0: Sentez basamakları sonucunda 20,83 g sarımsı sıvı şekilde 3. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 90 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3283 (NH), 1639 (HNC=O), 1546 (HNC=O); ¹H NMR sonuçları, $\delta\text{H}(500 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 2.26 (32H, brm, NR₂CH₂CH₂CONH), 2.58 (32H, brm, NR₂CH₂CH₂CONH), 2.64 (32H, t, CONHCH₂CH₂NH₂), 3.12 (32H, brm, CONHCH₂CH₂NH₂); ¹³C NMR $\delta\text{C}(125 \text{ MHz}; \text{CD}_3\text{OD})$ 32.23 (NCH₂CH₂CONH), 39.54 (CONHCH₂CH₂NH₂), 41.02 (CONHCH₂CH₂NH₂), 49.67 (NCH₂CH₂CONH), 171,42, 171.54, 171.69 (NCH₂CH₂CONH) olarak bulunmuştur.

- EDA-PAMAM 3,5: Sentez basamakları sonucunda 25,05 g sarımsı sıvı şekilde 3,5. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 93 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 3271 (NH), 1726 (C=O), 1638 (HNC=O),

1557 (HNC=O); ^1H NMR sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.40 (64H, bm, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.52 (64H, t, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.67 (32H, bm, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.17 (32H, bm, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.62 (96H, s, COOCH_3); ^{13}C NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 31.32 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 47.41 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 48.47 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$) 50.35 (COOCH_3), 171.02, 171.15, 171.43 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 172.01 (COOCH_3) şeklinde bulunmuştur.

- EDA-PAMAM 4,0: Sentez basamakları sonucunda 16,39 g sarımsı sıvı şekilde 4. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 90 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3270 (NH), 1643 (HNC=O), 1550 (HNC=O); ^1H NMR sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.24 (64H, brm, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.52 (64H, t, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.63 (64H, t, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 3.11 (64H, brm, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$); ^{13}C NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 32.02 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 39.43 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 41.89 ($\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 48.22 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 170.44, 170.52, 170.58, 170.67 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$) olarak bulunmuştur.

- EDA-PAMAM 4,5: Sentez basamakları sonucunda 17,62 g sarımsı sıvı şekilde 4,5. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 92,5 olarak bulunmuştur. ATR-IR sonuçları, $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ 3280 (NH), 1727 (C=O), 1634 (HNC=O), 1550 (HNC=O); ^1H NMR sonuçları, δH (500 MHz; CD_3OD) 2.38 (128H, bm, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.49 (128H, bm, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.66 (64H, bm, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.16 (64H, bm, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.62 (192H, s, COOCH_3); ^{13}C NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 31.42 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 47.51 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 48.37 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$) 50.25 (COOCH_3), 171.12, 171.18, 171.49 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 172.03 (COOCH_3) şeklinde bulunmuştur.

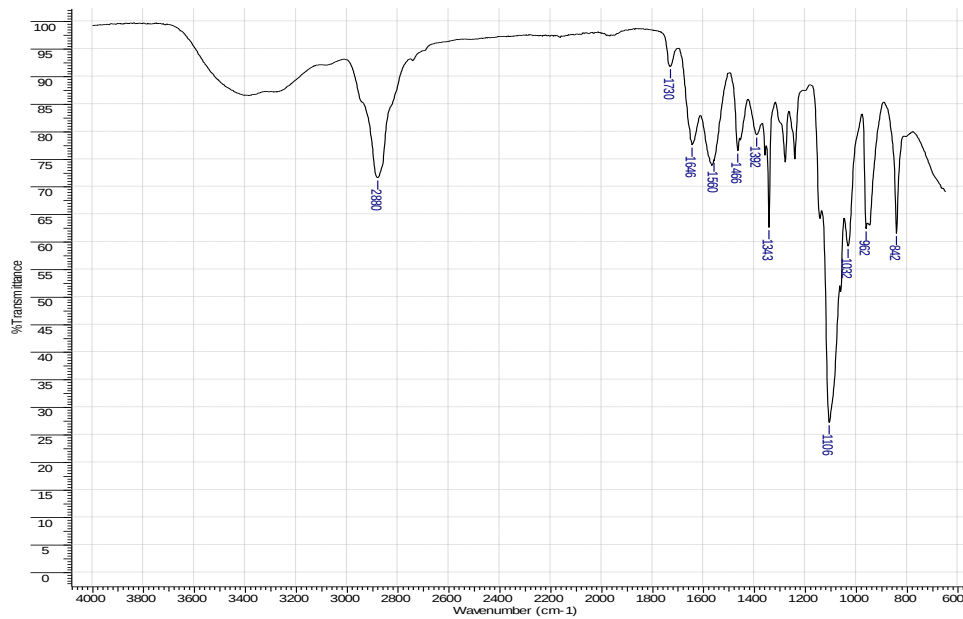


Şekil 4.6. (a) 0,5 (b) 1 (c) 1,5 (d) 2 (e) 2,5 (f) 3 (g) 3,5 (h) 4 (i) 4,5. jenerasyona sahip etilendiamin çekirdek yapısına sahip dendrimerlerin ATR spektrumları.

EDA Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin PEG-2000 ile Modifikasyonu

“EDA Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin PEG ile Yüzey Modifikasyonu” başlığı altında yürütülen sentez basamakları sonucunda 2,45 g sarımsı sıvı şekilde 4,5. jenerasyon yüzeyi PEG 2000 ile modifiye edilmiş dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 80 olarak bulunmuştur.

ATR-IR sonuçları, (cm^{-1}) 3411, 3286 (NH_2), 1734 (C=O), 1650 (HNC=O), 1564 (HNC=O); ^1H NMR sonuçları, δH (500 MHz, CD_3OD) 2.42 (m, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.6 (m, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.66 (bm, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.18 (bm, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.50 (s, COOCH_3), 3.50-3.57 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CH_2OCH_2), 4.22 (CH_2NH_2); ^{13}C NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 31.49 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 40.01 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 47.61 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 48.36 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 49.79 (COOCH_3), 68.43, 68.86, 69.28, 69.96, 70.11, 70.51, 70.98, ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 172.56 (CONH), 174.50 (COOCH_3) olarak bulunmuştur.

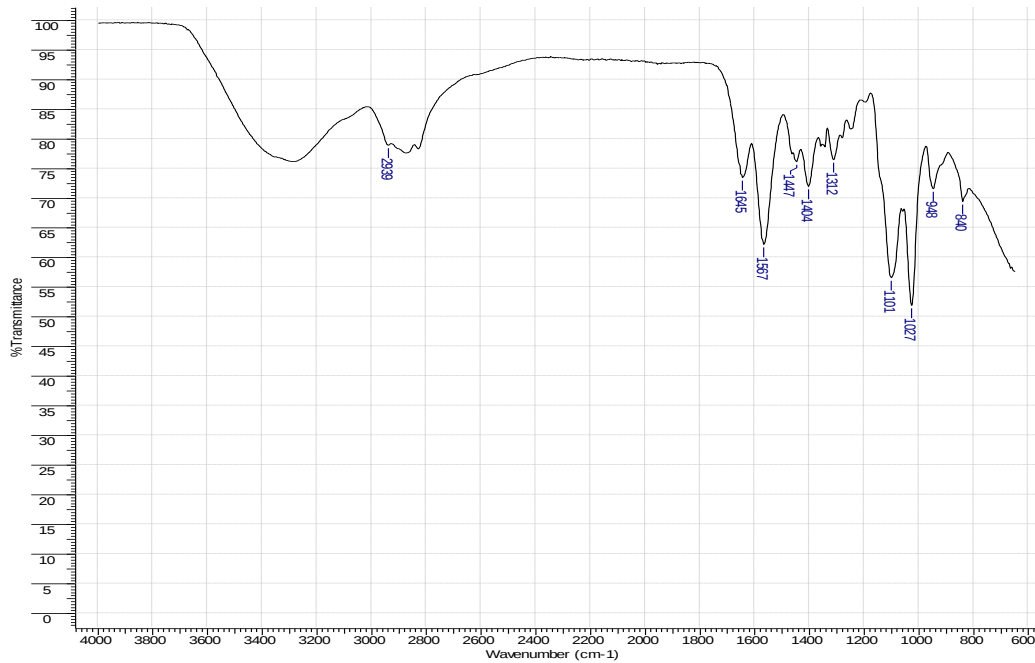


Şekil 4.7. EDA-PAMAM 4,5. jenerasyon dendrimerin PEG 2000 ile modifikasyonundan sonra elde edilen ATR spektrumu.

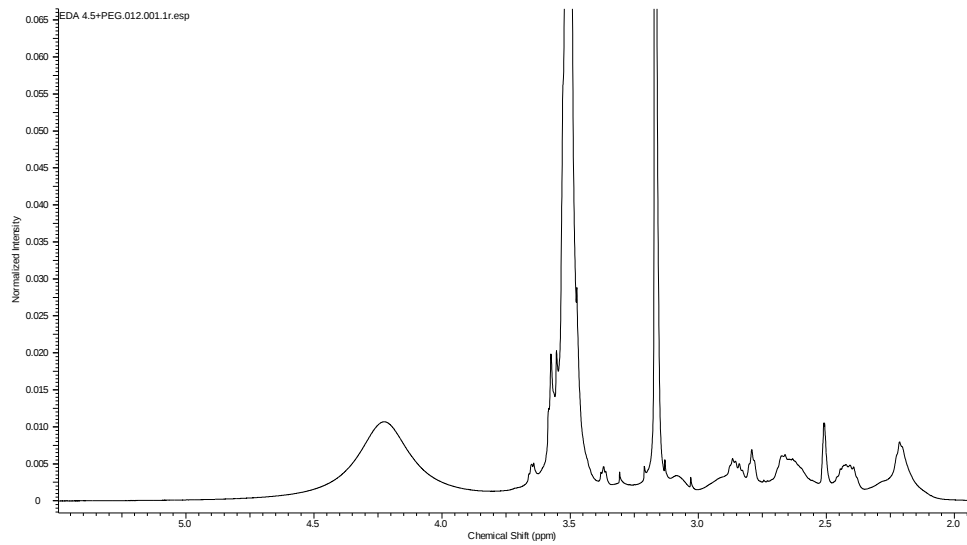
Yüzey Gruplarının Karboksilik Aside Dönüştürülmesi (Asit reaksiyonu)

Sentez basamakları sonucunda 1,22 g sarımsı sıvı şekilde 4,5. jenerasyon dendrimer elde edilmiştir. Üretimin verimi % 100 olarak bulunmuştur.

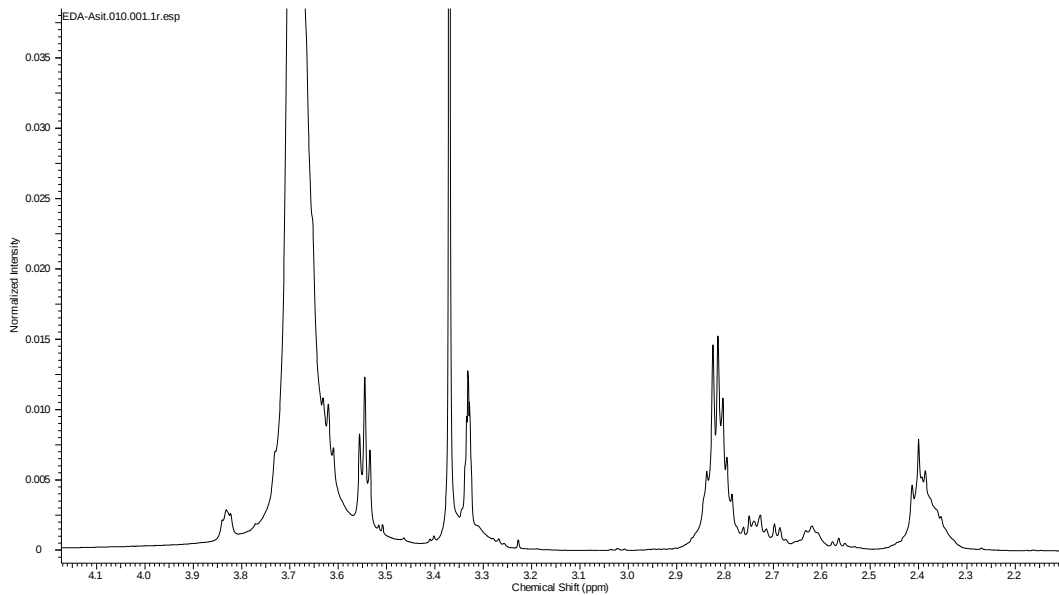
ATR-IR sonuçları, (cm^{-1}) 3450-3150 (COOH), 1653 (HNC=O), 1566 (HNC=O); ^1H NMR sonuçları, δH (500 MHz, CD_3OD) 2.40 (m, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.62 (m, $\text{NR}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 2.72 (bm, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{NR}_2$), 3.61-3.73 (m, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$, CH_2OCH_2); ^{13}C NMR sonuçları ise, δC (125 MHz; CD_3OD) 38.36 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$), 42.10 ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 49.65 (COOCH_3), 69.78, 70.50, 71.02, 71.26, 71.51, 71.73, 72.22, ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 180.58 (CONH), 181.28 (COOCH_3) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8. EDA-PAMAM 4,5-PEG 2000'in yüzey gruplarının karboksilik aside dönüştürülmesinden sonra elde edilen ATR spektrumu.



Şekil 4.9. EDA-PAMAM 4,5 + PEG'in ^1H NMR spektrumu.



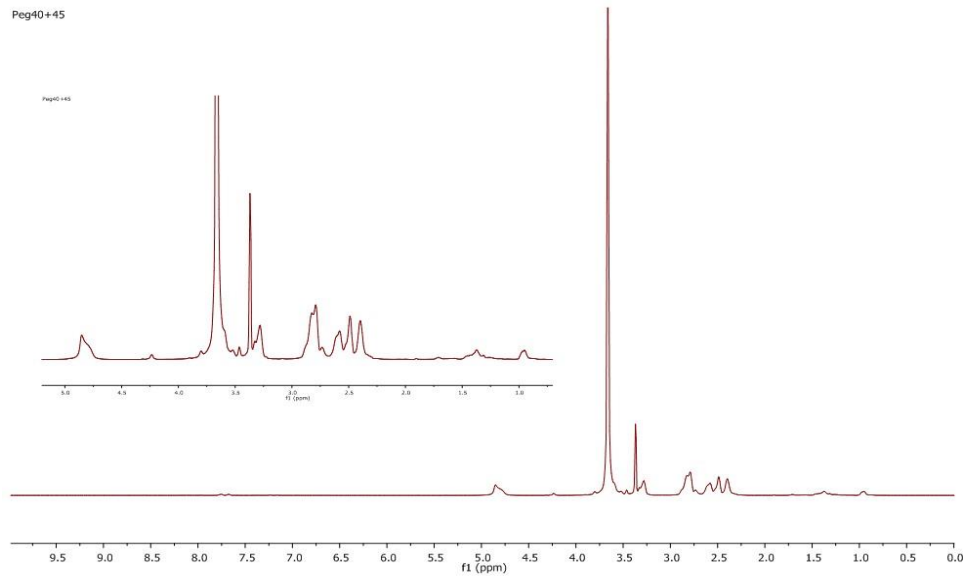
Şekil 4.10. EDA-PAMAM 4,5 + PEG asitin ^1H NMR spektrumu.

4.1.3. Antikor Konjugasyonu

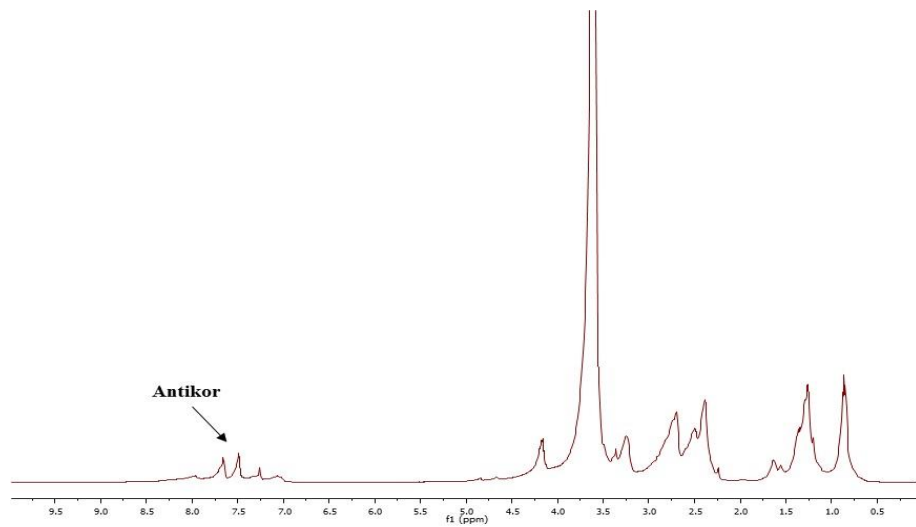
Bölüm 3.2.2'de "Antikor Konjugasyonu" başlığı altında yürütülen deneyler sonucunda, % 91 verimle 184 mg sarımsı sıvı halde dendrimer-antikor konjugatı elde edilmiştir. ATR-IR sonuçları (cm^{-1}) 3439, 3360 (NH_2), 1732 ($\text{C}=\text{O}$), 1643 ($\text{HNC}=\text{O}$), 1543 ($\text{HNC}=\text{O}$) olarak bulunmuştur.

Antikor konjugasyonunun gerçekleştiğini göstermek amacıyla PEG çekirdekli dendrimerin ^1H NMR spektrumu ile antikor ile konjuge edilmiş

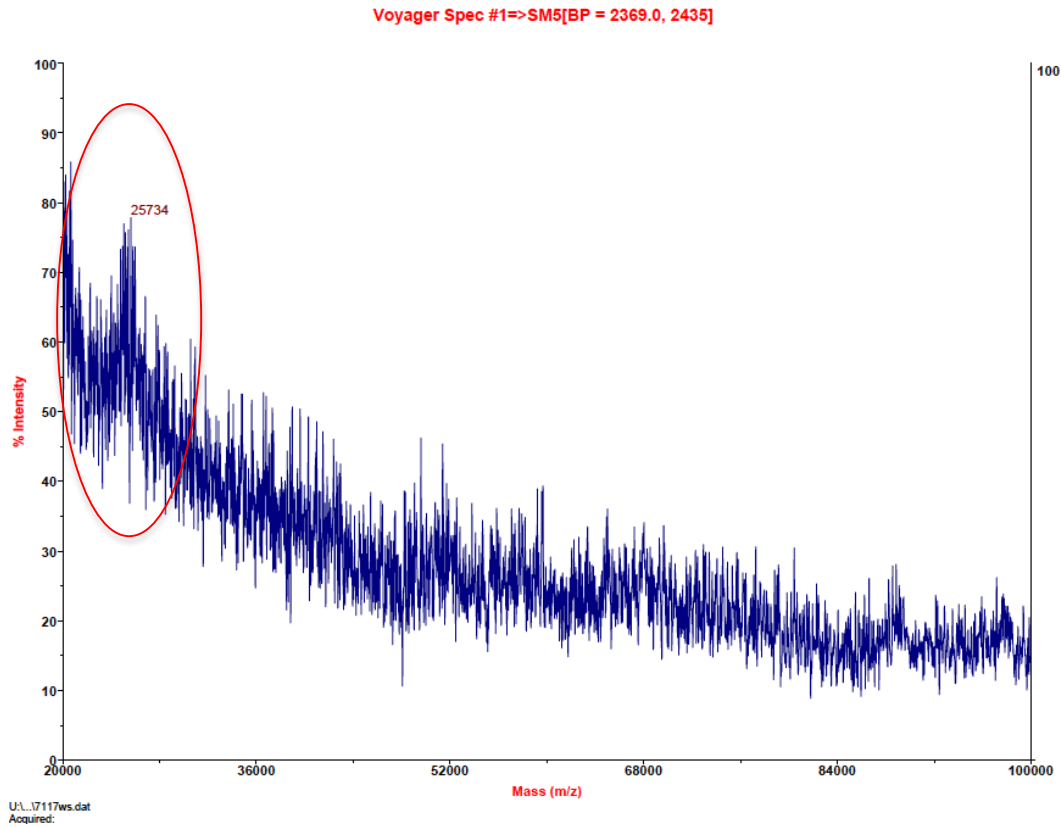
dendrimerin ^1H NMR spektrumları karşılaştırılmıştır. PEG-PAMAM 4,5 + PEG maddesinin ^1H NMR spektrumuna baktığımızda 5 ppm üzerinde herhangi bir pike rastlanmamaktadır (Şekil 4.11). PEG son gruplu dendrimere antikor bağlandığı zaman antikordan kaynaklanan rezonans pikleri 7-9 ppm arasında görülmektedir (Şekil 4.12). Bu pikler antikoron dendrimere bağlandığını bize göstermektedir. Yüzeyine PEG-Antikor bağlanmış dendrimerleri asite dönüştürdüğümüzde metil esterlerinin kaybolduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.11. PEG-PAMAM 4,5 + PEG'in ^1H NMR spektrumu.



Şekil 4.12. PEG-PAMAM-Flt1'in ^1H NMR spektrumu.



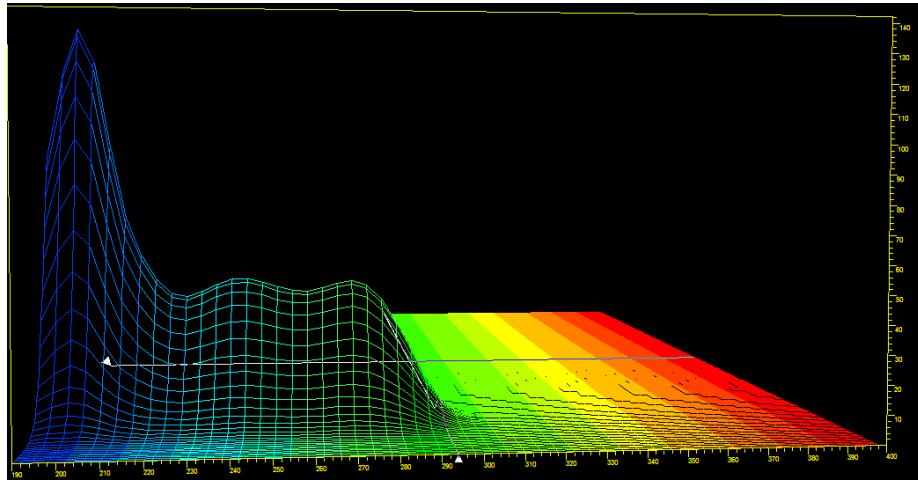
Şekil 4.13. PEG çekirdekli dendrimere Flt-1 konjugasyonunun gerçekleştiğini gösteren kütle spektrumu (MALDI-TOF/MS: m/z, (PEG_4.5 + PEG-Flt-1)₁Na₂₂).

Antikor konjugasyonu ¹H NMR analizinin yanı sıra MALDI-TOF ile de gösterilmiştir (Şekil 4.13). Molekül ağırlığının tayininde kullanılan MALDI-TOF'ta örnek, spesifik bir dalga boyundaki kısa pulslu lazerden gelen ışını absorblayan matris içinde çözülür, iyonlaşır ve kütle analizörlerinde ekstrakt edilir. Zaman-yol bağımlı kütle spektroskopisiyle (TOF, Time of Flight MS) birleştirilerek kullanılmaktadır. Yüksek kütle sayılarına çıkabilme özelliği nedeniyle kullanımı oldukça yaygın bir iyonizasyon yöntemidir. MALDI-TOF sonuçlarına baktığımızda Şekil 4.13'te elde edilen kuvvetli pik değeri olan 25734'ün 2 ile çarpılması sonucunda antikor ile konjuge edilmiş dendrimerin molekül ağırlığı 50701 g/mol olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç, PEG çekirdekli dendrimerin uçuna PEG 2000 maddesi ve antikor bağlandığını göstermektedir.

4.2. Gemsitabin HCl Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal Çalışmalar

4.2.1. Gemsitabin HCl'nin UV Spektrumu

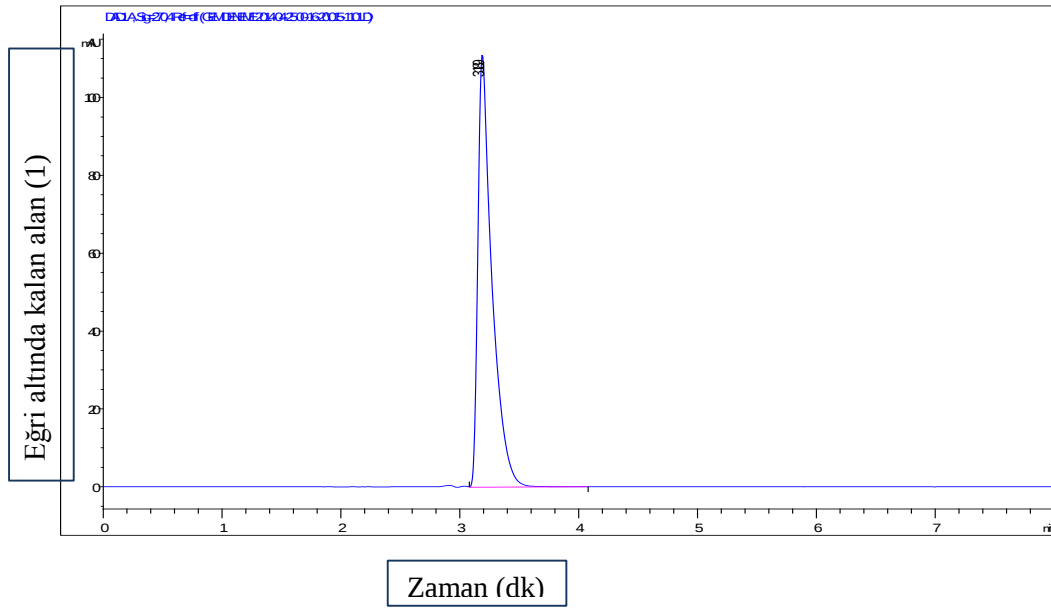
“UV Spektrumu” başlığı altında anlatıldığı şekilde yürütülen deney sonucunda gemsitabin HCl’ün su içerisinde maksimum absorbans gösterdiği dalga boyları 240, 260 ve 270 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4.14). HPLC analizleri yöntem geliştirme aşamasında her üç dalga boyunda da yürütülmüştür ancak, daha sonra elde edilen sonuçlar irdelendiğinde aynı konsantrasyon için elde edilen pik alanlarının 270 nm’de elde edildiği gözlenmiş ve analitik yöntem validasyonu bu dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.14. Gemsitabin HCl’ün su içerisindeki UV spektrumunun üç boyutlu görüntüsü.

4.2.2. Gemsitabin HCl'nin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

Gemsitabin HCl’ün HPLC ile miktar tayini Bölüm 3.2.4.2’de “Gemsitabin HCl’ün Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini” başlığı altında belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiş ve Gemsitabin HCl’e ait aşağıdaki pik elde edilmiştir (Şekil 4.15). Kromatogramdan da görüldüğü gibi Gemsitabin HCl’e ait pik düzgün bir şekilde elde edilmiş ve alıkonma zamanı 3,18 dakika olarak bulunmuştur.



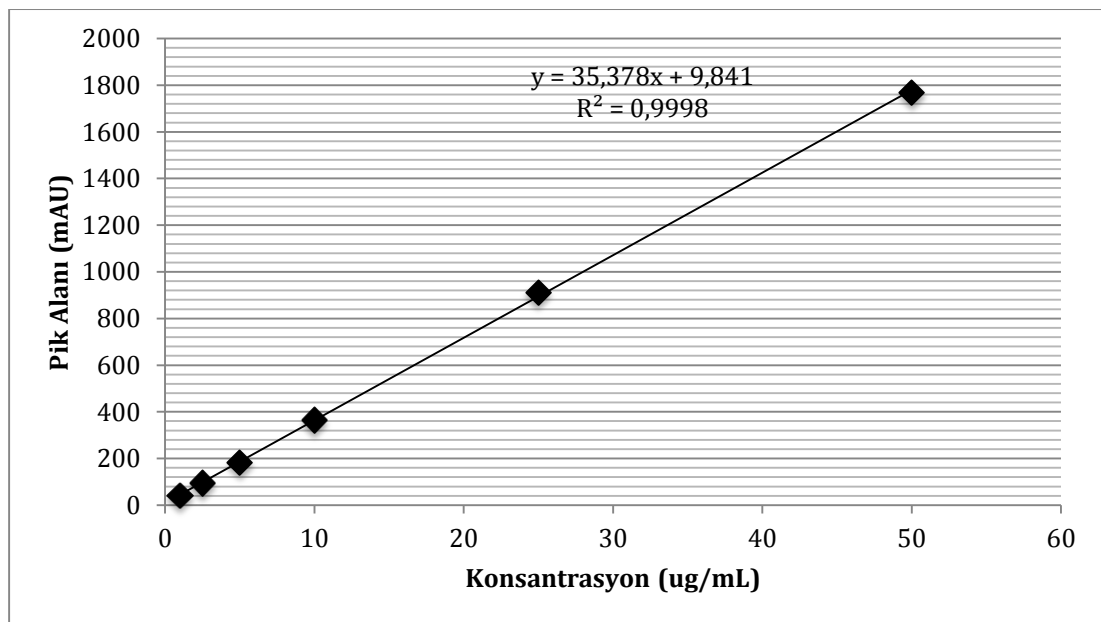
Şekil 4.15. Gemcitabin HCl'ün 25 µg/mL konsantrasyonuna ait HPLC kromatogramları.

Kalibrasyon Doğrusu ve Denklemi

Gemsitabin HCl'e ait kalibrasyon doğrusu HPLC analizleri her birinde 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg.mL⁻¹ konsantrasyonda Gemsitabin HCl olan çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar 6 seri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin HPLC kolonuna enjeksiyonundan sonra elde edilen pik alanları çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrusuna ait denklem lineer regresyon ile bulunmuştur. Gemsitabin HCl'ün HPLC ile miktar tayininde lineer regresyon verileri Tablo 4.1'de gösterilmekte olup, kalibrasyon doğrusu ve denklemi ise Şekil 4.16'da yer almaktadır.

Tablo 4.1. Gemsitabin HCl'ün HPLC ile miktar tayininde elde edilen regresyon verileri (n=6).

Parametre	Sonuç
Konsantrasyon aralığı	0,5 – 50 µg.mL ⁻¹
Eğim	35,378
İntersept	9,841
Korelasyon katsayısı (r ²)	0,9998



Şekil 4.16. Gemsitabin HCl'ün geliştirilen HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi.

Analitik Yöntem Validasyonu

Doğrusallık

Kalibrasyon doğruları "Doğrusallık" başlığı anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltilerden hareketle yapılan seyreltmeler sonucunda 0,5, 1, 5, 10, 25, 50 µg.mL⁻¹ konsantrasyondaki standart çözeltilerin HPLC analizi yapılmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar hesaplanmış ve doğru denklemi elde edilmiştir. Tanımlayıcılık katsayısı $r^2 = 0,9998$ olarak bulunarak denklemin doğrusallığı gösterilmiştir (Şekil 4.16).

Doğruluk

Gemsitabin HCl'ün miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (gün içi; intra-assay) ve deneyler arası (günler arası; inter-assay) doğruluğunun değerlendirilmesi için yapılan deneyler "Doğruluk" başlığı altında açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Deney içi ve deneyler arası doğruluğun tespiti için yapılan deneyleri takiben Formül 3.1 kullanılarak doğruluk bulguları elde edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Deney içi ve deneyler arası doğruluk.

	İlave Edilen Konsantrasyon (µg/mL)	Hesaplanan Konsantrasyon (µg/mL)	Doğruluk (Bağıl Hata)
Gün İçi^b	0,5	0,4958	0,84
	5	5,08	1,6
	50	50,6	1,2
Günler Arası^b	0.5	0,509	1,8
	5	5,076	1,52
	50	50,88	1,76

^b Gün içi ve günler arası tayinde her konsantrasyon için n = 6

Gün içi ve günler arası doğruluk % rölatif hata ile belirtilmiş olup, gün içi için bu değerler % 0,84 ile 1,6 arasında, günler arası için % 1,52 ile % 1,76 arasında değişmektedir (Tablo 4.2). Validasyon çalışmalarında % rölatif hata değerlerinin % 2'den küçük olması gerektiği bildirildiğinden, hesaplanan % rölatif hata değerlerinin % 2'nin altında olması ile kullanılan analitik yöntemin deney içi ve deneyler arası doğruluğu gösterilmiştir.

Kesinlik

Tekrarlanabilirlik

“Tekrarlanabilirlik” başlığı altında açıklandığı gibi, kalibrasyon eğrisinde yer alan üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 0,5, 5, 50 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltilerin pik alanları HPLC ile 6 kez ayrı ayrı okutulup, hesaplanmıştır. Pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyonlar için VK değerleri hesaplanmıştır. VK’nın % 2’den küçük olması yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Tekrarlanabilirlik sonuçları.

İlave Edilen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Hesaplanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	X $\pm$ SS	VK (%)
0,5	0,496	0,507 $\pm$ 0,0106	1,97
	0,512		
	0,507		
	0,493		
	0,519		
	0,521		
5	5,01	5,03 $\pm$ 0,09	1,78
	5,21		
	5,26		
	5,6		
	4,87		
	4,92		
50	49,7	50,01 $\pm$ 0,95	1,89
	50,121		
	50,213		
	51,7		
	51,83		
	48,19		

Tekrar Elde Edilebilirlik

Gemsitabin HCl'ün miktar tayini için kullanılan yöntemin deney içi (gün içi; intra-assay) ve deneyler arası (günler arası; inter-assay) kesinliğin değerlendirilmesi için yapılan deneyler metod bölümünde tekrar elde edilebilirlik başlığında 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.

Tablo 4.4. Gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları.

	İlave Edilen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Hesaplanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Kesinlik ^a
Gün İçi ^b	0,5	$0,498 \pm 0,008$	1,606
	5	$5,09 \pm 0,06$	1,17
	50	$51,87 \pm 0,24$	0,46
Günler Arası ^b	0,5	$0,508 \pm 0,01$	1,96
	5	$5,12 \pm 0,07$	1,367
	50	$52,03 \pm 0,33$	0,63

^a Varyasyon katsayısı (%)

^b Gün içi ve günler arası tayinde her konsantrasyon için n = 6.

Kesinlik çalışmaları üç farklı konsantrasyon (düşük, orta, yüksek: 0,5, 5, 50 $\mu\text{g/mL}$) üzerinden gerçekleştirilmiş olup, tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik % VK ile belirtilmiş olup, bu değerler 1,78 ile 1,97 arasında değişmektedir (Tablo 3). Gün içi ve günler arası tekrar elde edilebilirlik % VK ile belirtilmiş olup, gün içi için bu değerler % 0,46 ile % 1,606 arasında, günler arası için % 0,63 ile % 1,96 arasında değişmektedir (Tablo 4.4). Hesaplanan % VK değerlerinin % 2'nin altında olması ile analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve deney içi ve deneyler arası tekrar elde edilebilirliği gösterilmiştir.

Duyarlılık

Yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen konsantrasyon 102,4 ng/mL olup, saptama sınırı 46,7 ng/mL'dir. Bu veriler geliştirilen analitik yöntemin çalışmamızın amacına uygun duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir.

Özgünlük

Hazırlanan dendrimer inklüzyon komplekslerinde kullanılan yardımcı maddelerin etkin madde ile aynı kromatografik şartlarda pik verip vermediğinin belirlenmesi için HPLC kromatogramları alınmıştır.

Stabilite

“Stabilite” başlığı altında yürütülen deney kapsamında elde edilen bulgular incelendiğinde, seçilen bir konsantrasyonda, salım ortamlarında (pH 5,5 ve 7,4) hazırlanan Gemsitabin HCl çözeltisinin hazırlanır hazırlanmaz ve 37 °C’de 24 saat bekletildikten sonra HPLC ile analizi sonucunda elde edilen konsantrasyonlar karşılaştırılmış, % VK değerleri % 2’nin altında ve % geri kazanım değeri % 98,59-100 arasında bulunarak gemsitabin HCl’ün vitro salım çalışmaları sırasında dayanıklı olacağı gösterilmiştir (Tablo 4.5).

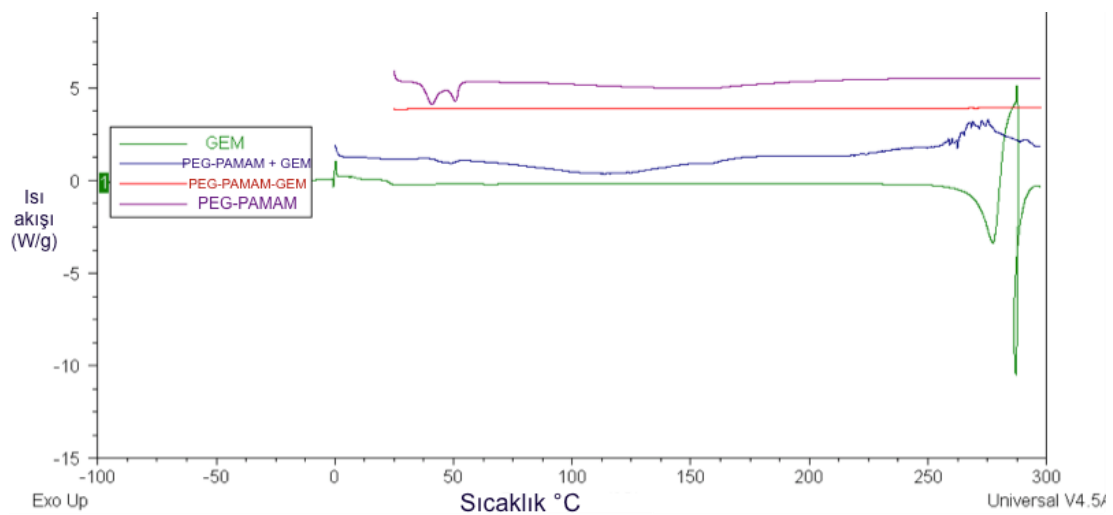
Tablo 4.5. Stabilite sonuçları.

pH	Ölçüm Zamanı (saat)	Konsantrasyon (µg/mL)	Hesaplanan Konsantrasyon (X ± SS)	Geri Kazanım (%)	VK (%)
7,4	0	5	4,98 ± 0,07	100	1,4
	24	5	4,91 ± 0,08	98,59	2
5,5	0	5	4,92 ± 0,09	98,4	1,44
	24	5	4,88 ± 0,06	97,6	1,28

4.3. Dendrimer-Gemsitabin HCl İnküzyon Komplekslerinin Karakterizasyonu

4.3.1. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

GEM, PEG-PAMAM, PEG-PAMAM-GEM ve PEG-PAMAM ile GEM'in fiziksel karışımlarına ait DSC termogramları grafikler şeklinde sunulmuştur (Şekil 4.17). Şekil 4.17'de 287,5 °C'de keskin bir pik şeklinde görülmüştür. PEG ile hazırlanan inküzyon kompleksine termogramda ise, gemsitabine ait bu erime pikinin kaybolduğu görülürken, PEG ile gemsitabinin fiziksel karışımı sonucunda elde edilen termogramda gemsitabine ait erime piki varlığını sürdürmektedir. Elde edilen DSC termogramları inküzyon komplekslerinin başarılı bir şekilde hazırlandığını göstermektedir.



Şekil 4.17. GEM, PEG-PAMAM, PEG-PAMAM-GEM inküzyon kompleksi ve PEG-PAMAM + GEM fiziksel karışımına ait DSC termogramları.

4.3.2. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

“Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi” başlığı altında anlatıldığı şekilde yürütülen deneyler sonucunda 2:1, 4:1, 6:1 gemsitabin: dendrimer mol oranları kullanılarak hazırlanan inküzyon kompleksleri üzerinde yapılan analizler göstermiştir ki, iki farklı çekirdek yapısında elde edilen sonuçlar farklılık göstermiştir. Elde edilen 100 µM dendrimer başına enkapsüle olan gemsitabin miktarı (µg) ve 100 µM dendrimer başına enkapsüle olan gemsitabin molü (µM) olarak Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6. Enkapsülasyon etkinliği sonuçları.

Formülasyon	100 μ M Dendrimer başına Enkapsüle olan Gemsitabin Miktarı (μ g)	100 μ M Dendrimer başına Enkapsüle olan Gemsitabin molü (μ M)
PEG1G2	24,002	80,09
PEG1G4	37,744	125,96
PEG1G6	39,696	132,47
EDA1G2	31,647	105,6
EDA1G4	41,854	139,67
EDA1G6	59,148	197,38

4.3.3. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli

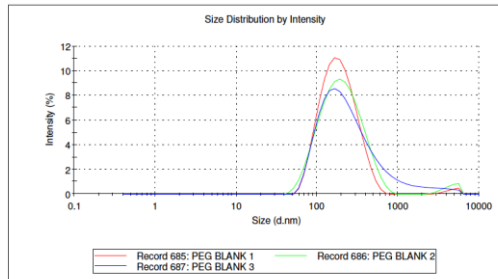
EDA ve PEG çekirdekli dendrimerlerin PEG 2000 ile modifiye edildikten sonraki formlarının ve bu şekilde modifiye edildikten sonra etkin madde içeren formlarının partikül boyutu ve dağılımları, zeta potansiyeli değerleri analiz edilmiştir. Çalışmaların devamında yapılan sitotoksite deneylerinden elde edilen verilere göre, in vivo deneylere PEG çekirdekli dendrimerlerle devam edilmesine karar verilmiştir. Bu nedenle antikor konjugasyonu ve antikor ile konjuge edilmiş dendrimerlerin partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümleri, sadece PEG çekirdekli dendrimerlere uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar standart sapmaları ile birlikte aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Dendrimerler, GEM-dendrimer inklüzyon kompleksleri, PEG-PAMAM-antikor konjugatları ve GEM-PEG-PAMAM antikor konjugatlarının partikül boyutu ve zeta potansiyeli sonuçları (n=6).

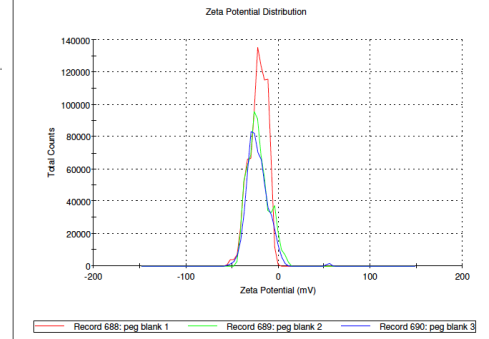
Formülasyon Kodu	Partikül Boyutu (nm)	Poli Dispersite İndeksi (PDI)	Zeta Potansiyeli (mV)
PEG-PAMAM	174,13 ± 11,3	0,28 ± 0,05	-21,9 ± 0,3
PEG-PAMAM1G2	263,63 ± 33	0,39 ± 0,07	-16,56 ± 1,3
PEG-PAMAM1G4	298,96 ± 11,88	0,32 ± 0,02	-8,9 ± 2,25
PEG-PAMAM1G6	234,53 ± 6,29	0,32 ± 0,04	-5,34 ± 2,5
EDA-PAMAM	318 ± 21	0,39 ± 0,07	-31,26 ± 2
EDA-PAMAM1G2	242,5 ± 6,9	0,32 ± 0,068	-23,46 ± 3,34
EDA-PAMAM1G4	380,95 ± 12,45	0,32 ± 0,078	-20,46 ± 2,34
EDA-PAMAM1G6	358,3 ± 11,6	0,36 ± 0,05	-8,13 ± 5,6
PEG-PAMAM-Flt1	230,76 ± 5,98	0,29 ± 0,02	-18,22 ± 2,21
PEG-PAMAM-Flt1-GEM	275 ± 6,21	0,26 ± 0,01	-17,29 ± 4,21

Results

Z-Average (d.nm): 186,0
 Pdi: 0,322
 Intercept: 0,803
 Result quality: Good



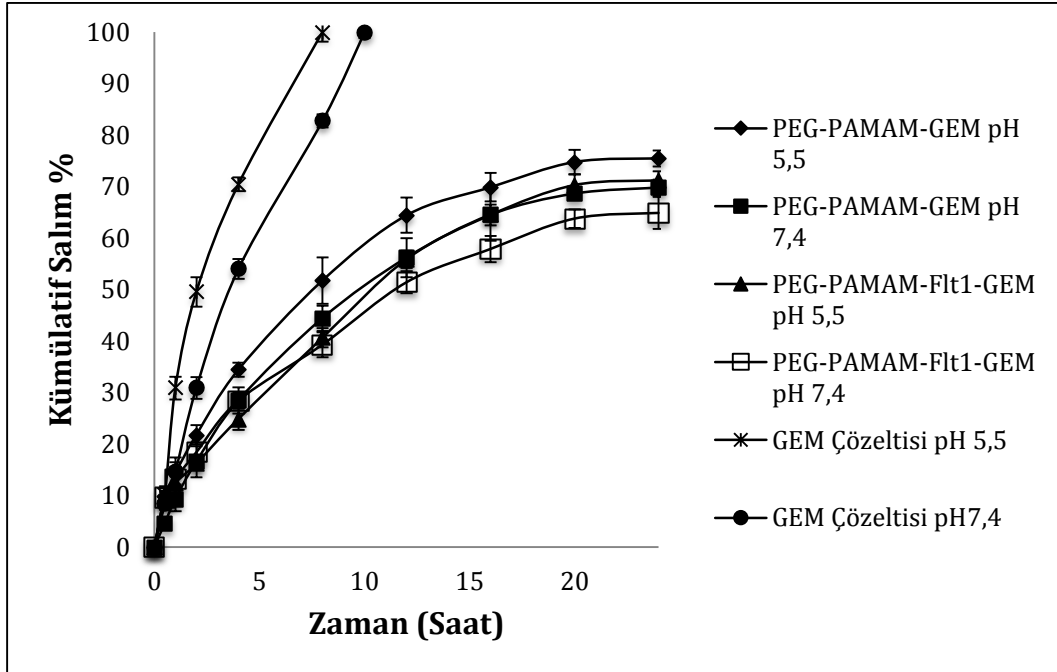
Results



Şekil 4.18. PEG-PAMAM dendrimerlerine ait partikül boyut ve zeta potansiyel dağılım grafikleri.

4.3.4. İn Vitro Salım Deneyleri

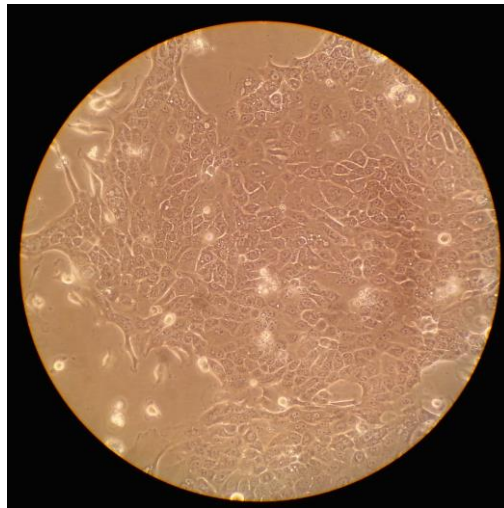
İn vitro salım çalışmaları Bölüm 3.2.6.4'te "İn Vitro Salım Deneyleri" başlığı altında anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Zamanın fonksiyonu olarak % kümülatif salım miktarının gösterildiği grafik Şekil 4.19'de verilmiştir.



Şekil 4.19. İn vitro salım profilleri (n=3).

4.4. Hücre Kültürü Deneyleri

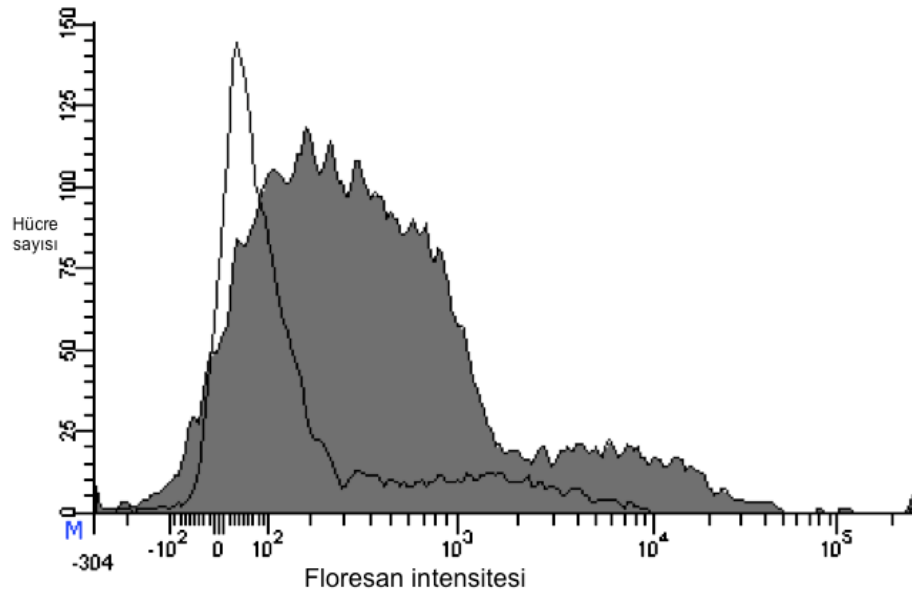
Bölüm 3.2.7’de “Hücre Kültürü Deneyleri” anlatıldığı şekilde açılıp büyütülen CFPAC-1 insan pankreas kanser hücreleri % 80 konfluense ulaştıktan sonra hücrelerin belirgin nükleuslu ve iğsi şekilli mikroskop görüntüleri Şekil 4.20’de görülmektedir.



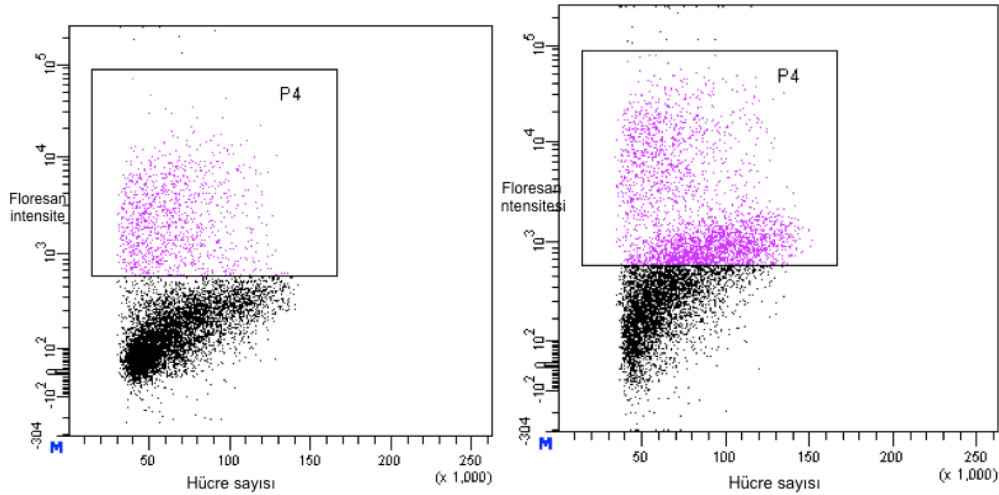
Şekil 4.20. CFPAC-1 insan pankreas hücrelerinin çoğaltma işleminden sonra ışık mikroskop altındaki görüntüsü.

4.4.1. CFPAC-1 Hücrelerinde VEGFR-1 Ekspresyonunun Gösterilmesi

“CFPAC-1 Hücrelerinde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü-1’in (VEGFR-1) Sentezinin Gösterilmesi” başlığı altında anlatıldığı şekilde yürütülen deney prosedürüne göre tez çalışmasında kullanılan insan pankreas kanser hücreleri olan CFPAC-1’in yüzeyinde aktif hedeflendirme ligandı olarak kullanılacak olan anti-VEGFR-1 antikorunun reseptörü olan VEGFR-1’in hangi oranda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu kapsamda elde edilen sonuçlar göstermiştir ki, CFPAC-1 hücrelerinde VEGFR-1 (Flt1) pozitiflik oranı $38,6 \pm 10,7$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.21). Şekil 4.21’de de görüldüğü gibi, boş histogram izotipik kontrol boyama, gri (dolu) histogram ise Flt-1 spesifik APC-işaretleli monoklonal antikor ile boyama sonucu elde edilen hücre dağılımını göstermektedir.



Şekil 4.21. CFPAC-1 hücrelerinin izotipik kontrol boyama (içi boş histogram) ve APC işaretli Flt-1 spesifik antikor ile boyama sonucu (gri) elde edilen akış sitometri histogram grafiği.

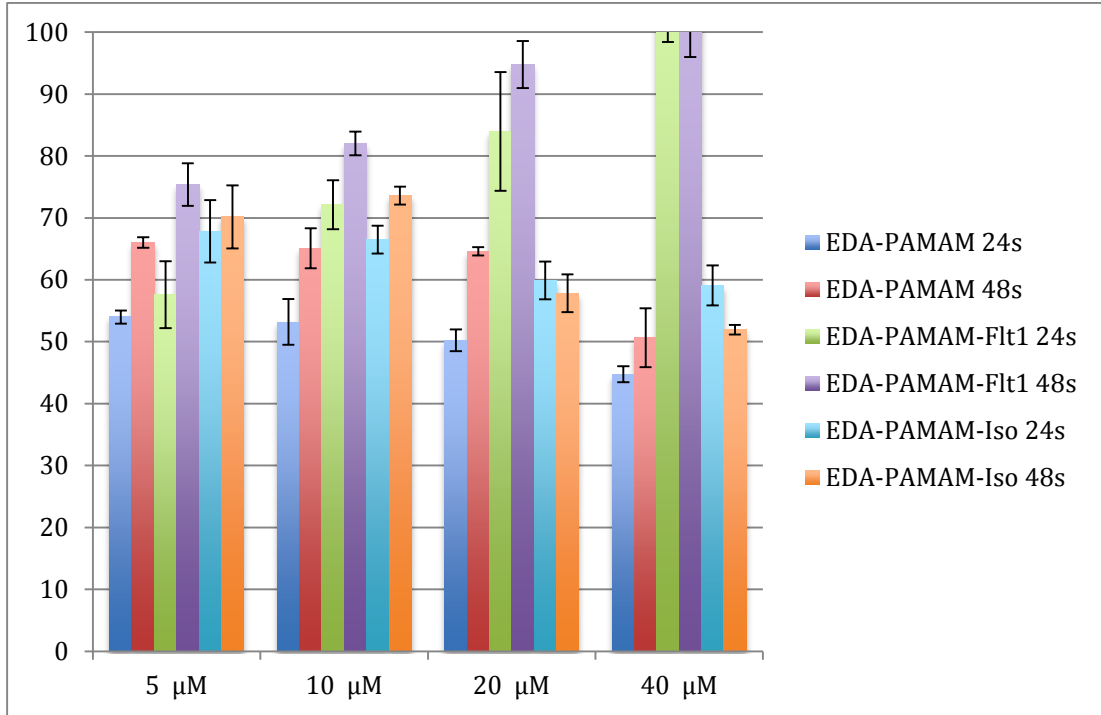


Şekil 4.22. CFPAC-1 hücrelerinin izotipik kontrol boyama (sol) ve APC işaretli Flt-1 spesifik antikor ile boyama sonucu (sağ) elde edilen akış sitometri saçılım grafiği.

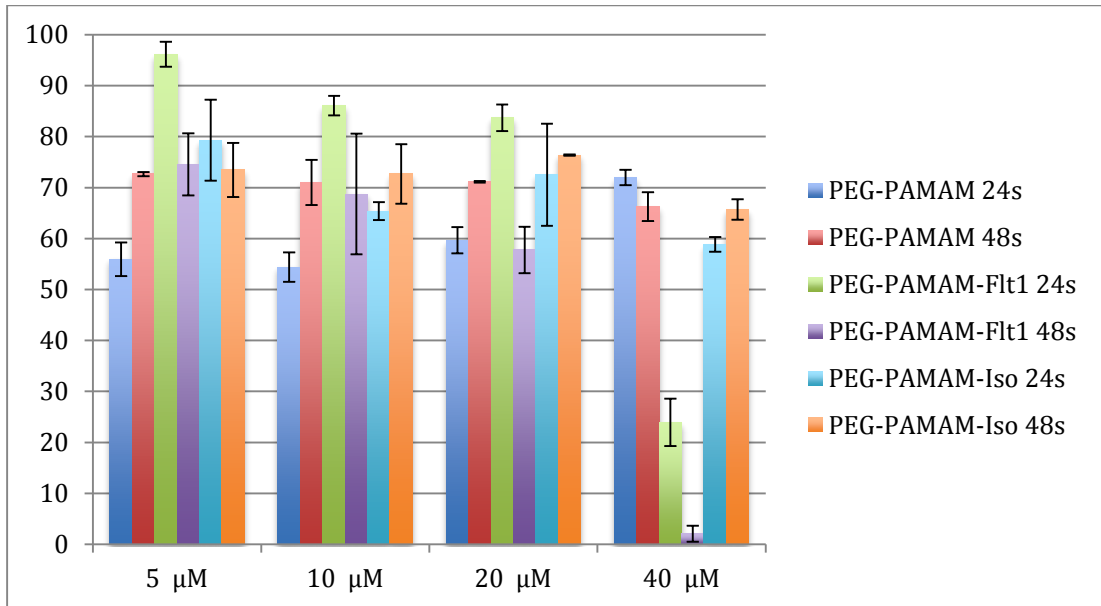
Şekil 4.22’de, Şekil 4.21’deki veriler saçılım grafiği şeklinde sunulmuştur. Solda izotipik kontrol boyama ile elde edilen saçılım grafiği görülmektedir. Kanser hücrelerinin yarattığı non-spesifik boyanma P4 içerisinde yer almaktadır. Sağdaki grafikte ise ana popülasyon içerisinde VEGFR-1 pozitif hücrelerin varlığı görülmektedir.

4.4.2. Sitotoksisite Çalışmaları

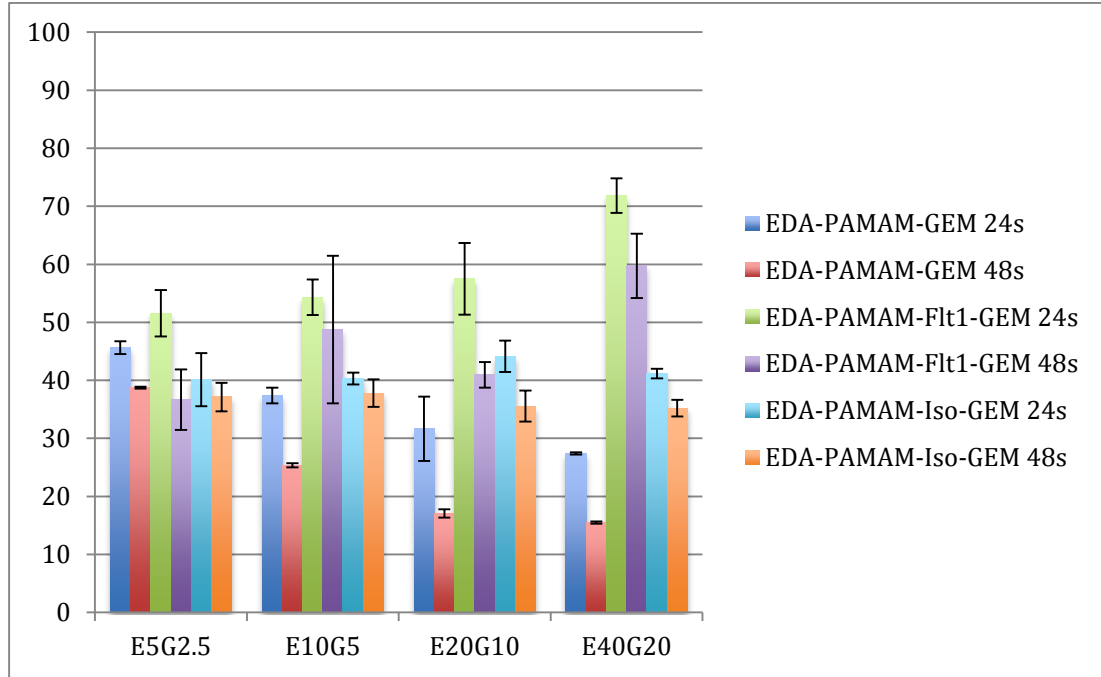
Tez çalışması kapsamında optimum dendrimer tipini (EDA ya da PEG), subtoksik konsantrasyon aralığını, gempitabine ilişkin sitotoksisite durumunu ve gempitabin yüklü dendrimerlerin gempitabinin sitotoksisitesini devam ettirmesine bir engel teşkil edip etmediğini ve antikor ile modifiye edilen dendrimerlerdeki sitotoksisite durumunu değerlendirebilmek amacıyla “Sitotoksisite Çalışmaları” başlığı altında anlatıldığı şekilde sitotoksisite çalışmaları yürütülmüştür. Bu kapsamda elde edilen sonuçlar grafikler halinde sunulmuştur (Şekil 4.23-4.26).



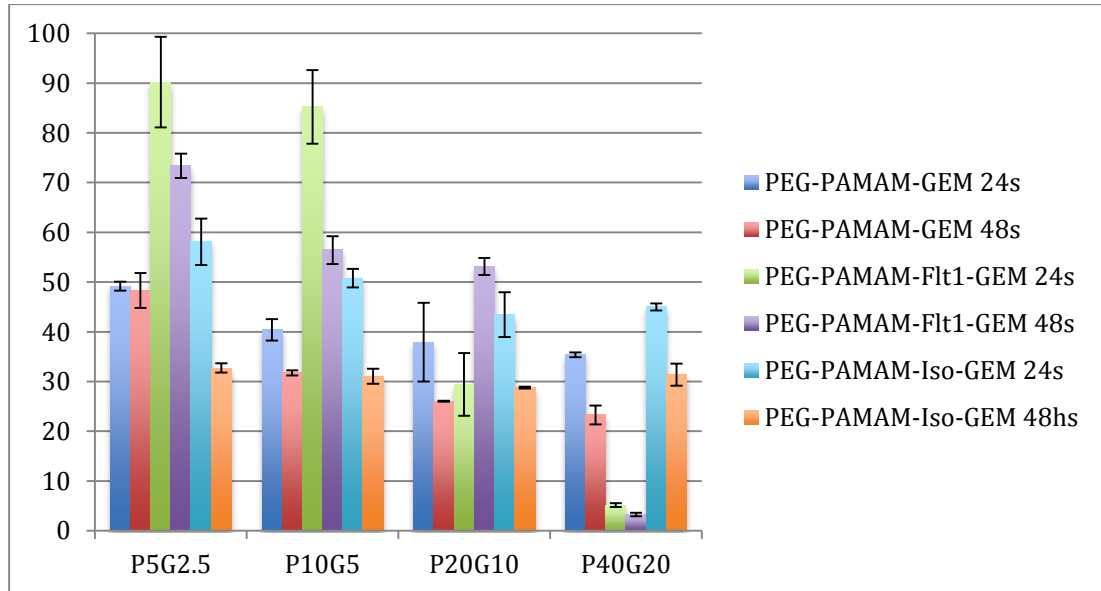
Şekil 4.23. EDA-PAMAM, EDA-PAMAM-Flt-1 ve EDA-PAMAM-Iso dendrimerlerinin CFPAC-1 hücrelerine 24 ve 48 saat süreli maruziyetten sonra elde edilen hücre canlılıkları.



Şekil 4.24. PEG-PAMAM, PEG-PAMAM-Flt-1 ve PEG-PAMAM-Iso dendrimerlerinin CFPAC-1 hücrelerine 24 ve 48 saat süreli maruziyetten sonra elde edilen hücre canlılıkları.



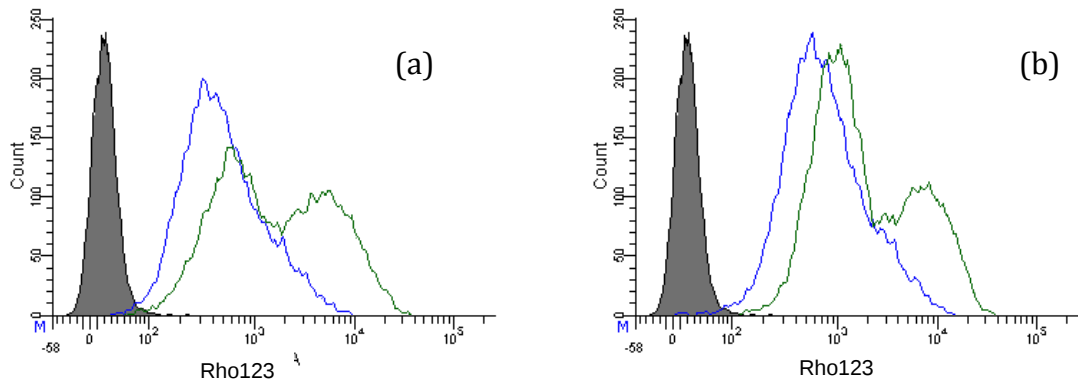
Şekil 4.25. EDA-PAMAM-GEM, EDA-PAMAM-Flt1-GEM, EDA-PAMAM-Iso-GEM'in CFPAC-1 hücrelerine 24 ve 48 saat süreli maruziyetten sonra elde edilen hücre canlılıkları.



Şekil 4.26. PEG-PAMAM-GEM, PEG-PAMAM-Flt1-GEM, PEG-PAMAM-Iso-GEM'in CFPAC-1 hücrelerine 24 ve 48 saat süreli maruziyetten sonra elde edilen hücre canlılıkları.

4.4.3. Hücre İçine Alım Çalışmaları

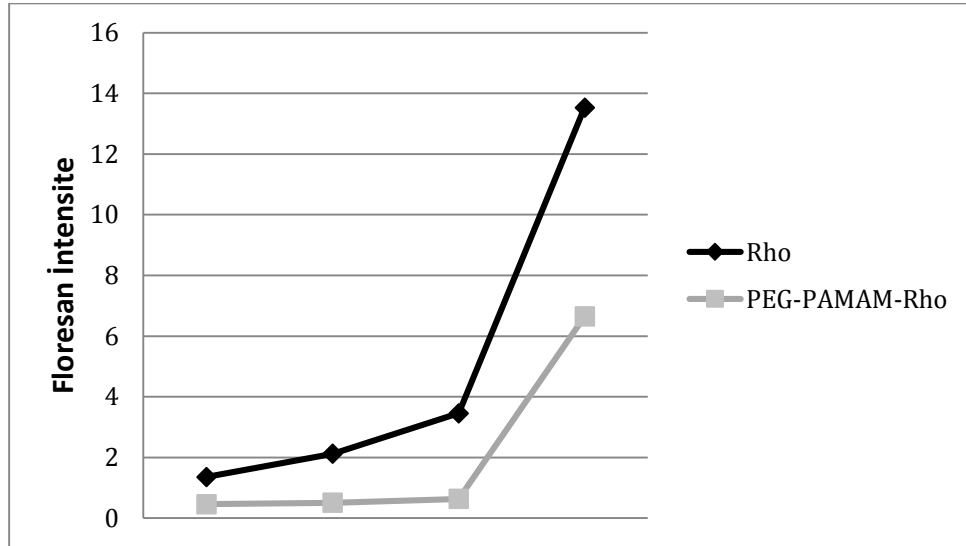
“Hücre İçine Alım Çalışmaları” başlığı altında anlatıldığı şekilde yürütülen in vitro hücre içine alım çalışmaları sonucunda akış sitometri cihazı ile tek başına Rho çözeltisi, PEG-PAMAM-Rho, PEG-PAMAM-Iso-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho dendrimerlerin uygulandığı hücrelerin verdikleri floresan şiddetindeki farklılıklara göre hücrelerin davranışı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Şekil 4.27’de görülen grafikte kontrol olarak hiçbir uygulama yapılmayan hücrelerin tek bir popülasyon ve düşük floresan oluşturduğu gözlenirken, mavi ile gösterilen ikinci hücre popülasyonu PEG-PAMAM-Iso-Rho dendrimerlerin uygulandığı hücrelerin uygulandığı grafiktedir. İki tepeli yeşil renk ile gösterilen popülasyon ise PEG-PAMAM-Flt1-Rho dendrimerlerin uygulandığı hücrelere aittir. Anti-VEGFR-1 ile hedeflendirilmiş dendrimerlerin hücrelerde VEGFR-1 pozitiflik oranlarına göre farklı floresan intensitesine sahip iki popülasyon oluşturduğu görülmektedir.



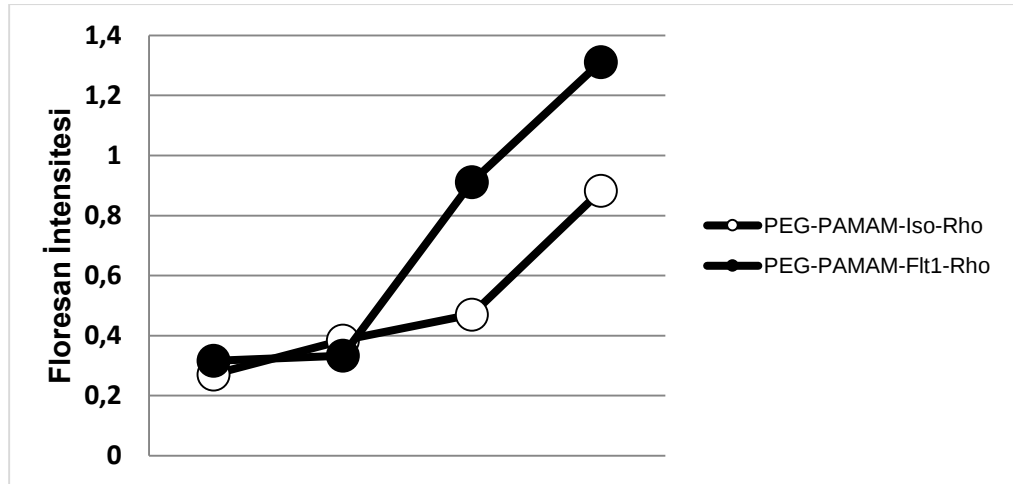
Şekil 4.27. Farklı molar oranlarda rodamin içeren (a) 20 nM (b) 40 nM formülasyonların uygulandığı CFPAC-1 hücrelerinin 8 saat sonunda gösterdikleri akış sitometrik histogram profilleri.

Rho, PEG-PAMAM-Rho, PEG-PAMAM-Iso-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho uygulanan dört farklı hücre grubunun kendi içerisindeki floresan intensiteleri akış sitometri ile tayin edilmiştir. Spesifik olmayan bir şekilde hücre içine alındıkları için Rho ve PEG-PAMAM-Rho’nun uygulandığı hücreler, PEG-PAMAM-Iso-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho’nun uygulandığı hücelere göre daha yüksek floresan intensite göstermiştir. Rho hücre içine rahatlıkla girebilen bir boya olduğu için PEG-PAMAM-Rho’ya göre hücre içerisine daha fazla alınmıştır (Şekil 4.28). PEG-

PAMAM-Iso-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho kendi aralarında kıyaslandığında ise düşük konsantrasyonlarda birbirlerine yakın profil gösterirken, artan konsantrasyonlarda, PEG-PAMAM-Flt1-Rho'nun uygulandığı hücreler daha yüksek floresan intensite göstermiştir.

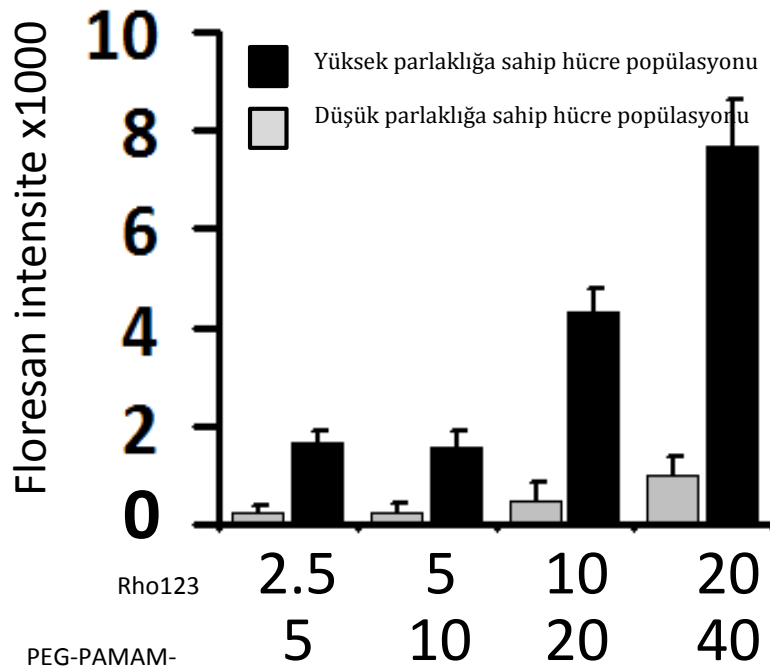


Şekil 4.28. Rho çözeltisi ve PEG-PAMAM-Rho formülasyonların artan konsantrasyonuna karşı hücrelerin akış sitometri sonucuna göre gösterdiği floresan intensite değişimi.

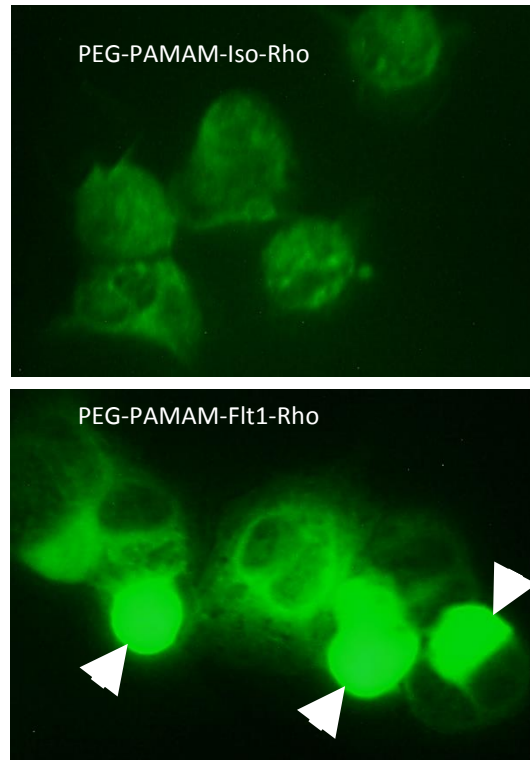


Şekil 4.29. PEG-PAMAM-Iso-Rho PEG-PAMAM-Flt1-Rho formülasyonlarının artan konsantrasyonuna karşı hücrelerin akış sitometri sonucuna göre gösterdiği floresan intensite değişimi.

PEG-PAMAM-Flt1-Rho'nun uygulandığı hücreler tek başlarına değerlendirildiğinde ise, hücreler yüksek ve düşük floresan intensite özelliklerine göre iki alt popülasyona ayrılmıştır. Şekil 4.30'de, CFPAC-1 hücreleri, Şekil 4.27'da yeşil renk ile gösterilen popülasyonda da görüldüğü gibi PEG-PAMAM-Flt1-Rho'nun hücre içine alımı Flt-1 pozitiflik oranına göre gerçekleştirmiştir.



Şekil 4.30. PEG-PAMAM-Flt1-Rho'nun artan konsantrasyona karşı düşük ve yüksek parlaklık gösteren hücrelerin intensite değişimi.



Şekil 4.31. PEG-PAMAM-Iso-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho uygulanan CFPAC-1 hücrelerine ait floresan mikroskop görüntüleri.

Hücre içine alımın floresan mikroskop ile gösterildiği deneylerde ise Şekil 4.31’de görüldüğü gibi anti-VEGFR-1 ile konjuge edilmiş rodamin 123 ile işaretlenmiş dendrimerlerin uygulandığı hücreler daha parlaktır.

4.5. İn Vivo Deneyler

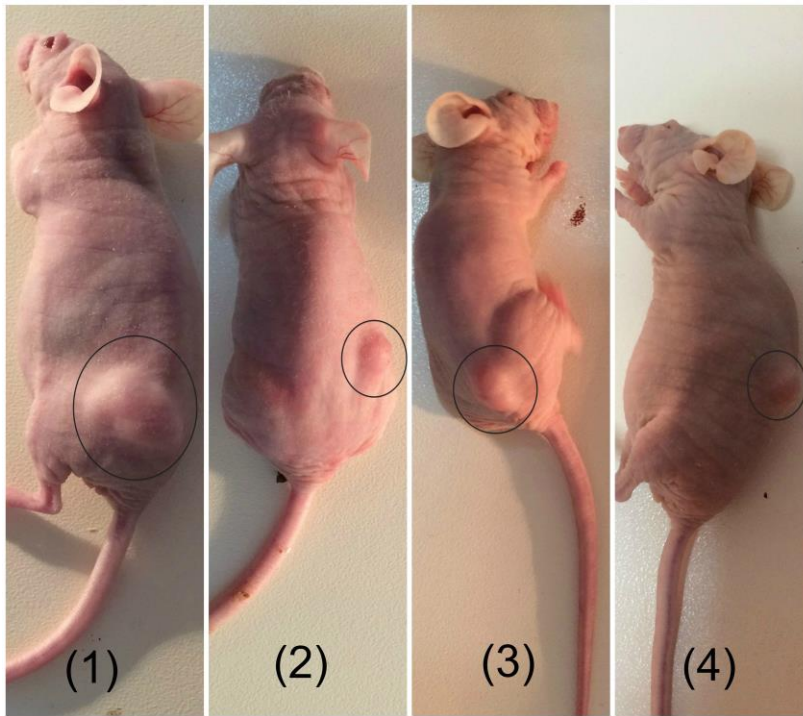
4.5.1. Pankreas Tümör Modelinin Geliştirilmesi

“Pankreas Tümör Modelinin Geliştirilmesi” başlığı altında anlatıldığı şekilde nude farelerde heterotopik olarak pankreas tümörü farelerin sırt bölgesinde geliştirilmiştir. Farelere CFPAC-1 enjeksiyonundan sonra fareler gözlemlenmiş ve kanser hücrelerinin enjeksiyonundan 21 gün sonra maksimum büyüklüğe erişen tümörler tedavi edilmeye başlanmıştır.

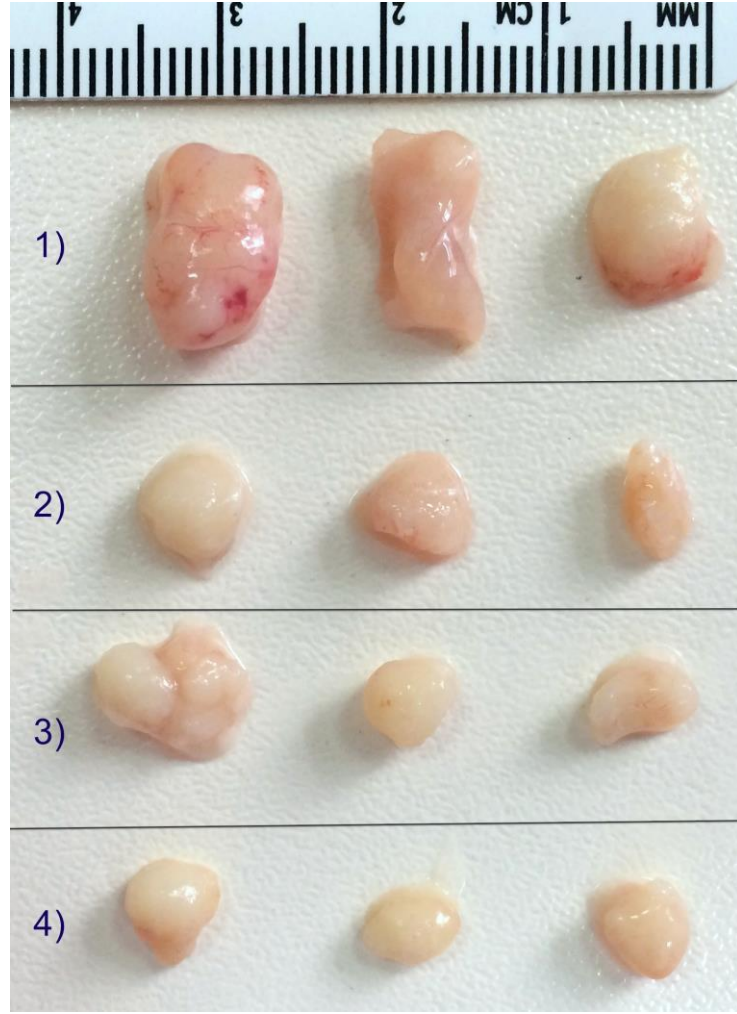
4.5.2. Antitümör Etkinlik Çalışması

“Antitümör Etkinlik Çalışması” başlığı altında anlatıldığı şekilde yürütülen in vivo deneyler kapsamında geliştirilen formülasyonların antitümör etkinliğinin

araştırılması için öncelikle subkütan olarak pankreas tümörü oluşturulmuş farelerde tümör çapının takibi yapılmıştır. Kontrol grubu, gempitabin HCl çözeltisinin uygulandığı grup, PEG-PAMAM-GEM inklüzyon komplekslerinin uygulandığı ve PEG-PAMAM-Flt1-GEM dendrimerlerinin uygulandığı grup olmak üzere dört farklı deney grubunda dörder gün ara ile dört kez ip enjeksiyon yapıldıktan sonra fareler sakrifiye edilmiştir (Şekil 4.32). Şekil 4.32’de de görüldüğü gibi tedavi edilmeyen farelerdeki tümör boyutu diğerlerine göre oldukça büyüktür. Bu durum uygulanan tedavi yaklaşımlarının işe yaradığını göstermektedir. Tümörleri çıkarılan farelerde de Şekil 4.32 ile paralel bir sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.33). Ancak tedavi sonucundaki sonuç tümör çapları, formülasyonun başarısını göstermek için yetersizdir, daha önemli bir veri olarak tümör çapındaki değişim grafikleri verilmiştir. 16 gün boyunca takip edilen tümör çapları her bir deney grubu için grafikler şeklinde sunulmuştur (Şekil 4.33).



Şekil 4.32. Tümör oluşturulmuş farelerde 4 kür tedavi sonrasında elde tümör görüntüleri (1) Tedavi edilmeyen kontrol grubu (2) GEM ile tedavi edilen grup (3) PEG-PAMAM-GEM inklüzyon kompleksi ile tedavi edilmiş grup (4) PEG-PAMAM-Flt1-GEM ile tedavi edilmiş grup.



Şekil 4.33. Dört kür tedavi sonrası farelerden çıkarılan tümörler (1) Tedavi edilmeyen kontrol grubu (2) GEM ile tedavi edilen grup (3) PEG-PAMAM-GEM inklüzyon kompleksi ile tedavi edilmiş grup (4) PEG-PAMAM-Flt1-GEM ile tedavi edilmiş grup.

Tablo 4.8. Tedavi uygulanmayan kontrol grubundaki farelere ait ağırlık ve tümör çapı verileri.

Fare No	Enjeksiyon No	Ağırlık (g)	Ortalama Tümör Çapı (cm)	Enjeksiyon Hacmi (µL)
1	1	32	0,70	480
1	2	34	0,65	510
1	3	32	0,75	480
1	4	32	0,79	
1		33	0,65	
2	1	31	0,40	465
2	2	32	0,50	480
2	3	31	0,65	465
2	4	31	0,65	
2		32	0,65	
3	1	27	0,81	405
3	2	32	0,75	480
3	3	31	0,99	465
3	4	31	0,99	
3		31	1,02	
4	1	30	0,84	450
4	2	32	0,75	480
4	3	32	1,12	480
4	4	30	1,31	
4		30	1,12	
5	1	28	0,60	420
5	2	29	0,70	435
5	3	29	0,80	435
5	4	28	0,80	
5		28	0,70	
6	1	27	0,50	405
6	2	29	0,55	435
6	3	28	0,60	420
6	4	29	0,88	
6		29	0,90	

Tablo 4.9. GEM uygulanan farelere ait ağırlık ve tümör çapı verileri.

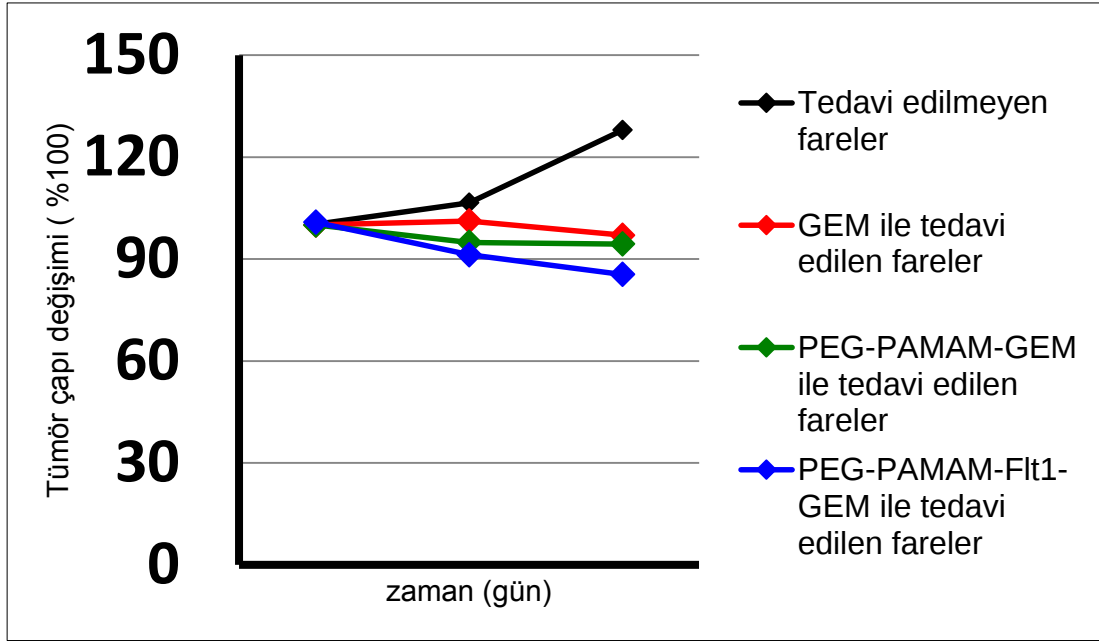
Fare No	Enjeksiyon No	Ağırlık (g)	Ortalama Tümör Çapı (cm)	Enjeksiyon Hacmi (µL)
1	1	26	0,55	390
1	2	30	0,70	450
1	3	30	0,70	450
1	3	32	0,79	
1		30	0,65	
2	1	33	0,60	495
2	2	33	0,59	495
2	3	33	0,65	495
2	4	34	0,65	
2		32	0,59	
3	1	32	0,45	480
3	2	31	0,55	465
3	3	32	0,45	480
3	4	33	0,45	
3		32	0,40	
4	1	25	0,75	375
4	2	27	0,65	405
4	3	27	0,55	405
4	4	29	0,55	
4		27	0,55	
5	1	31	0,85	465
5	2	30	0,80	450
5	3	31	0,75	465
5	4	31	0,69	
5		31	0,70	
6	1	26	0,50	390
6	2	23	0,45	345
6	3	23	0,49	345
6	4	25	0,45	
6		24	0,59	

Tablo 4.10. PEG-PAMAM-GEM inklüzyon kompleksi uygulanan farelere ait ağırlık ve tümör çapı verileri.

Fare No	Enjeksiyon No	Ağırlık (g)	Ortalama Tümör Çapı (cm)	Enjeksiyon Hacmi (µL)
1	1	29	0,59	440
1	2	30	0,65	450
1	3	29	0,70	435
1	4	30	0,65	
1		26	0,60	
2	1	27	0,55	405
2	2	27	0,45	405
2	3	26	0,50	390
2	4	23	0,45	
2		19	0,35	
3	1	33	0,65	495
3	2	32	0,50	480
3	3	32	0,53	480
3	4	31	0,59	
3		28	0,55	
4	1	27	0,99	405
4	2	30	1,02	450
4	3	30	0,88	450
4	4	29	0,99	
4		26	0,95	
5	1	30	0,80	450
5	2	30	0,79	450
5	3	30	0,84	450
5	4	29	0,75	
5		28	0,69	
6	1	29	0,80	435
6	2	30	0,75	450
6	3	29	0,69	435
6	4	29	0,69	
6		26	0,50	

Tablo 4.11. PEG-PAMAM-Flt1-GEM uygulanan farelere ait ağırlık ve tümör çapı verileri.

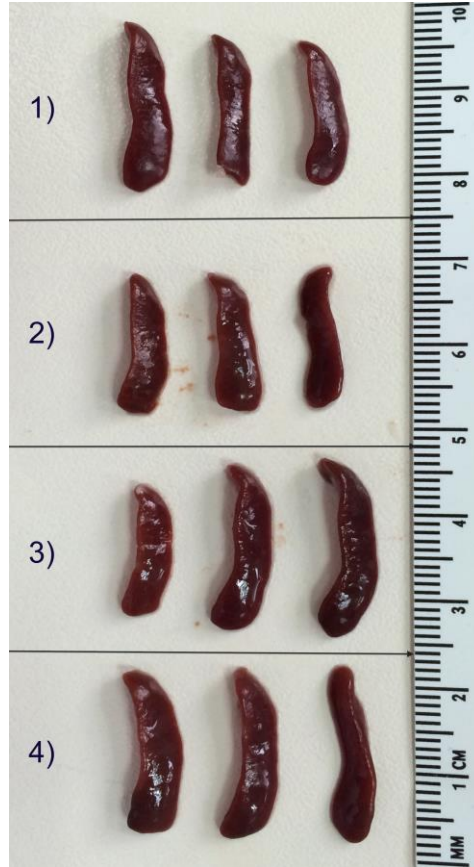
Fare No	Enjeksiyon No	Ağırlık (g)	Ortalama Tümör Çapı (cm)	Enjeksiyon Hacmi (µL)
1	1	27	0,79	405
1	2	28	0,70	420
1	3	28	0,73	420
1	4	28	0,65	
1		28	0,45	
2	1	32	0,95	480
2	2	32	0,89	480
2	3	32	0,73	480
2	4	32	0,63	
2		30	0,49	
3	1	32	0,94	480
3	2	32	0,65	480
3	3	31	0,75	465
3	4	32	0,69	
3		31	0,59	
4	1	32	0,65	480
4	2	31	0,60	465
4	3	31	0,55	465
4	4	32	0,63	
4		30	0,55	
5	1	29	0,85	440
5	2	25	0,79	375
5	3	24	0,65	360
5	4	26	0,65	
5		25	0,55	
6	1	26	0,49	390
6	2	26	0,50	390
6	3	26	0,49	390
6	4	27	0,45	
6		26	0,20	
7	1	28	0,35	420
7	2	30	0,40	450
7	3	30	0,35	450
7	4	28	0,20	
7		29	0,20	



Şekil 4.34. Uygulanan tedavi ile birlikte tümör çaplarında görülen değişim

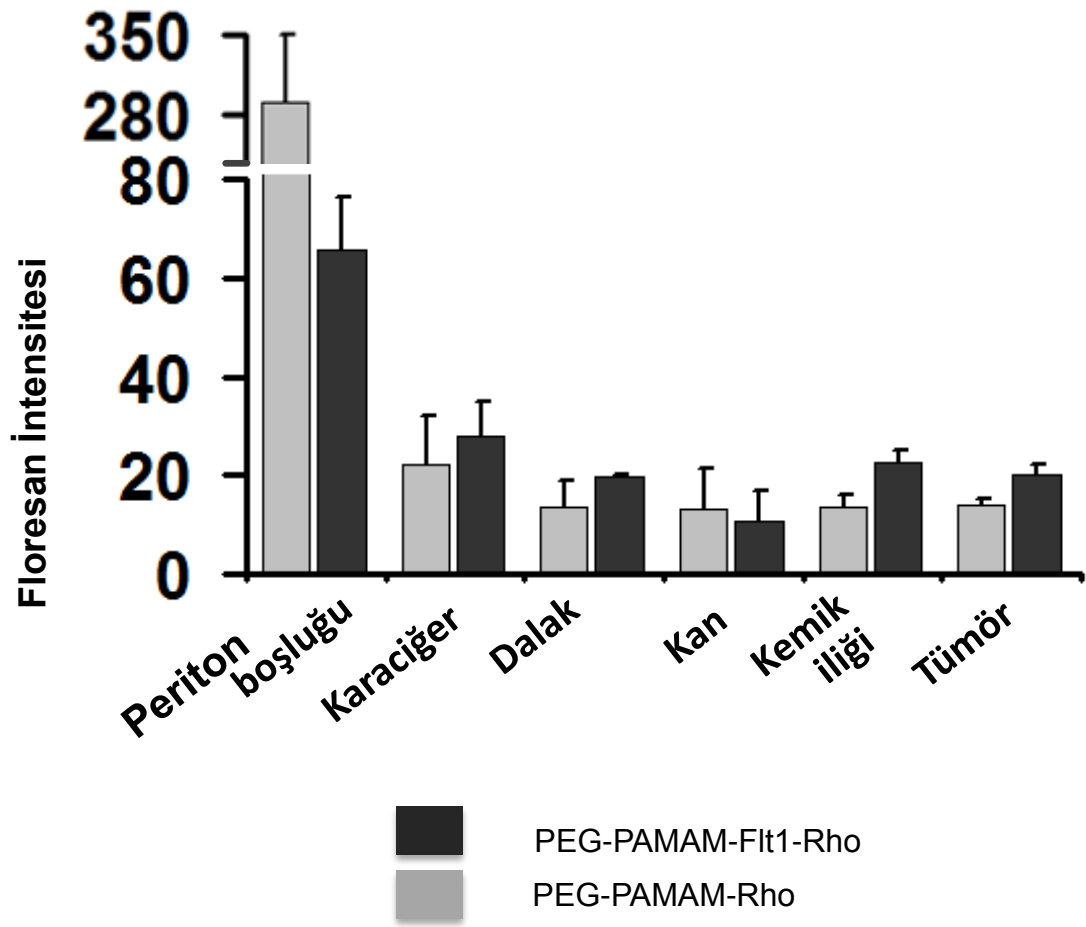
4.5.3. Biyodağılım Çalışmaları

“Biyodağılım Çalışmaları” başlığı altında anlatıldığı şekilde, çıkarılan periton boşluğu sıvısı, kan, karaciğer, dalak (Şekil 4.35), kemik iliği ve tümör dokuları homojenize edilip ficoll ile eritrositlerinden ayrıldıktan sonra PEG-PAMAM-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho dendrimerlerin uygulandığı fare gruplarında rodamin aracılığı ile dendrimerlerin biyodağılımı değerlendirilmiştir.

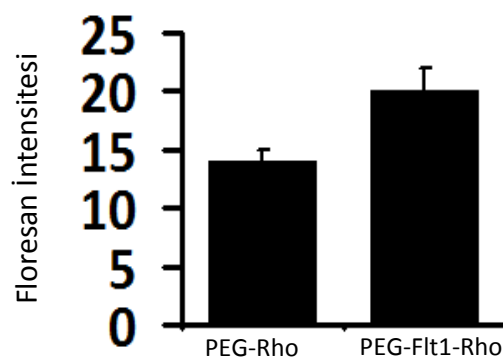


Şekil 4.35. Dört kür tedavi sonrası farelerden çıkarılan dalak dokuları (1) Tedavi edilmeyen kontrol grubu (2) GEM solüsyonu ile tedavi edilen grup (3) PEG-PAMAM-GEM kompleksi ile tedavi edilmiş grup (4) PEG-PAMAM-Flt1-GEM kompleksi ile tedavi edilmiş grup.

Akış sitometri cihazından elde edilen veriler grafiğe geçirildiğinde, tümöre hedeflendirilmemiş dendrimerlerin hedeflendirilmiş olanlara göre yaklaşık 4 kat fazla periton boşluğunda kaldığı görülmüştür. Karaciğer dokusundaki floresan intensitesine bakıldığında hedeflendirilmiş dendrimerlerin hücrelerde gösterdiği floresan intensitesi 30 iken, hedeflendirilmemişlerde 21'dir. Dalakta, kemik iliğinde ve tümörde de grafikte görüldüğü gibi hedeflendirilmiş dendrimerlerin hücrelerde yarattığı floresan intensitesi daha yüksektir. Şekil 4.36'da da görüldüğü gibi sadece periton boşluğunda ve kan dokusunda hedeflendirilmemiş olan PEG-PAMAM-Rho dendrimerleri hücrelerde daha yüksek floresan intensitesine neden olmuştur.



Şekil 4.36. PEG-PAMAM-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho uygulanan farelere ait biyodağılım sonuçları.

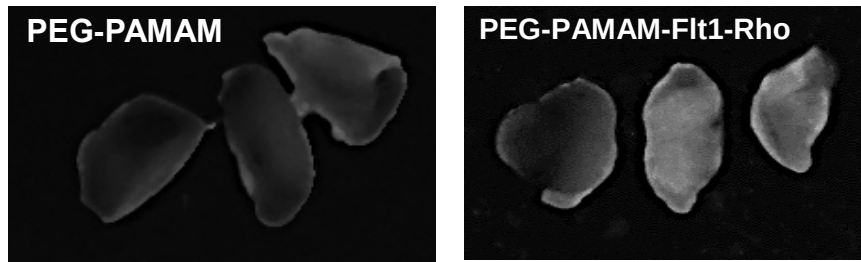


Şekil 4.37. PEG-PAMAM-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho uygulanan farelerin tümör dokularına ait floresan intensite grafikleri.

Tümör dokusunda elde edilen floresan intensite farklılıklar ayrıca Şekil 4.37’de grafik şeklinde sunulmuştur. PEG-Rho uygulanan farenin tümöründe 14 olan floresan intensitesi, PEG-Flt1-Rho uygulanan farede 20 olarak bulunmuştur.

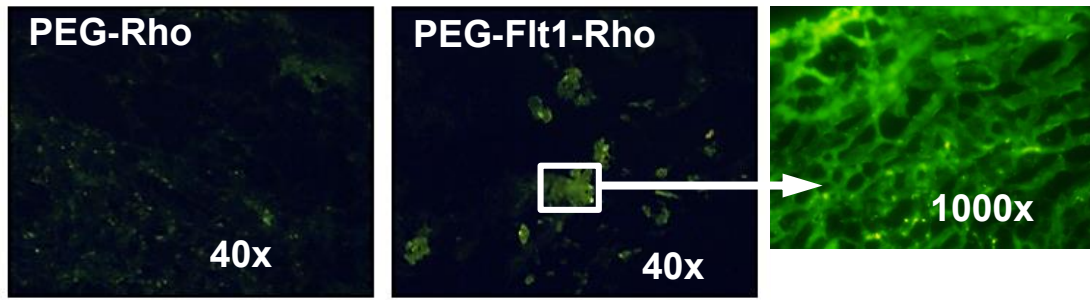
4.5.4. İn Vivo Görüntüleme

Tez çalışması kapsamında tasarlanan tümöre hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemin tümör dokusunda hedeflendirilmemiş olan sisteme göre daha fazla akümüle olduğunu göstermek amacıyla, rodamin enkapsüle edilmiş dendrimerler farelere uygulandıktan 12 saat sonra tümör dokuları çıkarılıp kesitler alınarak UV kamera altında görüntü alınmıştır. İki sistemi kıyaslamak amacıyla alınan tümör görüntüleri Şekil 4.38’de verilmiştir. Anti-VEGFR-1 yüklü sistemin uygulandığı fareye ait tümörün antikorsuz formülasyonun uygulandığı farenin tümör dokusuna göre floresan intensitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

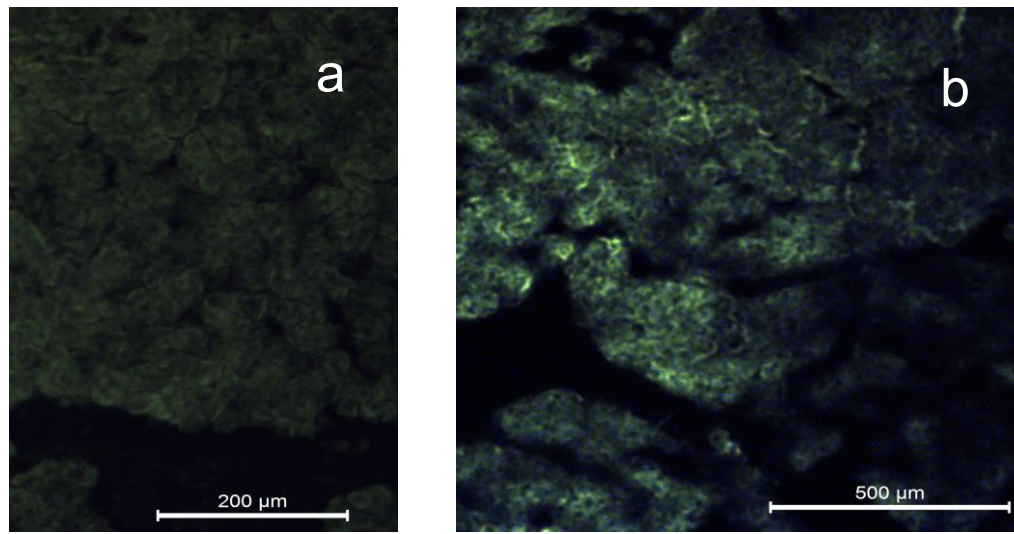


Şekil 4.38. Tümör dokularına ait UV kamera görüntüsü.

“İn Vivo Görüntüleme” başlığı altında anlatıldığı şekilde çıkarılıp, dondurulan tümör dokularında kesit alındıktan sonra floresan mikroskop altında görüntü alınmıştır (Şekil 4.39). Şekil 4.39’de de görüldüğü gibi aynı büyütme oranında alınan görüntülerden antikorsuz dendrimerin uygulandığı sisteme ait farenin tümör dokusu daha düşük floresan vermiştir. Bu durum bize antikor ile hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemin tümör dokusu tarafından daha yüksek oranda alındığı göstermektedir.



Şekil 4.39. PEG-PAMAM-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho uygulanan farelerin tümör doku kesitlerine ilişkin floresan mikroskop görüntüsü.



Şekil 4.40. Pankreas doku kesitlerinin floresan mikroskop görüntüleri (a) PEG-PAMAM-Rho; (b) PEG-PAMAM-Flt1-Rho uygulanan farelerin karaciğer doku kesitlerine ilişkin floresan mikroskop görüntüsü.

“Pankreas Tümör Modelinin Geliştirilmesi” başlığı altında farelerde tümör geliştirme çalışması ayrıntılı olarak anlatılmıştı. Heterotopik olarak deri altında yerleştirilerek geliştirilen pankreas tümöründe gerçekleştirilen in vivo görüntüleme deneyleri her ne kadar tümöre hedeflendirmenin başarıldığını gösterse de, in vivo görüntüleme çalışmaları pankreas dokusunda da gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda doku kesitlerinde yapılan görüntüleme sonuçları antikoru ve antikorsuz dendrimerlerin uygulandığı farelerin pankreas dokusunda da floresan intensitesinde farklılık olduğunu göstermektedir (Şekil 4.40).

5. TARTIŞMA

Bölüm 3.2.1.'de "Dendrimer Sentezi" başlığı altında şekilde tez çalışması kapsamında pankreas kanser tedavisi amacıyla tümöre hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistem tasarlanmış ve tasarlanan bu sistem başarı ile geliştirilmiştir. İlaç taşıyıcı sistemin geliştirilmesine ilişkin her bir basamak önceki bölümlerde sonuçları ile birlikte verilmiştir. Bunun yanı sıra ilaç taşıyıcı sistemin in vitro ve in vivo karakterizasyonları da ayrıntılı bir biçimde gerçekleştirilmiştir.

5.1. Dendrimer Sentezi

Tez çalışmasında metod bölümünde "PEG tetrakisamin Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin Sentezi" ve "EDA Çekirdekli PAMAM Dendrimerlerin Sentezi" başlığı altında anlatıldığı şekilde EDA ve PEG çekirdekli 4,5. jenerasyon, yüzeyi anyonik karboksilik asit grupları ile bezenmiş, PEG 2000 ile modifiye edilmiş ve pankreas tümörüne hedeflendirme amacıyla anti-VEGFR-1 antikoru ile konjuge edilmiştir. Dendrimer sentezi ıraksak yöntem esasına göre gerçekleştirilmiş olup, EDA çekirdekli dendrimer sentezinde, etilendiamin çekirdek olarak kullanılmış ve üzerine sırasıyla metilakrilat ve etilendiamin eklenerek PAMAM türü dendrimer sentezlenmiştir. PEG çekirdekli dendrimer sentezi de aynı şekilde ıraksak yöntem esasına göre yürütülmüştür, bu kapsamda, 4 kollu-NH₂-5000 maddesini çekirdek olarak kullanılmış ve üzerine sırasıyla 4. jenerasyona ulaşana kadar metilakrilat ve etilendiamin ilave ederek PAMAM türü dendrimer sentezlenmiştir. Sonrasında, her iki dendrimerin yüzeyini PEG 2000 ile modifiye etmek amacıyla NH₂-PEG2000-NH₂ maddesi kullanılmıştır. Dendrimer sentezi ATR spektroskopisi ile doğrulanmıştır. FTIR-ATR (Attenuated Total Reflectance) spektroskopisi, absorpsiyon bantlarının dalga boyunda azalma meydana getirilerek daha az emekle ve örnek kalınlığından bağımsız olarak soğurganlığı çok fazla olabilen farklı maddelerin spektrum analizlerine olanak sağlar. ATR tekniğinin temelinde ışının numune tarafında soğrulup yansıtılması (geçirgenlik metodu) yerine ışının örnekten saçılımı ölçülür. ATR Tekniği polimer, köpük, tekstil, boya, sır gibi kaplama maddelerin analizlerinde oldukça etkindir.

Reaksiyonlar ATR spektroskopisi ile takip edilmiştir. ATR spektroskopisi ile reaksiyon takibi yapılırken ester grupların oluşması ($\approx 1732 \text{ cm}^{-1}$) ayrıca amit I

($\approx 1640 \text{ cm}^{-1}$) ve amit II ($\approx 1540 \text{ cm}^{-1}$) bağlarının oluşması en önemli bir takip yöntemi olarak benimsenmiştir. Bunun yanı sıra amin jenerasyonundan estere geçiş veya esterden amine geçerken $\approx 3300 \text{ cm}^{-1}$ civarındaki amin gruplarının tam jenerasyonlarda ortaya çıkması buçuklarda kaybolması da önemli bir reaksiyon takip metodu olmuştur. Yarım jenerasyonlara (EDA-PAMAM 4,5 ve PEG-PAMAM 4,5) PEG 2000 maddesini bağlandığını ATR spektrumunda PEG 2000 maddesinden gelen iki kuvvetli bant C-O ($\approx 1100 \text{ cm}^{-1}$) ve $-\text{CH}_2$ ($\approx 2900 \text{ cm}^{-1}$) grupları sayesinde reaksiyonun gerçekleştiğini söyleyebiliriz.

Asit reaksiyonlarının takibinde ester pikinin ($\approx 1730 \text{ cm}^{-1}$) kaybolması, onun yerine $3500\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$ arasında asitten kaynaklı (COOH) yayvan pikinin oluşması reaksiyonun gerçekleştiğini göstermektedir.

Nükleer manyetik rezonans, dendrimerlerin karakterizasyonunda en sık kullanılan rutin analizdir. NMR analizleri yüksek jenerasyonlara kadar ilerleyen dendrimer sentezinin her basamağında gereklidir. Çünkü NMR analizi uç gruplarda gerçekleşen kimyasal dönüşüm hakkında bilgi sağlamaktadır. Poli(propilen imin), poli(fenilester) ve poli(eter keton) gibi organik dendrimerler için ^1H ve ^{13}C NMR en çok kullanılanlardır. Bazı durumlarda, seçici ışınlama ya da daha kompleks titreşim dizileri sinyallerin daha iyi ayrılması için gereklidir.

NMR çalışmasıyla reaksiyon takibi yaparken dikkat etmemiz gereken en önemli husus metil esterinin yarım jenerasyonlarda görülmesi, tam jenerasyonlarda kaybolmasıdır. Yarım jenerasyonlarda metil esteri ^1H NMR da 3,68 ve 3,69 ppm de rezonans olmaktadır. ^{13}C NMR da metil esteri 174,67-174,74 ppm arasında görülmektedir. Tam jenerasyonlara çıktığımızda ^1H NMR da metil esterinin kaybolduğu, ^{13}C NMR da ise amit bağından (CONH) kaynaklanan 174,77-175,35 ppm'deki piklerin geldiği gözlemlenmiştir. ^1H NMR da PEG_4,5 ve EDA_4,5 jenerasyonlu dendrimerlerin uçuna PEG 2000 maddesini bağladığımızda NH_2 protonu 4,22 ve 4,23 ppm de rezonans yaptığı görülmüştür. Ayrıca PEG maddesin de bulunan metilen grupları 3,5-3,7 ppm arasında rezonans yapmaktadır. Uç gruplarına PEG bağlanmış dendrimerleri asite dönüştürdüğümüzde metil esterleri kaybolduğu gözlemlenmiştir.

5.1.1. Antikor Konjugasyonu

Anjiyogenez ana gelişimsel ve yetişkin organizmadaki fizyolojik bir prosestir. Bu proseste, endotel ve müral hücrelerdeki hücre adezyon molekülleri ve çeşitli büyüme faktörlerinin koordineli bir şekilde çalışması gerekir. Gelişimsel anjiyogenezde VEGF-A ve onun reseptörleri bugüne kadar en iyi şekilde karakterize edilmiş sinyal yolağıdır (110,111). Tek bir VEGF-A alelinin kaybı, embriyonik ölümlere neden olur. Bu yolak, üreme sistemi ve kemik anjiyogenezinde de önemli role sahiptir. VEGF-A'nın tümör anjiyogenezindeki rolü de yoğun çalışılan bir araştırma konusudur (112). VEGF-A iki adet tirozin kinaz reseptörü olan VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (KDR, Flk-1)'ye bağlanır. VEGFR-2, VEGF-A'nın mitojenik, anjiyogenik ve permeabilite artırıcı etkilerinin ana aracısıdır. Anjiyogenezin regülasyonunda VEGFR-1'in önemi daha komplekstir. Bazı koşullarda, VEGFR-1 tuzak reseptör olarak rol oynayarak, VEGF'i ayrı tutmakta ve onun VEGFR-2 ile etkileşimini engellemektedir. Bununla birlikte, VEGFR-1'in hematopoezde, tümör damarlanmasında görev alan ve anjiyogenezi başlatan monositlerin ve diğer kemik iliğinden türetilmiş diğer hücrelerin temin edilmesinde önemli rollere sahip olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (113,114). Buna ek olarak, VEGFR-1, matriks metalloproteinazların indüksiyonunda ve endotel hücrelerden büyüme faktörünün parakrin yolla salımında rol oynamaktadır (115). Bu durumda, VEGFR-1'in selektif ligandları VEGF-B ve plasental benzeri büyüme faktörü de bu proseslerde yer almaktadır. Dahası, bazı durumlarda VEGFR-1 tümör hücreleri tarafından eksprese edilir ve kemotaktik sinyale aracılık eder, bu durum VEGFR-1'in kanser gelişmesindeki rolünü önemli ölçüde artırmaktadır (85).

Tez çalışması kapsamında, hem pankreas tümörüne aktif hedeflendirme sağlamak hem de tümör anjiyogenezini durdurabilmek için anti-VEGFR-1 antikorunu ile dendrimerler modifiye edilmiştir. Antikor Bölüm 3.2.2'de "Antikor Konjugasyonu" başlığı altında anlatıldığı şekilde dendrimer yüzeyine kimyasal yolla konjuge edilmiştir. Konjugasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini doğrulamak amacıyla NMR analizi ve kütle spektrometrisi kullanılmıştır.

Kütle sınırlamasından dolayı, kimyasal iyonizasyon veya hızlı atom bombardımanı (FAB) gibi klasik kütle spektrometri teknikleri sadece molekül ağırlığı 3000 D'a kadar olan küçük dendrimerlerin karakterizasyonunda kullanılabilmektedir.

Elektro-Sprey İyonizasyon (ESI) çok yüklü stabil türlere dönüşebilecek dendrimerler için kullanılabilir. PPI, PAMAM dendrimerlerde 10. jenerasyona kadar uygulanabilmektedir. Sınırsız kütlede kullanım olanağı sunabilen tek teknik Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometresidir (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight (MALDI-TOF)). Aromatik poliestерler, polibenzilasetilenler, PAMAM, silikon dendrimerler ve fosfor dendrimerlerin saflığının karakterizasyonu için MALDI-TOF kullanılmaktadır. Yüksek jenerasyonların hepsinde dedekte edilen eksiklik kimyasal defektlere bağlıdır (116).

MALDI-TOF ile antikor bağlı ve bağlı olmayan dendrimerler arasındaki molekül ağırlık farkı tespit edilmiştir. The Scripps Research Institute (La Colla, CA) tarafından çekilen MALDI-TOF spektrumlarından elde edilen veriler PEG-PAMAM'a anti-VEGFR-1'in başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir. Spektrumda kuvvetli pikin elde edildiği % intensite 25734 olarak bulunmuştur. Bu değerden molekül ağırlığına geçildiğinde elde edilen 50701 g/mol dendrimere antikorun bağlandığını göstermektedir.

5.2. Gempitabin HCl Üzerinde Yapılan Fizikokimyasal Çalışmalar

Antimetabolit nükleozit analogu olan gempitabin, insan solid tümörlerine karşı geniş bir sitotoksikite spektrumuna sahiptir (117). Ancak bu etkisi kandaki kısa yarılanma ömründen (8-17 dk.) dolayı sıklıkla sınırlanmaktadır (100). Gempitabinin kandaki kısa yarılanma ömrünün nedeni kanda, karaciğerde, böbreklerde ve diğer dokularda bulunan sitidin deaminaz aracılığı ile inaktif formu olan ve idrarla hızla atılan 2'-deoksi-2',2'-diflorodeoksiüridin (dFdU)'e dönüşmesidir. İn vivo ortamda terapötik konsantrasyona ulaşılabilmesi için genellikle 30 dakika intravenöz infüzyon yoluyla 1000 mg/m² gibi yüksek doz uygulaması yapılmaktadır. Fakat düşük molekül ağırlıklı antikanser ilaçların yüksek dozda uygulanması, hastalarda ilacın kontrol edilemeyen ve rastgele bir şekilde yayılmasından dolayı, genellikle spesifik olmayan doku toksisitesine neden olmaktadır. Bu gibi yüksek doz uygulamalar, kemoterapi sırasında, kemik iliğinin çalışmasının baskılanması ve geri dönüşümlü transaminaz yükselmesi gibi yan etkilere neden olabilmektedir (118). Gempitabinin in vivo stabilitesini artırmak ve toksisitesini azaltmak için bir çok girişimde bulunulmuştur. Bu yaklaşımlar, gempitabinin farklı lipozom formülasyonlarına enkapsüle edilmesi

(119), doymuş ve tekli doymamış C18 ve C20 açıl zincilerine gemitabinin bağlanmasıdır. Gemitabinin lipozom formülasyonlarına ve kısa zincirli hidrokarbonlara yüklenmesi gemitabinin hızlı plazma inaktivasyonuna karşı kısmen korurken, ilacın vücutta rastgele dağılmasına ve böbreklerden hızla atılmasına engel olamaz. Dolayısıyla, lipofilik enkapsülasyon ya da türevlendirilmiş gemitabinin artmış plazma membran geçirgenliğinden dolayı spesifik olmayan doku toksisitesine ilave olarak önemli ölçüde doku dağılımı ve gemitabinin böbrekten kaybı hala devam etmektedir.

5.2.1. Gemitabin HCl'ün UV Spektrumu

“UV Spektrumu” başlığı altında anlatıldığı gibi hazırlanan Gemitabin HCl çözeltisinin maksimum absorbans verdiği dalga boyu 200 - 400 nm dalga boyları arasında tarama yapılarak tayin edilmiştir. Tarama sonucunda elde edilen üç farklı dalga boyu da (240, 260 ve 270 nm) HPLC yöntemi geliştirme aşamasında aynı analiz içinde DAD dedektör ile kullanılmıştır. Elde edilen verilere incelendiğinde aynı konsantrasyon için en büyük pik alanı elde edilen 270 nm dalga boyu analitik yöntem validasyonunda ve çalışmanın devamındaki HPLC aşamalarında kullanılmıştır. Gemitabin HCl'ün maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu literatür ile uyumlu bulunmuştur (120).

5.2.2. Gemitabin HCl'ün Yüksek Basıncı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

Tez çalışmasında, Gemitabin HCl'ün miktar tayini için DAD dedektör içeren HPLC sistemi kullanılmıştır. Seshagiri Rao ve diğ. tarafından kullanılan yöntemde bazı değişiklikler yapılarak HPLC yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntemin analitik validasyonu yapılmıştır. Gemitabin HCl'e ait kromatogram Şekil 4.2'de verilmiştir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi Gemitabin HCl'e ait pik düzgün bir şekilde elde edilmiş olup, alıkonma zamanı 3,18 dakika olarak bulunmuştur.

Doğrusallık çalışmalarında, çalışma aralığı olarak 0,5 – 50 µg/mL arası konsantrasyonlar seçilmiştir. Deney bulguları incelendiğinde, belirtilen konsantrasyon aralığında, konsantrasyon ile elde edilen pik alanı arasında doğrusal ilişki saptanmış olup, regresyon analizi bulguları Tablo 4.1 ve Şekil 4.16'da

verilmiştir. Kalibrasyon doğrusuna ait korelasyon katsayısı 0,9998 olarak bulunmuştur.

Gün içi ve günler arası doğruluk % rölatif hata ile belirtilmiş olup, gün içi için bu değerler % 0,84 ile 1,6 arasında, günler arası için % 1,52 ile % 1,8 arasında değişmektedir (Tablo 4.2). Validasyon çalışmalarında % rölatif hata değerlerinin % 2'den küçük olması gerektiği bildirildiğinden (121), hesaplanan % rölatif hata değerlerinin % 2'nin altında olması ile kullanılan analitik yöntemin deney içi ve deneyler arası doğruluğu gösterilmiştir.

Kesinlik çalışmaları üç farklı konsantrasyon (düşük, orta, yüksek: 0,5, 5, 50 $\mu\text{g/mL}$) üzerinden gerçekleştirilmiş olup, tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik olarak ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik % VK ile belirtilmiş olup, bu değerler 1,78 ile 1,97 arasında değişmektedir (Tablo 4.3). Gün içi ve günler arası tekrar elde edilebilirlik % VK ile belirtilmiş olup, gün içi için bu değerler % 0,46 ile % 1,606 arasında, günler arası için % 0,63 ile % 1,95 arasında değişmektedir (Tablo 4.4). Hesaplanan % VK değerlerinin % 2'nin altında olması ile analitik yöntemin tekrarlanabilirliği ve deney içi ve deneyler arası tekrar elde edilebilirliği gösterilmiştir (121).

Yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen konsantrasyon 102,4 ng.mL^{-1} olup, saptama sınırı 46,7 ng.mL^{-1} 'dir. Bu veriler geliştirilen analitik yöntemin çalışmamızın amacına uygun duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir.

Yöntemin özgünlüğü için yapılan çalışmalarda, formülasyonda kullanılan diğer maddelerin (EDA-PAMAM, PEG-PAMAM) formülasyonda bulundukları konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmış ve etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda HPLC kullanılarak kromatogramları incelenmiştir. Kullanılan yardımcı maddelere ait pikler, ilaç yükleme ve salım deneyleri sırasında alınan örnekler üzerinde yapılan değerlendirmelerde gemsitabin HCl'e ait alıkonma süresinde ve 270 nm dalga boyunda herhangi bir pik görülmemiştir. Tüm bu analizler sonucunda, geliştirilen analitik yöntemin, hazırlanan formülasyonlar ve kullanılan yardımcı maddeler kapsamında özgün olduğu bulunmuştur.

Stabilite bulguları incelendiğinde, seçilen bir konsantrasyonda (5 $\mu\text{g/mL}$), salım ortamlarında (pH 5,5 ve 7,4) hazırlanan gemsitabin HCl çözeltisinin

hazırlanmasından hemen sonra ve 37 °C’de 24 saat bekletildikten sonra HPLC ile analizi sonucunda elde edilen konsantrasyonlar karşılaştırılmış, % VK değerleri % 2’nin altında ve % geri kazanım değerleri % 97,6 – 100 arasında bulunarak gemitabin HCl’ün in vitro salım çalışmaları sırasında dayanıklı olduğu gösterilmiştir (Tablo 4.5) (121).

Yöntemin doğrusallık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, özgünlük ve stabilite bulguları tümüyle değerlendirildiğinde, bu yöntemin analitik amaçla validasyonunun yapıldığı ve geçerli bir yöntem olduğu görülmektedir.

5.3. Gemitabin HCl’ün Dendrimere Fiziksel Yolla Enkapsülasyonu

Tez çalışması kapsamında kullanılan antikanser etkin madde gemitabin HCl dendrimerlere fiziksel yolla etkileşim sağlanarak enkapsüle edilmiştir. Etkin madde ile dendrimer arasında kovalan bağ ile kimyasal bir etkileşim yaratılmamıştır. In vitro salım çalışmaları da etkileşimin fiziksel yolla gerçekleştiğini doğrulamaktadır.

5.3.1. Gemitabin HCl-Dendrimer İnküzyon Komplekslerinin Karakterizasyonu

Tez çalışması kapsamında hazırlanan gemitabin-dendrimer inküzyon kompleksleri DSC analizi, partikül boyutu, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, in vitro salım, in vitro hücre kültürü teknikleri ile karakterize edilmiştir.

DSC Analizi

Tez çalışması kapsamında DSC analizleri “Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi” başlığı altında anlatıldığı şekilde yürütülmüş ve Bölüm 4.3.1’de “Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi” başlığı altında verilen termogramlar elde edilmiştir. Gemitabin HCl için 287 – 292 °C aralığında olduğu bilinen erime noktası Şekil 4.17’de 287,5 °C’de keskin bir pik şeklinde görülmüştür. PEG ile hazırlanan inküzyon kompleksine ait DSC termogramında ise, gemitabine ait bu erime pikinin kaybolduğu görülürken, PEG ile gemitabinin fiziksel karışımı sonucunda elde edilen DSC termogramında gemitabine ait erime piki varlığını sürdürmektedir. Elde edilen DSC termogramları inküzyon komplekslerinin başarılı bir şekilde hazırlandığını göstermektedir (Şekil 4.17).

Devarakonda ve diğ.'nin 2005 yılında niklozamid ile yaptıkları bir çalışmada, niklozamid dendrimer inklüzyon kompleksleri hazırlanmıştır. Niklozamidin tek başına çekilen DSC termogramında 233 °C'de keskin bir endotermik erime piki görülürken, inklüzyon komplekslerinde bu pik kaybolmuştur (122).

Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyeli

Partikül boyutu ve zeta potansiyel analizleri, Bölüm 3.2.6.2 ve “Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Analizleri” başlığı altında anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Dinamik ışık saçılımı, hidrodinamik boyut dağılımını tayin etmek için, brownian hareketi altındaki süspande haldeki partiküllerden saçılan ışığı zamanın değişimine göre kullanmaktadır (123). Partikül boyutu ölçümlerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Elektriksel çift tabaka dendrimerlerin stabilite, permeabilite ve toksisitesi üzerinde önemli rol oynamaktadır. Zeta potansiyelin +30 mV'dan daha yüksek olması ya da -30 mV'dan daha düşük olması partikülün sırasıyla kuvvetli katyonik ya da anyonik olduğunu göstermektedir. GEM ile kompleks oluşturulmamış PEG'in partikül boyutu $174,13 \pm 11,3$ nm aralığında iken, EDA 318 ± 21 nm aralığında tayin edilmiştir. GEM enkapsüle edilmiş PEG ve EDA çekirdekli dendrimerlerde ise partikül boyutlarında anlamlı bir artış olduğu göze çarpmaktadır ($p < 0,05$). Dendrimerlerin antikor ile konjugasyonu partikül boyutunda anlamlı bir artışa neden olmamıştır ($p > 0,05$). Partikül boyutlarındaki artışın dendrimerler arasındaki agregasyondan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Ciolkowski ve diğ.'nin 2011 yılında PAMAM dendrimerleri ile yaptıkları bir çalışmada dendrimerlerin yüksek polidispersite indekslerine sahip olduğu bulunmuştur (124). Tüm dendrimer çözeltileri konsantrasyondan bağımsız olarak 20 – 500 nm aralığında partikül boyut dağılımı göstermiştir. Yüksek polidispersite indeksi istatistiksel analiz yapmayı da imkansız kılmıştır. Dendrimer konsantrasyonu ile agregatların boyutu arasında herhangi bir bağlantı bulunamamıştır. Agregatların sergilemiş olduğu partikül boyutu dağılımında herhangi bir patern bulunamamış olması DLS yönteminin kısıtlamalarından da kaynaklanıyor olabiliyor diye düşünülmektedir. Hali hazırda, DLS yönteminin, polidispers numunelerde doğru sonuç veremediği bilinmektedir (125).

PEG çekirdekli dendrimerlerin zeta potansiyel $-21,9 \pm 0,3$ olarak bulunurken, artan molar oranlarda gemitabin içeren inklüzyon komplekslerinde zeta potansiyelinde düşüş gözlenmiştir. PEG-PAMAM1GEM2’de $-16,56 \pm 1,3$ mV; PEG-PAMAM1GEM4’de $-8,9 \pm 2,25$ mV; PEG-PAMAM1GEM6’da $-5,34 \pm 2,5$ mV olarak bulunmuştur. EDA çekirdekli dendrimerlerde ise zeta potansiyeli $-31,26 \pm 2$ mV olarak bulunmuştur. PEG çekirdekli dendrimerlerde de olduğu gibi artan molar konsantrasyonlarda gemitabin içeren inklüzyon komplekslerinde zeta potansiyelin düştüğü gözlenmiştir. EDA-PAMAM1GEM2’de $-23,46 \pm 3,34$ mV, EDA-PAMAM1GEM4’de $-20,46 \pm 2,34$ mV, EDA-PAMAM1GEM6’da $-8,13 \pm 5,6$ mV olarak bulunmuştur.

Das ve diğ.’nin 2013 yılında gemitabin HCl ile hazırlanan karbon nanotüp formülasyonlarında da etkin madde içermeyen formülasyonlarla, gemitabin yüklü nanotüpler karşılaştırıldığında, gemitabinin zeta potansiyelini düşürdüğü ve nötrale yaklaştırdığı gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar, gemitabin HCl’ün yapısında bulunan amin gruplarından kaynaklanan katyonik özelliğinden ileri gelmektedir (126).

Enkapsülasyon Etkinliği

Enkapsülasyon sırasında sabit dendrimer konsantrasyonlarına karşı artan molar oranlarda gemitabin eklenerek üç farklı formülasyon hazırlanmıştır ve bu formülasyonlara ilişkin enkapsülasyon etkinlikleri 100 μ M başına yüklenen μ g ve μ M gemitabin olarak ifade edilmiştir. Buna göre 100 μ M dendrimer başına 200, 400 ve 600 μ M oranlarda gemitabin ortama eklenmiştir. Bölüm 4.3.2’de “Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi” ayrıntılı olarak verilen sonuçlara göre eklenen gemitabin konsantrasyonu arttıkça yükleme etkinliğinin de arttığı görülmektedir ($p < 0,05$). Burada göze çarpan önemli bir nokta PEG çekirdekli ve EDA çekirdekli dendrimerlerin enkapsüle ettikleri gemitabin miktarlarındaki farklılıktır. Artan konsantrasyonlara karşı yüklenen gemitabin miktarı artış göstermiştir. Bu artış EDA çekirdekli dendrimerlerde 105,6 – 197,38 μ M aralığında gerçekleşirken, PEG çekirdekli dendrimerlerde 80,09-132,47 μ M aralığında gerçekleşmiştir. Bu farklılığın iki kaynaktan ileri gelebileceği düşünülmektedir. Bunlar PEG ve EDA arasındaki molekül ağırlığı ve hidrofiliklik farklılıklardır. Barichello ve diğ. tarafından yapılan çalışmaya göre lipofilik polimere, hidrofilik ve lipofilik etkin maddelerin

enkapsülasyonu ve bu enkapsülasyonun etkinliğinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu çalışmaya göre polimer ve etkin maddenin lipofilikliği birbine ne kadar yakınsa o kadar yüksek yükleme etkinliği elde edileceği sonucuna varılmıştır (127).

Vogtle ve diğ.'nin yaptığı çalışmada etkin maddenin dallanmış polimerin içine hapsedilmesi araştırılmıştır. Sudaki çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin fiziksel yolla dendrimerin boşluklarına enkapsüle edilmesinin sonucunda hem etkin maddenin çözünürlüğünün artırıldığı hem de kontrollü salım sağlandığı görülmüştür (128,129).

Hidrofobik moleküllerin dendrimerlerin içine inklüzyonu, hidrofobik etkileşimlerle hidrofobik ilacın polar olmayan çekirdek bölgesiyle etkileşimi ile gerçekleşirken, inklüzyon kompleksinin oluşturulması polimer ve etkin madde çözeltilerinin basit bir şekilde karıştırılmasıyla elde edilir. Etkin madde ve dendrimer arasındaki fiziksel ara yüzeyin sonucu olarak, enkapsüle edilen maddenin sulu ortama salımı hidrofobik etkiler, hidrojen bağları, sterik engel ve elektrostatik etkileşimleri içeren kovalan olmayan etkileşimler nedeniyle kontrollü olarak gerçekleşir. Etkin maddenin dendrimer içerisine yüklenme kapasitesini maksimuma çıkarabilmek için polimerin yapısı ve özellikle iç boşlukların karakteristikleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Kojima ve diğ. doksorubisin ve metotreksat antikanser etkin maddelerinin PEGlenmiş 3. ve 4. jenerasyon amin son gruplu katyonik dendrimerlere enkapsülasyonu ile ilgili bir çalışma yayınlamışlardır. Bu çalışmaya göre doksorubisin ve metotreksatın enkapsülasyon etkinliği 3. jenerasyon dendrimerlerde 6,5 mol/mol iken 4. jenerasyonda 25 mol/mol'dür (130). Her iki etkin madde için de enkapsülasyon etkinliği dendrimerin jenerasyon sayısı arttıkça ve dendrimerin yüzeyine bağlanan PEG'in molekül ağırlığı 550 Da'dan 2 kDa'ya artmasıyla artmıştır.

Bu sonuçlar, 5-florourasil enkapsüle edilmiş PEGlenmemiş 4. Jenerasyon amin son gruplu dendrimer 5 kDa molekül ağırlığında PEG kullanılarak yüzeyin % 25'inin kaplandığı dendrimerler kullanılarak in vitro ve in vivo salım çalışmalarının yürütüldüğü başka bir çalışma ile de desteklenmiştir (129). İn vitro sonuçlar, PEGlenmiş dendrimerlerin PEGlenmemiş dendrimerlere göre 12 kat daha fazla yükleme kapasitesi ve 6 kat daha yavaş etkin madde salımı sağladığı gösterilmiştir.

İn Vitro Salım Çalışması

Tez çalışması kapsamında "İn Vitro Salım Deneyleri" başlığı altında anlatıldığı gibi yürütülen in vitro salım deneyleri sonucunda Bölüm 4.3.4'te "İn Vitro Salım Deneyleri" başlığı altında grafik şeklinde sunulan sonuçlar elde edilmiştir. İn vitro salım çalışmaları sitotoksitesite çalışmalarından sonra uygun dendrimer tipi olarak PEG çekirdekli dendrimerlere karar verilip, bu dendrimerlerden salım çalışması yapılmıştır. İn vitro salım çalışmaları tümör çevresini taklit etmek amacıyla pH 5,5'te ve fizyolojik PH'yı taklit etmek amacıyla pH 7,4'te yapılmıştır. Diyaliz membran tekniği kullanılarak yapılan salım çalışmalarında diyaliz membranın salım hızına etkisini gözlemleyebilmek için pH 5,5 ve pH 7,4'te gempitabin HCl'ün çözeltileri de salım çalışmasına dahil edilmiştir. 24 saat boyunca sürdürülen salım çalışması sonucunda elde edilen profiller değerlendirildiğinde, gempitabin HCl çözeltileri her iki pH'da da inklüzyon komplekslerine göre daha hızlı bir profili göstermiştir. Gempitabin HCl'ün pH'ya bağlı bir çözünürlüğü olmakla birlikte pH 4-5'te kan pH'sı olan 7,4'te daha çok çözünmektedir (131). Salım profilinden elde edilen veriler de bu bilgiyi doğrulamaktadır. Serbest gempitabin HCl'ün pH 5,5'te % 100'ünün salınıp ortamda çözünmesi için 8 saatte gerçekleşirken, pH 7,4'te 10 saat sonunda % 100 çözünürlüğe ulaşabilmiştir. Bu durum hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin kan dolaşımındayken gempitabini daha az salacağını, tümörlü bölgeye ulaştığında ise, düşük pH'dan dolayı daha fazla salınacağını ve çözüneceğini göstermektedir. Antikor ile konjuge edilen dendrimerler ve antikorsuz dendrimerlerde de benzer durum gözlenmiştir, pH 5,5'te daha yüksek gempitabin salımı tayin edilmiştir ve pH'ya bağlı salımlar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Antikor ile konjuge edilmiş dendrimerler pH 5,5'te 24 saatin sonunda % 71,21'ini salarken, pH 7,4'te % 64,9'unu salabilmiştir. Antikor ile konjuge edilmemiş dendrimerlerde ise, pH 5,5'te % 75,5'lik bir kümülatif salım elde edilirken, pH 7,4'te % 69,8 olarak bulunmuştur ($n=3$). Elde edilen sonuçlar artan asiditenin gempitabinin çözünürlüğünü ve dolayısıyla salımını artırdığını gösterirken, antikor ile konjugasyonun salımı geciktirdiği gözlemlenmiştir ve bu gecikme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

2005 yılında Patri ve diğ.'nin antikanser madde olarak metotreksatı, ilaç taşıyıcı sistem olarak da 5. jenerasyon yüzeyi hidroksil grupları ile kaplı PAMAM

dendrimerlerin kullanıldığı bir çalışmada, metotreksatın dendrimerlerden salımı incelenmiştir. Metotreksat ile dendrimerin oluşturduğu inklüzyon kompleksleri ve metotreksatın dendrimerlere kovalan bağ ile konjuge edilmesi sonucunda elde edilen salım profilleri incelendiğinde, kovalan bağ ile konjugasyonun PBS ve deiyonize su içerisine salımı engellediği sonucuna varılırken, inklüzyon komplekslerinde ise, metotreksatın çözeltisine çok yakın bir profil elde edilmiştir. Dendrimer yüzeyinin folik asit ile modifiye edilmesi salımı daha kontrollü hale getirmiştir. Inklüzyon komplekslerinde, 2,5 saatin sonunda % 70 civarında metotreksat salınırken, folik ise ile yüzey modifikasyonu yapılmış dendrimerlerde salım % 50 civarındadır. Bu çalışma, metotreksat ile PAMAM dendrimeri arasındaki bağın güçlü olmadığını göstermektedir (132).

Kolhe ve diğ.'nin 2003 yılında yaptıkları çalışmada 3. ve 4. jenerasyon PAMAM dendrimerleri ve ibuprofen ile kompleks hazırlanmıştır. Hücre kültürü ortamı, deiyonize su ve metanol gibi çeşitli salım ortamları kullanılarak komplekslerinin dayanıklılığını ve stabilitesini diyaliz membrandan in vitro salım düzeneği ile incelemişleridir. Çalışmanın sonuçlarına göre serbest ibuprofen 6 saatin sonunda % 100 oranında salınırken, 9 saatin sonunda 3. jenerasyon dendrimerden ibuprofenin yaklaşık % 70'i 4. jenerasyondan ise % 80'i salınmıştır. Metanol ve deiyonize su içerisinde ise 12 saatin sonunda dendrimerlerden yaklaşık olarak % 20'lik bir salım görülmüştür. Yapılan bu çalışma komplekslerden salımın iyonik etkileşimlere ve tuz konsantrasyonuna bağlı olduğunu ortaya koymuştur (27).

5.4. Hücre Kültürü Deneyleri

5.4.1. CFPAC-1 Hücrelerinde VEGFR-1 Ekspresyonunun Gösterilmesi

"CFPAC-1 Hücrelerinde Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü-1'in (VEGFR-1) Sentezinin Gösterilmesi" başlığı altında anlatıldığı şekilde yürütülen deneyler sonucunda tez çalışmasında kullanılan insan pankreas kanser hücrelerinin, tümöre hedeflendirme ligandı olarak kullanılan anti-VEGFR-1'in hedeflendirme amacını hangi oranda başarıp başaramayacağını anlayabilmek için bu hücrelerde VEGFR-1 ekspresyonunun hangi oranda gerçekleştirildiği gösterilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda CFPAC-1 hücrelerinin VEGFR-1'i % $38,6 \pm 10,7$ oranında eksprese edildiği bulunmuştur (Şekil 4.21). Kanser araştırmalarının % 100 başarı ile

sonuçlanamamasının temel nedeni olan sadece tümörü iyileştirmeyi hedefleyecek doğru hedefin bulunmaması ya da olmaması bu araştırma kapsamında da ortaya konmuştur. Ancak bu orana rağmen, hücre kültürü ve in vivo deneylere devam edilmiştir.

5.4.2. Hücre Canlılığı Deneyleri

Tez çalışması kapsamında, sentezlenen dendrimerlerin kanser hücreleri üzerindeki etkisini irdelemek amacıyla hücre canlılığı testleri yapılmıştır. Hücre canlılığı testinin yapılma amacı, daha az toksik bulunan dendrimer tipini belirleyerek, ilerleyen çalışmalara bu dendrimer ile devam etmektir. Ayrıca, kullanılacak olan dendrimerin subtoksik olduğu konsantrasyon aralığını bulmak, gempitabin için hücre canlılığını CFPAC-1 hücreleri üzerinde tayin etmek de amaçlar arasındadır. Bunlara ek olarak, dendrimerlerle gempitabin inklüzyon kompleksi oluşturulduğunda ve antikor ile konjugasyon sağlandığında da CFPAC-1 üzerindeki antiproliferatif etkisi göstermek amaçlanmıştır.

Yüzeydeki anyonik karboksilik asit grupları PEG 2000 ile modifiye edilen EDA ve PEG çekirdekli dendrimerler, etkin madde yüklenmeden önce, etkin madde yüklendikten sonra ve ayrıca antikor ile konjuge edildikten sonra gempitabin yüklü ve yüklü olmayan formülasyonları CFPAC-1 hücreleri ile 24 ve 48 saat süre ile maruz bırakıldıktan sonra elde edilen hücre canlılıkları MTT testi ile değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı testi, hayatta kalan hücreleri tayin etmek için geliştirilmiş bir yöntemdir, hücre ölümünü analiz edemez. 24 ve 48 saatin sonunda bazı koşullarda elde edilen artan hücre canlılıkları, kontrol grubu ile paralel olarak değerlendirilmelidir. Bu durum, uygulanan formülasyonun hücrelerin canlılığını artırıyor şeklinde değil, hücrelerin devam eden çoğalma sürecini tamamen bloke etmediği şeklinde değerlendirilmelidir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen ve Bölüm 4.4.2’de “Sitotoksikite Çalışmaları” başlığı altında grafikler şeklinde sunulan sonuçlar irdelendiğinde, PEG çekirdekli dendrimerlerin, CFPAC-1 hücrelerine 24 saat maruz bırakıldıktan sonra elde edilen hücre canlılığı 2,5 - 40 μ M konsantrasyon aralığında % 58,03 $\pm$ 0,14 - 71,99 $\pm$ 1,49 arasında, 48 saat maruz bırakıldığında ise % 68,78 $\pm$ 5,95 - 66,27 $\pm$ 2,82 arasında değişiklik göstermiştir. Buradan elde edilen sonuçlar, PEG çekirdekli

dendrimerin artan konsantrasyona karşı sitotoksitesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı ($p > 0,05$) ve 48 saat süren maruziyette bile hücrelerin çoğalmaya devam edebildiği görölmektedir. EDA çekirdekli dendrimerlerden elde edilen sonuçlara göre, 2,5 – 40 μM konsantrasyon aralığında 24 saat maruziyette % $54,32 \pm 2,91$ – $44,76 \pm 1,28$ arasında iken 48 saat maruziyette % $67,98 \pm 2,77$ – $50,64 \pm 4,75$ arasında değişiklik göstermiştir. İki farklı çekirdek yapısına sahip dendrimer (EDA ve PEG) sitotoksite açısından değerlendirildiğinde PEG çekirdekli olan dendrimerin daha biyouyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan literatür taramasına göre CFPAC-1 hücreleri üzerinde gemitabinin LD_{50} konsantrasyonu 33 ± 14 nM olarak bulunmuştur (133). Bu verinin doğruluğunu tayin etmek ve deneysel olarak gösterebilmek için öncelikle 5 - 160 nM konsantrasyon aralığında gemitabin HCl için bir deneme yapılmıştır, hücre canlılığı bu konsantrasyon aralığında 24 saat maruziyet sonucunda % $60 \pm 10,36$ - $62 \pm 2,07$ arasında iken, 48 saat maruziyette % $42,96 \pm 0,1$ – $43,74 \pm 1,31$ olarak tespit edilmiştir. Bu ön denemeden sonra gemitabin-dendrimer inklüzyon komplekslerinin etkinliğini ve hedeflendirme stratejimizin GEM'in etkinliğini artırdığını gösterebilmek için çalışmalar 0,75 – 20 nM konsantrasyon aralığında tekrar edilmiştir. Gemitabin HCl tek başına 0,75 – 20 nM aralığında CFPAC-1 hücrelerine 24 ve 48 saat süren maruziyetlerde uygulandığında 24 saat için % $81,32 \pm 9,18$ – $63,44 \pm 2,77$, 48 saat için ise, % $78,33 \pm 9,36$ – $26,64 \pm 2,43$ olarak bulunmuştur. Dendrimerlerin ve gemitabinin ayrı ayrı değerlendirmelerinden sonra gemitabin ile EDA ve PEG çekirdekli dendrimerler inklüzyon kompleksi oluşturularak bu komplekslerin hücre canlılığına etkisi irdelenmiş ve Bölüm 4.4.2'de "Sitotoksite Çalışmaları" başlığı altında gösterildiği gibi sonuçlar grafikler şeklinde sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar her bir konsantrasyonda PEG çekirdekli dendrimer ile hazırlanan inklüzyon komplekslerinin tek başına PEG ve tek başına gemitabinin antiproliferatif etkilerine göre daha yüksek antiproliferatif etki göstermiştir. EDA çekirdekli dendrimerlerle hazırlanan inklüzyon kompleksleri de PEG çekirdekli dendrimerler gibi sonuçlar verse de, PEG çekirdekli dendrimerlerde elde edilen potansiyalizasyon daha fazladır. Bu çalışmaların ardından yine her iki dendrimerin anti-Flt-1 ile konjuge edilmiş türevlerinin hem etkin maddesiz hem de etkin madde yüklenerek hücre canlılıklarına etkisi irdelenmiştir. Bu kapsamda, elde edilen sonuçlar, EDA-PAMAM-Flt1

konjugatlarının her bir konsantrasyon noktasında (5, 10 ,20, 40 μ M) çıplak EDA-PAMAM'a göre hücre canlılığını artırdığı gösterilmiştir. PEG-antikor konjugatlarında ise 40 μ M dilüsyon noktasında ve 48 saat maruziyet sonuçlarında çıplak PEG'e göre hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Antikor konjugasyonu sonucu elde edilen MTT sonuçları irdelendiğinde, EDA çekirdekli dendrimerlerin antikor konjugatlarının seçici olarak sadece VEGFR-1 pozitif hücrelere tutunup etki göstermesinden dolayı hücre canlılığının arttığı söylenebilir. PEG çekirdekli dendrimerlerde ise, 24 saat süren maruziyette ve düşük dilüsyonlarda EDA ile uyumlu sonuçlar elde edilirken, 40 μ M konsantrasyonda ve 48 saat maruziyette hücre canlılığının antikorsuz dendrimerlere göre azalması, PEG-PAMAM-Flt1 konjugatlarının yine seçici olarak sadece VEGFR-1 pozitif hücrelere yöneldiğini ancak, PEG-PAMAM'ın yüksek molekül ağırlığından ve EDA-PAMAM'a göre kısmen daha pozitif yüzey yüküne sahip olmasından dolayı hücre içine alınmasının arttığı düşünülebilir. Artan hücre içine alım sonucunda sitotoksitenin arttığı öngörülmektedir. Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında hücre içine alım çalışmalarına PEG çekirdekli dendrimerlerle devam edilmesine karar verilmiştir.

Yapılan bir çalışmada, anyonik ve katyonik dendrimerler için belirli bir jenerasyon aralığında dendrimer konsantrasyonuna karşı hücre canlılığı incelenmiştir. Sitotoksitenin yüzey yükü, boyut ve konsantrasyonun bir fonksiyonu olduğu sonucuna varılmıştır. 2,5. ve 3,5. jenerasyon anyonik PAMAM dendrimerleri 1 mM konsantrasyona kadar ölçülebilecek bir sitotoksiste göstermemişlerdir. Bunun tam tersi, 2. jenerasyon katyonik dendrimerler Caco-2 hücreleri üzerinde 700 μ M'nin üzerinde sitotoksiste gösterirken, 3. ve 4. jenerasyonlar bütün konsantrasyonlarda sitotoksik bulunmuştur (49). Tez çalışmasında anyonik PAMAM dendrimerlerin kullanılması bu çalışması bu çalışma da anyonik dendrimerlerin daha düşük sitotoksositeye sahip olduğunu gözler önüne sermiştir.

5.4.3. Hücre İçine Alım Çalışmaları

Endositoz, küçük moleküllerin, makromoleküllerin ve partiküllerin internalizasyonunu ve onların spesifik hücre organellerine hedeflendirilmesini sağlayan özelleşmiş aktif taşıma mekanizmasıdır.

Dendrimerlerin yüzey yüklerinin bir fonksiyonu olarak hücre içine alım mekanizmasını anlamayı amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Epitel hücrelerinin negatif yüke sahip oldukları ve katyonik dendrimerlerin güçlü elektostatik etkileşimler göstererek hızlı bir şekilde endositoza uğradıkları bilinmektedir (134).

Hidroksil son gruplu dendrimerler fizyolojik pH'da net bir yüke sahip olmadıkları için, hidrofobik etkileşimler ya da hidrojen bağı etkileşimleri gibi spesifik olmayan yollarla endositoza uğramaktadırlar (135,136). Önceki çalışmalarda lineer makromoleküllerde de gösterildiği gibi anyonik dendrimerler hücre membranı üzerindeki proteinlerin pozitif yüklü bölgeleri ile etkileşerek endositoza uğramaktadırlar. Dendrimerlerin yüzey yükü onların hücre içine alımını önemli ölçüde etkilemektedir. A549 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, anyonik dendrimerler kısmen kalveol aracılığı ile alınırken genel olarak katyonik ve anyonik dendrimerler klatrinden ve kalveolden bağımsız olarak endositoza uğrarlar. Dendrimerlerin yüzey yükleri modifiye edilerek, hücre içine girişleri düzenlenebilir ve spesifik hücre için kompartmanlara hedeflendirilebilirler (137).

Tez çalışmasının asıl amacı gemsitabinin sağlıklı hücrelere dağılmadan, pankreas kanseri hücreleri tarafından alımını artırmaktır. Bu amaçla dendrimerler ilaç taşıyıcı sistem olarak seçilmiş ve hedeflendirme ligandı olarak anti-VEGFR-1 ile hedeflendirilmiştir. Hedeflendirmenin amacı tümör lokalizasyonunun ve tümör hücreleri tarafından alımın artırılmasıdır. Bu amacın gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için ilk basamak olarak hücre kültürü deneyleri planlanmıştır ve "Hücre İçine Alım Çalışmaları" başlığı altında anlatıldığı gibi uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Hücre içine alım çalışmaları, akış sitometri ile kantitatif olarak analiz edilirken, floresan mikroskop ile kalitatif olarak analiz edilmiştir. Floresan işaretleyici olarak rodamin 123'ün kullanıldığı deneylerde, akış sitometri ile analizde öncelikle hücrelere dört farklı formülasyon uygulanmıştır, bunlar, Rho çözeltisi, PEG-PAMAM-Rho, PEG-PAMAM-Iso-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho dendrimerlerdir. Ayrıca, herhangi bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu da bulunmaktadır. Bu dört uygulama sayesinde CFPAC-1 hücrelerinde VEGFR-1 reseptörünün varlığına bağlı olarak Flt-1 ile konjuge edilmiş dendrimerlerin uygulanmasından sonra yüksek floresan intensitesine sahip farklı bir alt hücre popülasyonunun olup olmadığı gösterilmiştir. Elde edilen veriler, CFPAC-1

hücrelerinde % $38,6 \pm 10,7$ oranında VEGFR-1 reseptör ekspresyonu ile orantılı olarak farklı bir alt hücre popülasyonunun varlığını göstermektedir (Şekil 4.27). Herhangi bir uygulama yapılmayan hücrelerde floresan intensitesi bakımından homojen ve daha düşük bir dağılım görülürken, PEG-PAMAM-Iso-Rho'nun uygulandığı hücreler de hiçbir uygulamanın yapılmadığı hücreler gibi floresan intensitesi bakımında homojen bir dağılım göstermiştir, ancak floresan intensitesi daha yüksektir. Bu durum, izotip kontrol antikoru ile CFPAC-1 hücrelerine selektif olmayan ve artan hücresel alım gerçekleştirildiğini göstermektedir. Rho ve PEG-PAMAM-Rho'nun uygulandığı hücrelerin gösterdiği floresan intensitesi, PEG-PAMAM-Iso-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho'nun uygulandığı hücrelere göre yaklaşık olarak 10 kat fazladır. Rho ve Peg-Rho'nun CFPAC-1 hücreleri tarafından fazla miktarda alınması, hücre içine kolaylıkla girebilen Rho ve PEG-PAMAM'ın nonselektif alımına bağlıdır. Tez çalışmasının amacı, ilaç taşıyıcı sistemin istenilen hücre grubu tarafından (VEGFR-1 pozitif) selektif olarak alımını artırmaktır. PEG-PAMAM-Iso-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho'nun uygulandığı hücrelerin artan dendrimer ve Rho çözelti molaritesine karşısında sahip oldukları floresan intensiteleri karşılaştırıldığında (Şekil 4.31), PEG-PAMAM-Flt1-Rho'nun uygulandığı hücrelerde PEG-PAMAM-Iso-Rho'ya göre daha yüksek floresan şiddeti gözlenmiştir sırasıyla 1,3, 0,9 (Şekil 4.31). Elde edilen bu sonuç, PEG-PAMAM-Flt1-Rho'nun Flt-1 pozitif hücreler tarafından spesifik olarak alındığını doğrulamaktadır.

Flt-1 ile konjuge edilmiş dendrimerlerin uygulandığı hücrelerin oluşturdukları floresan intensite farklılıkları incelendiğinde, CFPAC-1 hücrelerinin kendi içinde yüksek ve düşük floresan intensitesine sahip iki alt popülasyona sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.32). Bu iki alt popülasyonun sahip olduğu floresan intensitesi arasında yaklaşık 8 kat fark bulunmaktadır. Ayrıca, Rho ve dendrimer konsantrasyonu artırıldıkça, hücrelerin gösterdiği floresan intensitesi de artmıştır.

Hücre içine alımın mikroskop ile gösterildiği Şekil 4.33'te tümör hücrelerinin nükleusları ve hücre membranları belirgin bir şekilde görülmektedir. PEG-PAMAM-Iso-Rho ve PEG-Flt1-Rho'nun uygulandığı hücreleri kıyaslamak gerekirse, PEG-PAMAM-Flt1-Rho'nun uygulandığı hücrelerin daha parlak floresan verdiği görülmektedir. Hücrelerde homojen bir floresan görüntü olmaması dendrimerden

salınıp hücreye tek başına giren Rho olmadığını göstermektedir.

Elde edilen in vitro hücre içine alım çalışma sonuçları, CFPAC-1 hücrelerinin VEGFR-1 ekspresyonu açısından $38,6 \pm 10,7$ gibi nispeten düşük bir orana sahip olmasına rağmen, Anti-VEGFR-1 ile hedeflendirilmiş dendrimerler uygulandığında VEGFR-1 pozitif hücreler tarafından alınan dendrimerler diğer hücelere oranla 8 kat fazla floresan intensitesi göstermiştir. Bu da in vivo çalışmalar için umut vaat etmektedir.

5.5. İn Vivo Deneyler

5.5.1. Tümör Modeli Geliştirme

İnsan ksenograft fare modeli, tümör dokusu ya da tümör hücrelerinin yerleştirildikleri yere göre heterotopik ve ortotopik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Her iki teknik de kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Deri altında geliştirilen heterotopik fare modeli hızlı, düşük maliyetli, kolay yürütülebilen bir teknik olmakla birlikte, genişleyen insan tümör türleri için, insan tümörlerini hücre hatlarına dönüştürmek için ve anjiyogenez çalışmaları için oldukça uygundur. Ortotopik ksenograft modellerde ise, tümör ya da tümör hücreleri implantasyon ya da enjeksiyon yoluyla kanserin geliştirilmek istendiği organa uygulanır. Ortotopik modeller orijinal tümör mikro çevresine benzerlik gösterir ve metastaz çalışmaları için daha uygundur çünkü subkütan yolla geliştirilen tümörlerde metastaz oluşumu çok nadirdir. Ancak farede ortotopik yolla pankreas kanser modeli geliştirmek oldukça emek gerektiren, teknik olarak zor bir teknik olmakla birlikte, bu yöntemde implante edilen tümörün gelişimini gözlemleyebilmek için oldukça kompleks görüntüleme tekniklerine gereksinim duyulmaktadır. Tümör hücrelerinin ya da tümörün pankreasa cerrahi olarak ortotopik implantasyonu farede fiziksel travmaya neden olmakta ve ayrıca uzun bir postoperatif sürece gereksinim duyulmaktadır (138). Tüm bu gerekçelerle tez çalışması kapsamında timus bezi bulunmayan immün sistemi baskılanmış çıplak farelerde heterotopik yolla sırt bölgesinde tümör geliştirilmiştir. Tümör geliştirme çalışmaları daha önce pankreas tümör geliştirme çalışmalarında hiç kullanılmamış olan CFPAC-1 hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında CFPAC-1 hücrelerinin kullanılma nedeni bu hücrelerde VEGFR-1 ekspresyonunun diğer insan pankreas kanser hücrelerine göre

daha yüksek oranda gerçekleşmesidir (86). 15000000 hücre/200 µL şeklinde farelere subkütan enjeksiyon yapıldıktan 1 hafta sonra tümör gelişimi başlamıştır. CFPAC-1 enjeksiyonundan 3 hafta sonra tümör gelişiminin maksimuma ulaştığı tespit edilerek, 3 haftanın sonunda tedavi sürecine başlanmıştır.

5.5.2. Antitümör Etkinliğin Değerlendirilmesi

Heterotopik olarak sırt bölgesinde pankreas kanseri geliştirilen fareler, "Antitümör Etkinlik Çalışması" başlığı altında anlatıldığı gibi 4 gruba ayrılmıştır. Dörder günlük ara ile dört kez kemoterapi uygulanana ve tedavi edilmeyen gruptaki tümör boyutlarının değişimleri irdelendiğinde, tedavi edilmeyen grupta ortalama 0,64 cm olan tümör çapı 16 günün sonunda % 31'lik bir artışla 0,83 cm'ye çıkmıştır. Gemcitabin HCl ile standart tedavinin uygulandığı grupta, başlangıçta ortalama 0,61 cm olan tümör çapı 16 günün sonunda % 6'lık azalma ile 0,579 cm'ye inmiştir. PEG-PAMAM-GEM uygulanan grupta ise başlangıçta ortalama 0,73 cm olan tümör çapları 16 günün sonunda % 17'lik azalma ile 0,6 cm'ye düşmüştür. Son olarak tümöre aktif hedeflendirme stratejisi ile tedavi edilen (PEG-PAMAM-Flt1-GEM) grupta başlangıçta ortalama 0,71 cm olan tümör çapları, 16 günün sonunda % 40'lık bir azalma ile 0,43 cm'ye düşmüştür.

Patra ve diğ.'nin (139) 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada etkin madde olarak gemistabin HCl'ün kullanıldığı altın nanopartiküller, anti-EGFR (Cetuximab) antikoru ile pankreas kanserine hedeflendirilmiştir. Üç farklı pankreas kanser hücre hattında EGFR ekspresyonu gösterildikten sonra AsPC-1 ve PANC-1 hücre hatlarında yüksek olan EGFR ekspresyonu sonucunda bu hücreler üzerinde hücre içine alım çalışmaları yapılmıştır. EGFR'ın yüksek oranda eksprese edildiği hücrelere tarafından hedeflendirilmiş nanopartiküller hücre içine daha çok alınmıştır. Farelerde ortotopik olarak geliştirilen pankreas kanserleri üzerine anti-EGFR ile hedeflendirilmiş gemcitabin yüklü altın nanopartiküllerinin antitümör etkinliği incelendiğinde, hedeflendirilmemiş olanlara göre tümör boyutlarını anlamlı bir farkla küçültmüştür.

5.5.3. Biyodağılım Çalışmaları

İn vivo biyodağılım çalışmaları kapsamında, hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş PEG çekirdekli dendrimerlere rodamin enkapsüle edilerek, anti-VEGFR-1 ile hedeflendirmenin dendrimerlerin doku dağılımını etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Bu kapsamda elde edilen sonuçlar, ip uygulama sonucunda, karaciğer, kemik iliği, dalak ve tümör dokularında daha yüksek floresan intensitesi olduğunu göstermektedir. VEGFR-1 reseptör ekspresyonun yüksek olduğu karaciğer, kemik iliği, dalak ve tümör gibi dokularda anti-VEGFR-1 ile hedeflendirilmiş dendrimerlerin hücrel alımının daha yüksek olduğunu göstermektedir. PEG-PAMAM-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho dendrimerlerin uygulandığı farelerin tümör hücreleri floresan intensitesi açısından kıyaslandığında, PEG-PAMAM-Rho uygulananlarda 14 iken PEG-PAMAM-Flt1-Rho 20 olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.37).

Baker ve diğ. hedeflendirme ligandı olarak folik asidi kullandıkları dendrimer bazlı ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde yoğun olarak çalışmışlardır (140,141). Hedeflendirme ligandı olarak folik asit kullanılmasının nedeni insan meme, akciğer ve beyin tümörlerinde fazla miktarda eksprese edilmesidir (128). Dendrimer başına 5 adet folik asit bağlanması, dendrimerlerin kanser hücreleri içine reseptör aracılı endositoz ile alınmasını tetiklemiştir (142). Folik asit ile hedeflendirilmiş dendrimer bazlı ilaç taşıyıcı sistemler, folik asit reseptörü açısından pozitif olan kanser hücrelerinde hedeflendirilmemiş olan dendrimerlere ve serbest antikanser etkin maddeye göre önemli ölçüde yüksek akümülayon ve toksisite gösterilmiştir. 4. jenerasyon dendrimer-folik asit konjugatının kullanıldığı in vivo biyodağılım çalışmasında hedeflendirilmiş dendrimerler KB tümör taşıyan farelerde hedeflendirilmemiş dendrimerlere göre 4 kat daha fazla tümör akümülayonu göstermiştir (143). Hedeflendirilmiş konjugatların KB tümör taşıyan SCID farelerde iyileştirilmiş tümör lokalizasyonunun bir sonucu olarak farelerin hayatta kalma oranını hedeflendirilmemiş dendrimer metotreksat konjugatlarına göre 40 gün daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır (12).

5.5.4. İn Vivo Görüntüleme

Tez çalışması kapsamında, PEG-PAMAM-Rho ve PEG-PAMAM-Flt1-Rho

uygulanmış farelerde biyodağılım çalışmasının ardından in vivo görüntüleme çalışması "In Vivo Görüntüleme" başlık altında anlatıldığı şekilde yürütülmüştür. Elde edilen görüntüler, Bölüm 4.5.4'te "In Vivo Görüntüleme" başlık altında sunulmuştur. Tüm bu sonuçlar irdelendiğinde, Flt-1 ile konjuge edilen dendrimerlerin konjuge edilmeyenlere göre tümör tarafından daha yüksek oranda alındığı görülmektedir. Antikor ile konjuge edilen sistemin in vitro salım çalışmaları kapsamında konjuge edilmeyenlere göre gemesitabini daha geç salması da göz önünde bulundurulacak olursa, hem geciktirilmiş salım hem de artan tümör lokalizasyonu sayesinde, geliştirilen ilaç taşıyıcı sistem tümör dokusunda daha yüksek oranda lokalize olmuş ve hücre içerisine alınmıştır. Pankreas dokusundan alınan kesitler ve floresan mikroskop ile yapılan incelemeler, Flt-1 ile konjuge edilmiş sistemin, konjuge edilmeyen sisteme göre pankreas dokusunda daha yüksek oranda akümüle olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, tez çalışması kapsamında geliştirilen tümör modeli her ne kadar deri altında ve sırt bölgesinde gerçekleştirilse de, tümörün kaynağı olan pankreas dokusunda yapılan görüntüleme çalışmaları, pankreasta oluşacak tümöre karşı da geliştirilen sistemin başarılı olacağını göstermektedir.

Shukla ve diğ.'nin 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada, SCID farelere subkütan yolla MCA 207 hücrelerini enjekte ederek sırt bölgesinde geliştirdikleri beyin tümörünü anti-HER-2 ile konjuge edilmiş 5. jenerasyon PAMAM dendrimerleri ile tedavi etmeye çalışmışlardır, tümör dokusuna ait konfokal mikroskop görüntüleri HER2 pozitif hücrelerle oluşturulmuş tümörden elde edilen kesitte, Alexa flor ile işaretlenmiş anti-HER-2 ile konjuge edilmiş PAMAM dendrimerlerin tümör hücreleri içerisinde lokalize olduğu görülmektedir (144).

6. SONUÇ

Birçok antikanser ilacın en büyük dezavantajı yüksek toksisite ve yan etkilere neden olmasıdır. Hedeflendirilmiş kanser tedavisi sitotoksik maddeyi tümör hücrelerine spesifik olarak taşıyarak yan etkilerin ortadan kaldırılmasını ya da azaltılmasını amaçlar. Başarılı ilaç hedeflendirilmesi terapötik yanıt elde etmek için gerekli dozun da düşürülmesine olanak sağlar. Böylece antitümör etki artırılmış, sistemik toksisite azaltılmış olur. Antikorlar tek başlarına ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirler, ancak etkin maddelerin immünoglobulinlere doğrudan bağlanması bağlanma etkinliğinin kaybı ile ve immünokonjugatın çözünürlüğünde azalma ile sonuçlanabilir. Bu problemler, suda çözünür bir ilaç taşıyıcının antikor ile konjuge edilmesi ile çözümlenebilmektedir. 4,5. jenerasyon, yüzeyi karboksilik asit grupları ile kaplı ve yüzeyinde 118 adet karboksilik asit, 10 adet PEG 2000 bulunan immünojenik olmayan stabil PAMAM dendrimerleri tez çalışmasında bu amaç için kullanılmıştır. Bu eşsiz yapı, dalları arasına etkin maddenin, floresan boyanın enkapsüle olmasına olanak sağlarken, yüzey grupları da antikor konjugasyonuna olanak sağlamıştır. Kanser araştırmalarında çok önemli bir yer tutan pankreas kanseri ve bu kanserin tedavisindeki zorluklar tez çalışmasına da yön vermiştir. Pankreas kanseri tedavisinde kullanılan ancak, kısa yarılanma ömrü ve toksik yan etkileri nedeniyle kullanımı kısıtlanan gemitabin HCl, tez çalışmasında dendrimerler aracılığı ile yeniden formüle edilerek gemitabinin klinikte başarılı bir şekilde kullanılabilmesi amaçlanmıştır. İnsan pankreas kanseri hücreleri olan CFPAC-1'larda literatürden elde edilen bilgiye göre VEGFR-1'in fazla miktarda eksprese edilmesi nedeniyle tez çalışmasında GEM yüklü dendrimerler anti-VEGFR-1 ile konjuge edilmiştir. Hücreler üzerinde yapılan çok dozlu sitotoksikite çalışmaları sonucunda elde edilen toksik olmayan dendrimer konsantrasyonu ile hücreler üzerinde toksik etki gösteren gemitabin dozunun kombinasyonu ile elde edilen inklüzyon komplekslerinin sitotoksitelerini devam ettirdiği gözlenmiştir. İki farklı çekirdek yapısına sahip dendrimerin denendiği sitotoksikite çalışmaları sonucunda daha az toksisite sahip olan PEG çekirdekli dendrimerlerle çalışmalara devam edilmiştir. İn vitro hücre içine alım çalışmaları, floresan boya olarak kullanılan rodamin çözeltisi, kontrol antikoru ile konjuge edilen dendrimerler ve antikor içermeyen dendrimerlere göre anti-VEGFR-1 ile hedeflendirilmiş dendrimerlerin

VEGFR-1 pozitif hücrelere VEGFR-1 pozitiflik oranına göre seçici olarak daha fazla alınmıştır. Floresan mikroskop görüntüleri de akım sitometri sonuçlarını doğrulamıştır. İmmün sistemi baskılanmış farelerde heterotropik olarak sırt bölgesinde geliştirilen tümörler farklı formülasyonlar ile tedavi edilmeye çalışıldığında, GEM çözeltisi ile tedavi edilen farelerde tümör çapında % 6'lık bir küçülme gözlenirken, aynı miktarda GEM içeren PEG-PAMAM-Flt1-GEM ile tedavi edilen farelerin tümöründe % 40'lık bir küçülme görülmüştür. Biyodağılım çalışmaları kapsamında floresan işaretli dendrimerlerin uygulandığı farelerde, tümör doku kesitinin mikroskop altında incelenmesi sonucunda PEG-PAMAM-Flt1-Rho uygulanan farelerin tümör kesitleri daha şiddetli floresan vermiştir. Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında, tez çalışmasında sentezlenen ve ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanıp tümöre hedeflendirilen dendrimerler, gemitabin HCl'ün tümöre spesifik taşınmasını artırarak tümör çapının daha etkin bir şekilde küçültülmesini sağlamıştır. Hedeflendirme ligandı olarak kullanılan anti-VEGFR-1'in antianjiyogenik etkileri de gemitabinin antikanser etkisine ilave olarak tümör damarlanmasını azaltıcı yönde etki göstererek antitümör etkinliği artırabilmiş olabilir.

KAYNAKLAR

1. Wong, J.Y.C., Chu, D.Z., Yamauchi, D.M., Williams, L.E., Liu, A., Wilczynski, S. ve diğerleri. (2000) A phase I radioimmunotherapy trial evaluating 90yttrium-labeled anti-carcinoembryonic antigen (CEA) chimeric T84.66 in patients with metastatic CEA-producing malignancies. *Clin Cancer Res*, 6 (10), 3855-3863.
2. Kumari, A., Yadav, S.K.,Yadav, S.C. (2010) Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 75 (1), 1-18.
3. Esfand, R.,Tomalia, D.A. (2001) Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discovery Today*, 6 (8), 427-436.
4. Bibby, D.C., Davies, N.M.,Tucker, I.G. (2000) Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 197 (1-2), 1-11.
5. Liu, M.J.,Frechet, J.M.J. (1999) Designing dendrimers for drug delivery. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2 (10), 393-401.
6. Patri, A.K., Majoros, I.J.,Baker, J.R. (2002) Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6 (4), 466-471.
7. Nanjwade, B.K., Bechra, H.M., Derkar, G.K., Manvi, F.V.,Nanjwade, V.K. (2009) Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems. *Eur J Pharm Sci*, 38 (3), 185-196.
8. Buhleier, E., Wehner, W.,Vogtle, F. (1978) Cascade-Chain-Like and Nonskid-Chain-Like Syntheses of Molecular Cavity Topologies. *Synthesis-Stuttgart* (2), 155-158.
9. Abbasi, E., Aval, S.F., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H.T., Joo, S.W. ve diğerleri. (2014) Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters*, 9.
10. Tomalia, D.A., Baker, H., Dewald, J., Hall, M., Kallos, G., Martin, S. ve diğerleri. (1985) A New Class of Polymers - Starburst-Dendritic Macromolecules. *Polymer Journal*, 17 (1), 117-132.

11. Ozturk, K., Erturk, A.S., Sarisozen, C., Tulu, M., Calis, S. (2014) Cytotoxicity and in vitro characterization studies of synthesized Jeffamine-cored PAMAM dendrimers. *J Microencapsul*, 31 (2), 127-136.
12. Medina, S.H., El-Sayed, M.E.H. (2009) Dendrimers as Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Agents. *Chemical Reviews*, 109 (7), 3141-3157.
13. Hawker, C.J., Frechet, J.M.J. (1990) Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture - a New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, 112 (21), 7638-7647.
14. Sadekar, S., Ghandehari, H. (2012) Transepithelial transport and toxicity of PAMAM dendrimers: implications for oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 64 (6), 571-588.
15. Thomas, T.P., Patri, A.K., Myc, A., Myaing, M.T., Ye, J.Y., Norris, T.B. ve diğ erleri. (2004) In vitro targeting of synthesized antibody-conjugated dendrimer nanoparticles. *Biomacromolecules*, 5 (6), 2269-2274.
16. Jain, K., Kesharwani, P., Gupta, U., Jain, N.K. (2010) Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int J Pharm*, 394 (1-2), 122-142.
17. Ballauff, M., Likos, C.N. (2004) Dendrimers in solution: insight from theory and simulation. *Angew Chem Int Ed Engl*, 43 (23), 2998-3020.
18. Baars, M.W.P.L., Meijer, E.W. (2000) Host-guest chemistry of dendritic molecules. *Dendrimers II*, 210, 131-182.
19. D'Emanuele, A., Attwood, D. (2005) Dendrimer-drug interactions. *Adv Drug Deliv Rev*, 57 (15), 2147-2162.
20. Cloninger, M.J. (2002) Biological applications of dendrimers. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6 (6), 742-748.
21. Caminade, A.M., Turrin, C.O. (2014) Dendrimers for drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (26), 4055-4066.
22. Madaan, K., Kumar, S., Poonia, N., Lather, V., Pandita, D. (2014) Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues. *J Pharm Bioallied Sci*, 6 (3), 139-150.
23. Lin, W., Galletto, P., Borkovec, M. (2004) Charging and aggregation of latex particles by oppositely charged dendrimers. *Langmuir*, 20 (18), 7465-7473.

24. Jang, W.D., Selim, K.M.K., Lee, C.H., Kang, I.K. (2009) Bioinspired application of dendrimers: From bio-mimicry to biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 34 (1), 1-23.
25. Cheng, Y.Y., Wu, Q.L., Li, Y.W., Hu, J.J., Xu, T.W. (2009) New Insights into the Interactions between Dendrimers and Surfactants: 2. Design of New Drug Formulations Based on Dendrimer-Surfactant Aggregates. *Journal of Physical Chemistry B*, 113 (24), 8339-8346.
26. Jansen, J.F.G.A., Debrabandervandenberg, E.M.M., Meijer, E.W. (1994) Encapsulation of Guest Molecules into a Dendritic Box. *Science*, 266 (5188), 1226-1229.
27. Kolhe, P., Misra, E., Kannan, R.M., Kannan, S., Lieh-Lai, M. (2003) Drug complexation, in vitro release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *Int J Pharm*, 259 (1-2), 143-160.
28. Prajapati, R.N., Tekade, R.K., Gupta, U., Gajbhiye, V., Jain, N.K. (2009) Dendrimer-mediated solubilization, formulation development and in vitro-in vivo assessment of piroxicam. *Mol Pharm*, 6 (3), 940-950.
29. Chauhan, A.S., Sridevi, S., Chalasani, K.B., Jain, A.K., Jain, S.K., Jain, N.K. ve diğ erleri. (2003) Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. *J Control Release*, 90 (3), 335-343.
30. Beezer, A.E., King, A.S.H., Martin, I.K., Mitchell, J.C., Twyman, L.J., Wain, C.F. (2003) Dendrimers as potential drug carriers; encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives. *Tetrahedron*, 59 (22), 3873-3880.
31. Yang, H., Lopina, S.T. (2003) Penicillin V-conjugated PEG-PAMAM star polymers. *J Biomater Sci Polym Ed*, 14 (10), 1043-1056.
32. Yang, H., Lopina, S.T. (2005) Extended release of a novel antidepressant, venlafaxine, based on anionic polyamidoamine dendrimers and poly(ethylene glycol)-containing semi-interpenetrating networks. *J Biomed Mater Res A*, 72 (1), 107-114.
33. Wiwattanapatapee, R., Lomlim, L., Saramunee, K. (2003) Dendrimers conjugates for colonic delivery of 5-aminosalicylic acid. *J Control Release*, 88 (1), 1-9.

34. Najlah, M., Freeman, S., Attwood, D., D'Emanuele, A. (2007) In vitro evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery. *Int J Pharm*, 336 (1), 183-190.
35. D'Emanuele, A., Jevprasesphant, R., Penny, J., Attwood, D. (2004) The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, 95 (3), 447-453.
36. Malik, N., Evagorou, E.G., Duncan, R. (1999) Dendrimer-platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anti-Cancer Drugs*, 10 (8), 767-776.
37. Kaminskas, L.M., McLeod, V.M., Kelly, B.D., Sberna, G., Boyd, B.J., Williamson, M. ve diğerleri. (2012) A comparison of changes to doxorubicin pharmacokinetics, antitumor activity, and toxicity mediated by PEGylated dendrimer and PEGylated liposome drug delivery systems. *Nanomedicine*, 8 (1), 103-111.
38. Pasut, G., Scaramuzza, S., Schiavon, O., Mendichi, R., Veronese, F.M. (2005) PEG-epirubicin conjugates with high drug loading. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 20 (3), 213-230.
39. Soto-Castro, D., Cruz-Morales, J.A., Apan, M.T.R., Guadarrama, P. (2012) Solubilization and anticancer-activity enhancement of Methotrexate by novel dendrimeric nanodevices synthesized in one-step reaction. *Bioorganic Chemistry*, 41-42, 13-21.
40. Zhou, Z.Y., D'Emanuele, A., Attwood, D. (2013) Solubility enhancement of paclitaxel using a linear-dendritic block copolymer. *International Journal of Pharmaceutics*, 452 (1-2), 173-179.
41. Zhao, C., Wang, Y., Su, Y., Zhang, H., Ding, L., Yan, X. ve diğerleri. (2011) Inclusion complexes of isoflavones with two commercially available dendrimers: Solubility, stability, structures, release behaviors, cytotoxicity, and anti-oxidant activities. *Int J Pharm*, 421 (2), 301-309.
42. Lee, S.H., Choi, S.H., Kim, S.H., Park, T.G. (2008) Thermally sensitive cationic polymer nanocapsules for specific cytosolic delivery and efficient gene silencing of siRNA: swelling induced physical disruption of endosome by cold shock. *J Control Release*, 125 (1), 25-32.

43. Wang, X.L., Xu, R., Lu, Z.R. (2009) A peptide-targeted delivery system with pH-sensitive amphiphilic cell membrane disruption for efficient receptor-mediated siRNA delivery. *J Control Release*, 134 (3), 207-213.
44. Malik, N., Wiwattanapatapee, R., Klopsch, R., Lorenz, K., Frey, H., Weener, J.W. ve diğerleri. (2000) Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of ¹²⁵I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *J Control Release*, 65 (1-2), 133-148.
45. Kolhatkar, R.B., Kitchens, K.M., Swaan, P.W., Ghandehari, H. (2007) Surface acetylation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decreases cytotoxicity while maintaining membrane permeability. *Bioconjugate Chemistry*, 18 (6), 2054-2060.
46. H.T. Chen, M.F.N., A.R. Parrish, E. Simanek. (2004) Cytotoxicity, haemolysis, and acute in vivo toxicity of dendrimer based on melamine, candidate vehicles for drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (32), 10044-10048.
47. Rittner, K., Benavente, A., Bompard-Sorlet, A., Heitz, F., Divita, G., Brasseur, R. ve diğerleri. (2002) New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Molecular Therapy*, 5 (2), 104-114.
48. Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Kissel, T. (2003) In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials*, 24 (7), 1121-1131.
49. Jevprasesphant, R., Penny, J., Jalal, R., Attwood, D., McKeown, N.B., D'Emanuele, A. (2003) The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers. *Int J Pharm*, 252 (1-2), 263-266.
50. Ağ Sitesi: <http://www.cancer.gov/types/pancreatic>
51. Patri, A.K., Kukowska-Latallo, J.F., Baker, J.R., Jr. (2005) Targeted drug delivery with dendrimers: comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex. *Adv Drug Deliv Rev*, 57 (15), 2203-2214.
52. Hoag, H. (2006) Seeing the big picture. *Nature*, 440 (7087), 1084-1085.

53. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1), 57-70.
54. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144 (5), 646-674.
55. Krause, D.S., Van Etten, R.A. (2005) Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *New England Journal of Medicine*, 353 (2), 172-187.
56. Sharkey, R.M., Goldenberg, D.M. (2006) Targeted therapy of cancer: New prospects for antibodies and immunoconjugates. *Cancer Journal for Clinicians*, 56 (4), 226-243.
57. Collins, I., Workman, P. (2006) New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nature Chemical Biology*, 2 (12), 689-700.
58. Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W.E., Storm, G. (2012) Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. *Journal of Controlled Release*, 161 (2), 175-187.
59. Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P. ve diğeri. (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (8), 4607-4612.
60. Jain, R.K. (1999) Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. *Annu Rev Biomed Eng*, 1, 241-263.
61. Palmer, T.N., Caride, V.J., Caldecourt, M.A., Twickler, J., Abdullah, V. (1984) The mechanism of liposome accumulation in infarction. *Biochim Biophys Acta*, 797 (3), 363-368.
62. Torchilin, V.P., Klibanov, A.L., Huang, L., O'Donnell, S., Nossiff, N.D., Khaw, B.A. (1992) Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium. *FASEB J*, 6 (9), 2716-2719.
63. Schmidt, H.H., Hofmann, F., Stasch, J.P. (2009) Handbook of Experimental Pharmacology 191. cGMP: generators, effectors and therapeutic implications. Preface. *Handb Exp Pharmacol* (191), v-vi.
64. Wilczewska, A.Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K.H., Car, H. (2012) Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 64 (5), 1020-1037.

65. Whelan, J. (2005) Beyond PEGylation. *Drug Discov Today*, 10 (5), 301.
66. Chang, K.F.P.a.E.H. (2008) Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake? *Kathleen F. Pirollo and Esther H. Chang*, 26 (10), 552-558.
67. Bartlett, D.W., Su, H., Hildebrandt, I.J., Weber, W.A., Davis, M.E. (2007) Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (39), 15549-15554.
68. Kirpotin, D.B., Drummond, D.C., Shao, Y., Shalaby, M.R., Hong, K., Nielsen, U.B. ve diğerleri. (2006) Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res*, 66 (13), 6732-6740.
69. Wu, A.M., Yazaki, P.J., Tsai, S., Nguyen, K., Anderson, A.L., McCarthy, D.W. ve diğerleri. (2000) High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 (15), 8495-8500.
70. Sundaresan, G., Yazaki, P.J., Shively, J.E., Finn, R.D., Larson, S.M., Raubitschek, A.A. ve diğerleri. (2003) 124I-labeled engineered anti-CEA minibodies and diabodies allow high-contrast, antigen-specific small-animal PET imaging of xenografts in athymic mice. *J Nucl Med*, 44 (12), 1962-1969.
71. Kircheis, R., Wightman, L., Schreiber, A., Robitza, B., Rossler, V., Kurs, M. ve diğerleri. (2001) Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther*, 8 (1), 28-40.
72. Stasko, N.A., Johnson, C.B., Schoenfisch, M.H., Johnson, T.A., Holmuhamedov, E.L. (2007) Cytotoxicity of polypropylenimine dendrimer conjugates on cultured endothelial cells. *Biomacromolecules*, 8 (12), 3853-3859.
73. Luo, D., Haverstick, K., Belcheva, N., Han, E., Saltzman, W.M. (2002) Poly(ethylene glycol)-conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible, high-efficiency DNA delivery. *Macromolecules*, 35 (9), 3456-3462.

74. Ulbrich, K., Subr, V. (2004) Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 (7), 1023-1050.
75. Choi, C.H.J., Alabi, C.A., Webster, P., Davis, M.E. (2010) Mechanism of active targeting in solid tumors with transferrin-containing gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (3), 1235-1240.
76. Kocbek, P., Obermajer, N., Cegnar, M., Kos, J., Kristl, J. (2007) Targeting cancer cells using PLGA nanoparticles surface modified with monoclonal antibody. *Journal of Controlled Release*, 120 (1-2), 18-26.
77. Parveen, S., Misra, R., Sahoo, S.K. (2012) Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 8 (2), 147-166.
78. Shi, X., Patri, A.K., Lesniak, W., Islam, M.T., Zhang, C., Baker, J.R., Jr. ve diğ erleri. (2005) Analysis of poly(amidoamine)-succinamic acid dendrimers by slab-gel electrophoresis and capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 26 (15), 2960-2967.
79. Khandare, J.J., Jayant, S., Singh, A., Chandna, P., Wang, Y., Vorsa, N. ve diğ erleri. (2006) Dendrimer versus linear conjugate: Influence of polymeric architecture on the delivery and anticancer effect of paclitaxel. *Bioconjug Chem*, 17 (6), 1464-1472.
80. Ferrara, N. (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25 (4), 581-611.
81. Shibuya, M., Claesson-Welsh, L. (2006) Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*, 312 (5), 549-560.
82. Alitalo, K., Carmeliet, P. (2002) Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell*, 1 (3), 219-227.
83. Bridges, E.M., Harris, A.L. (2011) The angiogenic process as a therapeutic target in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 81 (10), 1183-1191.
84. Yu, X.J., Zhang, Y.Q., Chen, C.Y., Yao, Q.Z., Li, M. (2010) Targeted drug delivery in pancreatic cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1805 (1), 97-104.

85. Ferrara, N., Kerbel, R.S. (2005) Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438 (7070), 967-974.
86. Wey, J.S., Fan, F., Gray, M.J., Bauer, T.W., McCarty, M.F., Somcio, R. ve diğeri. (2005) Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer*, 104 (2), 427-438.
87. Itakura, J., Ishiwata, T., Friess, H., Fujii, H., Matsumoto, Y., Buchler, M.W. ve diğeri. (1997) Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. *Clin Cancer Res*, 3 (8), 1309-1316.
88. Ferrara, N., Hillan, K.J., Novotny, W. (2005) Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333 (2), 328-335.
89. Burris, H., Rocha-Lima, C. (2008) New therapeutic directions for advanced pancreatic cancer: Targeting the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways. *Oncologist*, 13 (3), 289-298.
90. Sopczyński, B.P. (2008) A New Anti-Tumor Drug Delivery System: Dendrimers. *MMG 445 Basic Biotechnology*, 2, 87-92.
91. Carmeliet, P., Jain, R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407 (6801), 249-257.
92. Philip, P.A. (2008) Targeted therapies for pancreatic cancer. *Gastrointest Cancer Res*, 2 (4 Suppl), S16-19.
93. Shaib, Y.H., Davila, J.A., El-Serag, H.B. (2006) The epidemiology of pancreatic cancer in the United States: changes below the surface. *Aliment Pharmacol Ther*, 24 (1), 87-94.
94. Freitas, D., Fernandes Gdos, S., Hoff, P.M., Cunha, J.E. (2009) Medical management of pancreatic adenocarcinoma. *Pancreatology*, 9 (3), 223-232.
95. Katz, M.H., Hwang, R., Fleming, J.B., Evans, D.B. (2008) Tumor-node-metastasis staging of pancreatic adenocarcinoma. *CA Cancer J Clin*, 58 (2), 111-125.
96. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Thun, M.J. (2009) Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 59 (4), 225-249.

97. Rejiba, S., Reddy, L.H., Bigand, C., Parmentier, C., Couvreur, P., Hajri, A. (2011) Squalenoyl gemcitabine nanomedicine overcomes the low efficacy of gemcitabine therapy in pancreatic cancer. *Nanomedicine*, 7 (6), 841-849.
98. Pliarchopoulou, K., Pectasides, D. (2009) Pancreatic cancer: current and future treatment strategies. *Cancer Treat Rev*, 35 (5), 431-436.
99. Custodio, A., Puente, J., Sastre, J., Diaz-Rubio, E. (2009) Second-line therapy for advanced pancreatic cancer: a review of the literature and future directions. *Cancer Treat Rev*, 35 (8), 676-684.
100. Immordino, M.L., Brusa, P., Rocco, F., Arpicco, S., Ceruti, M., Cattel, L. (2004) Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs. *J Control Release*, 100 (3), 331-346.
101. Kiew, L.V., Cheong, S.K., Sidik, K., Chung, L.Y. (2010) Improved plasma stability and sustained release profile of gemcitabine via polypeptide conjugation. *Int J Pharm*, 391 (1-2), 212-220.
102. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65 (1-2), 55-63.
103. Mastanamma, S., Ramkumar, G., Kumar, D.A., Rao, J.V.L.N.S. (2010) A Stability Indicating RP-HPLC Method for the Estimation of Gemcitabine HCl in Injectable Dosage forms. *E-Journal of Chemistry*, 7, S239-S244.
104. Xu, S., Xu, Q., Zhou, J., Wang, J., Zhang, N., Zhang, L. (2013) Preparation and characterization of folate-chitosan-gemcitabine core-shell nanoparticles for potential tumor-targeted drug delivery. *J Nanosci Nanotechnol*, 13 (1), 129-138.
105. Sharrow, S.O. (2002) Overview of flow cytometry. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 5, Unit 5 1.
106. Singh, S., Srivastava, S.K., Bhardwaj, A., Owen, L.B., Singh, A.P. (2010) CXCL12-CXCR4 signalling axis confers gemcitabine resistance to pancreatic cancer cells: a novel target for therapy. *Br J Cancer*, 103 (11), 1671-1679.
107. Von Hoff, D.D., Ramanathan, R.K., Borad, M.J., Laheru, D.A., Smith, L.S., Wood, T.E. ve diğerleri. (2011) Gemcitabine Plus nab-Paclitaxel Is an Active

- Regimen in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase I/II Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 29 (34), 4548-4554.
108. Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D. ve diğerleri. (2009) Inhibition of Hedgehog Signaling Enhances Delivery of Chemotherapy in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Science*, 324 (5933), 1457-1461.
 109. Ng, S.S., Tsao, M.S., Nicklee, T., Hedley, D.W. (2001) Wortmannin inhibits pkb/akt phosphorylation and promotes gemcitabine antitumor activity in orthotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res*, 7 (10), 3269-3275.
 110. Ferrara, N. (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, 2 (10), 795-803.
 111. Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9 (6), 669-676.
 112. Ferrara, N. (2004) Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*, 25 (4), 581-611.
 113. Hattori, K., Heissig, B., Wu, Y., Dias, S., Tejada, R., Ferris, B. ve diğerleri. (2002) Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature Medicine*, 8 (8), 841-849.
 114. Luttun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F. ve diğerleri. (2002) Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med*, 8 (8), 831-840.
 115. LeCouter, J., Moritz, D.R., Li, B., Phillips, G.L., Liang, X.H., Gerber, H.P. ve diğerleri. (2003) Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*, 299 (5608), 890-893.
 116. Caminade, A.M., Laurent, R., Majoral, J.P. (2005) Characterization of dendrimers. *Adv Drug Deliv Rev*, 57 (15), 2130-2146.
 117. Harper, P. (2003) Update on gemcitabine/carboplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Semin Oncol*, 30 (4 Suppl 10), 2-12.

118. Fossella, F.V., Lippman, S.M., Shin, D.M., Tarassoff, P., Calayag-Jung, M., Perez-Soler, R. ve diğerleri. (1997) Maximum-tolerated dose defined for single-agent gemcitabine: a phase I dose-escalation study in chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 15 (1), 310-316.
119. Celano, M., Calvagno, M.G., Bulotta, S., Paolino, D., Arturi, F., Rotiroti, D. ve diğerleri. (2004) Cytotoxic effects of gemcitabine-loaded liposomes in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *BMC Cancer*, 4, 63.
120. Kirstein, M.N., Hassan, I., Guire, D.E., Weller, D.R., Dagit, J.W., Fisher, J.E. ve diğerleri. (2006) High-performance liquid chromatographic method for the determination of gemcitabine and 2',2'-difluorodeoxyuridine in plasma and tissue culture media. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 835 (1-2), 136-142.
121. Shabir, 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. *J Chromatogr A*, 987 (1-2), 57-66.
122. Devarakonda, B., Hill, R.A., Liebenberg, W., Brits, M., de Villiers, M.M. (2005) Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins. *Int J Pharm*, 304 (1-2), 193-209.
123. Xu, R.L. (2008) Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology*, 6 (2), 112-115.
124. Ciolkowski, M., Rozanek, M., Szewczyk, M., Klajnert, B., Bryszewska, M. (2011) The influence of PAMAM-OH dendrimers on the activity of human erythrocytes ATPases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1808 (11), 2714-2723.
125. Filipe, V., Hawe, A., Jiskoot, W. (2010) Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27 (5), 796-810.

126. Das, S., Desai, J.L.,Thakkar, H.P. (2013) Gemcitabine Hydrochloride-Loaded Functionalised Carbon Nanotubes as Potential Carriers for Tumour Targeting. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75 (6), 707-715.
127. Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K.,Nagai, T. (1999) Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Dev Ind Pharm*, 25 (4), 471-476.
128. Morgan, M.T., Nakanishi, Y., Kroll, D.J., Griset, A.P., Carnahan, M.A., Wathier, M. ve diğerleri. (2006) Dendrimer-encapsulated camptothecins: increased solubility, cellular uptake, and cellular retention affords enhanced anticancer activity in vitro. *Cancer Res*, 66 (24), 11913-11921.
129. Bhadra, D., Bhadra, S., Jain, S.,Jain, N.K. (2003) A PEGylated dendritic nanoparticulate carrier of fluorouracil. *Int J Pharm*, 257 (1-2), 111-124.
130. Kojima, C., Kono, K., Maruyama, K.,Takagishi, T. (2000) Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs. *Bioconjug Chem*, 11 (6), 910-917.
131. Shilpee Das, J.L.D., and Hetal P. Thakkar. (2013) Gemcitabine Hydrochloride-Loaded Functionalised Carbon Nanotubes as Potential Carriers for Tumour Targeting. *Indian J Pharm Sci*, 75 (6), 707-715.
132. Patri, A.K., Kukowska-Latallo, J.F.,Baker, J.R. (2005) Targeted drug delivery with dendrimers: Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (15), 2203-2214.
133. Hong, S.P., Wen, J., Bang, S., Park, S.,Song, S.Y. (2009) CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells. *Int J Cancer*, 125 (10), 2323-2331.
134. Kopatz, I., Remy, J.S.,Behr, J.P. (2004) A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *Journal of Gene Medicine*, 6 (7), 769-776.
135. Goncalves, C., Mennesson, E., Fuchs, R., Gorvel, J.P., Midoux, P.,Pichon, C. (2004) Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma cells. *Molecular Therapy*, 10 (2), 373-385.

136. Vandamme, T.F., Brobeck, L. (2005) Poly(amidoamine) dendrimers as ophthalmic vehicles for ocular delivery of pilocarpine nitrate and tropicamide. *Journal of Controlled Release*, 102 (1), 23-38.
137. Perumal, O.P., Inapagolla, R., Kannan, S., Kannan, R.M. (2008) The effect of surface functionality on cellular trafficking of dendrimers. *Biomaterials*, 29 (24-25), 3469-3476.
138. Qiu, W., Su, G.H. (2013) Development of orthotopic pancreatic tumor mouse models. *Methods Mol Biol*, 980, 215-223.
139. Patra, C.R., Bhattacharya, R., Wang, E., Katarya, A., Lau, J.S., Dutta, S. ve diğ erleri. (2008) Targeted delivery of gemcitabine to pancreatic adenocarcinoma using cetuximab as a targeting agent. *Cancer Res*, 68 (6), 1970-1978.
140. Majoros, I.J., Myc, A., Thomas, T., Mehta, C.B., Baker, J.R., Jr. (2006) PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromolecules*, 7 (2), 572-579.
141. Nigavekar, S.S., Sung, L.Y., Llanes, M., El-Jawahri, A., Lawrence, T.S., Becker, C.W. ve diğ erleri. (2004) 3H dendrimer nanoparticle organ/tumor distribution. *Pharm Res*, 21 (3), 476-483.
142. Hong, S., Leroueil, P.R., Majoros, I.J., Orr, B.G., Baker, J.R., Jr., Banaszak Holl, M.M. (2007) The binding avidity of a nanoparticle-based multivalent targeted drug delivery platform. *Chem Biol*, 14 (1), 107-115.
143. Kukowska-Latallo, J.F., Candido, K.A., Cao, Z., Nigavekar, S.S., Majoros, I.J., Thomas, T.P. ve diğ erleri. (2005) Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Res*, 65 (12), 5317-5324.
144. Shukla, R., Thomas, T.P., Peters, J.L., Desai, A.M., Kukowska-Latallo, J., Patri, A.K. ve diğ erleri. (2006) HER2 specific tumor targeting with dendrimer conjugated anti-HER2 mAb. *Bioconjug Chem*, 17 (5), 1109-1115.

EK 1

KOBAY

deney hayvanları laboratuvarı a.ş.

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
BAŞVURU BİLGİLERİ	Protokol Numarası	23
	Protokol Adı	Anti-VEGFR-1 Monoklonal Antikor ile Konjuge edilmiş Gemsitabin yüklü Dendrimerlerin pankreas kanserine aktif hedeflendirilmesi ve in vitro –in vivo olarak değerlendirilmesi
	Başvuru Tarihi	08/09/2011
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
KARAR BİLGİLERİ	Onay Numarası	23
	Onay Tarihi	12.09.2011
	Onay Bilgileri	Proje amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinde Etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı Veteriner Hekim A. Begüm BUĞDAYCI	<i>ABY</i>
	Etik Kurul Üyesi Plastik Cerrahi Uzmanı Operatör Doktor Mert DEMİREL	<i>Mert Demirel</i>
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Sağlık Teknikeri Özge AVŞAR	<i>Ö AVŞAR</i>
	Etik Kurul Üyesi Kemal Tunç AÇIKKOL	<i>K. AÇIKKOL</i>
	Etik Kurul Üyesi Dilara GÜNTAV	<i>GÜNTAV</i>

KOBAY DENEX HAYVANLARI
LABORATUVARI SANAYİ VE TİCARET A.Ş.
 I.O.S.B. 21. Cad. 520. Sk. No: 2/2
 Yenimahalle / ANKARA
 Tel - Faks: 0312 394 70 94
 Ulus V.D. 584 053 4744

KOBAY DENEX HAYVANLARI
LABORATUVARI SANAYİ VE TİCARET A.Ş.
 I.O.S.B. 21. Cad. 520. Sk. No: 2/2
 Yenimahalle / ANKARA
 Tel - Faks: 0312 394 70 94
 Ulus V.D. 584 053 4744

ASLI GIBİDİR.

I.O.S.B. 21. Cad. 520 Sok
 No:2/2 Yenimahalle / ANKARA
 Tel : +90 (312) 394 70 94
 Gsm: +90 (534) 843 63
 www.kobay.com

EK 2 ÖZGEÇMİŞ

Ecz. (B.U.) Kıvılcım ÖZTÜRK



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

İş Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
06100 Ankara- TÜRKİYE

İş Telefonu : 90 312 305 12 41

İş Faks : 90 312 310 09 06

E-mail : k.ozturk@hacettepe.edu.tr

Doğum Günü : 15 Aralık 1985

Doğum Yeri : Ankara

EĞİTİM BİLGİLERİ

2010 - 2015 Doktora

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara
Tez Danışmanı: Prof.Dr. Sema ÇALIŞ
Not Ortalaması: 3,94/4,00

2008 – 2010 Yüksek Lisans

Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara
Tez Danışmanı: Prof.Dr. Yılmaz ÇAPAN
Not Ortalaması: 3,72/4,00

2004 - 2008 Lisans

Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Not Ortalaması: 3,18/4,00

MESLEKİ DENEYİM

2009 -

Araştırma Görevlisi
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara

ÇALIŞMA ALANLARI

- Nanoteknoloji
- Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler
- Dendrimerlerin ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanması ve değerlendirilmesi
- Hücre Kültürü
- HPLC
- İn Vivo deneyler
- Tümöre aktif hedeflendirme

YAYINLAR

- **MAKALELER**

- 1) Kivilcim Öztürk, Abdur Rahman Mashal, Betül Arıca Yegin, Sema Çalış, Preparation and In Vitro Evaluation of 5-Fluorouracil Loaded PCL Nanoparticles for Colon Cancer Treatment, Pharmaceutical Technology and Development, 2015, DOI:10.3109/10837450.2015.1116565 (Basım aşamasında).
- 2) K. Ozturk, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, R. Riguera, M. Yemisci, Y. Gursoy-Ozdemir, T. Dalkara, P. Couvreur, Y. Capan, Comparative in vitro studies on PBN loaded nanoparticles prepared by biodegradable chitosan, PLGA polymers and their PEGylated block copolymers, J. DRUG DEL. SCI. TECH., 24 (2) 148-152, 2014.
- 3) Oztürk K, Ertürk AS, Sarısözen C, Tulu M, Çalış S., Cytotoxicity and in vitro characterization studies of synthesized Jeffamine-cored PAMAM dendrimers, J Microencapsul. 2014;31(2):127-36. doi: 10.3109/02652048.2013.814727
- 4) K. Ozturk, S. Caban, S. Kozlu, E. Kadayıfci, F. Yerlikaya, Y. Capan, The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles, Pharmazie 65: 1–5 (2010)
- 5) Y. Çırpanlı, F. Yerlikaya, K. Ozturk, N.Erdogar, M. Launay, C.Gegu, T. Leturgez, E. Bilensoy, S. Calis, Y. Capan, Comparative evaluation of in vitro parameters of tamoxifen citrate loaded poly(lactide-co-glycolide), poly(ε-caprolactone) and chitosan nanoparticles, Pharmazie 65: 867-879 (2010)

- **SÖZLÜ SUNUMLAR**

- 1) Development of Dendrimer Based Drug Delivery System for Anticancer Therapy, Kivilcim Öztürk, Mustafa Ulvi Gürbüz, Metin Tülü, Sema Çalış, GPEN 2014, 27-29 August 2014, Helsinki, Finland (*selected for podium presentation*).

- **BİLDİRİLER**

- 1) S. Caban, E. Kadayifci, S. Kozlu, K. Ozturk, F. Yerlikaya, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, E. Quiñoá, R. Riguera, Y. Aktas, T. Dalkara, Y. Capan, The Preparation And Characterization Of Chitosan–Based Nanoparticles, 17th International Symposium on Microencapsulation, 29.09.2009 – 01.10.2009, Nagoya, JAPAN
- 2) K. Ozturk, S. Caban, E. Kadayifci, S. Kozlu, F. Yerlikaya, Y. Capan, The Influence Of Technological Parameters On The Characterization Of Blank PLGA Nanoparticles, 17th International Symposium on Microencapsulation, 29.09.2009 – 01.10.2009, Nagoya, JAPAN
- 3) K. Ozturk, F. Yerlikaya, Y. Capan, A validated reversed-phase high pressure liquid chromatography (HPLC) method for the in vitro determination of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN); 2009 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 8-12, 2009, Los Angeles, CA, USA
- 4) K. Ozturk, S. Caban, E. Kadayifci, S. Kozlu, F. Yerlikaya, Y. Capan, The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles; 2009 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 8-12, 2009, Los Angeles, CA, USA
- 5) Y.Çapan, K.Ozturk, In Vitro Evaluation of PBN Loaded Poly(DL-lactide-co-glycolide) PLGA Nano/Microparticle Formulations; 2010 Annual Meeting and Exposition, November 14-18, 2010, New Orleans, Louisiana, USA
- 6) ÖZTÜRK K., TULU M., ÇALIŞ, S., “Drug-Dendrimer Complex: Novel and Potential Systems for Oral Antiinflammatory Drug Delivery” 2011 AAPS Annual Meeting and Exposition, October 23-27, 2011, Washington, DC, USA.
- 7) OZTURK, K., SARISOZEN, C., ERTURK, A.S., TULU, M., “Effect of Generation Number and Concentration on *in vitro* Characterization and Cytotoxicity of Dendrimers” 2012 AAPS Annual Meeting and Exposition, October 14-18, 2012, Chicago, IL, USA.
- 8) CELEN, N. , OZTURK, K. , BILENSOY, E. , **CALIS, S.**,Enhanced Solubility of Cefixime, a Poorly Soluble Drug, with Using Hydroxypropyl β -Cyclodextrin, 3rd European Conference on Cyclodextrins, 2-4 October 2013, Antalya, TURKEY

- 9) Preparation and In Vitro Characterization of 5-Fluorouracil loaded biodegradable Nanoparticles, A. R. Mashal, K. Ozturk, B. Arica Yegin, S. Calis, 2014 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 2-6, 2014, San Diego, USA.
- 10) ÖZTÜRK K, GÜRBÜZ, M.U., TÜLÜ M., ÇALIŞ S. “Development of Dendrimer-based Nanocarrier System for Cancer Therapy”, 2014 AAPS Annual Meeting and Exposition, 2-6 November, 2014, San Diego, USA.
- 11) Öztürk, K., Gürbüz, M.U., Tülü, M., Esendağlı, G., Çalış, S., Evaluation of Developed Dendrimer-based Nanocarrier System for Pancreatic Cancer Therapy, 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition, 25-29 October, 2015, Orlando, USA.

ÇALIŞTIĞI PROJELER

TÜBİTAK Projeleri

1. “Anti-VEGFR-1 Monoklonal Antikor ile Konjuge Edilmiş Gemsitabin Yüklü Dendrimerlerin Pankreas Kanseri Aktif Hedeflendirilmesi ve İn Vitro-İn Vivo Olarak Değerlendirilmesi”

Proje No : 112S205, 2012-2015

Proje Yürütücüsü : Prof. Dr. Sema ÇALIŞ

Araştırmacılar : Doç. Dr. Metin Tülü, Doç. Dr. Güneş Esendağlı

2. “Nöroproteksiyonda Nanoteknolojik Yaklaşımlar”

Proje No:110S460 2010-2012

Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

Araştırmacı: Doç. Dr. Müge Yemişçi Özkan

SERTİFİKALAR

Laboratuvar Hayvanları Kullanım Sertifikası

ORIGINAL ARTICLE

Cytotoxicity and *in vitro* characterization studies of synthesized Jeffamine-cored PAMAM dendrimers

Kıvılcım Öztürk¹, Ali Serol Ertürk², Can Sansözün¹, Metin Tulu², and Sema Çalış¹

¹Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey and ²Department of Chemistry, Faculty of Arts and Sciences, Yıldız Technical University, Istanbul, Turkey

Abstract

The objective of this study is to make comprehensive cytotoxicity evaluation and *in vitro* characterization of Jeffamine-cored polyamidoamine (PAMAM) dendrimers on L929 cell lines for oral drug delivery purposes. Ester-, amine- and carboxylic acid-terminated PAMAMs were investigated for their cytotoxicity on L929 cells at different generations and concentrations. Cationic surface charge caused highest cytotoxicity on L929 cells, while ester-terminated PAMAMs showed generation- and concentration-dependent toxicity. Anionic dendrimers were determined as the lowest cytotoxic group, and highest generation number presented lowest cellular toxicity. Encapsulation studies were performed with anionic PAMAMs at 2.5, 3.5 and 4.5 generations and different concentrations. Increasing generation number provides greater loaded naproxen amounts and larger particle size. Moreover, formulations provide controlled release at simulated terminal ileum conditions. Consequently, Jeffamine-cored carboxylic acid-terminated PAMAMs can be a promising option for oral drug delivery of poorly water-soluble drugs.

Keywords

Cell culture, dendrimer, Jeffamine, naproxen, oral drug delivery

History

Received 19 December 2012
Revised 21 May 2013
Accepted 10 June 2013
Published online 17 July 2013

Introduction

Oral route is the major route of administration of dosage forms and provides various advantages over alternative administration routes such as possessing non-invasive nature, patient compliance and cost-effectiveness (Sastry et al., 2000; El-Sayed et al., 2002; Lin et al., 2011). On the other hand, it also has several disadvantages such as low bioavailability, low stability, insufficient controlled release in some cases and gastrointestinal tract irritation (Felt et al., 1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are good representatives for the mentioned side effects. They are used to treat rheumatic disease, osteoarthritis and other chronic musculoskeletal conditions, also have gastrointestinal and renal side effects, and hypersensitivity reactions (Cheng & Xu, 2005). Naproxen, presumably the most studied NSAIDs, is practically insoluble in water and a nonspecific anti-inflammatory drug that is usually used in water-soluble sodium salt form to formulate (Mura et al., 2001; Mitchell et al., 2003).

To overcome these low-numbered but important disadvantages about oral administration, several attempts have been made using nanotechnological approaches. To name a few, drug-encapsulated nano-sized carriers like cyclodextrins, micelles and nanoparticles were used to increase the solubility, stability and, at the end, bioavailability of the active substances (Mathot et al., 2006; Sajeesh & Sharma, 2006; Muchow et al., 2008). Among these carriers, dendrimers are hyperbranched, monodisperse, three-dimensional macromolecules, having defined molecular weight

and host-guest entrapment properties (Esfand & Tomalia, 2001; Cheng & Xu, 2005). Due to their well-defined structure, easily modified surface groups, monodispersity, specific size and shape characteristics, dendrimers are excellent candidates for drug delivery systems (Tomalia et al., 1985; Wong et al., 2012) and thus have been used for various pharmaceutical applications including, but not limited to targeted drug delivery, gene therapy, imaging, oral drug delivery, solubility and permeability enhancement (Najlah et al., 2007; Tsai & Imae, 2011).

Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers are the first complete dendrimer family to be synthesized, characterized and commercialized (Tomalia et al., 1985). They comprise repeated branches that are organized in concentric layers, called “generations”, around a central core. Amine-terminated PAMAM dendrimers are called full generation (G0, G1, G2, G3, etc.), whereas carboxylate-terminated dendrimers are half-generation (G1.5, G2.5, G3.5, etc.). PAMAM dendrimers can exist as positively charged amine-terminated, neutral hydroxyl-terminated or negatively charged carboxyl-terminated (Lin et al., 2011), all three having different advantages in terms of functionalization and surface properties (Perumal et al., 2008).

Drug-dendrimer interactions can be subdivided into the entrapment of drugs within the dendritic architecture (involving electrostatic, hydrophobic and hydrogen bond interactions) and the interaction between a drug and the surface of a dendrimer (electrostatic and covalent interactions). Entrapment of drugs within the dendritic structure is defined as encapsulation and obtained product can be termed as inclusion complex. Electrostatic interactions between the dendrimer surface groups and drug is defined as complexation. Chemical conjugation provides more stable structure than electrostatic interactions and thus favourable for targeted drug delivery systems. due to their

Address for correspondence: Prof. Sema Çalış, Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, 06100, Ankara, Turkey. Tel: + 90 312 305 12 41. Fax: + 90 312 310 09 06. E-mail: scalis@hacettepe.edu.tr

