

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

**AMFİFİLİK BLOK KOPOLİMERLER
KULLANILARAK NANOPARTİKÜL
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Harika ÖCAL

**Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2010

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

**AMFİFİLİK BLOK KOPOLİMERLER
KULLANILARAK NANOPARTİKÜL
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Harika ÖCAL

**Farmasötik Teknoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ**

**ANKARA
2010**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

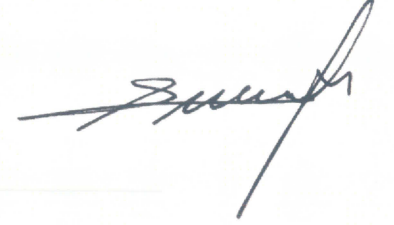
Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sema Çalış
(Tez Danışmanı) Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof.Dr. Tuncer DEĞİM
Gazi Üniversitesi



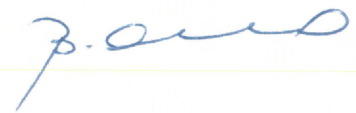
Üye: Prof.Dr.Yalçın ÖZKAN
GATA



Üye: Doç. Dr. İmran Vural
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Betül Arıca
Hacettepe Üniversitesi



ONAY:

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan S. Orer

Enstitü Müdürü

*Hiçbir karşılık beklemeden her zaman yanımda olan,
Anneme...*

TEŞEKKÜR

Farmasötik Teknoloji Yüksek Lisans Programına katılmamı teşvik eden **Prof. Dr. Filiz Öner** ile Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Eski Başkanı **Prof. Dr. Yılmaz Çapan**'a ve bu tez çalışmasını yapmama olanak sağlayan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Nurşen Ünlü**'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince bilimsel bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her zaman yanımda olan ve beni destekleyen danışman hocam **Prof. Dr. Sema Çalış**'a, tezim süresince en sıkıntılı zamanlarımda yanımda olan, bilimsel katkılarını benden esirgemeyen, her konuda ve her zaman yardımını gördüğüm **Doç. Dr. Betül Arıca**'ya teşekkür ederim.

Hücre kültürü çalışmalarım sırasında esirgemediği bilimsel yardım ve desteğinin yanı sıra, yüreğindeki sonsuz sevgisi, güleryüzü, sabrı ve anlayışı için, kendilerini tanımış olmaktan dolayı şanslı hissettiğim ve her zaman örnek almaya çalıştığım **Doç. Dr. İmran Vural**'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında, Fourier Transform İnfrared Spektroskopi analizlerinin gerçekleştirilmesindeki destekleri için **Prof. Dr. Ünsal Çalış** ile **Ecz. (B.U.) Ebubekir Septioğlu**'na ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetri analizlerinin gerçekleştirilmesindeki desteği için **Doç. Dr. Neslihan Gürsoy**'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm **Dr. Yasemin Çırpanlı**, **Dr. Sibel Şamdancıoğlu**, **Ecz. Süheyla Toprak**, **Ecz. Esra Enver**, **Ecz. (B.U.) Serhat Kozlu**, **Ecz. (B.U.) Seren Kayıran**, **Ecz. (B.U.) Merve Günbeyaz**, **Ecz. (B.U.) Burçin Yavuz**, **Ecz. (B.U.) Seçil Çaban**, **Ecz. (B.U.) Can Sarısözen** ve **Ecz. (B.U.) Tuğba Gülsün İnal** başta olmak üzere Eczacılık Teknolojisi Bölümü'ndeki tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, değerli hocalarıma ve idari personelimize teşekkür ederim.

İstisnasız her ihtiyacım olduğunda yanımda olan, yüreğinin kapılarını sonuna kadar bana açan ve hayatımda çok kıymetli bir yeri olan **Ecz. (B.U.) Serap Yılmaz** başta olmak üzere, **Prm. Leyla Güzel**, **Ecz. (B.U.) Gülsüm Gül**, **Ecz. (B.U.) G.Tuğba Ada**, **Ecz. Nilay Tarhan** ve her zaman desteklerini gördüğüm tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı gerçekleştirme yolunda yüksek lisans eğitimim boyunca sağladıkları destek için **TÜBİTAK**'a teşekkür ederim.

Tezim sırasında da, hayatımın her aşamasında olduğu gibi, özveriyle bana hem maddi hem de manevi destek olan, sıkıntılarıma ve mutluluklarıma gönülden paylaşan aileme ve aramıza yeni katılan sevgili yeğenime sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Öcal, H. Amfifilik Blok Kopolimerler Kullanılarak Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve İn Vitro Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2010. 5-Fluorourasil (5-FU) genellikle parenteral yolla hedef dokuya gönderilen kuvvetli bir antikanser maddedir. Parenteral yolla uygulanan hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin kanda uzun süre kalması istenmektedir, ancak bu sistemler, genellikle mononükleer fagositik sistem hücrelerince fagosit edilmektedirler. Bu nedenle kan dolaşımında kalış süresini uzatabilecek etkin bir ilaç taşıyıcı sistemin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, bir çeşit amfifilik triblok kopolimer olan PEG-PPG-PEG kullanılarak yüzeyi modifiye edilmiş, kanser tedavisine yönelik 5-FU yüklü PLA/PEG-PPG-PEG ve PLGA/PEG-PPG-PEG nanopartikülleri hazırlanmış ve nanopartiküllerin; partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, yükleme etkinliği, yüzey morfolojisi, salım özellikleri, DSC analizleri, FT-IR spektrumları ve sitotoksiteleri değerlendirilmiştir. Nanopartiküller emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemine göre hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin üretim verimleri, % 72.4 ile % 87.6 arasında değişmektedir. Bütün formülasyonların ortalama partikül büyüklükleri 200 nm'nin altında ve polidispersite indeksleri 0.5'den küçük bulunmuştur. İn vitro salım çalışmalarında, 1:10 oranında PLA ($M_w=10000$ Da) ve PEG-PPG-PEG kullanılarak hazırlanan formülasyon 6.7. saatte etkin maddenin % 50'sini salarken, 72. saat sonunda en yüksek oranda (% 94) 5-FU salan formülasyon olmuştur. Sitotoksite çalışmalarında antikanser aktiviteyi değerlendirmek için Caco-2 hücreleri kullanılmış, etkin madde yüklü olan formülasyonlar boşlara göre anlamlı derecede sitotoksik bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, 5-FU yüklü PLA/PEG-PPG-PEG ve PLGA/PEG-PPG-PEG nanopartikülleri, in vivo çalışmaların da desteklemesi durumunda, kanser tedavisinde potansiyel sistemler olarak değerlendirilebilir.

Anahtar Kelimeler: 5-Fluorourasil, Amfifilik blok kopolimer, PLA (poli-laktik asit), PLGA (poli-laktid-ko-glikolik asit), Nanopartikül, Antikanser etkinlik.

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK Uluslararası İkili İşbirliği Araştırma Projesi (SBAG, 108S146), TÜBİTAK.

ABSTRACT

Öcal, H. Development of Nanoparticle Formulations Using Amphiphilic Block Copolymers and Their In Vitro Evaluation, Hacettepe University Health Sciences Institute, Pharmaceutical Technology Programme, Master Thesis, Ankara, 2010. 5-Fluorouracil (5-FU) is a potent anticancer agent that is generally

administered parenterally to access the target tissue. Most targeted systems are administered parenterally and in order to reach their target, prolonged blood circulation times are important. However, this is often hampered by rapid carrier phagocytosis by cells of the mononuclear phagocyte system. That is why; it is focused to develop formulations which have long plasma residence time of drug. In this study, modifying the nanoparticle surface properties with PEG-PPG-PEG that is a type of amphiphilic triblock copolymer, 5-FU was encapsulated in PLA/PEG-PPG-PEG and PLGA/PEG-PPG-PEG nanoparticles for the treatment of cancer. The nanoparticles were characterized through particle size determination, zeta potential, encapsulation efficiency, surface morphology determinations, in vitro release studies, DSC thermograms, FT-IR spectrums and cytotoxicity studies. Nanoparticles were prepared with emulsification/solvent evaporation technique. Manufacturing yields of nanoparticles are between 72.4 % and 87.6 %. Mean particle sizes were under 200 nm and polydispersity indices were lower than 0.5 for all formulations. In vitro release studies showed that, when PLA ($M_w=10000$ Da) and PEG-PPG-PEG are used with the ratio of 1:10, the formulation release 50 % of active substance at 6.7 hour and the highest release (94 %) at 72 hour. Anticancer efficacy of the nanoparticles was evaluated against Caco-2 human colon adenocarcinoma cells. 5-FU loaded nanoparticles showed higher anticancer efficacy than blank nanoparticles significantly. These results indicated that 5-FU loaded PLA/PEG-PPG-PEG and PLGA/PEG-PPG-PEG nanoparticles emerge as promising carrier systems for the cancer treatment, in case supported by required in vivo studies.

Key Words: 5-Fluorouracil, Amphiphilic Block Copolymer, PLA (poly-lactic acid), PLGA (poly-lactid-co-glycolic acid), Nanoparticle, Anticancer efficacy.

Supporting Institute: TÜBİTAK International Bilateral Cooperation Research Project (SBAG, 108S146), TÜBİTAK.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
TABLOLAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler	3
2.1.2. Nanopartiküler Sistemler	4
2.1.2.1. Tanımı ve Özellikleri	4
2.1.2.2. Nanopartiküler Sistemlerin Üstünlükleri ve Önemleri	5
2.1.2.3. Polimerik Miseller	8
2.1.2.3.1. Polimerlerden Misel Oluşumu	12
2.1.2.3.2. Misel Oluşturan Polimerlerin Yapısı ve Özellikleri	13
2.1.2.3.3. Çekirdek Oluşturucu Blok Olarak Kullanılan PLGA ve PLA'nın Yapısı ve Özellikleri	13
2.1.2.3.4. Misel Oluşturucu Kopolimerlerin Yapısı ve Özellikleri	16
2.1.2.3.5. Amfifilik Triblok Kopolimerler	18
2.1.2.3.6. Blok Kopolimerler ile Yapılan Çalışmalar	19
2.1.2.4. Pluronic® Blok Kopolimerler	20
2.1.2.4.1. Pluronic® Blok Kopolimerlerin Yapısı ve Sentezi	20
2.1.2.4.2. Kendiliğinden Birleşebilen Pluronic® Blok Kopolimerler	22
2.1.2.4.3. İlaç ve Gen Taşınmasında Pluronic® Blok Kopolimerler	23
2.1.2.4.4. Pluronic® Blok Kopolimerler Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonlarla İlaça Dirençli Tümörlerin Tedavisi	24
2.1.2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlama Yöntemleri	25

2.1.2.5.1.	Emülsifikasyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi	25
2.1.2.6.	Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu	26
2.1.2.6.1.	Partikül Büyüklüğü	26
2.1.2.6.2.	Zeta Potansiyeli	27
2.1.2.6.3.	Etkin Madde Yükleme Kapasitesi	28
2.1.2.6.4.	Etkin Madde Salımı	28
2.1.2.6.5.	Stabilitesi	29
2.1.2.7.	Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Uygulama Alanları	29
2.1.2.7.1	Polimerik Misellerin Farmasötik Alanda Kullanımı	30
2.1.2.7.2.	Hedeflemede Polimerik Misellerin Kullanımı	31
2.1.2.7.3.	İmmünolojide Misellerin Kullanımı	34
2.1.2.7.4.	Gen Tedavisinde Polimerik Misellerin Kullanımı	34
2.2.	Pegilasyon	35
2.3.	Hücre Kültürü Çalışmaları	39
2.3.1.	Tanımı ve Tarihçesi	39
2.3.2.	Uygulama Alanları	39
2.3.3.	Hücre Kültürü Sistemlerinin Hayvan Deneylerine Üstünlükleri	40
2.3.4.	Hücre Kültürü Çalışmalarında Önemli Noktalar	40
2.3.5.	Hücre Kültürü Çalışmalarında Ortam Seçimi	41
2.3.6.	Sitotoksosite Değerlendirmesi ve Hücre Yaşayabilirliğinin Ölçülmesi	41
2.4.	Kanser	42
2.4.1.	Kanserin Mortalitesi	43
2.4.2.	Kanser Gelişimi	45
2.4.3.	Kanser Tedavisinde Karşılaşılan Sorunlar	46
2.4.4.	Kalın Barsak Kanseri (Kolorektal Kanser)	49
2.4.5.	Kanser İlaçlarının Sınıflandırılması	50
2.5.	5-Fluorourasil (5-FU)	51
2.5.1.	Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri	51
2.5.2.	Analiz Yöntemleri	51
2.5.3.	Etki Mekanizması ve Endikasyonları	51

2.5.4.	Farmakolojisi ve Farmakokinetiği	53
2.5.5.	Yan Etkileri ve Toksisitesi	53
2.5.6.	Stabilitesi	54
2.5.7.	Piyasa Preparatları	55
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	56
3.1.	Araçlar ve Gereçler	56
3.1.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	56
3.1.2.	Kullanılan Aletler	57
3.2.	Yöntemler ve Deneyler	58
3.2.1.	Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	58
3.2.1.1.	Ultraviyole (UV) Spektrumu	58
3.2.1.2.	Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu	58
3.2.1.3.	Erime Derecesi Tayini	58
3.2.1.4.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Termogramı	59
3.2.2.	Etkin Maddenin Spektrofotometrik Miktar Tayini	59
3.2.2.1.	Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması	59
3.2.2.2.	Analitik Yöntem Validasyonu	60
3.2.2.2.1.	Özgünlük	60
3.2.2.2.2.	Doğrusallık	60
3.2.2.2.3.	Doğruluk	61
3.2.2.2.4.	Kesinlik	61
3.2.2.2.5.	Stabilite	62
3.2.3.	Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	62
3.2.3.1.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	62
3.2.3.2.	DSC Termogramlarının İncelenmesi	63
3.2.4.	Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	63
3.2.4.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	63
3.2.4.2.	İlaç İçermeyen PLA/PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması	66
3.2.4.3.	Etkin Madde Yüklü PLA/PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması	66

3.2.5.	Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu	68
3.2.5.1.	Morfolojik Özellikler	68
3.2.5.2.	Partikül Büyüklüğü Tayini	68
3.2.5.3.	Zeta Potansiyel Tayini	68
3.2.5.4.	Nanopartiküllerin Üretim Verimi	69
3.2.5.5.	Nanopartiküllere Yüklenen 5-FU Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	69
3.2.5.6.	Nanopartiküllerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin Araştırılması	70
3.2.5.6.1.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	70
3.2.5.6.2.	DSC Analizi	70
3.2.5.7.	İn Vitro Salım Deneyleri	70
3.2.5.7.1.	Salım Ortamı ve Deneyin Yapılışı	70
3.2.5.7.2.	İn Vitro Salım Deneylerinin Validasyonu	71
3.2.5.8.	Caco-2 Hücreler ile Sitotoksosite Çalışmaları	71
4.	BULGULAR	73
4.1.	Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalara İlişkin Bulgular	73
4.1.1.	UV Spektrumu	73
4.1.2.	FT-IR Spektrumu	74
4.1.3.	Erime Derecesi Tayini	77
4.1.4.	DSC Termogramı	77
4.2.	Etkin Maddenin Spektrofotometrik Miktar Tayini	78
4.2.1.	Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması	78
4.2.2.	Analitik Yöntem Validasyonu	79
4.2.2.1.	Özgünlük	79
4.2.2.2.	Doğrusallık	79
4.2.2.3.	Doğruluk	79
4.2.2.4.	Kesinlik	80
4.2.2.5.	Stabilite	82
4.3.	Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	83

4.3.1.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	83
4.3.2.	DSC Termogramlarının İncelenmesi	89
4.4.	Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	92
4.4.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	92
4.4.2.	Emülsifikasyon ve Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması	95
4.5.	Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu	96
4.5.1.	Morfolojik Özellikler	96
4.5.2.	Partikül Büyüklüğü Tayini	99
4.5.3.	Zeta Potansiyel Tayini	101
4.5.4.	Nanopartiküllerin Üretim Verimi	102
4.5.5.	Nanopartiküllere Yüklenen 5-FU Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	103
4.5.6.	Nanopartiküllerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin Araştırılması	105
4.5.6.1.	FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	105
4.5.6.2.	DSC Termogramlarının İncelenmesi	109
4.5.7.	İn Vitro Salım Deneyleri	113
4.5.7.1.	Salım Ortamı ve Deneyin Yapılışı	113
4.5.7.2.	İn Vitro Salım Deneylerinin Validasyonu	116
4.5.8.	Caco-2 Hücreler ile Sitotoksikite Çalışmaları	117
5.	TARTIŞMA	121
5.1.	Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri ile İlgili Çalışmalar	121
5.2.	5-FU'in Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu	122
5.3.	Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar	123
5.4.	Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması	124
5.4.1.	Ön Formülasyon Çalışmaları	124
5.4.2.	Emülsifikasyon ve Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması	126

5.5.	Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu	127
5.5.1.	Morfolojik Özellikler	127
5.5.2.	Partikül Büyüklüğü Tayini	128
5.5.3.	Zeta Potansiyel Tayini	130
5.5.4.	Nanopartiküllerin Üretim Verimi	131
5.5.5.	Nanopartiküllere Yüklenen 5-FU Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi	133
5.5.6.	Nanopartiküllerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin Araştırılması	134
5.5.7.	İn Vitro Salım Deneyleri	134
5.5.8.	Caco-2 Hücreler ile Sitotoksite Çalışmaları	136
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	139
	KAYNAKLAR	141
	ÖZGEÇMİŞ	158

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-FU	5-Fluorourasil
AFM	Atomik kuvet mikroskobu (Atomic force microscopy)
ATP	Adenozin trifosfat
ATR	Hafifletilmiş toplam yansıtma (Attenuated total reflectance)
BK	Blok kopolimer
Caco-2	Kolon adenokarsinoma
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	Dimetilformamid
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetri (Differential scanning calorimetry)
ELISA	Enzim ilintili immün test (Enzyme linked immunosorbent assay)
EO	Etilen oksit (Etilen glikol)
EP	Avrupa Farmakopesi (European Pharmacopeia)
EPR	Artan geçirgenlik ve tutulma etkisi (Enhanced permeation and retention)
FBS	Fetal sığır serumu
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (Food and Drug Administration)
FITC	Florosein izotiyosiyanat
FTIR	Fourier dönüşümü kızıl ötesi (Fourier transform infrared)
HLB	Hidrofilik lipofilik denge
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High pressure liquid chromatography)
kV	Kilovolt
MDR	Çoklu ilaç direnci (Multi drug resistance)
M _n	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (Molecular number)

MPEG-b-PCL	Metoksi-polietilen glikol-blok-poli ϵ -kaprolakton
MPEG-DMA-DEA	Metoksi-polietilen glikol-poli(dimetilamino etilmetakrilat)- poli(dietilamino etilmetakrilat)
MTT	[3(4,5-dimetiltiyazol-2il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]
mV	Milivolt
M _w	Sayıca ortalama molekül ağırlığı (Molecular weight)
NaCl	Sodyum klorür
O ₂	Oksijen
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate buffered saline)
PEG	Polietilen glikol
PEG-PBA-PEG	Polietilen glikol-polibutilen adipat-polietilen glikol
PEG-PLGA-PEG	Polietilen glikol-poli(laktik-ko-glikolik) asit-polietilen glikol
PEG-PPG-PEG	Polietilen glikol-polipropilen glikol-polietilen glikol
PEO	Polietilen oksit
PEO-PAGE	Polietilen oksit-poli(alil glisidil eter)
PGA	Poliglikolik asit
P-gp	P-glikoprotein
PLA	Polilaktik asit
PLA-PEG-PLA	Polilaktik asit-polietilen oksit-polilaktik asit
PLA-PEO-PGA	Polilaktik asit-polietilen oksit-poliglikolik asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik) asit
PLGG-PEG-PLGG	Poli(laktik-ko-glikolik)-alt-l-glutamik asit-polietilen glikol- poli(laktik-ko-glikolik)-alt-l-glutamik asit
PO	Propilen oksit (Propilen glikol)
PPG	Polipropilen glikol
PVA	Polivinilalkol
PVC	Polivinil klorür
RES	Retiküloendotelyal sistem
RNA	Ribonükleik asit
RPMI	Rapid Prototyping&Manufacturing Institute
SDS	Sodyumdodesil sülfat

SEM	Taramalı elektron mikroskopisi (Scanning electron microscopy)
SS	Standart sapma
TEM	Transmisyon elektron mikroskopisi (Transmission electron microscopy)
T_g	Camsı geçiş sıcaklığı
T_m	Erime sıcaklığı
UICC	Dünya Kanser Örgütü (International Union Against Cancer)
USP	Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopeia)
UV	Mor ötesi (Ultraviolet)
VK	Varyasyon katsayısı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
X	Ortalama
$\lambda_{\max}$	Maksimum dalga boyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	“Nano” boyutun diğer boyutlar ile karşılaştırılması	7
Şekil 2.2.	Nanopartiküler sistemler: (a) nanoküre, (b) nanokristal, (c) nanokapsül, (d) nanozom, (e) polimerik misel, (f) nanosünger	8
Şekil 2.3.	Misel yapısı	11
Şekil 2.4.	Amfifilik kopolimerlerden misel oluşumunun mekanizması	12
Şekil 2.5.	PGA, PLA ve PLGA’nın kimyasal yapısı	14
Şekil 2.6.	Kopolimer tiplerinin şematik görünümü	18
Şekil 2.7.	Farklı amfifilik blok kopolimer yapılarının şematik gösterimi: (a) A-B diblok, (b) A-B-A triblok, (c) B-A-B triblok, (d) ardışık multiblok, (e) dallanmış blok, (f) yıldız şekilli blok	19
Şekil 2.8.	EO hidrofilik bloğu ve PO hidrofobik bloğu içeren Pluronic® kopolimerlerin şematik gösterimi	21
Şekil 2.9.	Etkin maddenin hidrofobik çekirdekten salımının şematik gösterimi	22
Şekil 2.10.	Farklı morfolojik yapılar gösteren Pluronic® miseller: (a) küresel yapı, (b) tabakalı yapı, (c) silindir yapı	23
Şekil 2.11.	Pluronic® kopolimerlerin MDR etkisi gösteren kanser hücreleri üzerine etkisi	24
Şekil 2.12.	Polimerik misellerin tümörlerde birikmesi	32
Şekil 2.13.	İlaç/ilaç taşıyıcı sistemlerin fiziksel hedeflendirilmesi	33
Şekil 2.14.	Peglenmiş nanopartikülün şematik gösterimi	36
Şekil 2.15.	PEG kaplı nanopartiküler sistemlerin kana geçişi	37
Şekil 2.16.	Kanser oluşumunun ve metastazının şematik olarak gösterilmesi	43
Şekil 2.17.	Türkiye’de ölüm sebepleri	44
Şekil 2.18.	5-Fluorourasil’in molekül formülü	51
Şekil 2.19.	Hücre büyüme siklusu	52
Şekil. 3.1.	Emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının üretim şeması	67

Şekil 4.1.	5-FU'in distile su içerisindeki UV spektrumu	73
Şekil 4.2.	5-FU'in PBS (pH 7.4) içerisindeki UV spektrumu	74
Şekil 4.3.	5-FU'in FT-IR spektrumu	76
Şekil 4.4.	5-FU'in DSC termogramı	77
Şekil 4.5.	5-FU'in distile sudaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6)	78
Şekil 4.6.	5-FU'in PBS (pH 7.4)'teki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6)	78
Şekil 4.7.	PLA ₁ 'in FT-IR spektrumu	85
Şekil 4.8.	PLA ₂ 'nin FT-IR spektrumu	86
Şekil 4.9.	PLGA'nın FT-IR spektrumu	87
Şekil 4.10.	PEG-PPG-PEG'in FT-IR spektrumu	88
Şekil 4.11.	PLA ₁ 'in DSC termogramı	90
Şekil 4.12.	PLA ₂ 'nin DSC termogramı	90
Şekil 4.13.	PLGA'nın DSC termogramı	91
Şekil 4.14.	PEG-PPG-PEG'in DSC termogramı	91
Şekil 4.15	Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin SEM fotoğrafları (A: PLA ₁ +5 _{BK} , B: PLA ₁ +5 _{BK} +5-FU, C: PLA ₁ +10 _{BK} , D: PLA ₁ +10 _{BK} +5-FU, E: PLGA+5 _{BK} , F: PLGA+5 _{BK} +5-FU, G: PLGA+10 _{BK} , H: PLGA+10 _{BK} +5-FU, I: PLA ₂ +5 _{BK} , J: PLA ₂ +5 _{BK} +5-FU, K: PLA ₂ +10 _{BK} , L: PLA ₂ +10 _{BK} +5-FU nanopartikülleri)	98
Şekil 4.16.	PLA ₁ +10 _{BK} +5-FU formülasyonuna ilişkin FT-IR spektrumu	106
Şekil 4.17.	PLGA+10 _{BK} +5-FU formülasyonuna ilişkin FT-IR spektrumu	107
Şekil 4.18.	PLA ₂ +10 _{BK} +5-FU formülasyonuna ilişkin FT-IR spektrumu	108
Şekil 4.19.	Nanopartikül formülasyonlarına ilişkin DSC termogramları (A: PLA ₁ +5 _{BK} ve PLA ₁ +5 _{BK} +5-FU, B: PLA ₁ +10 _{BK} ve PLA ₁ +10 _{BK} +5-FU, C: PLGA+5 _{BK} ve PLGA+5 _{BK} +5-FU, D: PLGA+10 _{BK} ve PLGA+10 _{BK} +5-FU, E: PLA ₂ +5 _{BK} ve PLA ₂ +5 _{BK} +5-FU, F: PLA ₂ +10 _{BK} ve PLA ₂ +10 _{BK} +5-FU nanopartikülleri)	112
Şekil 4.20.	Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarından 5-FU salımı (n=6)	116

- Şekil 4.21. PLGA+5_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 119
24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksosite
sonuçları (n=3)
- Şekil 4.22. PLGA+10_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri 119
üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen
sitotoksosite sonuçları (n=3)
- Şekil 4.23. PLA₂+5_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 120
24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksosite
sonuçları (n=3)
- Şekil 4.24. PLA₂+10_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri 120
üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen
sitotoksosite sonuçları (n=3)

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo.2.1.	Dispers sistemlerin ortalama partikül boyutlarına göre sınıflandırılması	9
Tablo 2.2.	İlaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan blok kopolimerler	17
Tablo 2.3.	Çalışmada kullanılan Pluronic® kopolimerin fizikokimyasal özellikleri	22
Tablo 2.4.	Kanser ilaçlarının sınıflandırılması	50
Tablo 2.5.	5-FU içeren ticari ürünler	55
Tablo 3.1.	Ön formülasyon çalışmalarında kullanılan polimerler ve kullanım oranları	64
Tablo 4.1.	5-FU'in distile sudaki doğruluk analiz sonuçları (n=6)	80
Tablo 4.2.	5-FU'in PBS (pH 7.4)'teki doğruluk analiz sonuçları (n=6)	80
Tablo 4.3.	5-FU için distile suda analitik yöntemin tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6)	81
Tablo 4.4.	5-FU için PBS (pH 7.4)'teki analitik yöntemin tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6)	81
Tablo 4.5.	5-FU için distile suda analitik yöntemin tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6)	82
Tablo 4.6.	5-FU için PBS (pH 7.4)'teki analitik yöntemin tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6)	82
Tablo 4.7.	5-FU'in in vitro salım ortamında ve koşullarında stabilite sonuçları (n=6)	83
Tablo 4.8.	Tez çalışmaları kapsamında hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının ön formülasyon çalışmalarına ilişkin veriler	94
Tablo 4.9.	Tez çalışmaları kapsamında hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının kodları ve bileşenleri	95
Tablo 4.10.	5-FU içeren ve içermeyen nanopartikül formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları	100

Tablo 4.11.	5-FU içeren ve içermeyen nanopartikül formülasyonlarına ilişkin zeta potansiyel değerleri	101
Tablo 4.12.	5-FU içeren ve içermeyen nanopartikül formülasyonlarına ilişkin üretim verimi sonuçları	103
Tablo 4.13.	5-FU içeren nanopartikül formülasyonlarına ilişkin yükleme etkinliği sonuçları	104
Tablo 4.14.	Nanopartikül formülasyonlarına ilişkin salım kinetiklerinin değerlendirilmesi	115
Tablo 4.15.	Nanopartikül formülasyonlarından in vitro salım deneylerinin validasyonuna ilişkin bulgular	117

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, önemi giderek artan bir sağlık sorunudur ve dünya genelinde ölümlerin nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Kanser tedavisine yönelik başlıca üç yaklaşım; cerrahi girişim, kemoterapi ve radyoterapi olarak sıralanabilir. Tümörün büyümesini engelleyecek ve hatta tümüyü ortadan kaldırılmasını sağlayacak sitotoksik etki sağlamak amacıyla gerçekleştirilen kanser kemoterapisinin başarı ile uygulanmasını engelleyen bir takım sorunlar vardır. Bunların başlıcalarından biri de kemoterapötiklerin toksisitesidir. Kemoterapötik ilaçların etkilerini sadece tümör hücrelerinde gösterip sağlıklı hücrelere daha az etki etmeleri hedeflenmektedir. Bu doğrultuda, antikanser ilaçlar için taşıyıcı sistemler geliştirilmesi amacıyla bilimsel çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir.

Son yıllarda antikanser ilaçların formülasyonu için dikkat çeken yaklaşımlardan bir tanesi nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında toksik yüzey aktif maddeler yerine kendiliğinden birleşebilen amfifilik blok kopolimerler kullanılarak nanopartiküller geliştirmektir. Kanser hücreleri, P-glikoprotein (P-gp) gibi hücre dışına madde pompalama görevine sahip *efflux* proteinlerini aşırı salgılar ve ilaçları hücre dışına atarlar. Yukarıda sözü edilen polimerik sistemlerin, P-gp inhibisyonuna sebep olarak ilacın hücreden dışarı atılmasına engel olduğu ve ayrıca ilacın stabilitesinin artırılmasına da katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Amfifilik blok kopolimerlerden olan Pluronic®'ler (PEG-PPG-PEG) ile hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler, eczacılık teknolojisinde potansiyel sistemler olarak dikkat çekmekte ve son yıllarda üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Amfifilik kopolimerlerde PEG'in yaygın olarak kullanılma nedenlerinden birisi de, suda çözünürlüğünün yüksek olması, nanopartiküler sistemler için sterik bir koruyucu olması ve çeşitli hidrofobik bloklarla kolayca konjuge edilebilmesidir.

Kolon kanseri başta olmak üzere over, mesane, uterus serviksi, endometriyum, prostat, pankreas ve karaciğer kanserlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanıldığı bilinen 5-FU (5-Fluorourasil) önemli bir antikanser madde olup, tez çalışmamızda model ilaç olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, öncelikle kolon kanserinde kullanılmak üzere, **5-FU yüklü, (1:5 ve 1:10 oranlarında) PLA/PEG-PPG-PEG ve (1:5 ve 1:10 oranlarında) PLGA/PEG-PPG-PEG** nanopartiküllerinin geliştirilmesi üzerine çalışmalar gerçekleştirilmesidir. Tez çalışmalarımız kapsamında, geliştirilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, yükleme etkinliği, yüzey morfolojisi, DSC analizleri, FT-IR spektrumları ve in vitro salım özelliklerinin tayini gibi yöntemler kullanılarak karakterize edilmelerini takiben, hücre kültürü çalışmaları ile hazırlanan nanopartiküllerin antikanser etkinliği değerlendirilmiştir. İn vitro deneysel çalışmalardan ve hücre kültürü çalışmaları sonuçlarından elde edilen verilere ilişkin yapılan istatistiksel değerlendirmeler göz önüne alınarak PLGA ve PLA nanopartikülleri içinden en etkin ve güvenli formülasyonun tespit edilmesine çalışılmıştır.

Tez çalışmalarımızda, toksik olmayan, FDA onaylı, biyouyumlu ve biyoparçalanabilir polimerlerden PLA ve PLGA ile PEG-PPG-PEG amfifilik triblok kopolimeri kullanılarak misel yapıda nanopartiküler taşıyıcı sistemler hazırlanmıştır. Miselin çekirdeğini PLA/PLGA ve blok kopolimerin hidrofobik kısmı (PPG) oluştururken PEG zincirleri de sulu ortamda kendiliğinden nanopartikülün yüzeyini kaplayarak sterik engel oluşturmuşlardır. Çalışmalarımız kapsamında hazırlanan yüzeyi modifiye edilmiş nanopartiküler taşıyıcı sistemlere 5-FU bileşiği hapsedilmiştir. PEG ile yüzey modifikasyonunun yapılmasının amacı da, 5-FU'nin kan dolaşımında kalış süresini artırmak, RES tarafından tanınmasını engellemek ve opsonizasyon reaksiyonlarını azaltmaktır.

Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı, amfifilik blok kopolimerlerden olan PEG-PPG-PEG kullanılarak, 5-FU yüklü PLA/PEG-PPG-PEG ve PLGA/PEG-PPG-PEG nanopartikülleri hazırlanması sonucunda, antikanser etkili 5-FU bileşiğinin kan dolaşımında daha uzun süre kalabildiği, in vivo stabilitenin de artırılabilirdiği başarılı sistemlere ulaşmanın mümkün olabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler

İlaç etkin maddesinin bir kimyasal madde, bir ilaç uygulama aygıtı ya da ilaç uygulama süreci ile dokulara salımını ve salım hızını kontrol eden sistemlere “*ilaç taşıyıcı sistemler*” denir. Yeni geliştirilen moleküllerin güvenlik ve etkinliğinin artırılması, aynı zamanda yan etkilerinin azaltılıp, biyoyararlanım ve terapötik indeksinin artırılması amacıyla son zamanlarda ilaç taşıyıcı sistemlere olan ilgi ve bu konudaki araştırma ve çalışmalarda belirgin bir artış dikkat çekmektedir. Yakın zamanda pek çok ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiş olup bunların başında etkin maddenin salım özelliklerini de kontrol edebilen bazı mikro ve nanopartiküler sistemler yer almaktadır (1) .

İlaç taşıyıcı sistemler üzerine yapılan çalışmalar geçmiş yıllara dayanmakla beraber son yıllarda büyük ilerlemeler katedilmiştir. İlaç taşıyıcı yeni sistemler tasarlanmış ve giderek gelişmiştir. Bu sistemlerin tasarımı için bir başlangıç tarihi vermek pek mümkün değildir. Mezopotamyalılar, Mısırlılar, Çinliler, Aztekler, ve Mayalar bu alanda çalıştığı bilinen ilk toplumlardır. Bu kadar eskilere dayanan farmasötik biliminde ilk devrim 1970’lerde sanayi devrimi ile gerçekleşmiş olup, üretimde kullanılan makinelerin gelişmesi ile büyük çapta üretim imkanı doğmuş, kapsüller ve hatta mikropartiküllerin üretimine başlanmıştır. 1970’lerden sonra ise hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler hızla geliştirilmiştir. Günümüzde ise bu sistemler daha da geniş bir alana yayılmış olarak karşımıza çıkmaktadır (2) .

Partiküler ilaç taşıyıcı sistemler başlığı altında incelenen dozaj şekilleri başlıca; katı lipid nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, seramik nanopartiküller, hidrojel nanopartiküller, nanoküreler, nanokapsüller, nanokristaller, nanosüspansiyonlar, nanotüpler, nanoiplikler, polimerik miseller, lipozomlar, niyozomlar, dendrimerler, mikroküreler, mikrokapsüller ve mikroemülsiyonlar olarak sıralanabilir (3-5) :

İlaç taşıyıcı partiküler sistemlerin önemi, sahip olduğu üstünlüklerinden dolayı dikkate değer olup, genel olarak şöyle sıralanabilir (3) :

- Konvansiyonel dozaj formları ile ilacın ulaşamadığı organlara, ilaç hedeflendirilmesini sağlar,
- Boyutlarının konvansiyonel formlara göre küçük olması sayesinde biyolojik membranlardan kolaylıkla geçmesini sağlar, biyomoleküllere daha kolay bağlanma gerçekleşir ve çözünürlüğü düşük ilaçların formülasyonuna olanak tanır,
- Özellikle 100-1000 nm arasındaki yapılar tümör dokusuna kolaylıkla penetre olur,
- Yüzey özellikleri değiştirilerek immun sistem tarafından tanınmaları önlenir ve etkili bir ilaç hedeflendirme sağlanır.

Bu sistemlerin temel sakıncası ise ambalajlama, depolama ve uygulama aşamasında bir takım sıkıntılar doğurabilmesidir ki, bu da agregasyona olan eğilimlerinden kaynaklanmaktadır (5) . İlaç taşıyıcı partiküler sistemlerin uygulama alanları partiküler sistemin tipine göre çeşitlenmekte olup tez çalışmamız kapsamında hazırlanan polimerik misellerin uygulama alanlarına ilgili kısımda detaylı olarak değinilmiştir.

Burada, tez çalışmamız kapsamında geliştirilen, miselik yapıda ve nano boyutta olan, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlere ilişkin bilgi verilecektir.

2.1.2. Nanopartiküler Sistemler

2.1.2.1. Tanımı ve Özellikleri

Nanopartiküller, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan, 10-1000 nm boyutlarında partiküler sistemlerdir (6-7) . Nanopartiküller; ilk olarak 1970'lerin ortalarında Birrenbach ve Speiser tarafından geliştirilmiş ve sonradan, insanlar üzerinde hayati fonksiyonları tehdit edici herhangi bir sakıncası olmadığı

kanıtlanan polimerlerle hazırlanarak ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaya başlanmıştır (8) . Etkin madde, nanopartikül içerisinde enkapsüle edilmiş ve/veya nanopartikül yüzeyine adsorbe ettirilmiş şekilde bulunabilir (6-7) .

2.1.2.2. Nanopartiküler Sistemlerin Üstünlükleri ve Önemleri

İlaç taşıyıcı sistem olarak nanopartiküllerin diğer kolloidal taşıyıcı sistemlerden üstünlükleri ve önemleri şöyle sıralanabilir:

- Nanopartiküllerin yüzey özellikleri çeşitli ajanlarla modifiye edilerek retiküloendotelyal sistem (mononükleer fagositik sistem) (RES) makrofajları tarafından tanınmaları engellenebilir (7,9) .
- Saklama ve uygulama sırasında diğer ilaç taşıyıcı sistemlere kıyasla stabilite problemi ile az karşılaşılır ve etkin maddenin raf ömrü uzar.
- Özellikle mikron boyutun altındaki taşıyıcı sistemler, etkin maddenin salım profilinde değişiklikler yapmaya olanak sağlar.
- Kan düzeyinde meydana gelen ani yükselmeleri önleyerek etkin maddenin yan etkilerinin azalmasını ve etkinliğinin artmasını sağlar.
- Etkin madde yükleme etkinliği artar (10) .
- Nanopartiküller, boyutları sayesinde küçük kapillerlere kolayca penetre olur ve hücreler tarafından tutulur. Bu sayede, etkin maddenin hedef bölgede salımı sağlanmış olur (11) .
- Etkin maddenin hedef bölgede salımını sağladıkları için, diğer organ ve dokular üzerindeki sistemik toksisitesi azalır (12) .
- Genel olarak kolay uygulanabilen yöntemlerle üretilirler (13) .

Üstünlüklerinin yanısıra, nanopartiküllerin bazı sakıncaları da mevcuttur. Partikül boyutlarının oldukça küçük ve yüzey alanlarının geniş olması sebebiyle, partiküller arasında agregasyon oluşabilmekte, bu da nanopartiküllerin katı veya sıvı formları halinde saklanması zorlaştırmaktadır. Sahip oldukları küçük partikül büyüklüğü ve geniş yüzey alanı sebebiyle, etkin madde yüklemesinde de zorluklar yaşanmakta ve yüklenen etkin maddenin salımında “burst effect” yani “patlama etkisi” olarak bilinen ani salım özelliği gözlenebilmektedir. Bu problemlerin üstesinden gelinmesini takiben pek çok nanopartikül formülasyonunun ruhsatlandırılması ve klinik kullanıma girmesi beklenmektedir (14) .

Yukarıda nanopartikül formülasyonlarının üstünlük ve sakıncaları sıralanmış olup; hedef dokuya etkin maddeyi yüksek verimde taşıyabilecek özellikte başarılı bir nanopartikül formülasyonundan temel olarak beklentiler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Biyolojik olarak vücutta parçalanabilmeli, parçalanma ürünleri toksik olmamalı,
- Etkin maddeyi hedef bölgeye taşıyabilmeli ve etkin maddenin salım hızı kontrol edilebilmeli,
- Yeterli derecede etkin madde yükleme kapasitesine sahip olmalı,
- Genellikle parenteral yolla uygulandıkları için sterilitesi sağlanmış olmalı ve vücut içerisinde herhangi bir emboli riski olmamalıdır (10,15) .

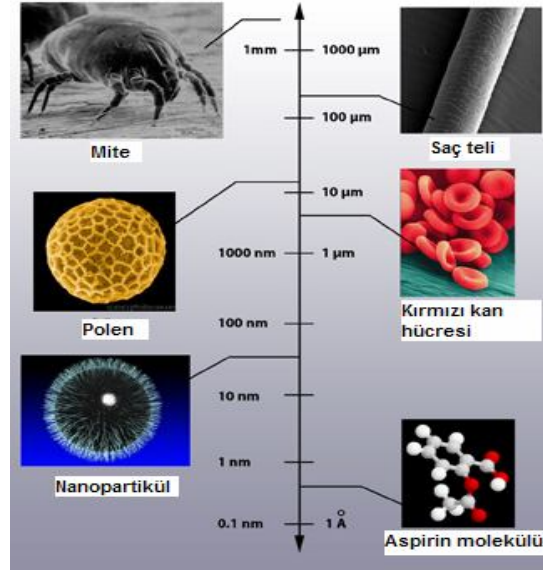
Nanopartiküler sistemlerin uygulama alanları Bölüm 2.1.2.7’de detaylı olarak anlatılacaktır.

“Nanopartikül” geniş kapsamlı bir kavram olup “nano” boyutta olan çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler nanopartikül olarak değerlendirilmektedir (16) .

Mikropartiküller ve nanopartiküller arasındaki boyut farkı, bu sistemlerin formüle edilmeleri ve performansları açısından önemlidir. Partiküler ilaç taşıyıcı sistemler pek çok etkin madde için kullanılmaktadır. Ayrıca klinikte de geniş bir uygulama alanına sahip olup, çeşitli hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadırlar.

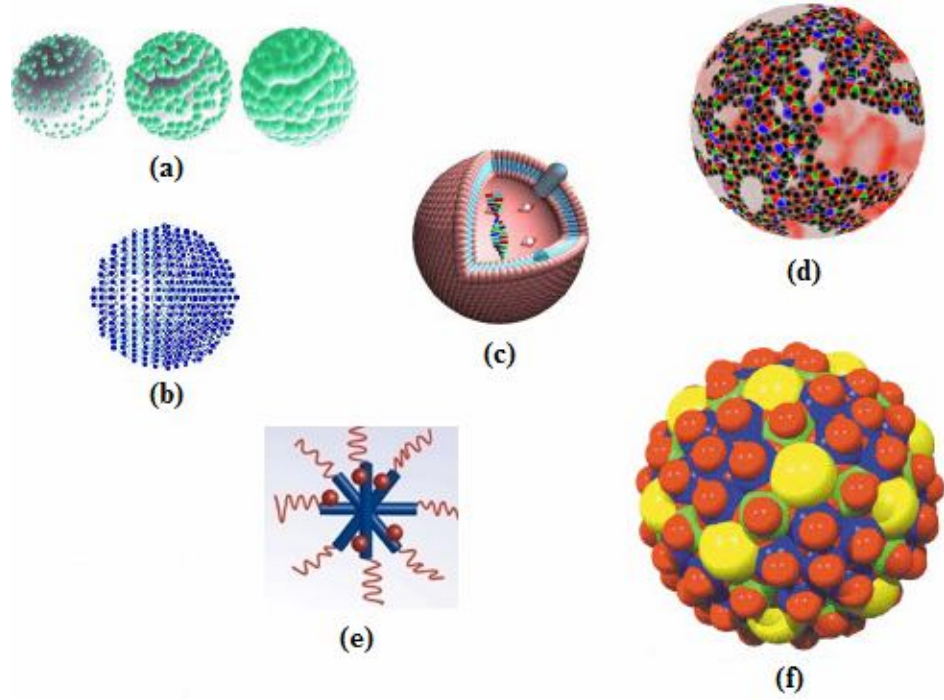
Bu sistemlerin yaygınlığı, süspansiyon ya da kuru toz halde uygulanabilirliği ve dolayısıyla uygulama kolaylığı ile kolay üretilebilmelerine bağlanmaktadır. Partikül büyüklüğü, elde edilen son ürün ve son ürünün potansiyel uygulamaları açısından büyük öneme sahiptirler. Sonuç olarak partiküler ilaç taşıyıcı sistemler, boyutlarına bağlı olarak “mikro” ve “nano” olmak üzere iki temel sınıfta incelenebilmektedir (17) .

“Nano” boyutun daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla nano boyuttaki bir partikülün farklı boyutlardaki yapılarla karşılaştırması Şekil 2.1’de görülmektedir.



Şekil 2.1. “Nano” boyutun diğer boyutlar ile karşılaştırılması (18)

Tez çalışmamızda hazırlanan, nano boyuttaki ve polimerik misel yapısındaki ilaç taşıyıcı sistemler de dahil olmak üzere, nanoküre, nanokapsül, nanokristal, nanozom ve nanosünger gibi pek çok nano yapı, nanopartiküler sistemler kapsamında değerlendirilmektedir (Şekil 2.2). Aşağıda, ayrıntılı olarak polimerik misellerin özelliklerine değinilecektir.



Şekil 2.2. Nanopartiküler sistemler: (a) nanoküre, (b) nanokristal, (c) nanokapsül, (d) nanozom, (e) polimerik misel, (f) nanosünger(19)

2.1.2.3. Polimerik Miseller

Bir dış (sürekli) faz/taşıyıcı ve bu fazda disperse edilen/dağıtılan bir iç faz olmak üzere iki fazdan oluşan, heterojen sistemlere dispers sistemler denir. Dispers sistemler başlığı altında incelenen çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler mevcut olup, sistemi oluşturan iç ve dış fazlar katı, sıvı veya gaz olabilir. Dispers sistemler sadece farmasötik alanda değil, kozmetik ve gıda sektöründe de sıklıkla kullanılmaktadır (20) .

Bu sistemler, ortalama partikül büyüklüklerine göre moleküler dispersiyonlar, kolloidal dispersiyonlar ve kaba dispersiyonlar olmak üzere üçe ayrılır (Tablo 2.1). Kolloidal dispersiyonlar da kendi içinde dispers fazı oluşturan partiküllerin, dispersiyon ortamı molekülleriyle etkileşimine bağlı olarak liyofilik, liyofobik ve amfifilik kolloidler olmak üzere üç sınıfta incelenebilir (21) .

Tablo.2.1. Dispers sistemlerin ortalama partikül boyutlarına göre sınıflandırılması (20) .

Kategori	Partikül boyutu	Özellikleri	Örnek
Moleküler Dispersiyonlar	< 1.0 nm	Elektron mikroskobu ile görülemez, yarı geçirgen zarlardan geçebilir, geçiş mekanizması genellikle hızlı difüzyondur.	Oksijen molekülü, su içerisinde disperse edilmiş potasyum ve klorür iyonları
Kolloidal Dispersiyonlar	1.0 nm- 1.0 µm	Elektron mikroskobu ile görülür, optik mikroskop ile görülmez, filtre kağıdından geçebilir, geçiş mekanizması genellikle hızlı difüzyondur. Yarı geçirgen zarlardan geçemez.	Kolloidal gümüş çözeltisi, sürfaktan miselleri
Kaba Dispersiyonlar	>1.0 µm	Optik mikroskop ile görülür, filtre kağıdından ve yarı geçirgen zarlardan geçemez.	Emülsiyonlar, süspansiyonlar

Kolloidal dispersiyonların içinde miseller, amfifilik kolloidler başlığı altında incelenmektedir. Amfifilik kolloidler, konsantrasyon ve sıcaklık gibi belirli koşulların uygun olması halinde amfifilik maddeler tarafından kendiliğinden oluşan sistemlerdir. Yüzey aktif madde ya da yüzey etkin madde olarak da adlandırılan amfifilik maddeler, aynı molekül veya iyon içinde yer alan ve zıt çözeltilere ilgi gösteren iki ayrı kısımdan oluşur (22) .

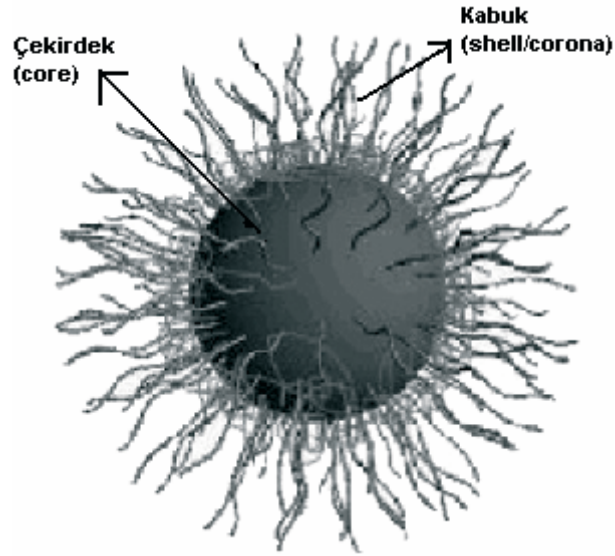
Düşük konsantrasyonlarda bu amfifilik maddeler, sulu ortamda bulunduklarında ayrı ayrı ve kolloidal boyutun altında bulunurlar. Artan konsantrasyonla beraber agregasyon başlar ve 50 veya üzeri sayıda monomer içeren agregatlar misel olarak adlandırılır (22) .

Misellerin eczacılıkla ilgili önemli bir özelliği az çözünen maddelerin çözünürlüğünü artırabilme yetenekleridir. Noniyonik yüzey aktif maddelerle hazırlanan miseller, en sık kullanılan farmasötik miseller olup, yapılarında anizotropik su dağılımına sahiptir (Anizotropik su dağılımı, su konsantrasyonun yüzeyden miselin çekirdeğine doğru azalmasını ifade etmektedir). Bu anizotropiden dolayı, sözü edilen miseller oldukça hidrate yüzeyden hidrofobik çekirdeğe doğru değişen bir polarite gösterir. Sulu sistemlerde nonpolar moleküller misel çekirdeği içinde çözünür, polar moleküller misel yüzeyine adsorplanır ve orta derecede polariteye sahip maddelerse yüzey aktif madde molekülleri ile birlikte ara yüzeyde dağılır. İlaçların yüzey aktif maddelerle hazırlanan sistemlerdeki çözünürlüğü çeşitli faktörlere dayanır; yüzey aktif madde ve ilacın kimyasal yapısı, ilacın polaritesi, pH vb. Bir yüzey aktif maddenin hidrofobik kısmının uzunluğundaki artış misel çekirdeği içindeki hidrofobik ilacın çözünürlüğünü artırır (23) .

Molekül ağırlığı düşük olan farmasötik yüzey aktif maddeler misel oluşturma yeteneğinde olup, düşük toksisiteye sahiptirler ve aynı zamanda çözünürlüğü düşük olan maddeleri çözünüreleştirici özellik gösterirler. Yüzey aktif madde miselleri, kontrollü ilaç taşınmasındaki araştırmalarda ve farmasötik teknolojiye ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı oligoetilenglikol bazlı yüzey aktif maddeler (Örnek olarak parenteral ve oral ilaç taşınmasında kullanılan polisorbata 80 verilebilir.) suda az çözünen ilaçlar için çözündürücü olarak farmasötik teknolojiye geniş bir şekilde kullanılmaktadır (24-27) . Oligoetilenglikol bazlı yüzey aktif maddelerin üstünlüğü düşük toksisiteleridir (28) . Ancak, yeterince dayanıklı miseller oluşturmamalarından dolayı ilaç taşıyıcı partiküler sistemler için daha dayanıklı yapıda misel oluşturabilecek yüzey aktif madde molekülleri araştırılmış ve bunun sonucunda da sulu ortamda polimerik miseller oluşturan amfifilik blok kopolimerler (di-blok, tri-blok ve graft kopolimerler gibi) dikkat çekmiştir. Hidrofilik ve hidrofobik monomer ünitelerinden oluşan amfifilik blok kopolimerler diğer farmasötik yüzey aktif maddeler ile kıyaslandığında sulu çözeltilerde daha dayanıklı ve daha yüksek çözündürme kapasitesine sahip küresel yapıda miseller oluştururlar (22) .

Polimerik miseller pek çok üstünlüğe sahiptir. Öncelikle ilaçları çözünürleştirme kapasitesine sahip oldukları için bu ilaçların biyoyararlanımları artar ve biyolojik ortamda inaktivasyonunun önüne geçilmiş olur. Ayrıca miseller, kan dolaşımında uzun süre kalabilir, vücudun belirli bölgelerinde birikebilir ve bu hedef bölgelere ilaç taşınmasını iyileştirebilir. Son olarak da dış yüzeylerine bir ligand bağlanarak ilaç hedeflendirmesinde kullanılabilir (29) .

Morfolojik olarak miseller, hidrofobik blokları içeren bir çekirdek ve hidrofilik bloklarla dayanıklı hale getirilmiş bir kabuktan (korona, taç) oluşan küresel partiküllerdir (Şekil 2.3).



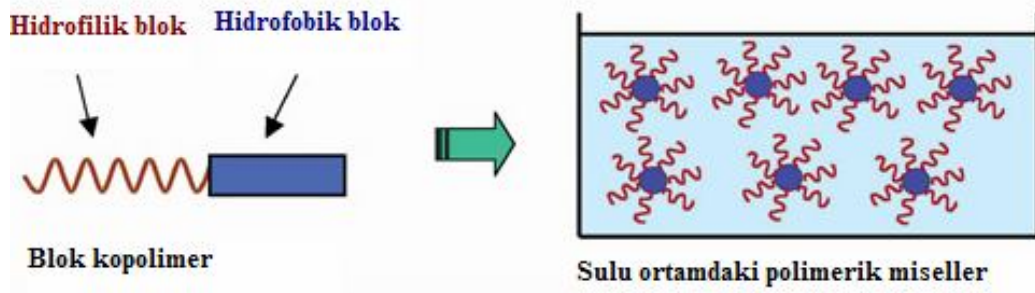
Şekil 2.3. Misel yapısı (30)

Yapılan araştırmalar, blok kopolimerlerden oluşan agregatların küre, çubuk, vezikül, lamel ya da altıgen gibi çok sayıda farklı misel benzeri şekiller halinde bulunabileceğini göstermektedir (31) . Kopolimerler sulu ortamda blok kopolimerin bileşimine, ortamdaki kopolimer konsantrasyonuna, kabuğu oluşturan hidrofilik zincirler arasındaki etkileşimlere, ortama asit, baz veya tuz eklenmesine, kullanılan organik çözücüye, çözücünün polaritesine ve blokların çözücüdeki bağlı çözünürlüklerine bağlı olarak, kontrollü koşullar altında tekrarlanabilir, farklı morfolojik yapılar oluşturabilmektedir (23) .

Son yıllarda miseller ilaç formülasyonları, çekirdek ve kabuktan oluşan yapıları sayesinde ilaç hedefleme alanında büyük ilgi çekerek, etkin ilaç taşıyıcı sistemler olmuşlardır (32) . Bu sistemlerde, çekirdek kısmı etkin maddelerin çözünmesine olanak sağlayan bir depo gibi görev görürken, kabuk kısmı tüm sisteme hidrofilik özellik sağlamaktadır. Molekül ağırlıklarına göre miseller, düşük molekül ağırlıklı yüzey aktif madde miselleri ve polimerik miseller olmak üzere iki gruba ayrılır (22) . Polimerik miseller hidrofilik ve hidrofobik monomerlerden oluşan kopolimerlerden meydana gelir. Bazı özel durumlarda başlangıç kopolimerleri iki hidrofilik bloktan oluşabilir ve bu bloklardan bir tanesi hidrofobik bir maddenin bağlanmasıyla modifiye olur ve amfifilik misel oluşturunca kopolimer meydana gelir (32) .

2.1.2.3.1. Polimerlerden Misel Oluşumu

Miseller, moleküllerin birleşmesine neden olan çekim kuvveti ve misellerin ayrı bir makroskobik faz halinde sınırsız büyümelerini önleyen itici kuvvet olmak üzere başlıca iki kuvvetin sonucunda oluşmaktadır. Amfifilik blok kopolimerler, kendini oluşturan hidrofilik veya hidrofobik bloklardan herhangi biri için seçici olan bir çözücü içine konulduğunda kendiliğinden birleşmektedir (21) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Amfifilik kopolimerlerden misel oluşumunun mekanizması (33)

2.1.2.3.2. Misel Oluşturan Polimerlerin Yapısı ve Özellikleri

Polimerik miseller üzerindeki farmasötik araştırmalar öncelikle di-blok kopolimer yapısı üzerinde yoğunlaşmıştır (34) . Araştırmacılar (35-42) yaptıkları çalışmalarda, çoğunlukla amaçlarına uygun hidrofilik-hidrofobik blok kombinasyonuna sahip miseller oluşturmayı başardıkları için bu anlamda çeşitlilik söz konusudur. Pek çok çalışmada polietilenoksit (PEO veya PEG) hidrofilik bloğu oluştururken, hidrofobik blok olarak çok sayıda farklı materyal kullanılmaktadır. Aşağıda çekirdek oluşturucu blok olarak kullanılan biyolojik olarak geçimli hidrofobik polimerlerden bazıları verilmiştir (43) :

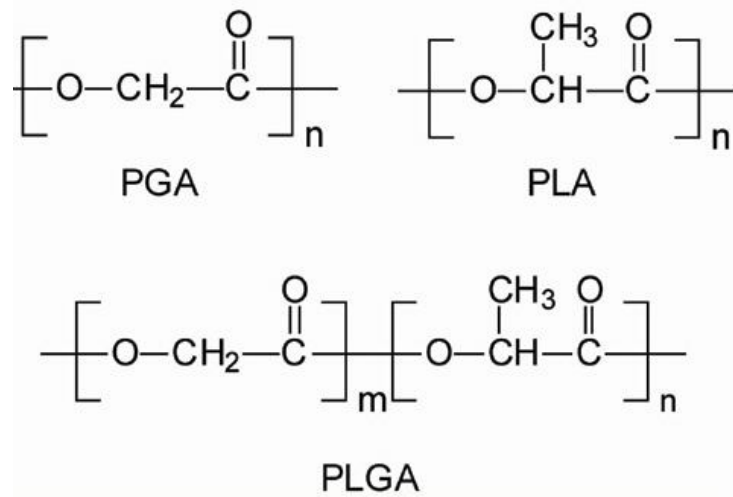
- Polikaprolakton (35)
- Poli(gama-benzil-L-glutamat) (36)
- Poli(beta-benzil-L-aspartat) (37-38)
- Poli(aspartik asit) (39)
- Poliakrilik asit (40)
- Poli(oksi propilen) (41)
- Oligo(metil metakrilat) (44)
- Polistiren (42)
- Poli(D,L-laktid) (41)

2.1.2.3.3. Çekirdek Oluşturucu Blok Olarak Kullanılan PLGA ve PLA'nın Yapısı ve Özellikleri

Sentetik polimerlerden poliester türevleri olan poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA) ve poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde en yaygın kullanılan polimerlerdir (45-49) . Bu polimerlerin biyoyumumluluğu, biyoparçalanabilirliği ve doku reaksiyon kinetiği pek çok araştırmacı tarafından incelenmiştir (50-53) . FDA onaylı olması nedeniyle de üzerinde sıklıkla araştırmalar yapılan bir polimer olan PLGA'nın biyoyumumluluğu ve biyoparçalanabilirliği yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır (53-54) .

Bu grup biyopolimerler, son yıllarda biyoyoumlu ve biyoparçalanır özellikleri nedeniyle tıpta ve farmasötik alanda sıklıkla tercih edilmektedir (52,54-57) . Çok sayıda ilaç grubunun taşınması için tasarlanan mikroküre, mikrokapsül, nanopartikül, pellet ve implant gibi taşıyıcı sistemlerin yapısında da yine bu polimerler kullanılmıştır (50,55,58) .

PLGA, molekül ağırlığına göre farklı yöntemlerle sentezlenir. Düşük molekül ağırlıklı PLGA, laktik ve/veya glikolik asidin doğrudan poliestерifikasyonu ile sentezlenirken, yüksek molekül ağırlıklı PLGA polimerlerinin sentezi ise siklik dimerlerin halka açılması polimerizasyonu ile gerçekleşir (59) . PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapısı aşağıda görölmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. PGA, PLA ve PLGA'nın kimyasal yapısı (60)

PLGA'nın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin tam olarak anlaşılabilmesi amacıyla öncelikle bu polimeri oluşturan monomerler olan PLA ve PGA'nın özelliklerinin incelenmesi gerekmektedir.

PLA doğada optik olarak aktif formu olan sterik formda (L-PLA) ve inaktif formu olan rasemik formda (D,L-PLA) bulunmaktadır. L-PLA polimer zincirindeki düzgün yapısı sebebiyle yarı kristal yapıya sahipken D,L-PLA polimer zincirindeki düzensizlikler sebebiyle amorf yapıya sahiptir. Bu özelliğinden dolayı D,L-PLA, L-

PLA'ya göre polimer matriksinde ilacın daha homojen dağılmasını sağladığı için özellikle ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanmasında daha fazla kullanılır (61-62) . PGA, PLA'nın yapısında bulunan metil gruplarını içermediği için yüksek kristal yapıya sahiptir. Laktik asit, glikolik asitten daha hidrofobik olduğundan glikolik asit oranı yüksek olan PLGA kopolimerleri daha hidrofilik olup daha çok su absorplar ve daha hızlı parçalanır (63) .

Polidispersite indeksi ve molekül ağırlığı gibi fiziksel özellikler bu polimerlerin mekanik direncini, dolayısıyla da ilaç taşıyıcı sistem olarak karakteristiklerini etkiler (59) . Bahsi geçen fiziksel özellikler aynı zamanda polimerin biyoparçalanabilirlik oranını ve hidrolizini de kontrol eder. Ticari PLGA polimerleri molekül ağırlığı ile ilişkili olan intrinsik viskozite değeri ile karakterize edilir (59,63) .

Şişme davranışı, hidrolize uğrama kapasitesi, mekanik güç ve biyoparçalanma hızı PLA ve PLGA kopolimerinin fiziksel özelliklerinden doğrudan etkilenir (64) . PLGA'nın kristal özellikleri kopolimer zincirindeki monomer bileşimlerinin tipine ve molar oranına bağlı olarak değişir (65) . 50:50 oranında laktik ve glikolik asit taşıyan PLGA polimerleri daha yüksek oranda laktik asit taşıyan (örneğin 85:15 ve 65:35) PLGA polimerlerine göre daha hızlı parçalanır (66) . L-PLA ve PGA'dan sentezlenen PLGA polimerleri kristal yapıda bulunurken, D,L-PLA ve PGA'dan sentezlenen PLGA polimerleri doğada amorf yapıda bulunur (59,66) . Ayrıca % 70'in altında PGA taşıyan PLGA polimerlerinin doğada amorf yapıda bulunduğu bilinmektedir (67) . Polimerlerin kristalinite derecesi ve erime noktası molekül ağırlığı ile doğrudan ilişkilidir (59,66) .

Camsı geçiş sıcaklıkları (T_g) fizyolojik sıcaklığın (37°C) üzerinde olan bu kopolimerler doğada camsı yapıda bulunur. Camsı yapıdan kaynaklanan katı zincir yapısı, bu polimerlere biyoparçalanır bir sistem olarak tasarlanabilmelerini sağlayan yüksek mekanik direnç kazandırır. Kopolimer bileşimindeki laktid içeriğinin ve molekül ağırlığının azalmasıyla T_g değerlerinin azaldığı bilinmektedir (59,66) .

Polimer zincirindeki laktik ve glikolik asitlerin molar oranına, polimerin molekül ağırlığına, kristalinite derecesine ve polimerin T_g değerine bağlı olarak PLGA kopolimerlerinin biyolojik parçalanma hızı değişmektedir (59,66) .

Şişen polimerlerden rastgele zincir kopması ile PLGA'nın biyolojik parçalanması gerçekleşir (65-66) . Bu reaksiyonda enzimlerin rolü net değildir. Biyolojik parçalanmanın sonucunda laktik ve glikolik asit meydana gelmektedir. Laktik asit, trikarboksilik asit döngüsüne girerek metabolize edilir ve vücuttan CO_2 ve H_2O şeklinde uzaklaştırılır (61,65) .

2.1.2.3.4. Misel Oluşturucu Kopolimerlerin Yapısı ve Özellikleri

Amfifilik kopolimerlerde PEO'in yaygın olarak kullanılma nedeni, suda çözünürlüğünün yüksek olması, çeşitli mikropartiküller/nanopartiküller için sterik bir koruyucu olması ve çeşitli hidrofobik bloklarla kolayca konjuge edilebilmesidir (43,68) .

Misel oluşturan blok kopolimerler, hidrofilik-hidrofobik bloklarının uzunlukları kontrol edilerek farklı HLB ve molekül ağırlıklarında sentezlenmektedirler. Kopolimerlerin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri, farklı blokların kopolimer içindeki molar oranları ile kontrol edilebilmektedir. Kopolimerlerin oluşturulmasında kullanılan blokların çeşitliliğine bağlı olarak misellerin fizikokimyasal özellikleri ve etkin madde taşıyıcısı olarak uygunlukları farklı olmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan çeşitli blok kopolimerler mevcuttur (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. İlaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanmasında kullanılan blok kopolimerler (69)

Genel Sınıf	Çekirdek Oluşturucu Blok	Etkin madde	Referans
Poli (ester)	PLGA	Doksorubisin	(70)
	PLA	Doksorubisin	(71)
	Poli (ϵ -kaprolakton)	Doksorubisin	(72)
	Poli (ϵ -kaprolakton)	Fenofibrat	(73)
	Poli (ϵ -kaprolakton)	İndometazin	(35,74)
	PLA	Paklitaksel	(75-76)
Poli (L-aminoasit)	Poli (L-aspartat)	Doksorubisin	(77-79)
	Poli (2-hidroksietil-L-aspartamid)	Metotreksat	(80)
	Poli (β -benzil-L-aspartat)	Amfoterisin B	(81)
	Poli (β -benzil-L-glutamat)	Klonazepam	(82)
	Poli (β -benzil-L-aspartat)	Kamptotesin	(83-84)
Pluronic®	P85, P105	Doksorubisin	(85-86)
	L61, F127	Doksorubisin	(87-89)
	P85	Vinblastin	(90)
	P85	Sisplatin	(90)
	F127, P105, F98	Nistatin	(69,91)
	F127, F87, F68	Propofol	(92)

Belirli bir etkin madde için uygun olan bir misel çekirdeği diğeri için uygun olmayabilir ayrıca blok kopolimerlerin sentezi de oldukça güçtür. Bu nedenle ancak bir parametre yani çekirdek bloğu uzunluğu değiştirilebilmekte ve bu değişkenliğin miselin çap, dayanıklılık, etkin madde yükleme kapasitesi ve salımı üzerine etkileri beklenmektedir. Zaten misel özelliklerini etkileyen tüm parametrelerin etkin madde salımı alanında sistematik olarak incelenmesinin gerçekçi olmayabileceği belirtilmektedir. Bu kısıtlamalar göz önüne alındığında ticari olarak bulunan bir amfifilik blok kopolimer olan polipropilenoksit-polietilenoksit (Pluronic®), misellerin çalışılmasında uygun bir materyal olmuş ve pek çok çalışmada kullanılmıştır (31,93-97) .

2.1.2.3.5. Amfililik Triblok Kopolimerler

Tek tür birimlerden oluşan polimer zinciri homopolimer, iki ya da daha fazla monomer içeren polimerler ise kopolimer olarak adlandırılırlar. Kopolimerler genellikle farklı monomerlerin düzensiz birleşmesinden oluşarak random (rastgele) kopolimer oluştururlar. Bununla beraber; ardışık (alternatif), graft (aşı) ve blok kopolimerler bu kuralın dışındadır. Ardışık kopolimerde monomer birimleri birbiri ardına gelir. Graft kopolimerler ya da diğer bir deyimle aşı kopolimerler, mevcut bir polimer zinciri üzerinde bir dallanma olarak ikinci bir monomer içerir (98) . Blok kopolimerler ise farklı homopolimerlerin uzun segmentlerini içerir (Şekil 2.6).

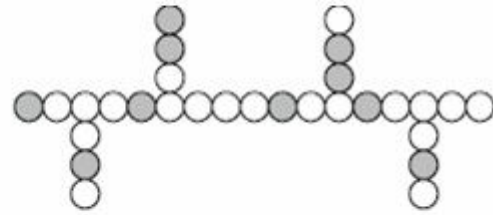
Random Kopolimer



Ardışık Kopolimer



Graft Kopolimer



Blok Kopolimer

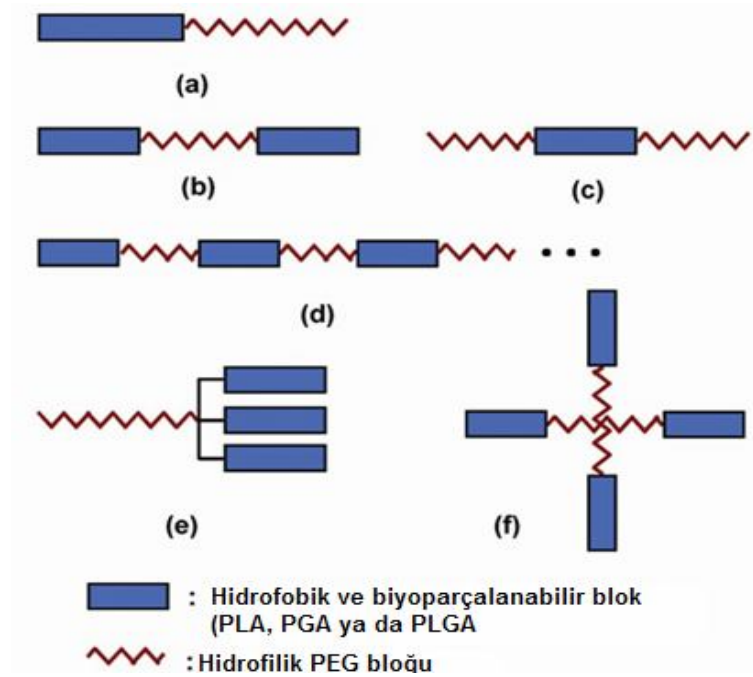


Şekil 2.6. Kopolimer tiplerinin şematik görünümü (98)

Blok kopolimerler, çeşitli monomerlerin iki veya daha fazla sayıda bloktan oluşturduğu dairesel ya da doğrusal yapılı, yüksek molekül ağırlığına sahip makromoleküllerdir. En basitinden, AB diblok kopolimeri uç uca bağlanmış iki farklı homopolimerden meydana gelir. Bu kompleks genişletildiğinde ABA, BAB ve $(AB)_n$ doğrusal multiblokları elde edilirken üçüncü bir kompozisyonu içeren polimer dizisi (ABC kopolimeri) bulunmuştur. Son yıllarda Wesley ve ark. (99) tersiyer amin metakrilat sıraları içeren blok kopolimerler geliştirmişler, miselleşme çalışmaları için onları çekici hale getiren pH, sıcaklık ve elektrolit konsantrasyonuna bağlı

çözünürlük özelliklerine sahip polimerlerin ilginç kombinasyonlarını sunmuşlardır (100) .

Blok kopolimerler kendi içinde di-blok, tri-blok, multiblok, dallanmış blok ve yıldız şekilli blok gibi farklı yapılara ayrılır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Farklı amfifilik blok kopolimer yapılarının şematik gösterimi: (a) A-B diblok, (b) A-B-A triblok, (c) B-A-B triblok, (d) ardışık multiblok, (e) dallanmış blok, (f) yıldız şekilli blok (33)

2.1.2.3.6. Blok Kopolimerler ile Yapılan Çalışmalar

Literatürde, blok kopolimerlerle yapılan çalışmalar incelendiğinde değişik etkin maddelerin formülasyonlarının araştırıldığı görülmüştür.

PLA-PEO-PGA (Polilaktik asit-polietilen oksit-poliglikolik asit) triblok kopolimerlerinin % 5' lik misel çözeltisi kullanılarak sulindak ve tetrakainin 4-6 saat olan salım süreleri 10-20 güne çıkarılmıştır (101) .

Diğer bir çalışmada, ABC triblok kopolimeri kullanılmıştır. Hidrofobik bir ilaç olan diprimadol misellere yüklenmiştir. MPEG-DMA-DEA miselleri bir ilaç taşıyıcı sistem gibi davranarak yavaş salım yapmışlardır (102) .

Doksorubisin ile yapılan bir çalışmada , etkin madde salımı için pH'ya duyarlı PEO-PAGE [Polietilen oksit-poli(alil glisidil eter)] diblok polimerik misel sistemi kullanılmıştır. Misellerin ilaç salımı pH 5 ve pH 7 tampon çözeltileri kullanılarak incelenmiş ve pH 5'deki ilaç salımının pH 7'ye göre çok daha hızlı olduğu tespit edilmiştir (103) .

Amfifilik triblok kopolimer PLGG-PEG-PLGG [Poli(laktik-ko-glikolik)-alt-l-glutamik asit-polietilen glikol-poli(laktik-ko-glikolik)-alt-l-glutamik asit] ile sudaki çözünürlüğü çok az olan paklitaksel kullanılarak nanopartikül formülasyonu hazırlanmıştır. Sonuçlar, paklitakselin sitotoksik etkisinde kayıp olmaksızın salındığını göstermiştir (104) .

Paklitaksel ile yapılan bir başka çalışmada PLA-PEG-PLA (ABA) ve PEG-PLA-PEG (BAB) triblok kopolimerleri kullanılmıştır. Her iki polimerden paklitaksel salımına bakılmış, paklitakselin difüzyon kontrollü salımının ABA' dan daha az olduğu görülmüştür (105) .

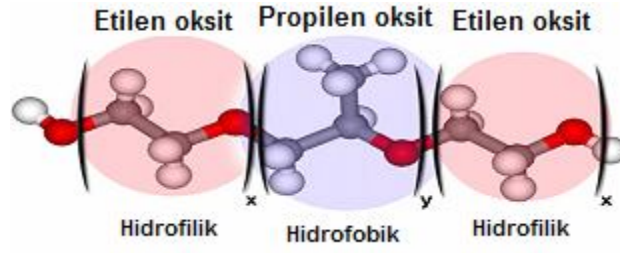
Zhang ve arkadaşları, amfifilik diblok kopolimer olan metoksi-PEG ve PLA'nın polimerik misellerini, suda çözünürlüğü az olan metotreksatı taşımak için hazırlamışlardır. Sonuç olarak, metotreksatın % 50'den az miktarı 5 gün içinde salınmıştır (27) .

2.1.2.4. Pluronic® Blok Kopolimerler

2.1.2.4.1. Pluronic® Blok Kopolimerlerin Yapısı ve Sentezi

Pluronic® blok kopolimerler (Poloxamer®ler) USP ve EP'de farmasötik yardımcı maddeler olarak kabul edilmişlerdir (106-107) . Sulu ortamda kendiliğinden

misel yapısı oluşturan Pluronic® kopolimerleri pek çok çalışmada kullanılmıştır (31,93-97) . Hidrofilik etilen oksit (EO) ve hidrofobik propilen oksit (PO) bloklarının A-B-A temel yapısına göre dizilmesi sonucu oluşurlar ($EO_x-PO_y-EO_x$). Bu dizilişteki EO (x) ve PO (y) birimlerinin sırası ile x ve y olarak gösterilen ortalama sayılarının değiştirilmesiyle farklı büyükte ve farklı hidrofilik özelliklere sahip amfifilik kopolimerler elde edilebilmektedir (31) (Şekil 2.8) .



Şekil 2.8. EO hidrofilik bloğu ve PO hidrofobik bloğu içeren Pluronic® kopolimerlerin şematik gösterimi (95)

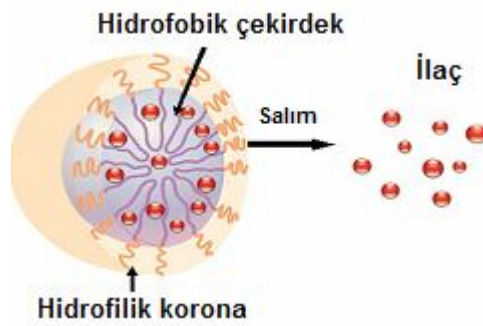
Pluronic®lerin adlandırılmasında kullanılan F, P ve L harfleri kopolimerin sırayla katı, yarı katı, sıvı formda olduğunu gösterir. Sayısal kodlamalar ise blok kopolimerin yapısal parametrelerini tanımlar. Son basamak EO bloğunun ağırlık yüzdesinin ortalama onda birini verir. Kalan bir veya iki basamak ise merkezdeki PO bloğunun moleküler kütlesinin Dalton olarak üçyüzde birini verir. Örneğin çalışmalarımızda kullanılan Pluronic® F108:

- Katıdır.
- EO bloğunun ağırlık yüzdesi: $8 \times 10 = \% 80$ dir.
- PO bloğunun moleküler kütlesi $10 \times 300 = 3000$ Da'dur.
- Fizikokimyasal özellikleri ise Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan Pluronic® kopolimerin fizikokimyasal özellikleri (108)

Kopolimer	Molekül ağırlığı	Ortalama EO birimi (x)	Ortalama PO birimi (y)	HLB
F 108	14600 Da	141	44	>24

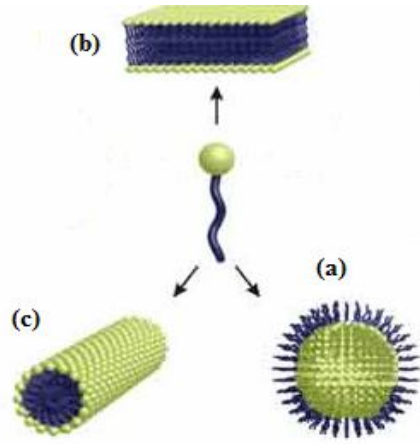
Bileşiklerin miseller çözeltinin PO çekirdeğine geçişi çözünme olarak tanımlanır. Pluronic® kopolimerler sayesinde çözünürlükleri ve stabiliteleri büyük ölçüde iyileştirilen etkin maddeler, oluşan bu hidrofobik çekirdekten salınır (95) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Etkin maddenin hidrofobik çekirdekten salımının şematik gösterimi (95)

2.1.2.4.2. Kendiliğinden Birleşebilen Pluronic® Blok Kopolimerler

Pluronic® kopolimerlerin bilinen bir özelliği, sulu çözeltilerde moleküler dispersiyonlar oluşturup, kendini oluşturan blokların yani ünimerlerin bir araya gelerek miseller oluşturmalarıdır. PO blokları birleşerek miselin çekirdeğini oluştururken, EO blokları çekirdeği çevreleyerek hidrofilik koronayı oluşturur. PO yapısından oluşan hidrofobik çekirdek çeşitli biyolojik ajanlar için bir depo görevi görmekte olup, sulu dış ortamdan EO içeren hidrofilik korona ile ayrılır. PO çekirdek ve EO koronadan oluşan Pluronic® miselleri genellikle küreseldir. Bu özellik pek çok Pluronic® için (EO içeriği % 30'un üzerinde olan) geçerli olup özellikle vücut sıcaklığına sahip seyreltik çözeltilerde gözlenir. Pluronic® miseller küresel yapının yanı sıra, tabakalı yapı ve silindir gibi farklı morfolojik şekiller de gösterebilir (109) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Farklı morfolojik yapılar gösteren Pluronic® miseller: (a) küresel yapı, (b) tabakalı yapı, (c) silindirik yapı (110)

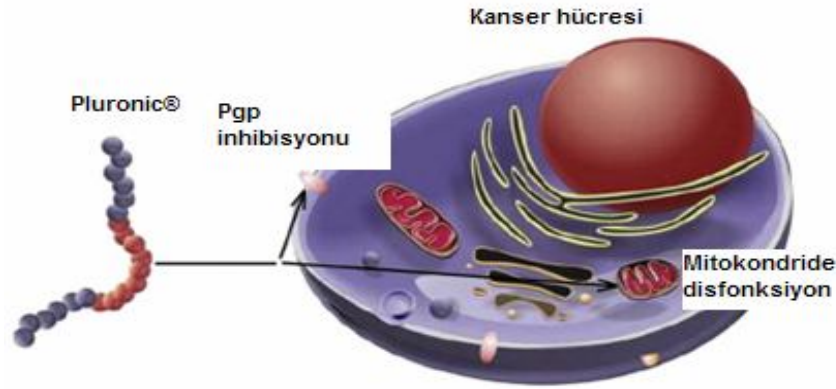
Sonuç olarak polimerik miseller, ilaçlar için çok iyi bir taşıyıcıdır. Blok kopolimerlerle hazırlanan formülasyonlardaki hidrofilik kısım, miselin disperse halde gösterdiği farmasötik davranışlar bakımından fayda sağlar, sterik engel oluşturarak ilaçların hücrelerle ve proteinlerle istenmeyen etkileşimlerini azaltır (111) .

2.1.2.4.3. İlaç ve Gen Taşınmasında Pluronic® Blok Kopolimerler

Son yirmi yıldır, düşük molekül ağırlıklı ilaçlar ile DNA ve proteinler gibi biyolojik makromoleküllerin vücuda transferi amacıyla kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerdeki gelişmeler büyük ölçüde dikkat çekmektedir (2-3,8,112) . Bu sistemlerin, ilacın hedef bölgesinde karşılaşılan ilaca direnç gösterme gibi sorunların üstesinden gelinmesine ve ayrıca ilacın çözünürlük ve stabilitesinin artırılmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (52,95) . Sentetik polimerler, ilaç ve gen taşınması amacıyla kullanılan en yaygın polimerler arasındadır (31,87,96,113) . Bu polimerlerden olan Pluronic® blok kopolimerler, oldukça önemli ve ümit verici olup eczacılık alanında uzun zamandır kullanılmaktadır (95,97,109) .

2.1.2.4.4. Pluronic® Blok Kopolimerler Kullanılarak Hazırlanan Formülasyonlarla İlaça Dirençli Tümörlerin Tedavisi

“*Multi drug resistance (MDR)*” etkisi gösteren tümörler tedavisi en zor olan tümörlerdir çünkü bu tümör hücreleri, artan ATP (Adenozin trifosfat) aktivitesi ile beraber P-glikoprotein (P-gp) gibi hücre dışına madde pompalama görevine sahip *efflux* proteinlerini aşırı salgılar ve ilaçları hücre dışına atarlar. Pluronic®'ler ise P-gp inhibisyonuna ve mitokondrinin yetersiz çalışmasına sebep olarak ilacın hücreden dışarı atılmasına engel olmaktadır (Şekil 2.11). Ayrıca glutatyon, S-transferaz, topoizomeraz I ve topoizomeraz II gibi proteinlerin de bu mekanizmada rol aldığı bilinmektedir (111) .



Şekil 2.11. Pluronic® kopolimerlerin MDR etkisi gösteren kanser hücreleri üzerine etkisi

Alakhov ve ark. yaptıkları çalışmalarda (88,90) ilaca dirençli hücreleri Pluronic® blok kopolimerlerle daha duyarlı hale getirdiklerini göstermişler ve bunun sonucunda da etkin madde olarak seçtikleri doksorubisinin sitotoksik aktivitesinde 2-3 kat artış gözlemlemişlerdir. Pluronic® blok kopolimerler kullanılarak yapılan in vivo çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (87,114) .

2.1.2.5. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlama Yöntemleri

Nanopartikül hazırlamak amacıyla kullanılan çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır (96,115-119) . Kullanılan polimerlerin ve etkin maddenin yapısına, seçilen çözücüye, özellikle yüzey aktif maddeler olmak üzere formülasyonda yer alan diğer maddelere ve bu maddelerin oranlarına göre uygun hazırlama yöntemi seçilmelidir (9,115) .

Genel olarak, nanopartikül hazırlamak amacıyla kullanılan yöntemler aşağıdaki gibidir (115,119-120) :

- 1- Polimerizasyon Yöntemi
 - a. Yüzeyleylerarası Polimerizasyon
 - b. Misel Polimerizasyonu
 - c. Sulu Fazda Polimerizasyon
- 2- Koaservasyon Yöntemi
- 3- Emülsifikasyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi
- 4- Poli-iyon Kompleks Oluşturma Yöntemi
- 5- Süperkritik Çözücü ile Hazırlama Yöntemi
- 6- Nanoçöktürme (Küresel kristalizasyon) Yöntemi
- 7- Tuzla çöktürme (*Salting-out*) Yöntemi

Çalışmamızda kullanılan emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi hakkında aşağıda bilgi verilmektedir.

2.1.2.5.1. Emülsifikasyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Bu yöntem ilk olarak 1981 yılında poli(D,L-laktik asit) nanoküreleri hazırlamada kullanılmış ve birçok uygulamaları yapılmıştır (121) . Bu yöntem poli(D,L-laktik-ko-glikolid) için modifiye edilmiş, organik faz içerisinde çözündürülen polimere, etkin madde ilavesi yapılmış ve yüzey etkin madde içeren su

fazı ile karıştırılarak emülsiyon oluşturulmuştur. Hazırlama sırasında organik çözücünün, buharlaştırma ile ortamdan uzaklaştırılması gereklidir (122) .

Yöntemin uygulanmasında PLGA'nın farklı oranları ve farklı miktarlarda yüzey etkin madde kullanılarak araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Poli-vinil alkolün (PVA) parenteral formülasyonlar için uygun bulunmaması nedeniyle yerine Pluronic®'ler kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda hazırlanan sistemin partikül büyüklüğünün, yüzey etkin madde tipine ve polimer-yüzey etkin madde oranına bağlı olarak değişim gösterdiği bulunmuştur (96) .

Çözücü buharlaştırma tekniği daha ziyade polimer çözeltisinde çözünen, lipofilik etkin maddenin enkapsülasyonunda başarılı olarak kullanılmıştır ancak modifikasyonlar yapılarak protein gibi amfifilik özellik gösteren maddeler için de bu yöntemin kullanılması mümkün olmuştur (41,119) .

Peptit, protein ve diğer makromoleküllerin hapsedilmesine olanak sağlayan çoklu emülsiyon (*double emulsion*) yönteminde ise, etkin maddenin sulu çözeltisi polimer çözeltisinde dağıtılarak bu karışıma yağ/su emülgatörünün sulu çözeltisi eklenmektedir. Daha sonra su/yağ/su (çoklu) emülsiyonu, ilaç çözeltisini içeren polimer çözeltisi damlacıklarını oluşturmakta ve çözücü buharlaştırıldıktan sonra, etkin maddenin sulu çözeltisini içeren nanopartikül süspansiyonu elde edilmektedir (123) .

2.1.2.6. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Karakterizasyonu

2.1.2.6.1. Partikül Büyüklüğü

Nanopartiküllerde, partikül büyüklüğü dağılımı Coulter ve Malvern cihazlarıyla ölçülür. Coulter cihazında kapiller bir akış hücresi olup, nanopartikül süspansiyonu iki elektrot arasından geçerken, sürekli olarak sıvının direnci ölçülür. Ölçülen elektriksel direnç değişikliğine bağlı olarak partikül büyüklüğü bulunur (9) .

Işık saçılması yöntemiyle çalışan Malvern cihazında ise dinamik ışık saçılımı yöntemi, seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetindeki değişimin ölçülmesi esasına dayanır. Parçacığın hareketine, dolayısı ile parçacığın büyüklüğüne, ortamın viskozitesine ve sıcaklığa bağlı olarak saçılan ışığın şiddeti değişir. Kolloidal sistemler temelde iki farklı ışık saçılımı yöntemiyle karakterize edilir. Bunlardan ilki olan statik ışık saçılımı yöntemi; polimerlerin molekül ağırlığının belirlenmesinde kullanılır. Dinamik ışık saçılımı yöntemi ise; difüzyon katsayısı, dağılım indeksi ve partikül büyüklüğü dağılımının elde edilmesinde kullanılır. Bu iki farklı yöntemin birleştirilmesi ile, nanopartikül süspansiyonun içerisinde yer alan partiküllerin yapısı hakkında bilgi sağlanır (1) .

Nanopartiküllerin partikül büyüklüklerinin ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM), Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Atomik Güç Mikroskobu (AFM) gibi görüntüleme yapan cihazlar da kullanılmaktadır (9) .

2.1.2.6.2. Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyel, belli bir ortamdaki partiküllerin sahip olduğu yüklerin toplamı olarak tanımlanmaktadır. Bir kolloidal sistemin sahip olduğu zeta potansiyel değeri, o kolloidal sistemin olası dayanıklılığı hakkında bilgi vermektedir. Eğer sistemdeki tüm partiküller yüksek negatif veya pozitif zeta potansiyele sahipse, birbirlerini itmekte ve dispersiyon dayanıklı olmaktadır. Eğer partiküller düşük zeta potansiyele sahipse, o zaman partiküllerin birleşmesine engel olacak güç kalmamakta ve dispersiyon dayanıklı olmamaktadır. Genellikle, yüksek zeta potansiyele sahip, yani yüklü partiküllerde, nanopartikül dispersiyonları, partiküller arasındaki yüksek itme gücü sayesinde agregasyona eğilimi olmamakta ve dolayısıyla daha dayanıklı bir yapı sergilemektedir (9,112) .

2.1.2.6.3. Etkin Madde Yükleme Kapasitesi

Etkin madde yükleme kapasitesi (*drug loading capacity*), nanopartiküler sistemlerin önemli karakterizasyon parametrelerinden birisidir. Etkin madde, partikülün içine hapsedilebileceği gibi yüzeye de adsorbe edilebilmektedir. Etkin madde yükleme kapasitesi (a) ile nanopartiküle hapsedilen etkin madde miktarını ifade eden enkapsülasyon etkinliği (*encapsulation efficiency*) (b) değerleri aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmaktadır (58) :

Yükleme kapasitesi= [Nanopartiküle yüklenen etkin madde miktarı (mg)/ Nanopartikül miktarı (mg)] x 100 (a)

Enkapsülasyon etkinliği= [Nanopartiküle yüklenen etkin madde miktarı (mg)/ Başlangıçtaki etkin madde miktarı (mg)] x 100 (b)

2.1.2.6.4. Etkin Madde Salımı

Nanopartiküllerde etkin maddenin salımını etkileyen parametreler; etkin maddenin çözünürlüğü, kullanılan polimerin özellikleri, hazırlanan dozaj şekli ve etkin maddenin nanopartiküllere kimyasal olarak bağlanması veya yüzeyine adsorbe olması olarak sıralanabilir (124-126) . Etkin maddenin çözünürlüğüne bağlı olarak partikül yüzeyinden kopması, sızması, matriksin erozyonu ve difüzyon mekanizmaları ile olmaktadır. PLGA ve PLA gibi biyoparçalanabilir polimerlerle hazırlanan nanopartiküllerden salım, polimerin parçalanması ile gerçekleşmekte ve parçalanma hızı polimerdeki alkil zincirinin uzunluğuna göre değişmektedir.

Polimer yüzeyinin degradasyonu, kimyasal veya enzimatik yolla gerçekleşir. Polimer matriksten etkin maddenin difüzyonu, matriksin erozyonundan fazla olursa, salım difüzyon mekanizması ile kontrol edilir. Difüzyon mesafesi partikül boyutu nedeniyle çok kısa olduğundan, bu mekanizmayla salım sağlayan sistemler kontrollü ve sürekli salım göstermezler (124) .

Etkin maddenin nanopartiküllere zayıf bağlanması ya da nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olması, ani ilaç salımına (patlama etkisi) neden olur (125) . Etkin maddenin nanopartiküllere yüklenme yöntemi ile ani salım hızı azaltılarak, kontrollü salım sağlanabilir. Salım hızı, etkin madde ve formülasyonda yer alan yardımcı maddeler arasında oluşan iyonik etkileşime bağlı olarak da değişebilir. Eğer etkin madde ve yardımcı madde, suda az çözünen bir kompleks oluşturuyorsa, etkin maddenin salım hızı düşebilir ve ani salım etkisi gözlenmez (126) .

Blok kopolimerler kullanılarak hazırlanan miselik yapıdaki nanopartikül formülasyonlarından salımı etkileyen parametrelere bakılacak olursa, temelde nanopartiküllerden etkin maddenin salımını etkileyen parametreler ile aynıdır fakat kullanılan blok kopolimerin tipine bağlı olarak değişir. Pluronic®'lerden etkin madde salımını etkileyen parametreler özellikle polimerin blok uzunluğu ve çözünürlüğüdür (31) .

2.1.2.6.5. Stabilitesi

Dispersiyon ortamındaki kolloidal partiküllerin hareketleri Brown hareketleri ile tanımlanır. Brown hareketleri, partiküllerin dispersiyon ortamındaki moleküller tarafından bombardımanı sonucu oluşur. Brown hareketlerinin derecesi, dispersiyon ortamının viskozitesine, sıcaklığına ve molekül büyüklüğüne bağlıdır. Partikül boyutunun küçülmesi ile hareket hızlanırken, viskozitenin artması ile yavaşlar. Nanopartikül dispersiyonunun çökmesi ve kremalaşması bu hareketler sayesinde önlenir ve uzun dönem stabilite sağlanmış olur (127) .

2.1.2.7. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Uygulama Alanları

Nanopartiküller genel olarak kanser tedavisi, gen tedavisi, antiparaziter tedavi, aşı üretimi, tanı maddelerinin üretimi, peptit ve proteinlerin taşınması ile gastrointestinal sisteme, derinin alt tabakalarına, göze ve akciğerlere ilaç taşınması gibi amaçlarla kullanılmaktadır (112) .

Nanoparçacıklar aracılığıyla ilaç taşınımının en güçlü yönü, istenilen yüzey modifikasyonları sayesinde, parçacıklara biyotaklit (biyomimetik) özelliği kazandırılabilmesidir. Bu sayede ilaç taşıyıcılarının yalnızca belirli bir bölgede, belirli bir damarda veya belirli bir çevrede etkin maddeyi salmaları sağlanmış olur. Bu yaklaşımla tedavinin özgünlüğünün artırabilmesi amaçlanmaktadır (128) .

Nanotaşıyıcıların çeşitli yüzey modifikasyonları yardımıyla dolaşımdaki yarı ömürlerinin ayarlanması, immün sistemden saklanması, beraberinde ilaç takibi için floresan veya manyetik bildiricilerin de bulunması ve hatta taşıyıcının ilacı hücrenin içine vermek üzere programlanması mümkündür (128) . Benzer bir yaklaşımla nanoparçacıklar aracılığıyla ancak yalnızca tanıdığı tümör dokusunda etkin madde salımını gerçekleştiren “smart” parçacıklar da tasarlanabilmektedir. Bu nanoparçacıklar içine yüklenen ilaçların “*multi-drug resistance (MDR)*” pompalarından saklanarak hücre içine yüksek konsantrasyonda etkin madde salmasını sağlamak amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (129-132) .

Nanopartiküller, doksorubisin, kamptotesin ve 5-FU gibi sitostatik ilaçların istenilen organda yoğunlaşmalarına, salımın kontrolüne ve intravenöz uygulama sonucunda daha az toksisiteye neden olmaktadır (133) . Nanopartiküllerin lenf düğümlerindeki makrofajlarda yoğunlaşması, lenf düğümlerindeki metastazlara karşı da spesifik tedavi ve tanı olanağı sağladığını göstermektedir (112) .

Nanopartiküllerin gen tedavisinde kullanılması oldukça ilgi çeken bir konu olup, özellikle PLGA nanopartiküllerinin, plazmid DNA’nın uzatılmış salımı için kullanımıyla ilgili araştırmalar literatürde bulunmaktadır (11,134-136) .

2.1.2.7.1 Polimerik Misellerin Farmasötik Alanda Kullanımı

Küçük çap, yüksek çözünürlük, kolay sterilizasyon, kontrollü etkin madde salımı gibi özellikleri nedeniyle polimerik misellerin ideal ilaç taşıyıcı sistemler olduğu düşünülmektedir. Polimerik misellerin teorik olarak uygulama bulabileceği

farmasötik alanlar medikal tanı amaçlı görüntüleme, bölgesel ilaç hedeflendirmesi, immünoloji, gen terapisi ve ilaç taşınmasıdır (29,137-139) .

2.1.2.7.2. Hedeflemede Polimerik Misellerin Kullanımı

Dokulara, hücrelere ve hücre içi yapılara ilaç taşıyıcı sistemler olarak hedeflendirilmiş nanopartiküller üzerine son yıllarda pek çok çalışma yapılmıştır. Örneğin; Stella ve ark. (138) , PEG ile kapladıkları nanopartiküllerin yüzeyine folik asit takarak, kanser hücrelerine hedefli formülasyonlar hazırlamışlardır. Çalışmalarda, nanopartikül yüzeyine yapılan modifikasyonlar ile kan-beyin engelini rahatlıkla geçebilen, beyne hedefli nanopartiküllerin formülasyonları gerçekleştirilmiştir (115,140) .

Hedeflendirme, etkin maddenin vücutta istenilen bölgeye, organa, dokuya veya hücreye gönderilebilmesidir. Böylece ilaç bütün vücuda dağılmadan doğrudan etki etmesi istenen yere ulaşabilmektedir (141) . Bu durumda çok düşük ilaç miktarları ile etki sağlanabildiği için ilaçların yan etkileri de belli ölçüde önlenabilmektedir. Nanopartiküllerin hedeflendirilmeleri pasif ve aktif olmak üzere iki şekilde olmaktadır (112) .

Pasif hedeflendirmede nanopartiküller, hücreye fagositoz yoluyla girer ve hücre içindeki lizozomal enzimler tarafından parçalanırlar. Nanopartiküller, pasif hedeflendirme ile en fazla karaciğer ve böbreklerde toplanırlar ve dolayısıyla da karaciğer hastalıklarında sıklıkla kullanılırlar.

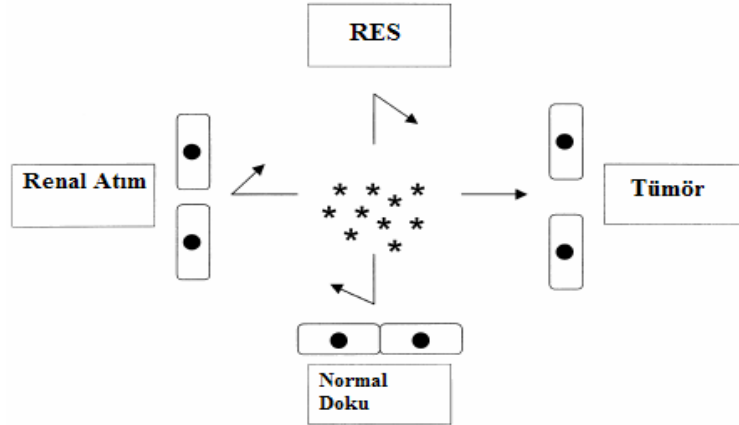
Aktif hedeflendirmede ise ilacın hedef bölgeye götürülebilmesi için, nanopartiküler taşıyıcı sistem, hedef bölgedeki reseptörlerle birleşebilen spesifik bir molekülle kaplanır. Bu moleküller başlıca; lektinler, monoklonal antikorlar ve bazı glikoproteinlerdir. Monoklonal antikorlar, nanopartiküllere antijen bağlayan bölgelerinden adsorbe olurlar. Bu spesifik etkileşme, in vivo ilaç hedeflendirilmesinde önemli rol oynar. Monoklonal antikorlarla kaplı

nanopartiküllerin, in vitro koşullarda hedef tümör hücrelerine etkili olduğu gösterilmiştir (137,142) .

İntravenöz olarak verilen nanopartiküllerin RES hücrelerinin fazla olduğu karaciğer, dalak, kemik iliğinde; deri altı ve adale içine verildiklerinde ise böbrek ve barsaklarda yoğunlaştıkları, idrar ve feçes yoluyla atıldıkları gösterilmiştir. Bu amaçla pek çok çalışmada, taşıyıcı sistemlerin, RES hücreleri tarafından tutulmalarını engellemek için yüzeyleri PEG ile kaplanmış ve dolaşımda kalış süreleri uzatılmıştır (137) .

Miseller, hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcıları olarak kullanılabilirler. Misellerle 3 temel hedeflendirme mekanizması gözlenir:

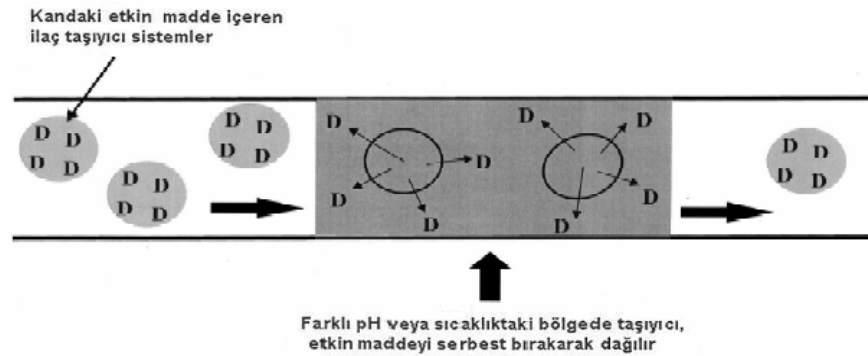
- 1) Bunlardan birincisi gevşek damarlanma boyunca miselin organ ya da dokudaki boşluklara kendiliğinden penetrasyonu ile olur (EPR etkisi) ve pasif hedefleme olarak adlandırılır (139) . Difüzyon ve birikme parametreleri, tümör damar çeperinin por büyüklüğüne bağlıdır ve tümörün tipine göre değişir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Polimerik misellerin tümörlerde birikmesi (34)

- 2) Bu hedefleme mekanizması ise farklı doku ve organlarda lokal sıcaklık artması ve/veya asidozla patolojik olayların oluşmasına dayalı **fiziksel hedeflemedir** (Şekil 2.13). Sıcaklık ve pH'ya duyarlı maddelerden

hazırlanmış miseller, (örneğin poli(N-izopropilakrilikamid) ile onun poli(D,L-laktid) ve diğer bloklarla oluşturulan kopolimerleri gibi) bu bölgelerde parçalanarak içeriğindeki etkin maddeyi salarlar (143) .



Şekil 2.13. İlaç/ilaç taşıyıcı sistemlerin fiziksel hedeflendirilmesi (68)

- 3) Bir diğer hedefleme ise **ölgül vektör molekülleriyle** yapılır. Antikorlar gibi ölgül ligandlar hidrofilik blokların suya maruz kalan uçlarına bağlanabilir. Bu durumda antikor için herhangi bir sterik engel olmadan miselleri hedeflendirmek için seçilen antikor veya onun bir bölümü, aktive edilmiş hidrofilik blokların suya maruz kalan uçlarına bağlanabilir ve hedefleme yapılır (144) .

Kataoka ve arkadaşları (145) yaptıkları bir çalışmada hidrofobik bir antikanser ilaç olan adriamisini poli(etilen oksit)-poli(aspartik asit) blok kopolimerine konjuge ederek polimerik miseller hazırlamışlardır. Bu polimerik misellerin, in vivo olarak farelerdeki kolon kanserine karşı antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Subkütan olarak transplante edilen ve büyüyen katı tümörlerin tedavisinde kullanılan misellerin etkinliğinin parenteral adriamisinden daha fazla olduğu görülmüştür. Misellerin ekstravasküler tümörlerdeki bu mükemmel etkinliği polimerik misellerin damar dışı dokulara ve özellikle de katı tümörlere spesifik olarak ilaç taşımada kullanılabileceğini göstermiştir (145) .

Kabanov ve arkadaşları poli(oksietilen)-poli(oksipropilen) blok kopolimeriyle (Pluronic®) hazırladıkları 12-36 nm boyutlarındaki miselleri kullanarak beyne ilaç hedeflendirilmesi üzerinde çalışmışlardır (31,93) . Etkin madde yüklü misellerin in vivo olarak sıçanlara uygulandıktan sonraki dağılımlarını görmek amacıyla FITC (Florosein izotiyosiyanat), model ilaç olarak kullanılmıştır. Serbest FITC ve miseller çözeltisi intravenöz veya intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Serbest ve Pluronic® P85 misellerinde çözündürülmüş FITC'dan elde edilen sonuçlardan intravenöz ve intraperitoneal verilisin benzer olduğu görülmüştür. FITC'ın dağılımında en önemli fark akciğerler, karaciğer ve beyinde görüldüğü için bu organlar incelenmiştir. Fare dokularındaki maksimum floresans, uygulamadan 1 gün sonra ortaya çıkmıştır. FITC'ın Pluronic® misellerde çözündürülmüş halinde floresansın; beyin, kalp, böbrek, karaciğer ve akciğerlerde giderek arttığı görülmüştür. Pluronic® P68, P85, L64 serilerinde penetrasyon etkinliğinin artan Pluronic® hidrofobluğuyla yükseldiği görülmüştür (31) .

2.1.2.7.3. İmmünolojide Misellerin Kullanımı

Polimerik misellerin bir diğer kullanım alanı ise immünolojidir. Non iyonik blok kopolimerler (özellikle Pluronic®) immün cevabın düzenlenmesi ile yeni ve etkin aşılardan hazırlanması için immünolojik adjuvanlar olarak kullanılmışlardır (95,146) . Pluronic®'lerin makrofaj aktivasyonunu artırdıkları ve adjuvan özelliklerini miseller veya emülsiyon şeklinde gösterdikleri belirtilmektedir (146-147) . Yüksek molekül ağırlıklı Pluronic®'ler çeşitli antijenlerle yüklenebilecek miseller oluşturmaktadırlar. Bu misellerin yüksek adjuvan etkisi influenza virüs aşısıyla gösterilmiştir (147) .

2.1.2.7.4. Gen Tedavisinde Polimerik Misellerin Kullanımı

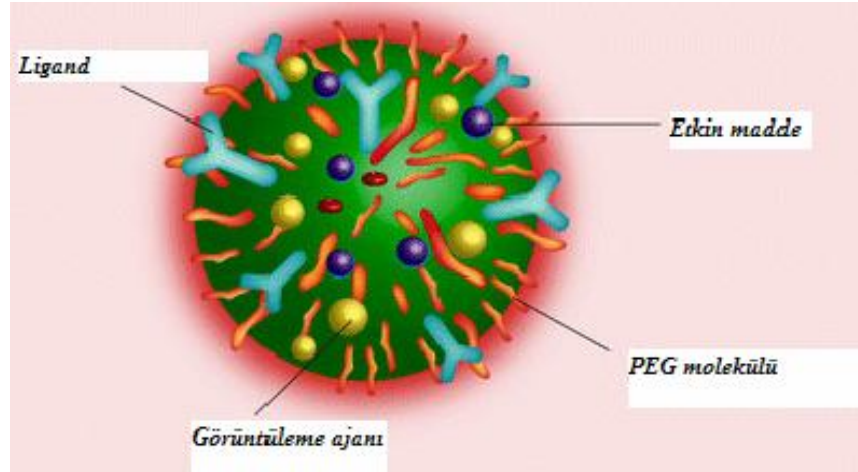
Polimerik misellerin ilaç taşınmasında kullanıldığı bir diğer alan da gen tedavisidir. Gen tedavisinde, hedeflemede kullanılan viral vektörlere göre sentetik vektörler emniyet, immünojenite ve üretim kolaylığı açısından daha üstündürler (11) . İntravenöz enjeksiyon bölgesinin uzağındaki hedef hücrelere etkin gen taşıma

sistemleri geliştirmek için, polikasyon ve PEG'in blok kopolimerleri kullanarak poli-iyon kompleks miselleri hazırlanmıştır (148) . Bu miseller gen taşıma vektörlerinde aranan suda çözünebilme, nükleaza dayanıklı olma ve kanda dayanıklı olma özelliklerini karşılarlar. Bu misellerle karaciğer, arter duvarı ve akciğere gen taşıma çalışmaları vardır (148-149) ve PEG kullanılarak sistemin yüzeyinin modifiye edilmesi işlemi ise *pegilasyon* olarak adlandırılır. Bu bölümde pegilasyon ile ilgili ayrıntılı bilgi verilecektir.

2.2. Pegilasyon

Araştırmacılar, RES tarafından alımı engellemek amacıyla nanopartiküllerin PEG türevleri ile birleştirilmesine yönelik stratejiler geliştirmişler ve bu yapıdaki partiküllere kanda kalış süresi uzatılmış nanopartiküller veya “*Stealth nanopartiküller*” adını vermişlerdir. Bu amaçla bazı küçük moleküllerin, makromoleküllerin ve özellikle protein peptit gibi ürünlerin terapötik etkinliğini artırmak için yapılan işleme *pegilasyon* adı verilir (150) .

Polietilen glikoller (PEG), etilen oksit ünitelerinden oluşan, kimyasal olarak aktive edilebilen 2 terminal hidroksi grubu taşıyan amfifilik polimerlerdir. PEG’ler suda çözünebilen, inert, toksik ve immunojenik olmayan güvenli polimerlerdir. PEG zinciri bağlanarak fizikokimyasal, farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri farklı olan, biyolojik aktivitesini kaybetmemiş yeni bir molekül oluşturmak mümkündür (151) . Ayrıca pegilasyon işlemi yapılmış nanopartiküllere ligand vb. farklı komponentler bağlanarak aktif hedeflendirme ya da görüntüleme amaçlı bir takım ajanlar takılarak görüntüleme yapılabileceği gibi amaca yönelik çok farklı komponentler bağlanabilir (Şekil 2.14).



Sekil 2.14. Peglenmiş nanopartikülün şematik gösterimi (152)

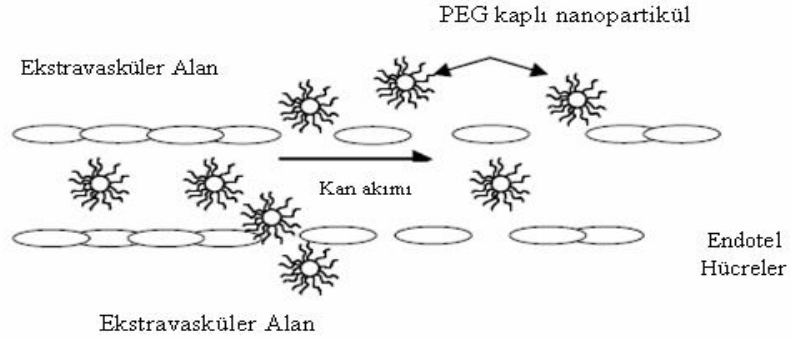
Pegilasyon işleminin tedaviye yönelik sağladığı yararlar aşağıdaki gibi sıralanabilir (120,153) :

- Kan dolaşımı içindeki stabiliteleri az olan ilaçların dayanıklılıklarının artırılması ve buna bağlı olarak da kan dolaşımındaki kalış sürelerinin uzatılması
- Plazma konsantrasyonunda daha az dalgalanmaya neden olması
- Vücutta meydana gelebilecek olan toksisite ve yan etkilerin azaltılması
- İmmunojenite ve antijenitenin azaltılması
- Enzimatik parçalanmanın önlenmesi
- Fiziksel ve termal stabilitenin artırılması
- İn vivo aktivitenin artırılması

Farklı yöntemlerle hazırlanan, etkin madde yüklü nanopartiküllerin istenen organa başarılı bir şekilde hedeflendirilmelerine yönelik yapılan araştırmaların çoğu, nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin uygun bir yüzey aktif madde ile kaplanarak veya PEG ile konjuge edilerek modifiye edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (153-154) .

Nanopartiküllerin, intravenöz uygulanmasını takiben 5 dk içinde RES makrofajları tarafından kandan % 90'dan fazlası uzaklaştırılmaktadır. Nanopartiküllerin bu sakıncaları aşma yetenekleri büyük oranda polisorbata 20 ve 80, poloksamer 184, 188, 338, 407 (Pluronic® 127) ve poloksamin 908 gibi çeşitli yüzey aktif maddeler ile yapılan kaplama veya PEG ile gerçekleştirilen pegilasyon işlemi sonucunda yüzey özelliklerinin değiştirilmesinden kaynaklanmaktadır. Yüzey özelliklerinin modifikasyonu ile nanopartiküller RES makrofajları tarafından tanınmamakta ve bu şekilde kandan hızlı bir şekilde uzaklaştırılmaları da engellenmektedir (153-154) .

Pegilasyon işlemi yapılmış nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde PEG, kopolimerin hidrofobik bloğuna kovalan olarak bağlanmaktadır. Bağlanma sonucunda hidrofilik yüzeye sahip olan PEG, vücuttaki opsonizasyon reaksiyonlarını azaltmakta ve hidrofobik çekirdeğin yüzeyindeki PEG zincirleri ile partiküller, in vivo ortamda çok daha uzun dolaşım özelliği göstermektedirler (112) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. PEG kaplı nanopartiküler sistemlerin kana geçişi (112)

Nanopartiküllerin yüzeyinin PEG ile kaplanması temelde iki şekilde olur: ilki PEG içeren polimerlerin partikülün yüzeyine fiziksel adsorbsiyonudur, ikincisi ise kimyasal bağlanmadır. Şöyle ki, PEG kaplı nanopartiküller doğrudan PEG içeren polimerlerle hazırlanabileceği gibi, nanopartikül yüzeyine PEG'in kovalan bağlarla bağlanmasıyla da oluşabilir (155) .

Tez çalışmamızda yukarıda sözü edilen, kimyasal bağlanmayla gerçekleştirilen pegilasyon işlemi yapılmamış olmasına rağmen genel anlamda bilgi vermek üzere pegilasyon işleminin tanımı ve önemi verilmiş, PEG içeren polimerler kullanılarak partikülün yüzeyine fiziksel adsorbsiyon yapılmıştır.

Fiziksel adsorbsiyon ile nanopartiküllerin yüzeyinde PEG tabakası oluşturmak amacıyla PEG-PPG-PEG (polietilen glikol-polipropilen glikol-polietilen glikol) triblok kopolimeri ya da PEG bloğu içeren kopolimerler kullanılmaktadır. Buradaki pegilasyon işleminin esası, kopolimeri oluşturan blokların sudaki çözünürlüğünün farklı olmasıyla açıklanır. Şöyle ki, blok kopolimerin sulu ortamda çözeltisi hazırlandığı takdirde hidrofilik segment olan PEG suda rahatça çözünürken, PPG çözünemeyecektir. İşte bu selektif çözünme sonucu, kopolimere sıkıca bağlanmış olan hidrofobik kısım içe doğru kıvrılıp, dış ortamla ilişkisini kesmeye çalışırken, hidrofilik kısmı oluşturan PEG tam tersi bir davranış sergileyip dışa doğru yönelmekte ve nanopartikül yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluşturmaktadır (105,120,155) .

Partikül yüzeyinde oluşan bu PEG tabakasının yoğunluğu ve adsorbsiyonu, partikülün yüzey özellikleri, partikül boyutu ve tabakayı oluşturan polimerin özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Partikülün yüzeyi ne kadar gözenekli ve polar olursa adsorbsiyon o ölçüde azalmaktadır, yine aynı şekilde partikül boyutu küçüldükçe de PEG tabakasının kalınlığı ve sıklığı azalmaktadır. Aslında partikül boyutu büyüdükçe adsorbsiyon artmaktadır fakat aynı zamanda PEG tabakasının mobilitesi de yükseldiği için bu sonuç ortaya çıkmaktadır. Blok kopolimeri oluşturan hidrofobik kısmın molekül ağırlığı yükseldikçe daha dayanıklı bir yapı elde edilirken, PEG bloğunun yüzeydeki yoğunluğunun artması ile de opsonizasyonun önüne büyük ölçüde geçilmiş olur (105,155) .

2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.3.1. Tanımı ve Tarihçesi

Hücre kültürü terimi temel olarak, orjinal bir dokudan alınan disperse hücrelerden, primer kültürlerden veya bir hücre serisinden/soyundan, enzimatik, mekanik veya kimyasal ayırıştırma ile elde edilen hücrelerin çoğaltılması işlemi olarak ifade edilebilir (156) . 1907 yılında Ross Harrison, kurbağa embriyo dokularındaki sinir liflerini plazma pıhtısında üretmiş, incelemiş ve sinir liflerinin geliştiğini gözlemlemiştir (157) . Harry Eagle ise bu noktadan başlayan hücre kültürü çalışmalarında 1955 yılında yeni bir alan açmıştır. Hücreleri büyütmek için kullanılan karışık doku ekstraktlarının ve pıhtıların yerine aminoasitler, vitaminler, kofaktörler, karbonhidratlar ve küçük miktarlarda serum proteinleri içeren tuzların kullanılabileceğini açıklamıştır (158) . Rosenfield ve arkadaşları 1992’de yaptıkları çalışmalarda, çeşitli hastalıkların tedavisinde genetiği değiştirilmiş hücreler kullanmışlar, bu da hücre kültürü teknolojisinin kullanıldığı son ve önemli alanlardan biri olmuştur (159) .

Hücre kültürleri kullanılarak yapılan çalışmalar, uygulama kolaylığı ve in vivo korelasyonun yüksek olması sebebiyle her geçen gün artmaktadır (156) .

2.3.2. Uygulama Alanları

Hücre kültürlerinin kullanıldığı alanların başlıcaları aşağıda sıralanmıştır (160-161) :

1. Enzim üretimi
2. Antikor üretimi
3. Büyüme faktörleri ve hormonları üretimi
4. Aşılar
5. Üç boyutlu doku tasarımı
6. Gen tedavisi

7. Kök hücre tedavisi
8. Sitotoksosite ve permeabilite çalışmaları

2.3.3. Hücre Kültürü Sistemlerinin Hayvan Deneylerine Üstünlükleri

1. Çok daha fazla sayıda madde örneğini inceleme olanağı vardır.
2. Deneyler için ihtiyaç duyulan ilaç miktarı azdır.
3. İşlemler hızlı gerçekleştirilebilmektedir.
4. Geçiş mekanizması değerlendirilebilir.
5. Hücre toksisitesi erken teşhis edilebilir.
6. Patolojik koşullar yaratılarak moleküler mekanizmalar aydınlatılabilir.
7. Ön formülasyon aşamasında formülasyona eklenen yardımcı maddelerin, absorpsiyon artırıcıların absorpsiyon üzerine etkileri incelenebilir (162) .

2.3.4. Hücre Kültürü Çalışmalarında Önemli Noktalar

Bir hücre kültürü sisteminin in vivo özellikleri yansıtmada yeteri kadar başarılı olabilmesi için dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıda belirtilmiştir (163) :

1. Kullanılacak hücrelerin veya hücre serilerinin seçimi
2. Hücre serisinin birincil kültür veya pasaj yapılmış seri olması
3. Hücrelerin pasajlanma sayısı
4. Hücrelerin stabilitesi
5. Hücre serisinin heterojenitesi

Çalışılacak hücre dizini seçildikten sonra, hücre özellikleri bazı şartlara bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Bunlar (163) :

1. Hücrelerin ekilme yoğunluğu,
2. Hücrelerin istenilen sonucu verip vermeme durumu,
3. Gerekli besin maddelerinin, büyüme faktörlerinin varlığı ya da yokluğudur.

2.3.5. Hücre Kültürü Çalışmalarında Ortam Seçimi

Hücre kültürleri ile yapılan ilk çalışmalarda dokulardan elde edilen doğal ortamlar veya serum, plazma, lenf ve süt gibi vücut sıvıları kullanılmıştır. Hücre serileri oluşturuldukça daha fazla ortama ihtiyaç duyulmasından dolayı kimyasal yollarla ortamlar hazırlama ve bu ortamları kullanma ihtiyacı doğmuştur (156) .

Günümüzde hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan ortamlar: MEM (Eagle's Minimum Essential Medium), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), RPMI (Rapid Prototyping&Manufacturing Institute), Fischer ve Ham's F-10'dur (156) . Besiyeri, bölünen hücreleri beslemek için gerekli olan aminoasitler, yağ asitleri, şekerler, iyonlar, eser elementler, vitaminler gibi temel besin maddeleri ve uygun kimyasal ortamı oluşturmak için gerekli olan kofaktörler, iyonlar ve molekülleri içerir. Ayrıca kültür ortamına, bakteri ve mantar kontaminasyonlarına engel olmak amacıyla penisilin, streptomisin, gentamisin gibi antibiyotikler ilave edilebilir. Ortamın temel gaz bileşimi O₂ ve CO₂ olup, hücre tipine göre farklılıklar göstermektedir (164) .

2.3.6. Sitotoksosite Değerlendirmesi ve Hücre Yaşayabilirliğinin Ölçülmesi

Hücre kültürlerinde sitotoksosite testlerinin temeli; hücrelerin, örneklerin uygulanması sonucunda canlı kalabilme yeteneklerine dayanmaktadır ve bu cevap, hücrenin canlılık veya metabolik değişiklikler ile ölçülmektedir. Canlılık testlerinde, membran bütünlüğündeki yıkıma dayanan hücre sayısının saptanması, metabolik testlerde ise enzim aktivitesindeki değişikliklerin saptanması amaçlanmaktadır. Sitotoksosite; hücre büyümesi, enzim salımı, radyoaktif işaretleyicilerin salımı ve boya kullanımı vasıtasıyla değerlendirilebilmektedir (165) .

Birçok yaşayabilirlik analizi, iki karakteristik parametreden birine dayanmaktadır. Bunlar sağlıklı hücrelerin metabolik aktivitesi veya membran bütünlüğüdür. Hücre popülasyonlarındaki metabolik aktivite genellikle metabolik

olarak aktif olan hücreler tarafından renkli bir formazana ayrılan, MTT gibi bir tetrazolyum tuzu ile inkübasyon vasıtasıyla ölçülmektedir (166-167) . Diğer bir analiz yönteminde ise, sitoplazmik membran bütünlüğüne sahip sağlıklı hücrelerin tripan mavisi gibi boyaları içeri almama kabiliyetinden yararlanmaktadır. Bu yöntemde, ölü hücreler boyanmakta ve böylece sağlıklı hücreler doğrudan sayılabilmektedir.

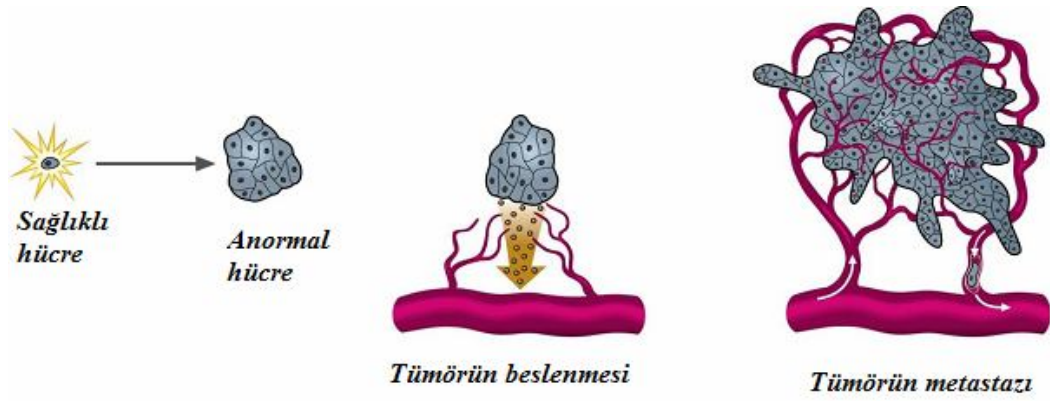
Son zamanlarda, hücrelerin mitokondriyal enzimlerinin MTT tetrazolyum tuzunu [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromür] MTT formazana dönüştürme kapasitesine (167) ya da yaşayabilir hücrelerin endojen heksosaminidaz aktivitesine dayanan kolorimetrik bir analizin kullanıldığı yöntemler önerilmiştir. Bu kolorimetrik yöntemlerin, radyoaktif yöntemlere göre bazı avantajları bulunmaktadır. Bu yöntemler daha az zaman harcamakta, daha ucuz olmakta, ELISA okuyucuları gibi çok kuyucuklu tarayıcı spektrofotometrelerin kullanımıyla çok sayıdaki numunenin işlenmesini sağlamaktadır. 1980'lerin başında Mosmann, canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz tarafından MTT'nin parçalanmasına dayanan bir yöntemi tanımlamıştır. MTT'nin tetrazolyum halkası ayrılmakta ve daha sonra izopropanol tarafından çözündürülecek şekilde mavi formazana indirgenmektedir. Bu durum renk değişimi ile sonuçlanmaktadır ve renk değişiminin yoğunluğu ise canlı hücrelerin enzimatik aktivitesini yansıtmaktadır (167-168) .

2.4. Kanser

En küçük yapı taşlarımız olan hücreler bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanırlar. Ancak, bu yetenekleri de sınırlıdır ve sonsuz bölünemezler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre gerektiği yerde ve gerektiği kadar bölüneceğini bilir. Buna karşın kanser hücreleri, bu bilinci kaybeder, kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar (169) .

Çoğunlukla kanser, hücrenin büyümesini ve mitoz bölünmesini kontrol eden genlerin mutasyona uğramasına bağlı olarak görülür. Kansere sebep olan genler

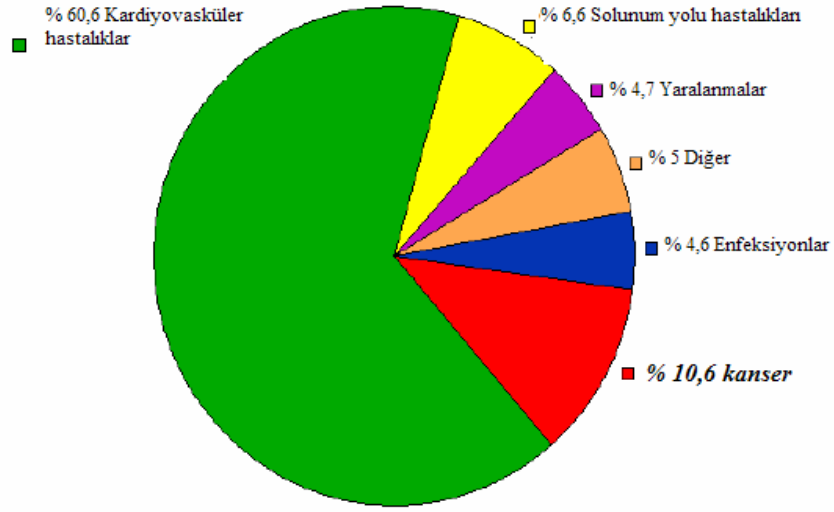
onkogen olarak adlandırılmakta olup, çok sayıda farklı onkogenin varlığı bilinmektedir. Kanseri hücreleri birikerek tümörleri (kitleleri) oluştururlar, tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilirler veya tahrip edebilirler. Kanseri hücreleri oluştukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine gidebilirler. Gittikleri yerlerde tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler (170-171) . Kanseri bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına ise metastaz adı verilir (Şekil.2.16).



Şekil 2.16. Kanseri oluşumunun ve metastazının şematik olarak gösterilmesi

2.4.1. Kanseri Mortalitesi

Kanseri, önemi giderek artan bir sağlık sorunudur ve dünya genelinde ölümlerin nedeni olarak, kalp ve damar hastalıklarının hemen ardından gelmektedir. Türkiyede de bu sıralama farklılık göstermemekte ve WHO'nun yaptığı araştırmanın sonuçları Şekil 2.17'de verilmektedir (172) .



Şekil 2.17. Türkiye’de ölüm sebepleri (172)

Dünya Kanser Örgütü (International Union Against Cancer- UICC) verilerine göre, 2007’de yaklaşık 7.9 milyon kişi, çeşitli kanser türlerine bağlı hastalıklardan yaşamını yitirmiştir.

2008 Yılı Dünya Kanser Kongresi’nde sunulan veriler ise hastalığın global olarak büyük boyutlara ulaştığını ortaya koymaktadır (173) :

- Her yıl 11 milyon insan kansere yakalanmakta,
- Her yıl 1.4 milyon kişi akciğer kanseri, 866 bin kişi mide, 653 bin kişi karaciğer, 677 bin kişi kolon, 548 bin kişi meme kanseri nedeniyle ölmektedir.
- Kanserden ölümlerin yüzde 80’i gelişmemiş ve az gelişmiş ülkelerde meydana gelmektedir.
- 2030 yılında 12 milyon insanın kanserden öleceği öngörülmektedir.

Ülkemizde ise kanser verileri Sağlık Bakanlığı’na bağlı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı’nın 2004 yılı verilerine dayanmaktadır. En sık görülen kanser türleri erkeklerde akciğer, prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, over, mide ve pankreas kanserleri olarak sıralanmaktadır (173) .

2.4.2. Kanser Gelişimi

Tümör hücrelerinin oluşma ve yayılma mekanizmaları halen tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, dış faktörler (sigara, kimyasallar, radyasyon, enfeksiyon) ve iç faktörlerin (kalıtsal metabolizma mutasyonları, hormonlar, bağışıklık sistemi zayıflaması) etkili olduğu düşünülmektedir.

1) Tümör başlangıcı: Bir tek hücrenin çoğalmasına neden olan genetik değişikliğin (mutasyon) sonucudur.

2) Tümör ilerlemesi: Hücre çoğalmasına paralel olarak tümör hücrelerinden oluşan hücre topluluğu da giderek büyür ve bu topluluktaki diğer hücrelerde de mutasyonlar gelişir. Bazı mutasyonlar hücreye daha hızlı çoğalma gibi avantajlar kazandırır ve tümör klonu içerisinde baskın hale geçerler. Bu hücrelerin bazılarının da hızlı çoğalma, invazyon ve metastaz gibi özellikler kazanmasıyla avantajlı yeni bir hücre klonu ortaya çıktığından bu işleme klonal seçim adı verilir. Klonal seçim tümör gelişimi boyunca devam eder ve tümörler bu nedenle giderek daha hızlı çoğalarak malign özellik kazanırlar.

Vücutta mutasyona uğrayan hücrelerin ancak çok küçük bir kısmı kansere yol açar. Bu durum, mutasyona uğrayan hücrelerin yaşama kabiliyetlerinin normal hücrelere göre daha az olmasından kaynaklanmaktadır. Mutasyon gösteren hücrelerin pek çoğunda aşırı büyümeyi önleyen normal kontrol mekanizması bulunur, bu yüzden hayatta kalabilen mutant hücrelerin çok azı kanserli hücreye dönüşür (171) .

Sağlıklı doku tarafından çevrili tek bir kanser hücresi, diğer sağlıklı hücrelere göre çok daha yüksek oranda çoğalmaktadır ve daha fazla besin ihtiyacı bulunmaktadır. Tümör hücreleri, difüzyonla-sınırlı maksimum boyuta ulaşana kadar geçen sürede sağlıklı hücrelerin yerini almaktadır.

Besin açısından yetersiz bir çevrede bulunan tümör hücreleri programlı hücre ölümü (apoptozis) olayını başlatmazlar; ancak beslenmeleri için oksijen, glukoz,

amino asit gibi hücre fonksiyonu için gerekli yapı taşlarına ihtiyaç duymaktadırlar. Bu şekilde bazı tümör hücreleri bölünerek çoğalmaya devam ederken; bazıları ise besinlerin miktarının yetersizliği nedeni ile ölmektedir. Tümör hücreleri tarafından dolaşım sistemi ile daha güçlü bir bağlantı sağlayana kadar, proliferasyon ile hücre ölüm hızının birbirine eşit olduğu kararlı bir tümör büyüklüğüne ulaşılmaktadır (169) .

Tümörler difüzyonla-sınırlı maksimum boyuta ulaştıktan sonra gelişimlerini devam ettirebilmek için anjiyogenez olayı çok önemlidir ve bu durum kanser tedavisinde hedeflendirmede önem kazanmaktadır. Tümör hücreleri anjiyogenezi uyaran moleküller salgılama yeteneğindedirler. Oluşan yeni damarlar tümörün gelişimine katkı sağlamaktadır. Bazı tümör çeşitleri ise yeni damarlar oluşturma yeteğine sahip değildirler ve büyüklükleri difüzyonla-sınırlı maksimum boyutta kalmaktadır. Anjiyogenez sırasında yeni kan damarlarının oluşumu, anjiyogenezi inhibe eden moleküllerin üretimi ve salınması ile kendi kendine sınırlandırılmaktadır. Ancak, tümör hücrelerinde yeni kan damarlarının oluşumu sırasında, anjiyogenezin uyarılması ve inhibisyonu arasındaki dengenin bozulduğu düşünülmektedir (169) .

2.4.3. Kanser Tedavisinde Karşılaşılan Sorunlar

Kanser tedavisinde uygulanan yöntemler başlıca üç ana başlık altında toplanabilir:

- 1) Cerrahi Girişim
- 2) İlaçla Tedavi (Kemoterapi)
- 3) Işınla Tedavi (Radyoterapi)

Neoplastik hücreler, önce cerrahi olarak veya radyasyon tedavisi ile azaltılır veya gelişimi yavaşlatılır. Bunu kemoterapi, immunoterapi veya bu tedavi yöntemlerinin birlikte kullanılması takip eder .

En basit tanımı ile kanser kemoterapisi, tümörün büyümesini engelleyecek ve farklı odaklarda yeniden gelişmesini ve hatta tümüyle ortadan kaldırılmasını sağlayacak sitotoksik etki sağlamak amacıyla kanser hücrelerini öldüren veya çoğalmalarını kontrol altında tutan kemoterapötik ajanların kullanılması ile gerçekleştirilen bir işlemdir. Etkinliği; seçilen kematerapötik ilaçlar, hastanın genel durumu, dozaj şekli ve dozlama gibi pek çok faktöre bağlıdır. Günümüzde kemoterapinin başarı ile uygulanmasını engelleyen bir takım sorunlar vardır. Bu sorunlar temel olarak beş grupta incelenebilir (174) :

Dozaj Şekli: Genellikle antikanser ilaçlar oldukça hidrofobiktir ve klinik uygulamaları için kullanılan, suda çözünürlüklerini artırıcı maddeler ciddi yan etkilere yol açabilmektedir.

Farmakokinetik: Kullanılan ilacın dozu, tedavinin başarısında önemli bir etkindir. Kanser hücrelerinin, uygun zamanda ve istenilen bölgede, yeterli derecede etkinlik gösterecek kadar yüksek konsantrasyonda ve uzun süre boyunca antikanser ilaca maruz bırakılması ile ideal bir kemoterapi sağlanabilecektir.

Hem normal hücreler hem de tümör hücreleri çeşitli evrelerden geçerek gelişirler. Sadece çoğalmakta olan hücrelere etkili olan kemoterapötik ilaçlara, “döngüye spesifik ilaçlar” denir. Döngüye spesifik olmayan ilaçlar, çoğalmakta olan hücrelere daha etkili olmalarına karşın büyüme hızı düşük olan tümörlerin tedavisinde etkilidirler. Bu nedenle, etkin kemoterapinin sağlanabilmesi için kanser hücre sitokinetikleri dikkate alınmalı ve hücre siklusuna özgü antikanser ilaçlar için dozlama rejimi, tümör hücre ölümünün maksimum, sağlıklı hücrelerinkinin ise minimum olacağı zamana göre ayarlanmalıdır (175) .

Toksisite: Genel olarak kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar, hücre siklusları boyunca daha hızlı bir geçişe sahip olan kanser hücrelerinde normal hücrelere kıyasla daha etkilidirler. Ancak, kemik iliği ve barsak epitel hücreleri gibi hızlı bir hücresel döngüye sahip hücreler ciddi şekilde etkilenebilmektedirler. Bu nedenle

kemoterapinin devamının sağlanabilmesi amacı ile destekleyici tedavi önem kazanmaktadır (170,176) .

Kemoterapötik ilaçların etkilerini sadece tümör hücrelerinde gösterip sağlıklı hücrelere daha az etki etmeleri hedeflenmektedir. Bu doğrultuda, antikanser ilaçlar için hedeflendirilmiş taşıyıcı sistemler geliştirilmeye çalışılmaktadır ve bu alanda bilimsel çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir. Belirli antikanser ilaçlar için hedeflendirilmiş taşıyıcıların geliştirilmesinde, fizikokimyasal prensipler (yüzey yükü, hidrofoboklığı ve diğer etkileşmeler), biyolojik/tıbbi bilgi (ligand/reseptör etkileşmeleri) ve tümör özellikleri dikkate alınmaktadır (177) .

İlaç Direnci: Kemoterapide gelişmeler elde edilmesine rağmen, uzun dönem uygulamada kanser hücreleri tarafından ilaç direnci gelişimine bağlı başarısızlıklar elde edilmektedir. Bu ilaç direnci klinik olarak tümör boyutunda azalmanın gözlenmemesi veya antitümör tedavisine başlangıçtaki pozitif cevaptan sonra hastalığın yeniden nüksetmesi şeklinde ortaya çıkabilmektedir.

İlaç direnci mekanizmaya bağlı olarak üç kategoriye ayrılmaktadır: Tümör bölgesinde düşük ilaç konsantrasyonuna bağlı farmakokinetik direnç, az miktarda tümör hücresinin duyarlı durumda bulunmasına bağlı kinetik direnç ve tümör hücrelerinin ilaca biyokimyasal direncine bağlı genetik direnç. Pratikte klinik onkolojide çeşitli ilaç etkileşmeleri gözlenmesine rağmen, genellikle kombinasyon tedavisi uygulanmaktadır.

Belirli moleküler yapı gösteren birçok ilaç türüne karşı direnç gelişebilmektedir (örneğin çoklu ilaç direnci). Bu hücrelerde gözlenen azalmış ilaç birikiminin, hücre zarındaki P-gp'nin aşırı ekspresyonuna bağlı olduğu bulunmuştur. Böbrek, karaciğer, kolon ve uterus epitelinde ve adrenal bezde indüklenebilir şekilde P-gp sentezlenmektedir ve bu glikoprotein toksik maddelerin hücreden dışarı çıkmasına neden olabilmektedir (178) .

Mikro dolaşım bariyeri: Terapötik ilaçların ilk önce tümör kan damarlarına, damar duvarından interstisyuma ve son olarak interstisyumda ilerleyerek tümör hücrelerine ulaşmaları gerekmektedir. Ancak, ilaç moleküllerinin tümör hücrelerine ulaşmalarını engelleyen fizyolojik bariyerler bulunmaktadır. Şöyle ki; nekrotik veya yarı-nekrotik bölgeler içeren heterojen tümör vaskülarizasyonu, interstisyel hipertansiyon, ilacın tümöre ulaşması için interstisyumda aşılması gerekli mesafenin uzunluğu gibi faktörler, terapötik ilaç moleküllerinin tümöre zayıf taşınmasında rol oynamaktadır (179) .

2.4.4. Kalın Barsak Kanseri (Kolorektal Kanseri)

Kalın barsak, sindirim sisteminin son kısmını oluşturmaktadır, kalın barsakta oluşan kanserler genel olarak kolorektal kanserler olarak da isimlendirilmektedir. Kalın barsağın son kısmı olan rektumda oluşursa rektum kanseri, daha önceki kısımlarında oluşursa kolon kanseri olarak isimlendirilir. Kalın barsak kanserleri erkeklerde akciğer ve prostat kanserinden sonra, kadınlarda ise meme ve akciğer kanserinden sonra en sık görülen kanserlerdir. Genellikle elli yaşından sonra görülür ama daha erken yaşlarda da görülebilir. Nedeni kesin olarak bilinmemektedir.

Tümörün yerleştiği yere ve hastalığın evresine göre tedavi seçenekleri vardır.

Cerrahi: Hastalığın en önemli tedavisi, tümörün barsağın sağlıklı bir kısmı ile birlikte çıkartılmasıdır. Bununla birlikte ilgili bölgesel lenf bezleri de çıkartılır. Tümörün yerleşim yerine göre bazı durumlarda geçici veya kalıcı kolostomi denilen barsağın karına açılma işlemi yapılması gerekebilir.

Kemoterapi: Cerrahi tedaviden sonra riskli kişilerde hastalığın yinelenmesini önlemek veya hastalığın metastaz denilen yayılma olayını gösterdiği hastalarda kontrolü için, kemoterapi denilen serumla veya ağızdan alınan ilaç tedavisi yapılabilir.

Bunun yanında günümüzün modern kanser tedavisi olan “hedefe yönelik tedavi”, kolorektal kanserlerde uygulanmaktadır. Burada amaç, kanserin oluşumuna neden olan mekanizmaların işleyişini önlemektir. Hücrenin kontrolsüz çoğalmasına yol açan mekanizmaların veya tümörün beslenmesi ve yayılması için oluşturduğu damarlanmanın önlenmesi amaçlanmaktadır.

Radyoterapi: Cerrahiden önce veya sonra hastalığın yayılmasını ve yinelenmesini önlemek için yapılan ışın tedavisidir (180) .

2.4.5. Kanser İlaçlarının Sınıflandırılması

Kanser tedavisinde yararlanılan ilaçlar daha farklı mekanizmalarla da etki göstermektedirler. Tablo 2.4’de bu ilaçların sınıflandırılması verilmektedir.

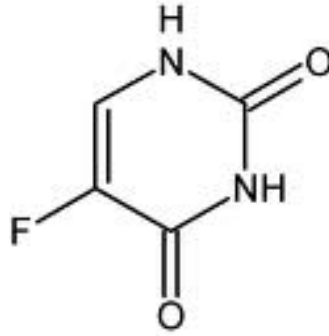
Tablo 2.4. Kanser ilaçlarının sınıflandırılması (181)

Antimetabolitler	Antibiyotikler	Alkilleyici ilaçlar
Sitarabin Fludarabin 5-Florourasil 6-merkaptopürin Metotraksat 6-Tiyoguanin	Bleomisin Daktinomisin Daunorobisin Doksorubisin İdaurubisin Plikamisin	Korbustin ve Lomustin Siklofosfamid Mekloreタミン Streptozotosin
Mikrotübül İnhibitörleri	Steroid Hormonlar ve Antagonistleri	Diğerleri
Novelbin Paklitaksel (Taksol) Vinblastin	Amino glutetimidler Estrojenler Flutamid Prednizon Löprolid	Asparaginaz Sisplatin Kaboplaün Estopozid İnterferonlar Radyoaktif izotoplar

2.5. 5-Fluorourasil (5-FU)

2.5.1. Yapısı ve Fizikokimyasal Özellikleri

5-Fluorourasil, 1957 yılında Dr. Charles Heidelberger tarafından tasarlanıp sentezlenmiş, 5 pozisyonunda flor bulunan bir primidin analogudur (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. 5-Fluorourasil'in molekül formülü (182)

Molekül ağırlığı 130.1 g/mol olup beyaz, kokusuz, kristalize bir tozdur. Kloroform, benzen ve eterde çözünmez, sudaki çözünürlüğü 12.2 mg/ml'dir (183) .

2.5.2. Analiz Yöntemleri

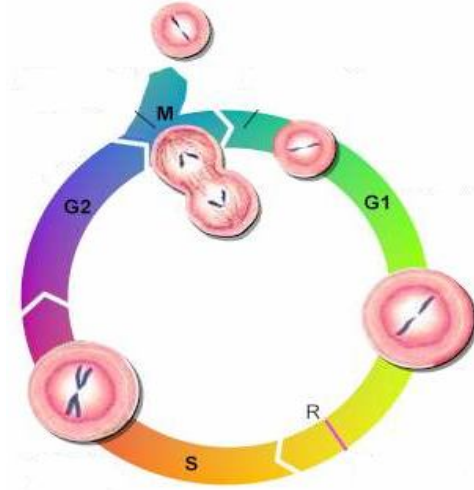
5-FU; kromatografik, spektrofotometrik, mikrobiyolojik ve titrimetrik yöntemler ile analiz edilebilir (184) . Ultraviyole (UV) spektrofotometre, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (184) , gaz-sıvı kromatografisi (185) , ince tabaka kromatografisi (186) , mikrobiyolojik (187) ve titrimetrik (182) yöntemler ile yapılan analiz çalışmaları literatürde kayıtlıdır.

2.5.3. Etki Mekanizması ve Endikasyonları

5-Fluorourasil, bazı tümör türlerinde hücrelerin, primidin bazı olan urasili normal vücut hücrelerine göre daha fazla kullandığının gözlenmesi üzerine sentez edilmiş bir ilaçtır (188) . 5-FU'in aktif metabolitleri olduğu bilinen bazı nükleotidlere

dönüşümü sonucu, birden fazla mekanizma ile sitotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir (189) . Sitotoksik etkili aktif metabolitlerin ilk basamağı fluoroüridin trifosfat olup, RNA ile birleşerek, onun sentez ve fonksiyonlarını engellemekte, aktif metabolitlerden ikincisi olan 5-fluorodeoksiüridilat monofosfat, timidilat sentetaz isimli enzimi bağlayarak DNA sentezini önlemekte, üçüncü bir toksik metabolit, 5-fluorodeoksiüridilat trifosfat ise doğrudan DNA'ya bağlanarak zincir uzamasını inhibe etmektedir (190) .

5-FU hücre siklusundaki S fazına etkilidir (Şekil 2.19). Bu nedenle çoğalan hücreler üzerinde, istirahat halindekiyle göre daha fazla sitotoksik etki yapar; fakat döneme-özü olma özelliğı diğeri antimetabolit ilaçlarındaki kadar belirgin değildir (174) .



Şekil 2.19. Hücre büyüme siklusu (174)

Fluorourasil tümörlerin tedavisinde endikedir. Yaygın kolorektal kanser ve meme kanserinin tedavisinde tek başına kullanılabilir (191) . Ayrıca over, mesane, uterus serviksi, endometriyum, prostat, baş ve boyun, pankreas ve karaciğer kanserinin tedavisinde yararlı olabilir (188,192-193) . Cildin bazal hücreli kanserinde ve baş-boyun bölgesindeki aktinik keratozlarda % 2 veya 5 oranında ilaç içeren merhem şeklinde lokal uygulanır. Yine şiddetli psöriyaziste etkilidir. 5-FU potent bir radyasyon duyarlaştırıcısıdır. Bu yüzden lokal ilerlemiş baş-boyun, özefagus, akciğer

ve rektum tümörlerinin primer tedavisi için radyoterapi ile eş zamanlı olarak kullanılabilir (174,194) .

2.5.4. Farmakolojisi ve Farmakokinetiği

5-FU oral, intravenöz, intraarteriyel, intraperitoneal olarak kullanılabilmekte, veriliş yoluna göre klinik etkinlik ve toksisite tablosu değişiklik göstermektedir. Oral biyoyararlanımının değişkenliği nedeni ile ağız yolundan ziyade, intravenöz enjeksiyon veya infüzyon şeklinde uygulanır. Genel kullanım yolu olan intravenöz yoldan verildiğinde kolayca vücut sıvılarına geçebilirken, yarı ömrü 10 dk kadar sürüp insandan insana değişmektedir (195) . Bolüs uygulama sonrası plazmada en yüksek düzeyine ulaşan 5-FU, atılımının % 80'ini gerçekleştiren karaciğer ve ekstrahepatik dokularca dihidroflorourasile dönüştürüldüğünden, kandaki seviyesi hızla düşer. Enjeksiyonu takiben 6 saat içinde plazma 5-FU seviyesi sitotoksik etki için eşik değer olan 1 μ M'ın altına indiğinden, uzun süreli sitotoksik etki için infüzyon şeklinde uygulama tercih edilen bir yoldur (190) .

Verilen 5-FU'in % 80'inden fazlası, özellikle karaciğerde dihidroflorourasile dönüştürülerek atılırken, kalanı değişmeksizin idrarla atılmaktadır. Karaciğerden sonra en fazla metabolize olduğu organlar ise böbrekler ve gastrointestinal mukozadır (190) .

2.5.5. Yan Etkileri ve Toksisitesi

5-FU' nun başlıca yan etkileri anoreksi, bulantı ve kusma gibi gastrointestinal bozukluklar ve kemik iliği depresyonudur.

Primer klinik toksisitesi, hızlı bölünen dokularda, kemik iliği, oral ve intestinal mukozada gözlenmektedir. Lökosit ve trombosit sayılarında düşme 4-7 günde başlamakta, ilaç kesildikten iki hafta sonra normal seviyelere dönmektedir. Gastrointestinal toksisite belirtisi olarak diyare, bulantı ve kusmayı takiben sıklıkla gözlenen bir bulgudur.

İnfüzyon şeklinde uygulandığı takdirde toksisite bulguları değişiklik göstermekte olup, hematolojik bulgular normal değerlerde kalırken, gastrointestinal toksisite ön plana çıkmakta, nadir olarak kardiyotoksik veya nörotoksik bulgulara da rastlanabilmektedir (190) .

2.5.6. Stabilitesi

5-FU'in kuvvetli alkali ortamlarda üre, florid ve aldehide hidroliz olduğu, hidroliz ürünlerinin ileri aşamalarda amonyak ve CO₂'ye dönüştüğü belirtilmiştir (196) .

Kemoterapötik ilaçlar uzun süreli tedavide genellikle intravenöz infüzyon ile uygulanır. Bu nedenle stabilitelerinin bilinmesi gerekir. 5-FU ile yapılan stabilite çalışmalarından birisinde, 5-FU içeren % 5 dekstroz çözeltisi, elastomerik ve PVC kaplarda 5°C'de saklandığında, 16 hafta süresince, 5-FU stabilitesinde değişiklik gözlenmediği belirtilmiştir. Her iki kap da, oda sıcaklığında 1 hafta saklandığında ise, özellikle PVC kaplarda su kaybı nedeni ile 5-FU konsantrasyonunda artış olduğu gösterilmiştir (197) . Başka bir benzer çalışmada da, PVC ambalajların 5-FU stabilitesi üzerinde kısıtlayıcı faktör olduğu belirtilmiştir (198) .

5-FU'in PVC kapların yanı sıra cam kaplarda oda sıcaklığında ve ışıktan korumadan stabilitesinin incelendiği bir çalışmada ise, 5-FU içeren % 5 dekstroz çözeltisinin plastik kaplarda daha stabil olduğu, raf ömrünün cam kaplarda 8 saat iken, plastik kaplarda 48 saat olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 5-FU stabilitesinin her iki kapta da bifazik azalma gösterdiği, cam kaplarda başlangıçtaki azalmanın daha hızlı olduğu ve bu durumun cam yüzeyine adsorbsiyondan ileri geldiği açıklanmıştır (199) .

Vincke ve ark. ise 5-50 mg/ml konsantrasyonlarda 5-FU içeren % 0.9 NaCl çözeltisi hazırlamışlar, PVC ve cam kaplarda, oda sıcaklığında 42 gün stabilitesini koruduğunu, 5 mg/ml konsantrasyondaki çözeltinin buzdolabında 13 haftaya kadar stabil kaldığını; 1 haftalık ek sürede de stabilitesinin değişmediğini, ancak PVC

kaplarda oda sıcaklığında su kaybı nedeni ile 5-FU konsantrasyonunda artış gözlemlendiğini belirtmişlerdir (200) . Mannot ve ark. tarafından da bahsedilen çalışmaların sonuçlarını destekleyen bulgular elde edilmiştir (198) .

2.5.7. Piyasa Preparatları

Tablo 2.5’ de 5-FU içeren FDA onaylı değişik dozaj şekillerinin listesi görülmektedir.

Tablo 2.5. 5-FU içeren ticari ürünler (201)

Ürün Adı	Firma	Dozaj Şekli	5-FU Oranı
Fluoroplex®	Allergan Herbert	Krem	% 1
Carac®	Sanofi Aventis Us	Krem	% 0.5
Fluorouracil®	Spear Pharms	Krem	% 5
Fluorouracil®	Taro	Krem	% 5
Efudex®	Valeant Pharm Intl	Krem	% 5
Fluorouracil®	App Pharms	Enjektabl	50 mg/mL
Fluorouracil®	Bioniche Pharma	Enjektabl	50 mg/mL
Fluorouracil®	Ebewe Pharma	Enjektabl	50 mg/mL
Fluorouracil®	Teva Parenteral	Enjektabl	50 mg/mL
Fluorouracil®	Valent	Enjektabl	50 mg/mL
Fluorouracil®	Taro	Topikal Çözelti	% 2
Fluorouracil®	Taro	Topikal Çözelti	% 5
Efudex®	Valeant Pharm Intl	Topikal Çözelti	% 2
Efudex®	Valeant Pharm Intl	Topikal Çözelti	% 5

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araçlar ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Diklorometan	Merck, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Riedel De Haen, Almanya
PEG-PPG-PEG (Pluronic® F-108)	Sigma, Almanya
PEG-PPG-PEG (Pluronic® F-68)	Sigma, Almanya
5-Fluorourasil	Ebewe Pharma, Avusturya
PLGA (50:50) (M.A: 12500-30000 Da) (Resomer RG 502 H)	Boehringer Ingelheim, Almanya
PLGA (50:50) (M.A: 34000 Da)	Medisorb, Merck Dupont, ABD
PLA (M.A: 75000-120000 Da)	Sigma, Almanya
PLA (M.A: 10000 Da)	Wako, Japonya
Metiltiyazoliltetrazolyum (MTT)	Sigma, ABD
Ultra saf su	Millipore, ABD
“Dulbecco’s Modified Eagle’s / Ham’s F12” (DMEM/Ham’s F12) (1:1)	Biochrom AG, Almanya
Fetal sığır serumu (FBS)	Biochrom AG, Almanya
Penisilin/Streptomisin (10000U/10000µg/mL)	Biochrom AG, Almanya
Tripsin – EDTA çözeltisi	Biochrom AG, Almanya
Sodyumdodesil sülfat (SDS)	J.T. Baker, Hollanda
Dimetilformamid (DMF)	J.T. Baker, Hollanda
Etanol	Tekel, Türkiye

Biyolojik Materyal

Caco-2 insan kolon karsinoma hücre hattı	ATTC (American Type Tissue Cell Culture Collection – ABD)
--	---

3.1.2. Kullanılan Aletler

Diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC)	Q 100, TA Instruments, ABD
ELISA Okuyucu	ASYS-UVM 304, Avusturya
Hücre kültürü için flask	Greiner bio-one, Almanya
Steril pipet	Greiner bio-one, Almanya
Steril santrifüj tüpü	Greiner bio-one, Almanya
İnkübatör	Sanyo MCO-18AIC, Japonya
Laminar hava akımlı kültür kabini	BHG 2000 S/D, D: Group Company, İtalya
Liyofilizatör	Heto PowerDry PL 3000, Danimarka
Membran filtre	Millipore, ABD
Hassas terazi	Shimadzu AX 200, Japonya
FT-IR spektrofotometresi	Perkin Elmer FT-IR Spektrofotometresi, Almanya
Kapiller erime derecesi tayin cihazı	Thomas Hoover Melting Point Apparatus, ABD
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Mekanik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Vorteks	Nuvmix, ABD
Yatay çalkalayıcılı su banyosu	Memmert, Almanya
Optik mikroskop	Leica DFC 320, Almanya
pH metre	Sartorius PP-20, Almanya
Santrifüj aleti	Hermle Z323, Almanya
Ultrasonik prob	Bandelin D-12207, Almanya
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	Jeol – SEM 6400, Japonya
Ultrasonik banyo	Branson B 220 Smith Kline, ABD
Ultra saf su sistemi	Simplicity 185-Millipore, ABD
UV spektrofotometre	UV-1800, Shimadzu, Japonya
Partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel tayin cihazı	Zetasizer Nanoseries-ZS, Malvern, İngiltere

3.2. Yöntemler ve Deneyler

3.2.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

3.2.1.1. Ultraviyole (UV) Spektrumu

Nanopartikül formülasyonlarına hapsedilen etkin maddenin miktar tayini, in vitro salım çalışmaları ve stabilite deneylerinin sonuçlarının değerlendirilmesinde spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla, etkin madde 5-FU'in, distile suda ve PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi, pH 7.4) çözeltisinde, $\lambda=200-400$ nm aralığında, UV-1800 Shimadzu Ultraviyole Spektrofotometresi (Kyoto, Japonya) kullanılarak UV spektrumu çekilmiş ve maksimum dalga boyu ($\lambda_{\max}$) belirlenmiştir.

3.2.1.2. Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spektrumu

5-FU'in FT-IR spektrumu, ATR (attenuated total reflectance) kullanılmak suretiyle, Perkin Elmer FT-IR system-spektrum BX-IR spektrofotometresinde (Überlingen, Almanya), $400-4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında alınmış olup dalga sayısı cm^{-1} cinsinden değerlendirilmiştir.

3.2.1.3. Erime Derecesi Tayini

Erime derecesi tayini için 5-FU kılcal tüp içerisine konulmuş ve “Thomas Hoover Capillary Melting Point Apparatus” kapiller erime derecesi tayin cihazı (Philadelphia, ABD) ile analiz gerçekleştirilmiştir. Tüpler cihaza yerleştirildikten sonra beklenen erime derecesinin $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ altına kadar hızlı ısıtma yapılmış, bu seviyeden sonra sıcaklık daha yavaş yükseltilerek etkin maddenin erimeye başladığı sıcaklık ile erimenin tamamlandığı sıcaklık aralığı kaydedilmiştir.

3.2.1.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Termogramı

Diferansiyel taramalı kalorimetri yöntemi (*Differential scanning calorimetry, DSC*) kimyasal maddelerin termodinamikleri, stabiliteleri ile moleküler yapılarının tayini ve incelenmesi gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Tez çalışmamız kapsamında da 5-FU'in termal özelliklerinin incelenmesi için DSC termogramı çekilerek erime dereceleri tayin edilmiştir. Termogramların çekilebilmesi için standart küçük hacimli alüminyum örnek kaplarına tam tartılmış 5-FU, 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 (USA)
- Atmosfer: Azot (50 mL/dk)
- Başlangıç ve bitiş sıcaklıkları: 25-300 °C
- Sıcaklık yükseltme ve soğutma hızı (Ramp time): 10 °C/dk
- Standart: Alüminyum pan

3.2.2. Etkin Maddenin Spektrofotometrik Miktar Tayini

3.2.2.1. Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması

5-FU'in distile su ve PBS (pH 7.4) çözeltisindeki kalibrasyon doğruları; bu çözücülerde 200 µg/ml konsantrasyonda hazırlanmış olan altı adet stok çözeltiden hareketle elde edilmiştir. Her bir stok çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 2-12 µg/ml konsantrasyon aralığında altı standart çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin absorbansları 266 nm'de okunmuştur. Bulunan absorbans değerleri kullanılarak, konsantrasyona karşı absorbans grafikleri elde edilmiştir. Bu grafiklerden elde edilen kalibrasyon doğru denklemleri lineer regresyon analizi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, tayini yapılacak olan etkin maddenin miktar tayin yönteminin istenilen amaca yönelik olduğunu, uygulama bakımından doğru, kesin bir şekilde ve sürekli olarak kullanılabilirliğini göstermek için uygulanan bir işlemdir. Farmasötik preparattaki etkin maddenin tayininde kullanılacak analitik bir yöntem validasyonunun performans kriterleri şunlardır:

- Özgünlük (Specificity)
- Doğrusallık (Linearity)
- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precision)
 - Tekrar edilebilirlik (Repeatability)
 - Tekrar elde edilebilirlik (Reproducibility)
- Stabilitate (Stability)

3.2.2.2.1. Özgünlük

5-FU için kullanılan analitik yöntemin (UV spektrofotometri) maddeye özgün olduğunu kanıtlamak, nanopartiküller ya da çözücüler içindeki bileşenlerin ölçüm yapılan dalga boylarında 5-FU ile girişim yapan bir absorbands vermediğini göstermek amacıyla, çözündürülen boş (etkin madde içermeyen) nanopartiküllerin ve çözücülerin (PBS, diklorometan) UV spektrumları incelenmiştir.

3.2.2.2.2. Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, deney bulgularının örnek içindeki etkin madde konsantrasyonu ile olan ilişkisinin belli bir aralıkta doğrusal olduğu anlamına gelir. Analitik yöntemin doğrusallığını belirlemek amacıyla altı adet 200 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltiden hareketle gerekli seyreltmeler yapılarak 2, 4, 6, 8, 10, 12 µg/ml konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmış ve absorbandsları

ölçülmüştür. Çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı absorbens değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon doğrularının denklemleri elde edilmiştir (202) .

3.2.2.2.3. Doğruluk

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem yardımıyla bulunan sonuçlar ile, elde edilen deney sonuçları arasındaki uygunluk veya yakınlığın derecesidir. Analitik bir yöntemin doğruluğunun tespiti için en az üç farklı konsantrasyonda, her bir konsantrasyon değerinde en az beş seri çözelti hazırlanarak ölçümlerin yapılması gerekmektedir (203) . Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunu göstermek için altı farklı konsantrasyonda (2, 4, 6, 8, 10, 12 µg/ml) hazırlanmış olan altışar adet çözeltinin absorbensları ölçülmüştür. 5-FU'in miktar tayini amacıyla kullanılan analitik yöntemin doğruluğunun araştırılması için aşağıdaki formül kullanılmıştır (204) .

$$\text{Doğruluk (\% ortalama bağıl hata)} = (X - Y) / Y \times 100 \text{ (Formül 3.1)}$$

X= Ölçülen konsantrasyon (µg/mL)

Y= Hazırlanan konsantrasyon (µg/mL)

3.2.2.2.4. Kesinlik

Belirlenen şartlarda yapılan bağımsız test sonuçları arasındaki uyumu ifade eden bir validasyon kriteridir. Standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) ile ifade edilen analitik yöntem kesinliği, istatistiksel olarak anlamlı sayıda aynı konsantrasyondaki örneklerin absorbens değerlerinin art arda ölçülmesi ile değerlendirilir. Kesinlik, normal deney koşulları altında bir analitik yöntemin tekrar edilebilirlik (repeatability) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) derecesinin ölçüsüdür (205) .

Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin değerlendirilmesi için farklı konsantrasyonlarda (2, 4, 6, 8, 10, 12 µg/ml) hazırlanan altı ayrı standart çözeltinin absorbansları altışar kez üst üste okunarak kaydedilmiştir.

Tekrar elde edilebilirliğin incelenmesinde ise, aynı stoktan hareket edilerek seyreltmeyle 2, 4, 6, 8, 10, 12 µg/ml konsantrasyon değerlerinde altışar adet çözelti hazırlanarak bu çözeltilerin absorbansları birer defa ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucunda bulunan değerlerden kalibrasyon doğrusu yardımıyla konsantrasyonlar hesaplanarak, SS ve VK bulunmuştur. Analitik yöntemin tekrar elde edilebilir olduğunun kabul edilebilmesi için VK'nın % 2'den küçük olması gerekmektedir (205) .

3.2.2.2.5. Stabilité

5-FU'in stabilitesini incelemek amacıyla PBS (pH 7.4) kullanılarak, 10 µg/mL konsantrasyonda 5-FU çözeltisi hazırlanmış ve 37±0.5 °C'de saklanmıştır. 30. dk, 1., 2., 4., 8., 12., 24., 48. ve 72. saatlerde, çözeltinin etkin madde miktarı 266 nm'de ölçülmüş, % kalan 5-FU değerleri karşılaştırılarak 5-FU'in stabilitesi araştırılmıştır.

3.2.3. Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Bu bölümde, tez çalışmalarımızda kullanılan polimerler olan PLA₁ [(M_w=75000-120000 Da)], PLA₂ [(M_w=10000 Da)], PLGA ve PEG-PPG-PEG'e ilişkin fizikokimyasal özellikleri incelemek amacıyla yapılan FT-IR çalışmaları ve DSC analizleri ile ilgili bilgi verilecektir.

3.2.3.1. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

Kullanılan polimerlerin FT-IR spektrumu, ATR (attenuated total reflectance) kullanılmak suretiyle Perkin Elmer FT-IR system-spektrum BX-IR

spektrofotometresinde (Überlingen, Almanya), 400-4000 cm^{-1} aralığında alınmış olup dalga sayısı cm^{-1} cinsinden değerlendirilmiştir.

3.2.3.2. DSC Termogramlarının İncelenmesi

Kullanılan polimerlerin termal davranış özelliklerinin incelenmesi amacıyla DSC termogramları çekilmiştir. Polimerler için alüminyum örnek kapları kullanılmıştır. Örnek kabının yüzeyini tamamen kaplayacak kadar polimer örneği hassasiyetle tartılmış ve kaplar kapatıldıktan sonra analiz gerçekleştirilmiştir.

DSC çalışmalarında kullanılan analiz şartları aşağıda verilmiştir;

- Cihaz: DSC Q100 TA (USA)
- Atmosfer: Azot (50 mL/dk)
- Başlangıç ve bitiş sıcaklıkları: 25-300 °C
- Sıcaklık yükseltme ve soğutma hızı (Ramp time): 10 °C/dk
- Standart: Alüminyum pan

3.2.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

3.2.4.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Çalışmalarımızda emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi çeşitli modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır (41) . Kullanılan polimerler ve yöntemde yapılan modifikasyonlara ilişkin bilgiler aşağıda sunulmuştur.

Nanopartikül formülasyon çalışmalarında;

- 75000-120000 Da molekül ağırlıklı PLA,
- 34000 Da molekül ağırlıklı, kopolimer oranı 50:50 olan PLGA ve
- 12500-30000 Da molekül ağırlıklı, kopolimer oranı 50:50 olan PLGA kullanılmıştır.

Pegilasyon amacıyla kullanılan ve triblok kopolimer olan PEG-PPG-PEG'in iki farklı molekül ağırlığındaki tipleri (8400 ve 14600) kullanılmıştır (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Ön formülasyon çalışmalarında kullanılan polimerler ve kullanım oranları

Kullanılan Polimer (x)	Kullanılan Blok Polimer(y)	Oran (x:y)
PLA ($M_w=75000-120000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:8400$)	1:1
		1:2
		1:3
		1:4
		1:5
		1:10
PLA ($M_w=75000-120000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:14600$)	1:1
		1:2
		1:3
		1:4
		1:5
		1:10
PLGA ($M_w=34000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:8400$)	1:1
		1:2
		1:3
		1:4
		1:5
		1:10
PLGA ($M_w=34000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:14600$)	1:1
		1:2
		1:3
		1:4
		1:5
		1:10
PLGA ($M_w=12500-30000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:8400$)	1:1
		1:2
		1:3
		1:4
		1:5
		1:10
PLGA ($M_w=12500-30000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:14600$)	1:1
		1:2
		1:3
		1:4
		1:5
		1:10

* M_w : Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı

M_n : Sayıca ortalama molekül ağırlığı

Nanopartikül üretim yöntemi olarak emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi, istenen boyutlarda ve küresel yapıda nanopartikül üretilmesini sağladığı için tercih edilmiştir. Literatürde, emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma tekniğine ilişkin formülasyon çalışmalarında yer alan deney koşullarının standardizasyonu dikkate alınarak, optimum koşullar tespit edilmeye çalışılmıştır. Oluşan yapıların küresel olup olmadıkları araştırılmıştır. Yapıların küreselliklerinin kontrolünde bilgisayar sistemine bağlı Leica DFC 320 optik mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) fotoğrafları kullanılmıştır.

Ön formülasyon çalışmalarına temel olarak, seçilen yöntemin iki farklı şekilde modifiye edilmesi ile başlanmıştır (41) .

Yöntem :

- PLA/PLGA ve PEG-PPG-PEG diklorometanda çözülmüş,
- gerekli miktarda su eklenmiş,
- vorteks yardımıyla karıştırılmış,
- Y/S emülsiyonunu oluşturmak amacıyla belli bir süre sonikasyon uygulanmış ve
- oda sıcaklığında karıştırılarak nanopartikül süspansiyonu oluşturulmuştur.

Seçilen yönteme ilişkin;

- kullanılan dış faz (su) miktarı,
- homojenizasyon (ultrasonik prob ile) süresi,
- kullanılan dış fazın (su) sıcaklığı,
- karıştırma süresi,
- polimer-triblok kopolimer oranı

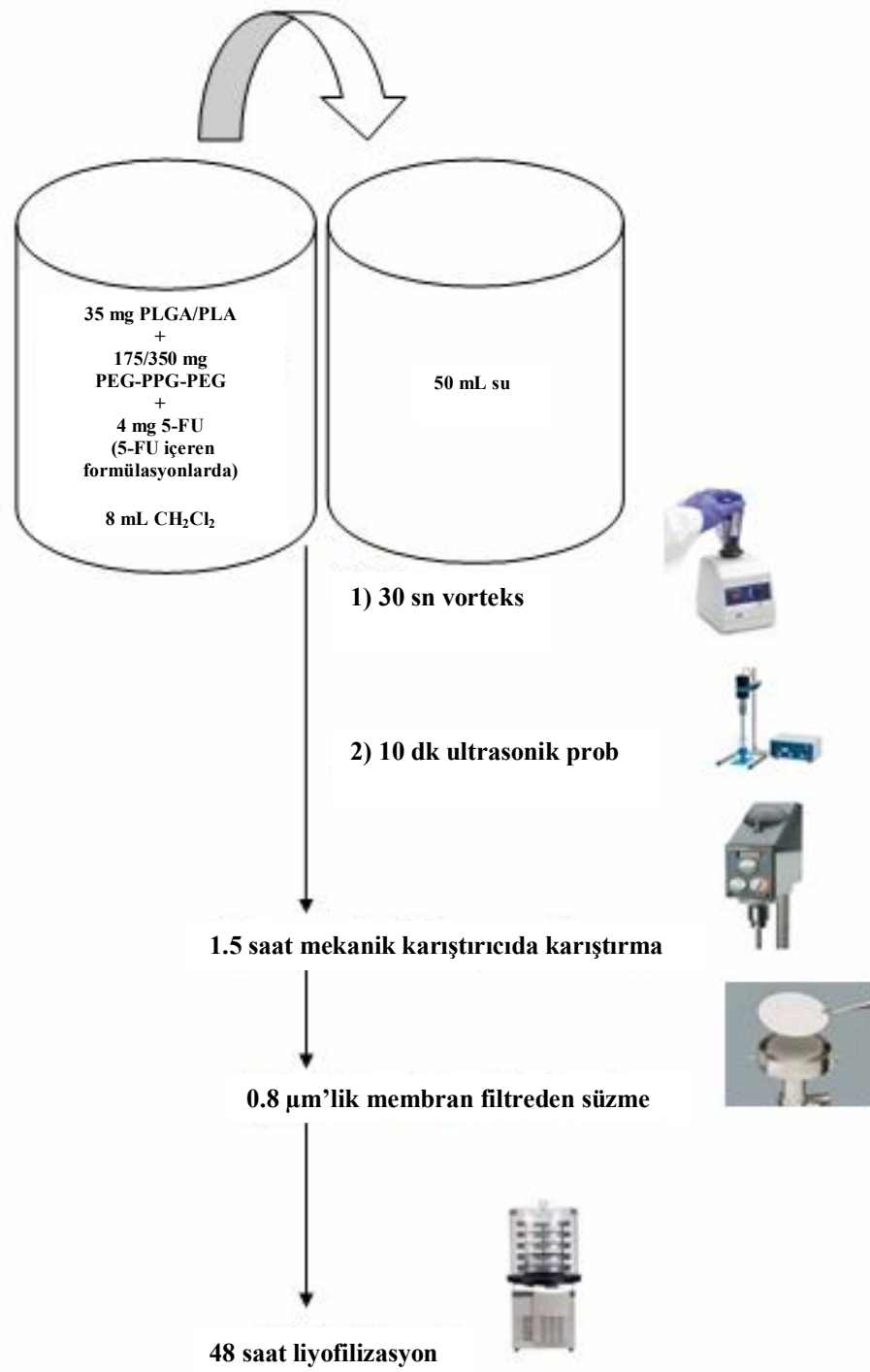
parametrelerinde literatür verileri de (41) dikkate alınarak farklı düzenlemeler yapılmış ve ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2. İlaç İçermeyen PLA/PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Bu amaçla (35 mg) PLA/PLGA tartılmış, üzerine 5 katı ve 10 katı olmak üzere iki farklı miktarda PEG-PPG-PEG eklenmiştir. Polimer karışımı 8 mL diklorometanda çözülmüş ve (50 mL) suya ilave edilmiştir. Emülsiyon oluşturmak amacıyla 30 sn vortekslenmiş ve daha sonra 10 dk ultrasonik prob yardımıyla sonikasyona tabi tutulmuştur. Nanopartiküllerin oluşumu ve çözücünün uzaklaştırılması için 1500 rpm hızda çalışan mekanik karıştırıcıda 1.5 saat karıştırılmış, daha sonra 0.8 µm'lik membran filtre kullanılarak süzümüştür (Şekil 3.1). Elde edilen yarı saydam görünümdeki nanopartikül süspansiyonu liyofilize edildikten sonra üretilen nanopartiküller cam flakonlarda, ışıktan korunarak buzdolabında saklanmışlardır.

3.2.4.3. Etkin Madde Yüklü PLA/PLGA Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Etkin madde yüklü nanopartiküllerin hazırlanması için boş PLA/PLGA nanopartiküllerinin hazırlama yöntemi aynen uygulanmış, organik faza 4 mg 5-FU eklenerek etkin madde yüklü PLA/PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil. 3.1. Emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının üretim şeması

3.2.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

Emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyonu amacı ile morfolojik özellikleri, partikül büyüklüğü tayini yapılmış, üretim verimi ve nanopartiküllere yüklenen 5-FU miktarı hesaplanmıştır. Ayrıca, nanopartiküllerin DSC ile termal özellikleri de araştırılmıştır. Üretilen nanopartiküllerden 5-FU'in salımının incelenmesi ve salım özelliklerinin değerlendirilebilmesi için in vitro salım çalışmaları yapılmıştır.

3.2.5.1. Morfolojik Özellikler

Etkin madde yüklü olan ve olmayan nanopartiküllerin yüzey özellikleri SEM kullanılarak incelenmiştir. Nanopartikül örnekleri, pirinç levhalar üzerine çift tarafı yapışkan bantla sabitlenerek, kaplama cihazında altın ile kaplanmıştır. Uygulanan kaplama işlemi sonrasında örnekler SEM cihazına (Nova Nano SEM 430) yerleştirilmiştir. Örneklerin incelenmesi sırasında 20 kV'luk voltaj uygulanmış ve farklı büyütme oranlarında nanopartiküllerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.5.2. Partikül Büyüklüğü Tayini

Hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklükleri ışık saçılımı prensibine göre çalışan Malvern Zetasizer Nano ZS (İngiltere) ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak 25 °C 'de yapılmıştır.

3.2.5.3. Zeta Potansiyel Tayini

Hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel ölçümleri Malvern Zetasizer Nano ZS (İngiltere) ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak 25 °C 'de yapılmıştır.

3.2.5.4. Nanopartiküllerin Üretim Verimi

Nanopartiküllerin üretiminde kullanılan emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yönteminin etkinliğinin değerlendirilmesi amacı ile hazırlanan formülasyonların üretim verimi hesaplanmıştır. Bu amaçla, her bir serinin üretiminden sonra elde edilen nanopartikül ağırlığı (g olarak), kullanılan polimer ağırlığı ve etkin madde ağırlığının toplamına oranlanmış ve bulunan değer yüzde cinsinden ifade edilmiştir. Her seri için elde edilen bu değerlerin ortalaması ve standart sapması bulunarak, her bir formülasyon için üretim verimi hesaplanmıştır (206) .

$$\% \text{ Verim} = (A / B) \times 100$$

A: Elde edilen nanopartikül ağırlığı

B: Polimer + etkin madde ağırlığı

3.2.5.5. Nanopartiküllere Yüklenen 5-FU Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Nanopartiküllere yüklenen etkin madde miktarının belirlenmesi için 10 mg nanopartikül hassas terazide tam olarak tartılmış ve 25 mL'lik balon jöjeye aktarılmıştır. Nanopartiküllerden etkin maddeyi açığa çıkarmak amacıyla, nanopartiküllerin üzerine 10 mL diklorometan eklenmiştir. Açığa çıkan 5-FU'ı su fazına çekmek için karışıma 10 mL su eklenmiş ve karışım, 5-FU'in nanopartiküllerden ekstre edilebilmesi için 10 dk süresince ultrasonik banyoda tutulmuştur. Sulu faz, selüloz nitrat yapısındaki membran filtreden süzülmuş, 266 nm'de UV spektrofotometresi kullanılarak absorbans ölçümü yapılmıştır. Ölçülen absorbans değeri kalibrasyon doğrusu denklemine yerleştirilerek bu absorbans değerine karşılık gelen konsantrasyon saptanmış ve bu şekilde etkin maddenin yükleme etkinliği hesaplanmıştır.

3.2.5.6. Nanopartiküllerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin Araştırılması

3.2.5.6.1. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının FT-IR spektrumu, ATR (attenuated total reflectance) kullanılmak suretiyle Perkin Elmer FT-IR system-spektrum BX-IR spektrofotometresinde (Überlingen, Almanya), 400-4000 cm^{-1} aralığında alınmış olup dalga sayısı cm^{-1} cinsinden değerlendirilmiştir.

3.2.5.6.2. DSC Analizi

Hazırlanan nanopartiküllerin termal özelliklerinin araştırılması için DSC analizleri yapılmıştır. Analiz için standart alüminyum örnek kaplarını tam olarak dolduracak kadar numune, örnek kabının yüzeyini tam olarak kaplayacak ve boşluk bırakmayacak şekilde doldurulmuştur. Analiz kapsamında, etkin madde içeren ve içermeyen nanopartikül formülasyonlarının, 5-FU'nun ve polimerlerin 25-300 $^{\circ}\text{C}$ arasında DSC termogramları çekilmiş ve incelenmiştir.

3.2.5.7. İn Vitro Salım Deneyleri

3.2.5.7.1. Salım Ortamı ve Deneyin Yapılışı

Salım deneylerinde hazırlanan nanopartiküllerden 5-FU'nun salım özelliklerinin incelenmesi için kullanılan ortam, in vivo ortamı en iyi şekilde taklit etmesi nedeniyle PBS (pH 7.4) tamponudur. Salım deneyleri için hassas terazide tartılmış olan 10 mg'lık nanopartikül formülasyonları 1.5 mL'lik Eppendorf tüplere aktarılmış ve üzerine 1 mL salım ortamı ilave edilmiştir. Her formülasyon için bu şekilde hazırlanan altı salım hücresi, sıcaklığı 37 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulan yatay çalkalayıcı su banyosuna (Mettler, Almanya) yerleştirilmiştir. Aynı zamanda, 5-FU içermeyen ve deneylerde kör olarak kullanılacak nanopartiküllere de aynı işlemler uygulanmıştır. İn vitro salım deneylerinde bir Eppendorf tüpü içerisine

stabilite değerlendirmesi için etkin madde konmuş ve in vitro salım şartlarında tutulmuştur. Yatay alkalayıcının hızı 60 devir/dk'ya ayarlanmıştır.

Salım deneyleri sırasında önceden belirlenen zaman noktalarında (30. dk, 1., 2., 4., 8., 12., 24., 48. ve 72. saatler) Eppendorf tüpleri alınarak 13500 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiş ve ortamdaki nanopartiküller ktrlmştur. Alınan örneklerin 266 nm'deki absorbansları UV spektrofotometresinde okunmuş ve elde edilen değerler kalibrasyon doğrusuna yerleştirilerek zamana bağlı olarak salınan % kümülatif 5-FU miktarı bulunmuş ve salım grafikleri çizilmiştir. Etkin madde salımının 0. derece, Higuchi ve Hixon-Crowell modellerine göre kinetik değerlendirmeleri yapılmıştır.

3.2.5.7.2. İn Vitro Salım Deneylerinin Validasyonu

İn vitro salım deneylerinin validasyonunu gerçekleştirmek amacıyla her bir nanopartikül formülasyonu için in vitro salım deneylerinde belirtildiği gibi hazırlanan altışar ortamdan, her bir örnek alma zamanında analiz yapılarak etkin madde için X, SS ve VK hesaplanmıştır. Böylece, her bir formülasyonun in vitro salım çalışmasında bütün örnek noktaları için tekrar elde edilebilirlik parametresi bulunmuştur. Salım ortamında stabilite değerlendirmesi Bölüm 3.2.2.2.5'de yapılmıştır. Bu validasyon kriterlerinden son örnek alma zamanında (72.saat) salınan etkin madde miktarı için VK hesaplanarak in vitro salım deneyinin validasyonu değerlendirilmiştir. VK değerinin % 2'den küçük olması istenmektedir (207) .

3.2.5.8. Caco-2 Hücreler ile Sitotoksisite alışmaları

Tez alışmasında 5-FU içeren nanopartikül formülasyonlarının insan kolon adenokarsinoma (Caco-2) hücre hattı üzerinde sitotoksisite değerlendirme çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının sitotoksisitesini tayin etmek amacıyla literatürde sıklıkla kullanılan bir yöntem olan (208-209) Metil-tiyazol-tetrazolyum (MTT) boyama yöntemi kullanılmıştır.

Caco-2 hücre ortamı olarak DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) kullanılmıştır. Caco-2 hücreler -180 °C azot tankından alınarak, laminar hava akışı olan kabine yerleştirilmiştir. 15 mL'lik steril santrifüj tüpüne alınan hücrelere 10 mL Caco-2 hücre ortamı eklenmiş ve 2000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak hücreler 5 mL yeni ortamda süspande edilmiş ve 25 cm²'lik hücre kültürü flasklarına (ince boyunlu yatay şişe) transfer edilmişlerdir. Hücreler, % 5 CO₂ ortamında 37 °C'de nem inkübatöründe inkübe edilmiştir. Hücre ortamı her 2-3 günde bir değiştirilmiş daha sonra tripsinizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tripsinizasyon için 1.5 mL tripsin-EDTA (% 0.005 tripsin, % 0.002 EDTA) çözeltisi flasklara eklenerek inkübatörde 2 dk tutulmuştur.

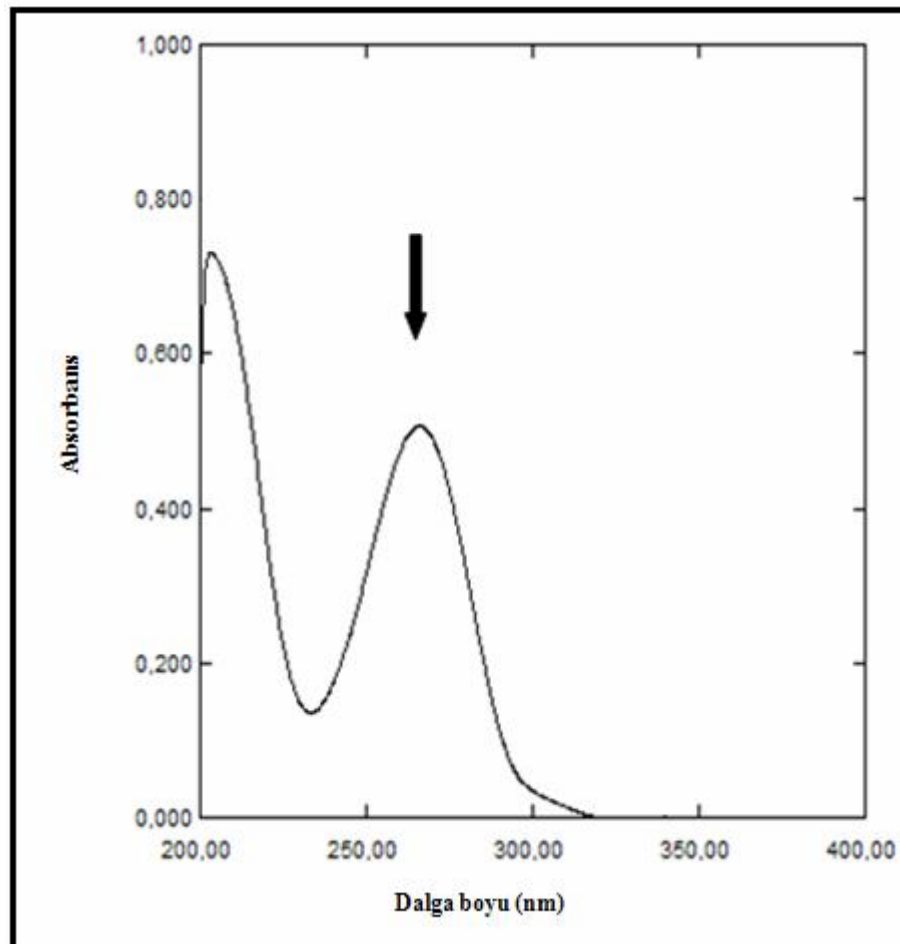
Daha sonra, Caco-2 hücreleri tripan mavisini ile boyandıktan sonra hemositometrede sayılarak 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde U-tabanlı 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Caco-2 hücreleri, % 10 FBS, % 1 Penisilin G sodyum (100 ünite/mL) ve streptomisin sülfat (100 ünite/mL) içeren DMEM vasatı içinde 37 °C'de % 5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatör içinde bir gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün, hazırlanan değişik konsantrasyonlardaki nanopartikül formülasyonları kuyucuklara ilave edilmiş ve 37 °C'de % 5 CO₂ içeren nemlendirilmiş inkübatör içerisinde 24 saatlik bir inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, her bir kuyucuğa 20 µl MTT çözeltisi (5 mg/mL) eklenmiştir ve plaklar 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemi takiben plaklara 80 µl % 45 dimetil formamid (DMF) çözeltisi içerisindeki % 23 sodyum dodesil sülfat (SDS) (pH 4.7) çözeltisi eklenmiş ve 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldıktan sonra, bir mikropalak okuyucu kullanılarak 570 nm dalga boyundaki absorbasları ölçülmüştür. Kültür ortamında formülasyon ilave edilmeden inkübe edilen hücreler hücre yaşayabilirliğinin ölçülmesinde kontrol grubu olarak kullanılmışlardır. Hücre yaşayabilirliği, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüzde olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalara İlişkin Bulgular

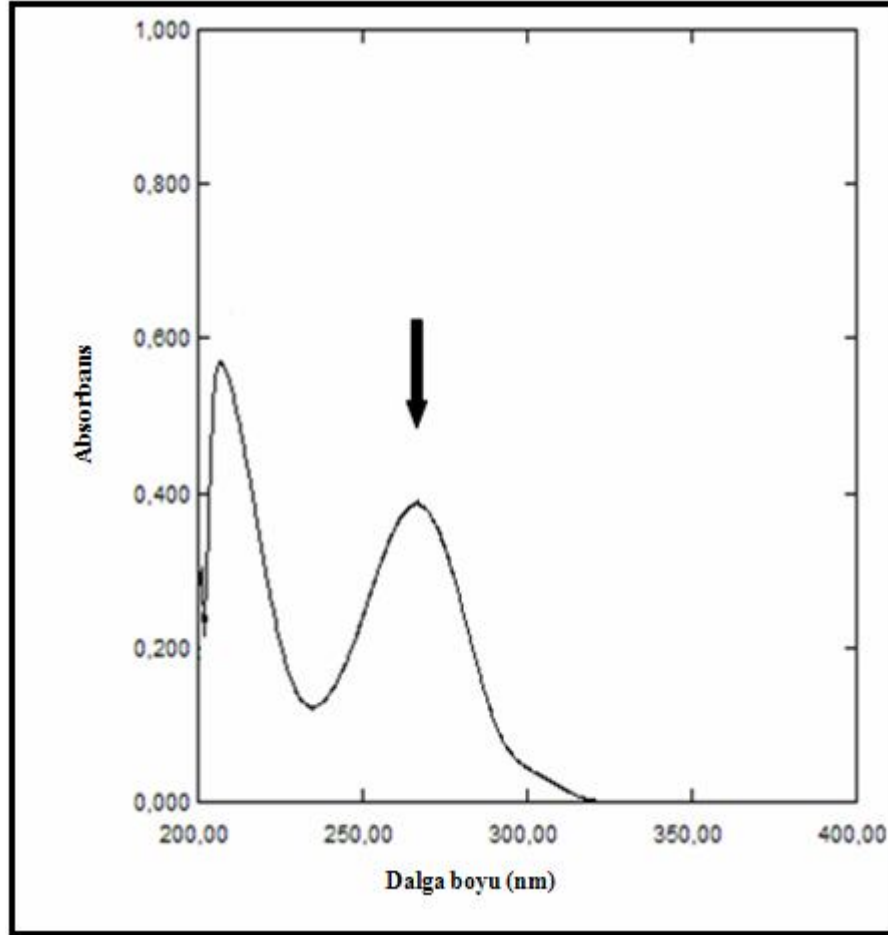
4.1.1. UV Spektrumu

5-FU'in Bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı üzere distile suda çekilen UV spektrumunda maksimum dalga boyu ($\lambda_{\max}$) 266.0 nm olarak gözlenmiş olup, elde edilen spektrum Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Bu bulgu, 5-FU'in literatürde belirtilen maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu ile uyumlu bulunmuştur (210) .



Şekil 4.1. 5-FU'in distile su içerisindeki UV spektrumu

5-FU'in Bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı üzere PBS (pH 7.4) çözeltisinde çekilen UV spektrumunda maksimum dalga boyu (λ_{max}) 266.4 nm olarak gözlenmiş olup Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Bu bulgu, 5-FU'in literatürde belirtilen maksimum absorbands gösterdiği dalga boyu ile uyumlu bulunmuştur (210) .



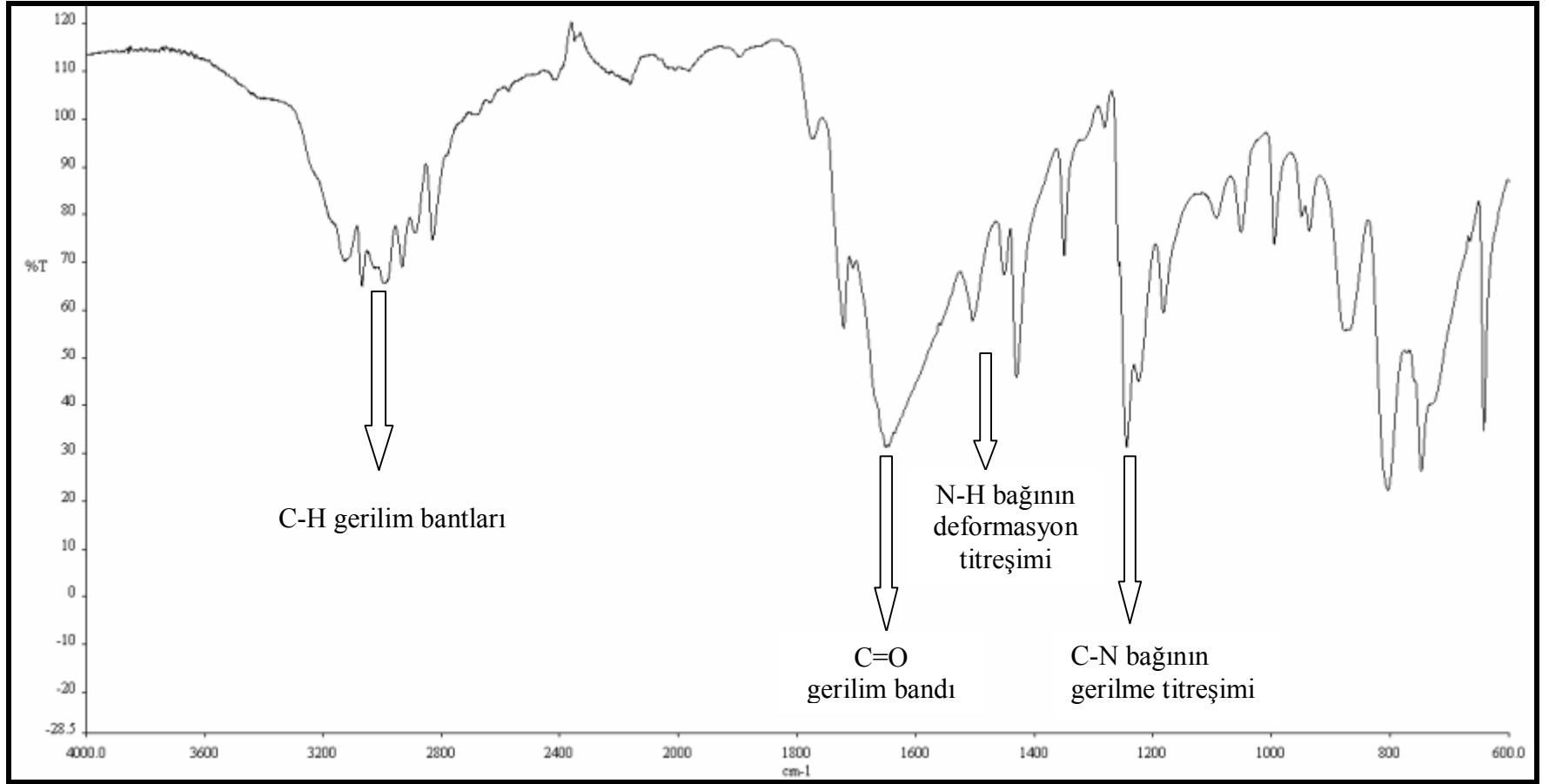
Şekil 4.2. 5-FU'in PBS (pH 7.4) içerisindeki UV spektrumu

4.1.2. FT-IR Spektrumu

5-FU'in FT-IR spektrumu Bölüm 3.2.1.2'de anlatıldığı şekilde çekilmiş ve elde edilen spektrum Şekil 4.3'de gösterilmiştir. FT-IR spektrumunda gözlenen absorbsiyon bantları, 5-FU'e ilişkin referanstaki (211) absorbsiyon bantları ile uyum içindedir.

5-FU'in FT-IR spektrumunda gözlenen karakteristik pikler aşağıdaki gibidir:

- 3124-2828 cm^{-1} arasında görülen pikler C-H bağlarına ait gerilim bantlarıdır.
- 1650 cm^{-1} de gözlenen pik “amid 1 bandı” olarak da bilinen ve 1650-1690 cm^{-1} dalga sayısı aralığında gözlenen, amid yapısına özgü C=O gerilim bandıdır.
- 1503 cm^{-1} de gözlenen pik ise “amid 2 bandı” olarak bilinen, amidin primer ya da sekonder olmasına göre yeri değişebilen, amid 1 pikinin yarısı, bazen de 1/3’ü şiddetinde gözlenen N-H bağının deformasyon titreşimidir.
- 1244 cm^{-1} de gözlenen keskin pik de 1300-1200 cm^{-1} de gözlenen, C-N bağının gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır.



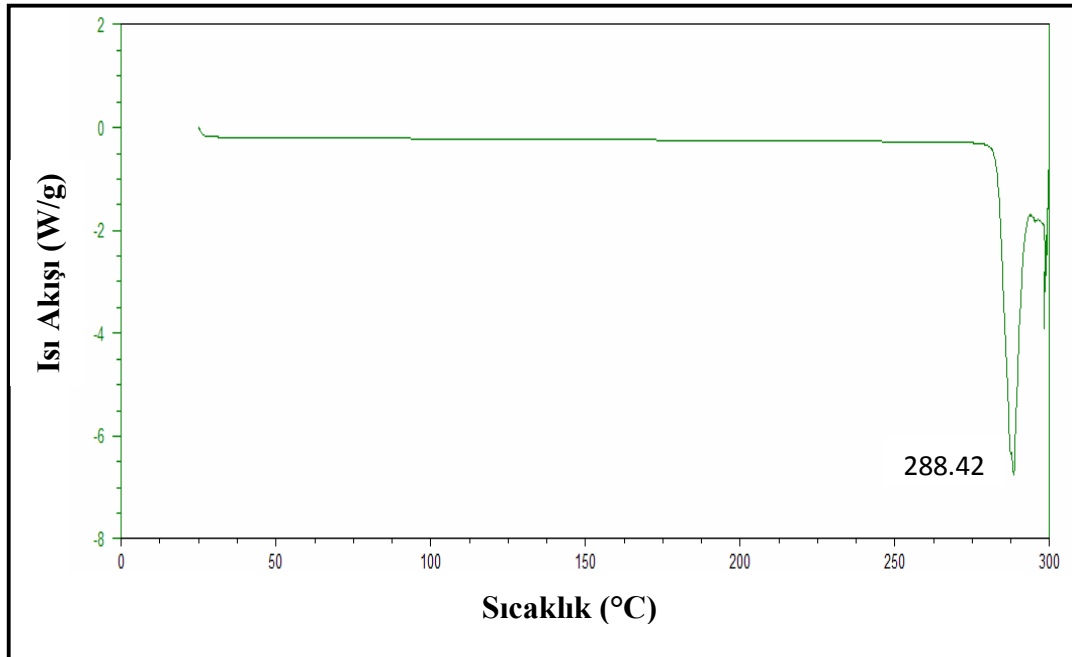
Şekil 4.3. 5-FU'in FT-IR spektrumu

4.1.3. Erime Derecesi Tayini

5-FU'in erime derecesi Bölüm 3.2.1.3'de anlatıldığı şekilde tayin edilmiştir. Erime derecesi tayini sonucunda etkin maddenin erimeye başladığı sıcaklık ile erimenin tamamlandığı sıcaklık aralığı 282-283°C olarak kaydedilmiştir. Bu değerler referans kaynaklarda (212) 5-FU için verilen değerler ile uyum içindedir.

4.1.4. DSC Termogramı

5-FU'in DSC termogramı Bölüm 3.2.1.4'de belirtilen cihaz ve yöntem kullanılarak çekilmiştir. Elde edilen termogram Şekil 4.4'de görülmektedir. Grafikteki keskin endotermik pik, 5-FU'in erime derecesine ilişkin olup 288.42 °C değerinde elde edilmiştir. 5-FU için DSC yöntemiyle bulunan erime derecesi de kaynaklarda verilen referanslarla (212) uyum içindedir.

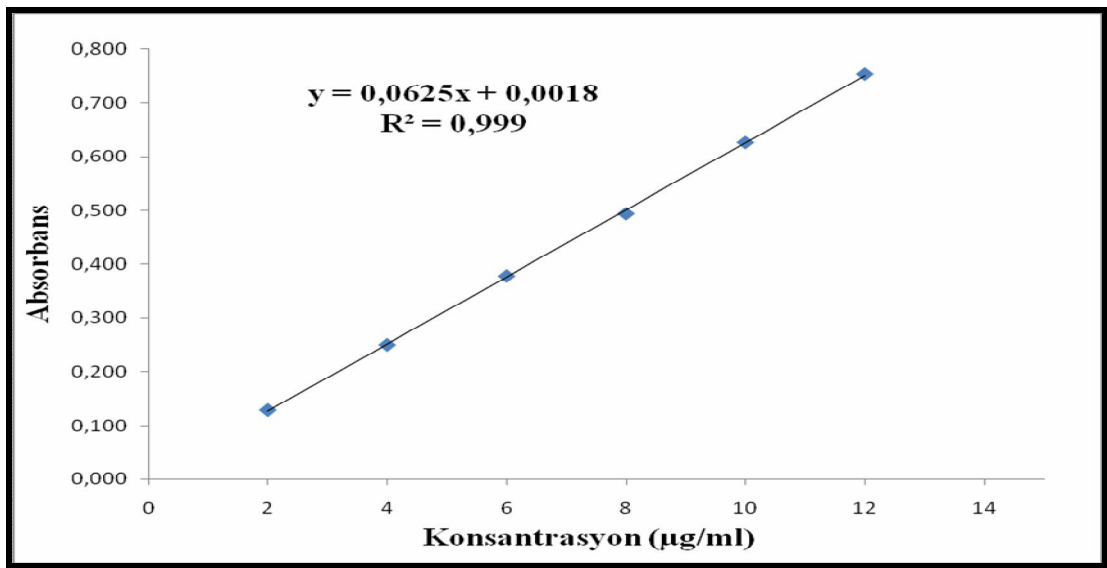


Şekil 4.4. 5-FU'in DSC termogramı

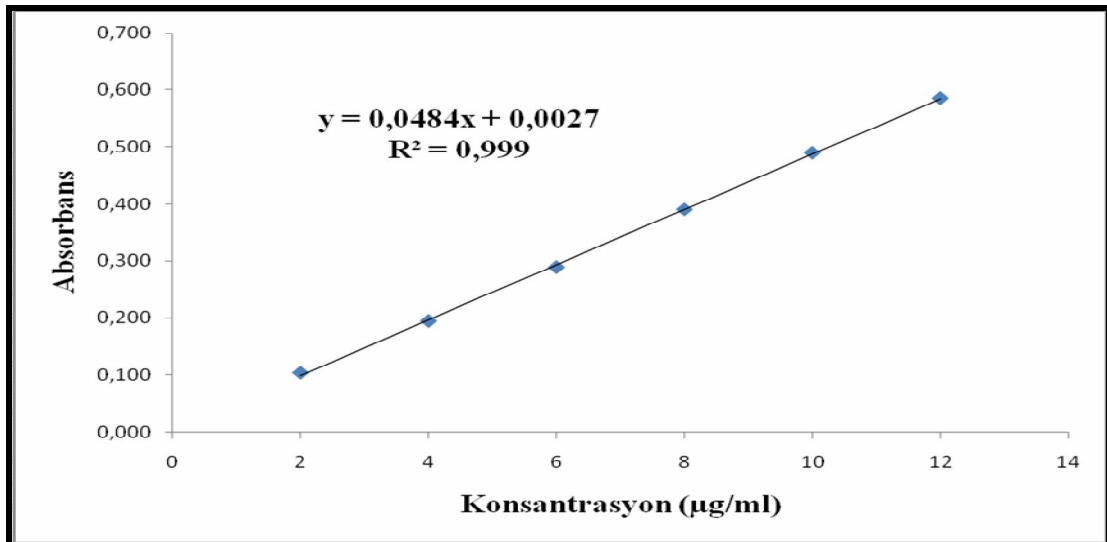
4.2. Etkin Maddenin Spektrofotometrik Miktar Tayini

4.2.1. Kalibrasyon Doğrularının Oluşturulması

5-FU'in iki farklı ortamdaki kalibrasyon doğrusu, UV spektrofotometrik yöntem kullanılarak, Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı şekilde oluşturulmuştur. Distile sudaki kalibrasyon doğrusu Şekil 4.5'de, PBS (pH 7.4)'teki kalibrasyon doğrusu ise Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.5. 5-FU'in distile sudaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6)



Şekil 4.6. 5-FU'in PBS (pH 7.4)'teki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=6)

4.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

4.2.2.1. Özgünlük

Bölüm 3.2.2.2.1’de anlatıldığı üzere etkin madde içeren nanopartikül formülasyonlarının yanı sıra, aynı formülasyonların etkin madde içermeyen şekilleri de hazırlanmış ve distile su ile PBS (pH 7.4) içerisinde ayrı ayrı $\lambda=200-400$ nm aralığında UV spektrumları çekilmiştir. 5-FU’in maksimum absorbands verdiği dalga boyunda çözücü bileşenleri ve formülasyona giren yardımcı maddelerin absorbands vermedikleri gözlenmiştir.

4.2.2.2. Doğrusallık

DeneySEL kısımda anlatıldığı gibi (Bölüm 3.2.2.2.2), UV spektrofotometresinde okunan absorbands değerleri grafiğe geçirilmiştir. Hesaplar sonucunda, distile suda elde edilen kalibrasyon denkleminin doğrusallığını belirleyen tanımlayıcılık katsayısı değeri (R^2) 0.999; PBS (pH 7.4) içerisinde elde edilen kalibrasyon denkleminin doğrusallığını belirleyen tanımlayıcılık katsayısı değeri (R^2) ise 0.999 olarak bulunmuştur.

4.2.2.3. Doğruluk

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğuna ilişkin veriler, Bölüm 3.2.2.2.3’de anlatıldığı şekilde, % ortalama bağıl hatalar hesaplanarak elde edilmiştir. Kalibrasyon doğrusunda yer alan altı farklı konsantrasyonda (2, 4, 6, 8, 10, 12 $\mu\text{g/mL}$) hazırlanmış olan altışar adet çözeltinin absorbandsları ölçülmüş ve ölçülen konsantrasyon ile % bağıl hatalar distile su için Tablo 4.1, PBS (pH 7.4) için ise Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. 5-FU'in distile sudaki doğruluk analiz sonuçları (n=6)

Hazırlanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{X} \pm SS^*$	% Ortalama Bağıl Hata
2	2.03 $\pm$ 0.05	1.63
4	3.98 $\pm$ 0.03	-0.52
6	6.03 $\pm$ 0.06	0.50
8	7.89 $\pm$ 0.03	-1.43
10	10.00 $\pm$ 0.04	0.03
12	12.04 $\pm$ 0.05	0.32

*X: Ortalama, SS: Standart Sapma

Tablo 4.2. 5-FU'in PBS (pH 7.4)'teki doğruluk analiz sonuçları (n=6)

Hazırlanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{X} \pm SS^*$	% Ortalama Bağıl Hata
2	2.09 $\pm$ 0.02	1.48
4	3.94 $\pm$ 0.01	-1.45
6	5.96 $\pm$ 0.01	-1.41
8	8.01 $\pm$ 0.01	0.07
10	10.04 $\pm$ 0.03	0.37
12	12.03 $\pm$ 0.00	0.26

*X: Ortalama, SS: Standart Sapma

4.2.2.4. Kesinlik

Kesinlik, bir analitik yöntemin tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik derecesinin ölçüsüdür. Analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi için Bölüm 3.2.2.2.4'de anlatıldığı şekilde, hazırlanan altı ayrı standart çözeltinin absorbansları altışar kez üst üste okunarak kaydedilmiştir. Bu değerlerden hareketle kalibrasyon doğrusu kullanılarak hesaplanan etkin madde konsantrasyonları arasındaki varyasyon katsayısı hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar distile su için Tablo 4.3'de, PBS (pH 7.4) için ise Tablo 4.4'de gösterilmiştir. Hesaplanan varyasyon katsayılarının hepsi % 2'den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.3. 5-FU için distile suda analitik yöntemin tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6)

Hazırlanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{X} \pm SS^*$	Varyasyon Katsayısı (%)
2	2.11 $\pm$ 0.01	0.57
4	4.07 $\pm$ 0.01	0.16
6	6.04 $\pm$ 0.04	0.60
8	7.91 $\pm$ 0.01	0.18
10	10.07 $\pm$ 0.02	0.22
12	12.04 $\pm$ 0.02	0.20

* $\bar{X}$: Ortalama, SS: Standart Sapma

Tablo 4.4. 5-FU için PBS (pH 7.4)'teki analitik yöntemin tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6)

Hazırlanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{X} \pm SS^*$	Varyasyon Katsayısı (%)
2	2.32 $\pm$ 0.02	1.04
4	4.44 $\pm$ 0.03	0.56
6	6.76 $\pm$ 0.06	0.81
8	8.93 $\pm$ 0.06	0.61
10	11.53 $\pm$ 0.02	0.19
12	13.47 $\pm$ 0.03	0.23

* $\bar{X}$: Ortalama, SS: Standart Sapma

Kullanılan analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliğinin incelenmesinde ise, aynı stoktan hareket edilerek seyreltmeyle 2, 4, 6, 8, 10, 12 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında altışar adet çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin absorbanları birer defa ölçülerek, her bir konsantrasyon değeri için ortalamalar hesaplanmıştır. Sonuçlar, distile su için Tablo 4.5, PBS (pH 7.4) için ise Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Hesaplanan varyasyon katsayılarının hepsi % 2'den küçük bulunmuştur.

Tablo 4.5. 5-FU için distile suda analitik yöntemin tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6)

Hazırlanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{X} \pm SS^*$	Varyasyon Katsayısı (%)
2	2.10 $\pm$ 0.03	1.40
4	4.06 $\pm$ 0.02	0.59
6	5.97 $\pm$ 0.01	0.11
8	7.87 $\pm$ 0.01	0.17
10	10.00 $\pm$ 0.01	0.12
12	12.02 $\pm$ 0.01	0.10

*X: Ortalama, SS: Standart Sapma

Tablo 4.6. 5-FU için PBS (pH 7.4)'teki analitik yöntemin tekrar elde edilebilirlik sonuçları (n=6)

Hazırlanan Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{X} \pm SS^*$	Varyasyon Katsayısı (%)
2	2.84 $\pm$ 0.02	0.65
4	5.11 $\pm$ 0.02	0.40
6	7.38 $\pm$ 0.02	0.21
8	9.31 $\pm$ 0.02	0.18
10	11.84 $\pm$ 0.02	0.18
12	13.90 $\pm$ 0.02	0.12

*X: Ortalama, SS: Standart Sapma

4.2.2.5. Stabilité

5-FU'in stabilitesi, in vitro salım deneyleri süresince takip edilmiştir. Bu amaçla, Bölüm 3.2.2.2.5'de anlatıldığı şekilde PBS (pH 7.4) içerisinde 10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda 5-FU çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti 37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 50 rpm'de çalışan yatay çalkalayıcıda 72 saat boyunca bekletilmiş ve belirlenen zaman noktalarında örnekler alınmıştır. Örneklerdeki etkin madde miktarı $\lambda_{\text{max}} = 266 \text{ nm}$ 'de

ölçülmüştür. Sonuçlar Tablo 4.7’de gösterilmiştir. Elde edilen % kalan 5-FU miktarında herhangi bir kayıp tespit edilmemiştir.

Tablo 4.7. 5-FU’in in vitro salım ortamında ve koşullarında stabilite sonuçları (n=6)

Zaman (saat)	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Ölçülen Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) $\bar{X} \pm SS^*$	% Kalan 5-FU
0.5	10	10.04 $\pm$ 0.03	100.41
1	10	10.08 $\pm$ 0.08	100.76
2	10	10.05 $\pm$ 0.06	100.46
4	10	10.01 $\pm$ 0.05	100.05
8	10	10.07 $\pm$ 0.05	100.64
12	10	10.00 $\pm$ 0.05	100.02
24	10	10.01 $\pm$ 0.02	100.06
48	10	10.09 $\pm$ 0.10	100.93
72	10	10.08 $\pm$ 0.05	100.83

* $\bar{X}$: Ortalama, SS: Standart Sapma

4.3. Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

4.3.1. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

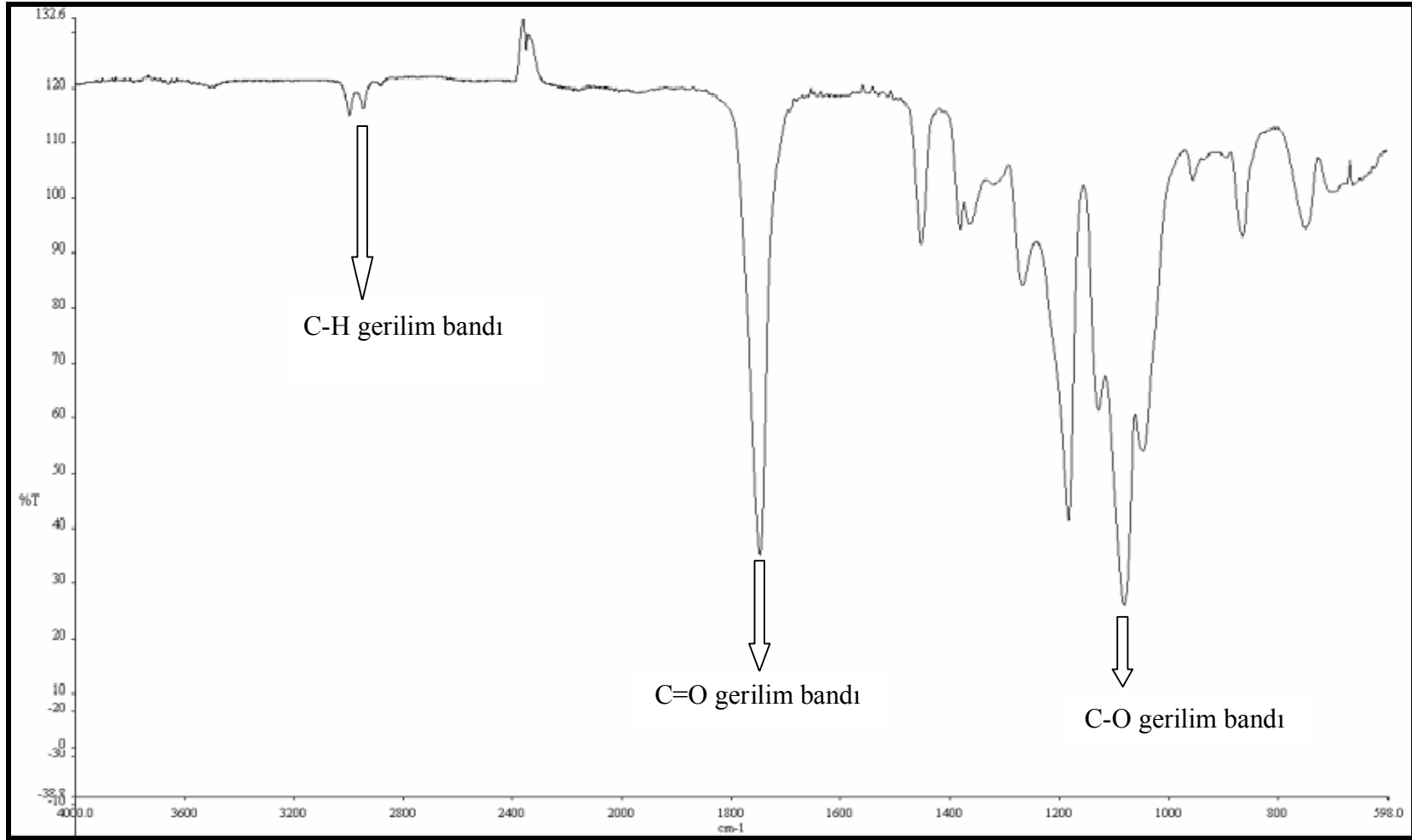
Tez çalışmalarımızda nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan biyopolimerlerin Bölüm 3.2.3.1’ de belirtildiği şekilde çekilen FT-IR spektrumları Şekil 4.7 (PLA₁), 4.8 (PLA₂), 4.9 (PLGA) ve 4.10 (PEG-PPG-PEG)’ da görülmektedir.

PLA₁’in FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.7) 2996 ve 2945 (C-H gerilim), 1747 (C=O gerilim) ve 1081 cm^{-1} ’de (C-O gerilim) polimere özgü karakteristik pikler görülmektedir.

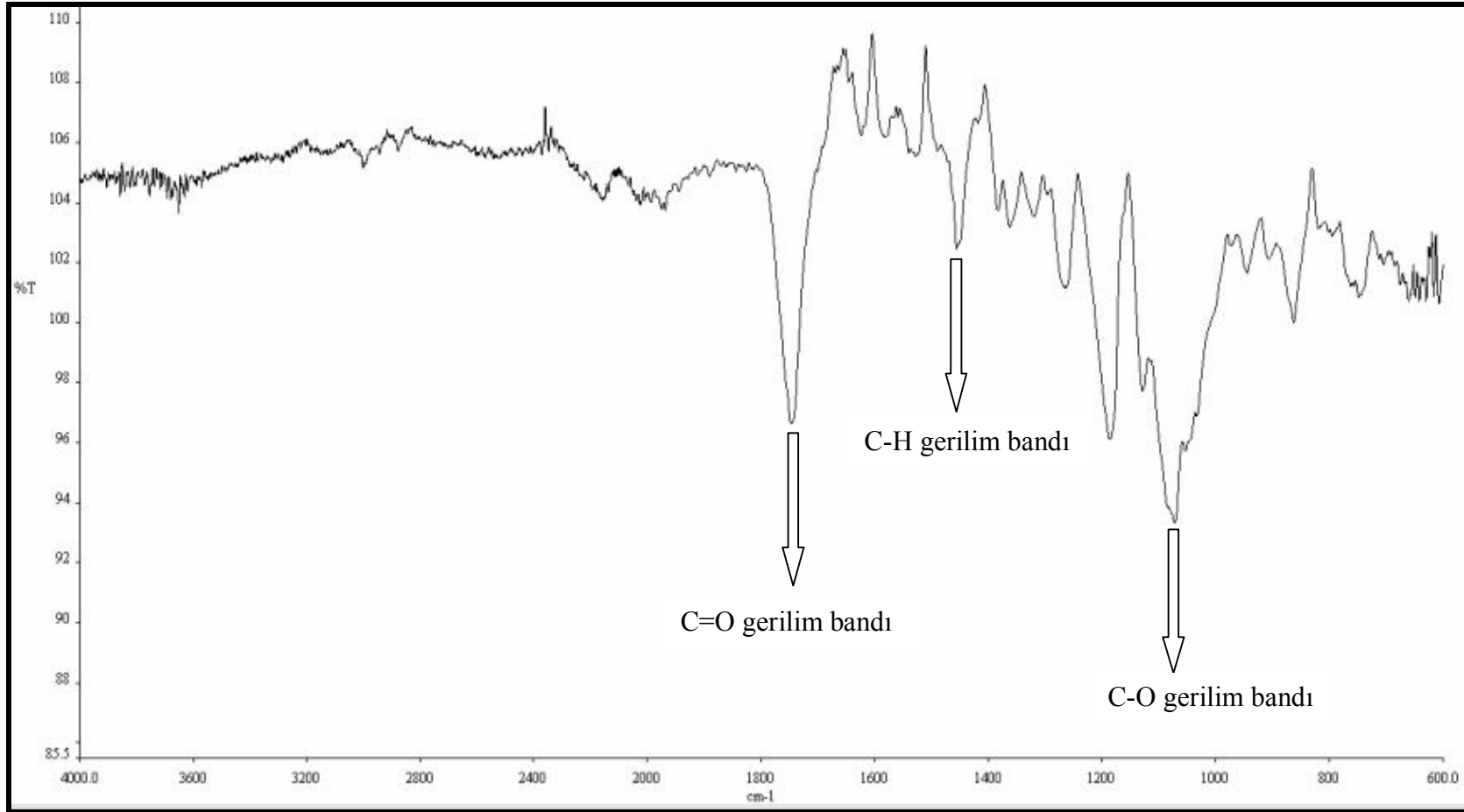
PLA₂'nin FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.8) 1745 (C=O gerilim), 1455 (C-H gerilim) ve 1072 cm⁻¹'de (C-O gerilim) polimere özgü karakteristik pikler görülmektedir.

PLGA'nın FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.9) 3372 (O-H gerilim), 2975 (C-H gerilim), 1749 (C=O gerilim) ve 1087 cm⁻¹'de (C-O gerilim) polimere özgü karakteristik pikler görülmektedir. 3372 cm⁻¹'de görülen pikin, molekül içi hidrojen bağına ilişkin veya totomerizasyon sonucu oluşabilecek enol formunda yer alan O-H bağına ilişkin olabileceği düşünülmektedir.

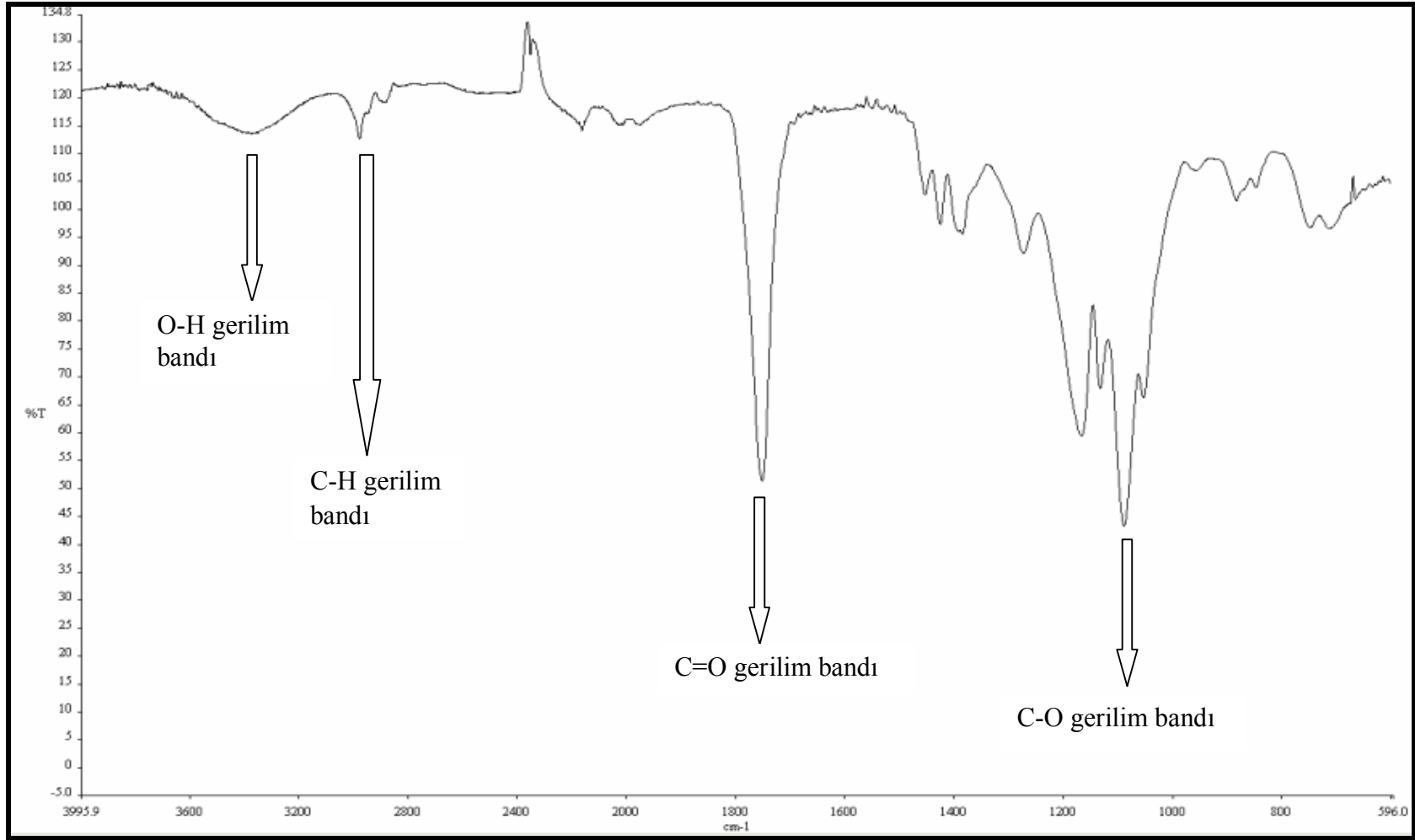
PEG-PPG-PEG'in FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.10) 3405 (O-H gerilim), 2974 ve 2882 (C-H gerilim) ve 1096 cm⁻¹'de (C-O gerilim) polimere özgü karakteristik pikler görülmektedir.



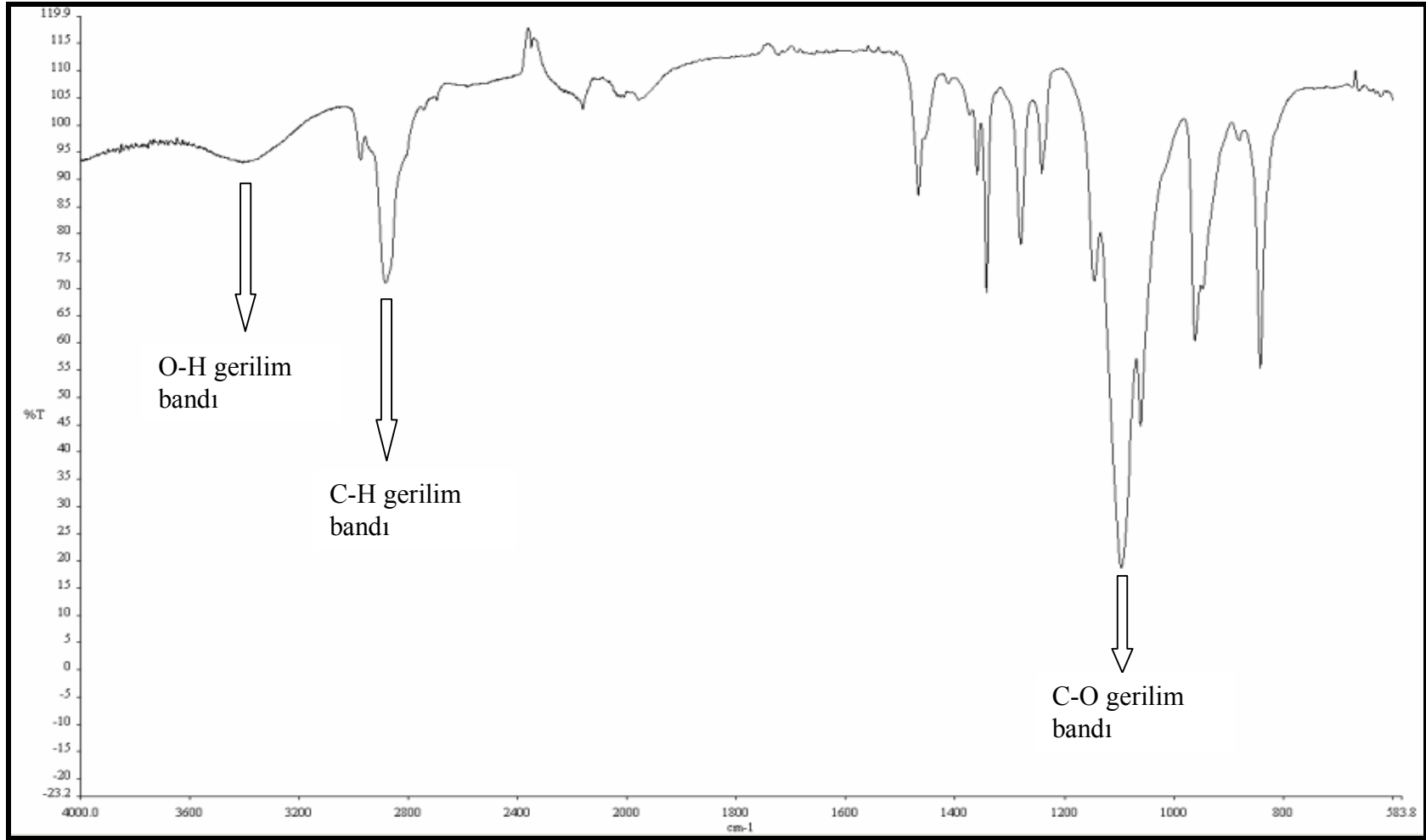
Şekil 4.7. PLA₁'in FT-IR spektrumu



Şekil 4.8. PLA₂'nin FT-IR spektrumu



Şekil 4.9. PLGA'nın FT-IR spektrumu



Şekil 4.10. PEG-PPG-PEG'in FT-IR spektrumu

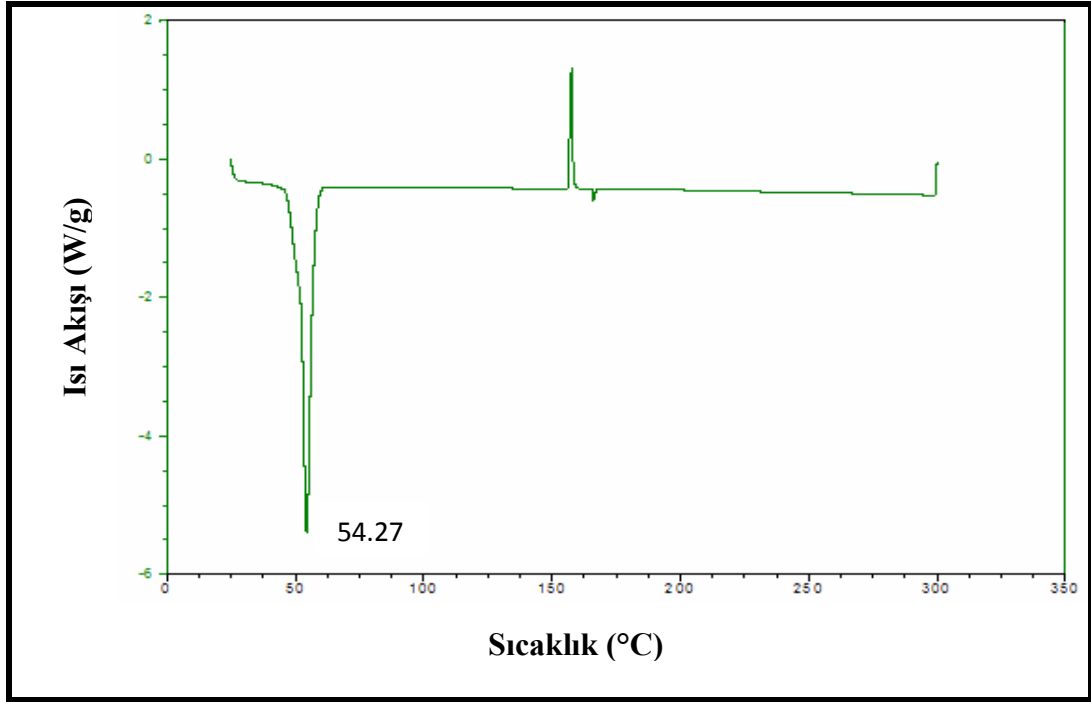
4.3.2. DSC Termogramlarının İncelenmesi

DSC termogramlarının çekilmesi için, Bölüm 3.2.3.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanan polimer örnekleri DSC ile analiz edilmişlerdir. Kullanılan polimerlerin termal analizlerine ilişkin grafikler sırasıyla Şekil 4.11 (PLA₁), 4.12 (PLA₂), 4.13 (PLGA) ve 4.14 (PEG-PPG-PEG)’de görülmektedir.

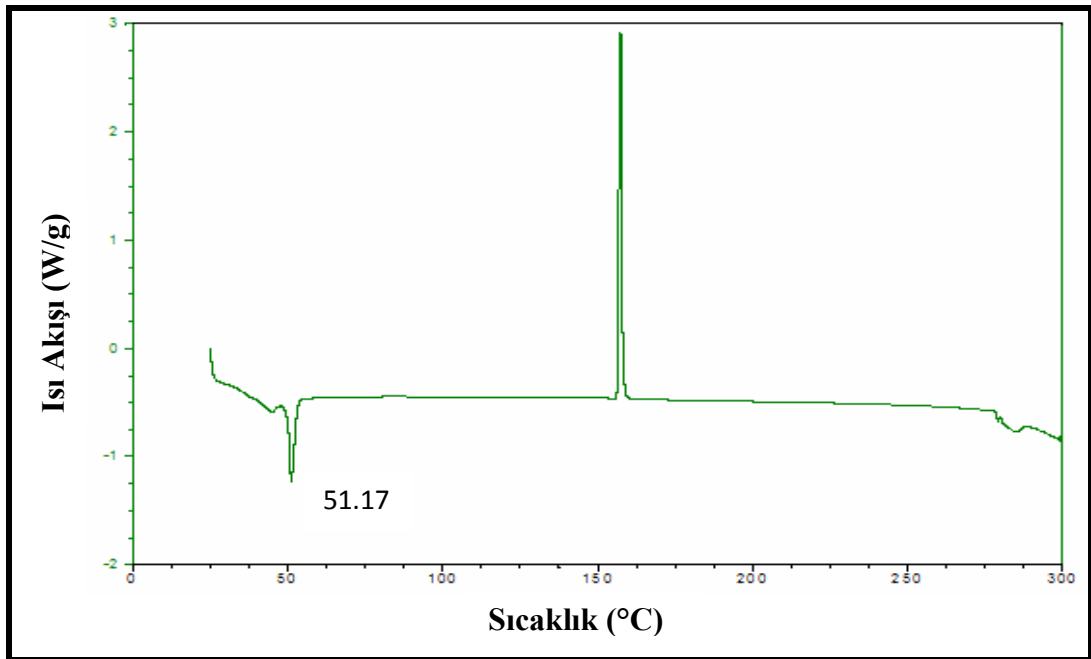
Bilindiği gibi polimerlerin termal özellikleri, onların camsı geçiş sıcaklıkları (T_g) ile tanımlanır. Sert ve camsı polimerin, yumuşak durumdaki hali ile dengede olduğu sıcaklığa camsı geçiş sıcaklığı denir. Polimer zincirleri camsı geçiş sıcaklığı T_g ’nin altında sert ve kırılğan, T_g ’nin üzerinde yumuşak ve esnek durumdadır.

- PLA₁’in DSC termogramı incelendiğinde (Şekil 4.11) gözlenen endotermik pik, polimerin T_g değerine ilişkin olup 54.27 °C olarak elde edilmiştir.
- PLA₂’nin DSC termogramı incelendiğinde (Şekil 4.12) gözlenen endotermik pik, polimerin T_g değerine ilişkin olup 51.17 °C olarak elde edilmiştir.
- PLGA’nın DSC termogramı incelendiğinde (Şekil 4.13) gözlenen endotermik pik, polimerin T_g değerine ilişkin olup 49.50 °C olarak elde edilmiştir.
- PEG-PPG-PEG’in DSC termogramı incelendiğinde (Şekil 4.14) gözlenen endotermik pik, polimerin T_m değerine ilişkin olup 59.70 °C olarak elde edilmiştir.

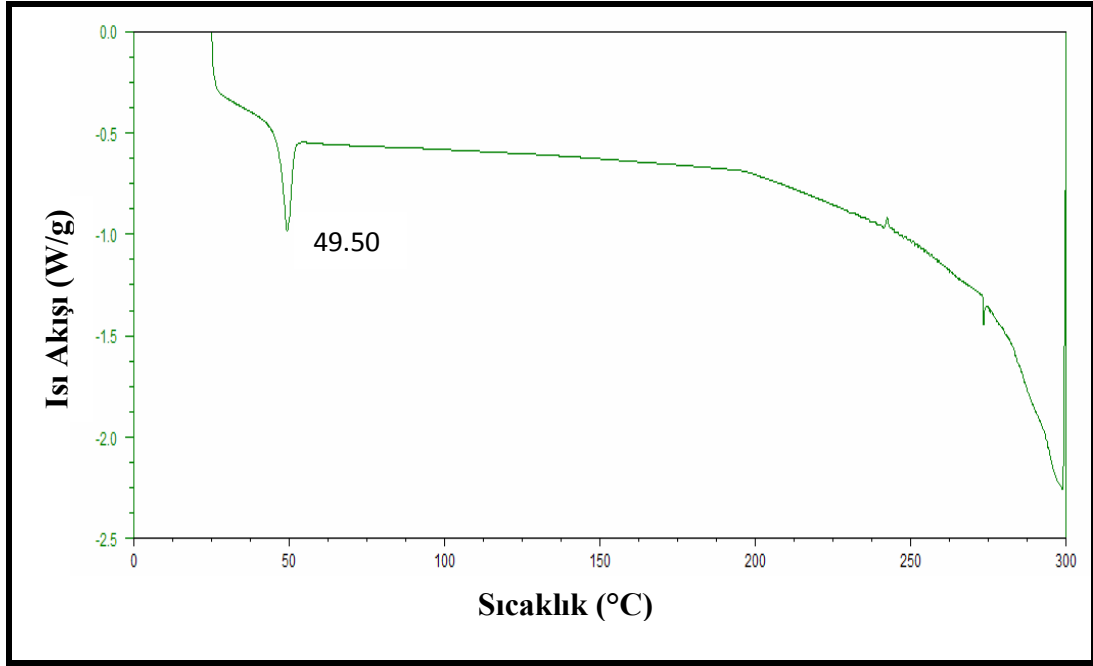
Tez çalışmalarımızda kullanılan polimerlere ilişkin DSC analizlerinin sonuçları referanslar ile uyumlu bulunmuştur (213-215) . Bu sonuçlar, kullanılan polimerlerin, termal özellikleri bakımından kendilerine özgü spesifikasyonlara uygun olduğunu göstermektedir.



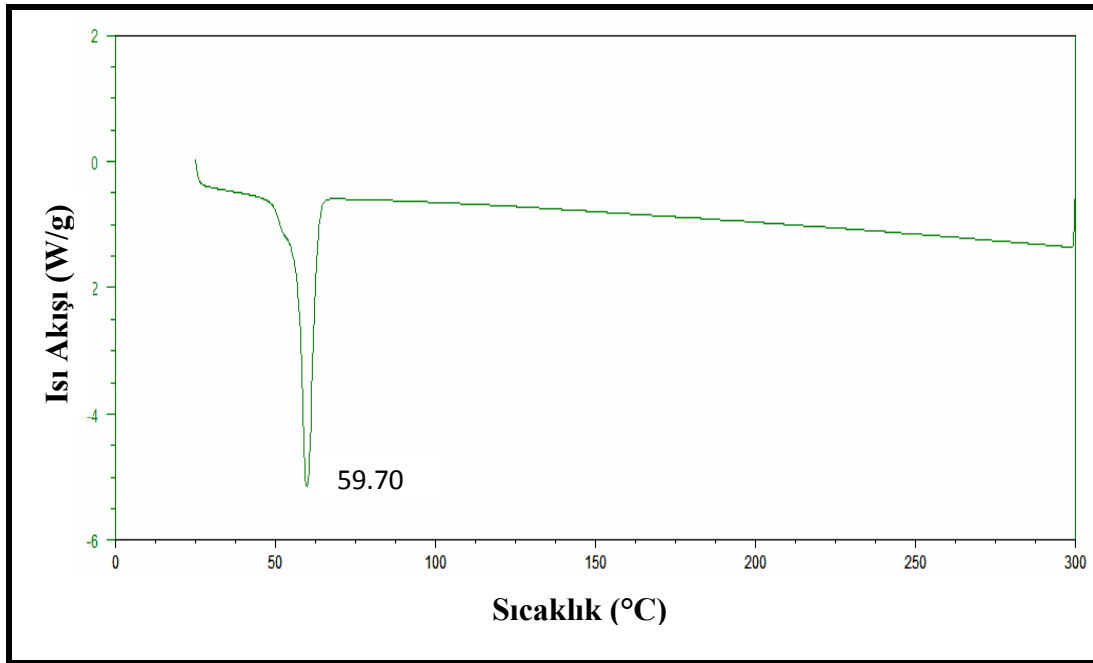
Şekil 4.11. PLA₁'in DSC termogramı



Şekil 4.12. PLA₂'nin DSC termogramı



Şekil 4.13. PLGA'nın DSC termogramı



Şekil 4.14. PEG-PPG-PEG'in DSC termogramı

4.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

4.4.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için, tezimizin gereç ve yöntem kısmında (Bölüm 3.2.4.1) belirtilen parametrelerde literatür verileri de (41) göz önüne alınarak farklı düzenlemeler yapılmış ve ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Literatürde PLA ve PLGA gibi çekirdek oluşturuçu polimerler ile PEG-PPG-PEG gibi amfifilik blok kopolimerlerin birlikte kullanıldığı çalışmalar yer almaktadır (41,96,216) . Son yıllarda misel yapıda nanopartikül formülasyonları hazırlamak amacıyla amfifilik blok kopolimerlerin de kullanılması sayesinde, blok kopolimeri oluşturan hidrofobik zincir (PPG), kombine kullanıldığı diğer polimerler (PLA/PLGA) ile birlikte miselin hidrofobik çekirdeğini oluştururken, blok kopolimeri oluşturan hidrofilik zincir (PEG) ise oluşan çekirdeğin etrafını kaplamaktadır. İşte bu hidrofilik zincirin, tez çalışmamızda olduğu gibi PEG zinciri olması durumunda, hem sulu ortamda kendiliğinden birleşebilen, hem de yüzeyi PEG ile kaplı bir misel yapısı elde edilebilmektedir.

Tez çalışmamızda çekirdek oluşturuçu polimerler olarak seçilen 75000-120000 Da molekül ağırlıklı PLA ve 12500-30000 Da molekül ağırlıklı, kopolimer oranı 50:50 olan PLGA ile yüzey aktif madde olarak da PEG-PPG-PEG (M_n :14600) kombinasyonu; 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 ve 1:10 olmak üzere farklı oranlarda kullanılmıştır. Ön formülasyon çalışmalarına bilimsel öngörüler dikkate alınıp, ilk olarak düşük yüzey aktif madde konsantrasyonundan başlanmış, düşük konsantrasyonlarda nanopartikül elde edilemediği için konsantrasyon giderek artırılmış ve nanopartikül oluşumu incelenmiştir.

Sonuç olarak, 75000-120000 Da molekül ağırlıklı PLA ve 12500-30000 Da molekül ağırlıklı, kopolimer oranı 50:50 olan PLGA'nın 1:5 ve 1:10 oranlarında PEG-PPG-PEG (M_n :14600) ile karıştırılmasıyla elde edilen optimum formüller tez çalışmalarında kullanılmak üzere tespit edilmiştir:

- 1) PLA: PEG-PPG-PEG (Mn:14600); 1:5
- 2) PLA: PEG-PPG-PEG (Mn:14600); 1:10
- 3) PLGA: PEG-PPG-PEG (Mn:14600); 1:5
- 4) PLGA: PEG-PPG-PEG (Mn:14600); 1:10

Ön formülasyon denemeleri, ilgili parametreler dikkate alınarak nanopartikül elde edilmesi yönünden değerlendirilmiş, daha kolay anlaşılması ve görülebilmesi düşüncesiyle Tablo 4.8’de sunulmuştur.

Tablo 4.8. Tez çalışmaları kapsamında hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının ön formülasyon çalışmalarına ilişkin veriler

Kullanılan Polimer (x)	Kullanılan Blok Kopolimer (y)	Oran (x:y)	Nanopartikül Oluşumu
PLA ($M_w=75000-120000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:8400$)	1:1	-
		1:2	-
		1:3	-
		1:4	-
		1:5	-
		1:10	-
PLA ($M_w=75000-120000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:14600$)	1:1	-
		1:2	-
		1:3	-
		1:4	-
		1:5	+
		1:10	+
PLGA ($M_w=34000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:8400$)	1:1	-
		1:2	-
		1:3	-
		1:4	-
		1:5	-
		1:10	-
PLGA ($M_w=34000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:14600$)	1:1	-
		1:2	-
		1:3	-
		1:4	-
		1:5	-
		1:10	-
PLGA ($M_w=12500-30000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:8400$)	1:1	-
		1:2	-
		1:3	-
		1:4	-
		1:5	-
		1:10	-
PLGA ($M_w=12500-30000$ Da)	PEG-PPG-PEG ($M_n:14600$)	1:1	-
		1:2	-
		1:3	-
		1:4	-
		1:5	+
		1:10	+

* M_w : Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı

M_n : Sayıca ortalama molekül ağırlığı

4.4.2. Emülsifikasyon ve Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması

Tez çalışmamızda kullanılmak üzere hazırlanan nanopartiküller, Bölüm 3.2.4.2 ve 3.2.4.3’de anlatıldığı şekilde, emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi ile üretilmiştir (41) . Tablo 4.9’da kodları ve bileşenleri verilen bu formülasyonların in vitro karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Tablo 4.9. Tez çalışmaları kapsamında hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının kodları ve bileşenleri

Formülasyon Kodu	Formülasyon Bileşenleri
PLA ₁ +5 _{BK} (Boş)	1k PLA (M _w =75000-120000 Da), 5k PEG-PPG-PEG (M _n :14600)
PLA ₁ +5 _{BK} +5-FU	1k PLA (M _w =75000-120000 Da), 5k PEG-PPG-PEG (M _n :14600), 5-FU
PLA ₁ +10 _{BK} (Boş)	1k PLA (M _w =75000-120000 Da), 10k PEG-PPG-PEG (M _n :14600)
PLA ₁ +10 _{BK} +5-FU	1k PLA (M _w =75000-120000 Da), 10k PEG-PPG-PEG (M _n :14600), 5-FU
PLGA+5 _{BK} (Boş)	1k PLGA (M _w =12500-30000 Da), 5k PEG-PPG-PEG (M _n :14600)
PLGA+5 _{BK} +5-FU	1k PLGA (M _w =12500-30000 Da), 5k PEG-PPG-PEG (M _n :14600), 5-FU
PLGA+10 _{BK} (Boş)	1k PLGA (M _w =12500-30000 Da), 10k PEG-PPG-PEG (M _n :14600)
PLGA+10 _{BK} +5-FU	1k PLGA (M _w =12500-30000 Da), 10k PEG-PPG-PEG (M _n :14600), 5-FU
PLA ₂ +5 _{BK} (Boş)	1k PLA (M _w =10000 Da), 5k PEG-PPG-PEG (M _n :14600)
PLA ₂ +5 _{BK} +5-FU	1k PLA (M _w =10000 Da), 5k PEG-PPG-PEG (M _n :14600), 5-FU
PLA ₂ +10 _{BK} (Boş)	1k PLA (M _w =10000 Da), 10k PEG-PPG-PEG (M _n :14600)
PLA ₂ +10 _{BK} +5-FU	1k PLA (M _w =10000 Da), 10k PEG-PPG-PEG (M _n :14600), 5-FU

*M_w: Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı

M_n: Sayıca ortalama molekül ağırlığı

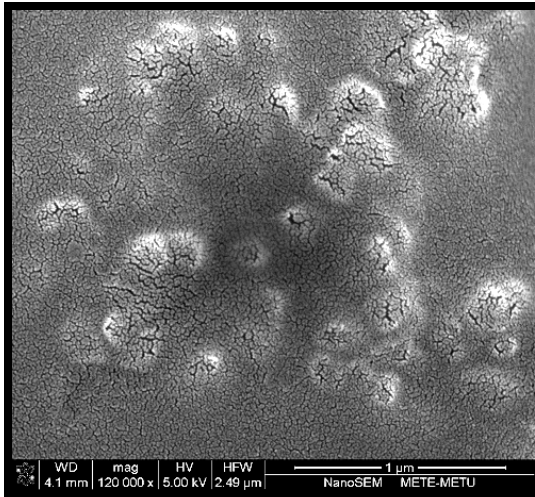
BK: Blok kopolimer

4.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

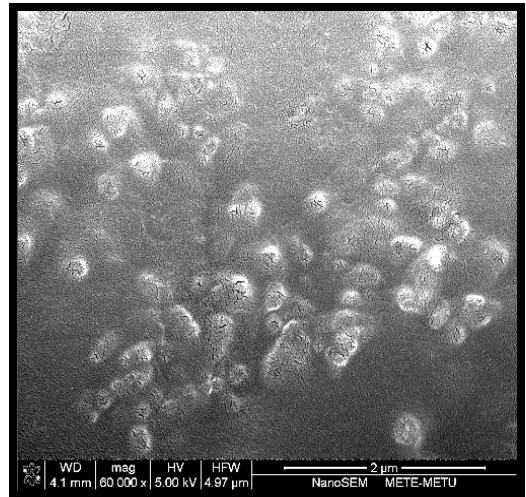
4.5.1. Morfolojik Özellikler

Tez çalışmalarımız kapsamında üretilen, etkin madde içeren ve içermeyen nanopartikül formülasyonlarının yüzey özelliklerinin incelenmesinde Bölüm 3.2.5.1’de anlatılan SEM ile görüntüleme tekniği kullanılmıştır. Şekil 4.15’de nanopartikül formülasyonlarına ilişkin SEM fotoğrafları görülmektedir.

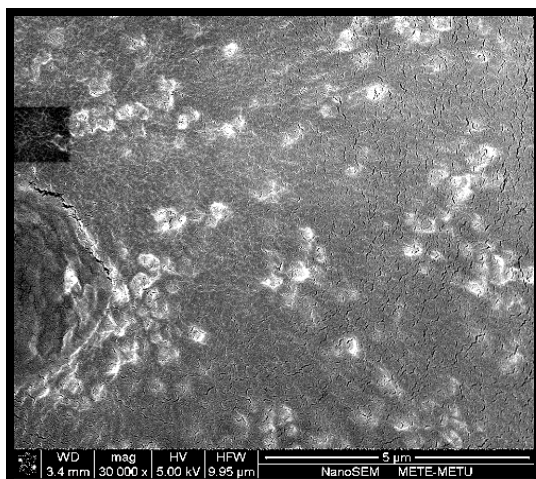
SEM fotoğrafları incelendiğinde, tam olarak küresel özellik göstermeyen partiküler oluşumlar görülmektedir. Etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlarda amfifilik triblok kopolimer konsantrasyonunun ve çekirdek oluşturu polimerin türü ile çekirdek oluşturu polimerin molekül ağırlığının nanopartiküllerin yüzey özelliklerini ve şekillerini değiştirmedeği gözlenmiştir. Ayrıca, formülasyonlara etkin madde yüklenmesinin de morfolojik özellikler üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. SEM fotoğrafları çekimi sırasında uygulanan yüksek elektron bombardımanı, polimerlerin yapısına zarar verdiği için görüntülerin netlikleri beklenen düzeyde olmamıştır.



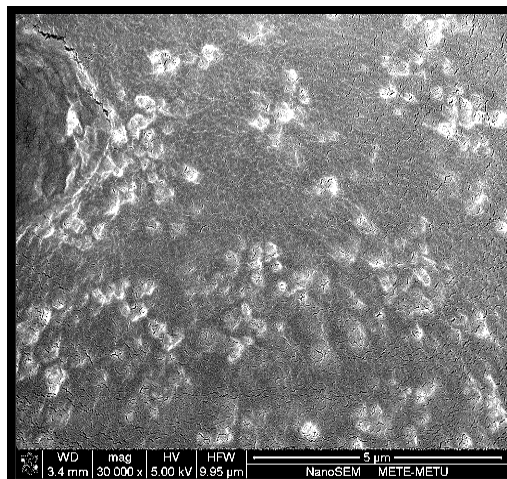
(A)



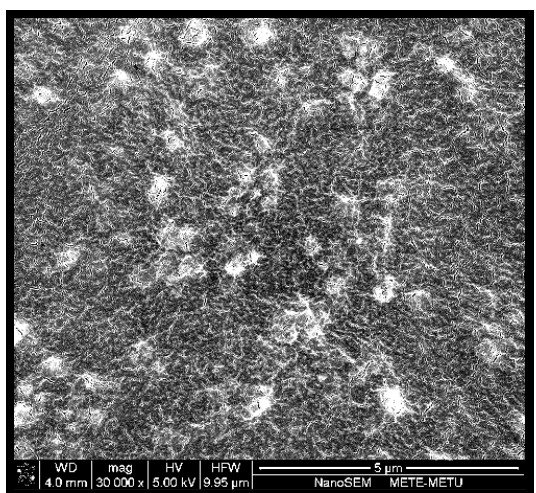
(B)



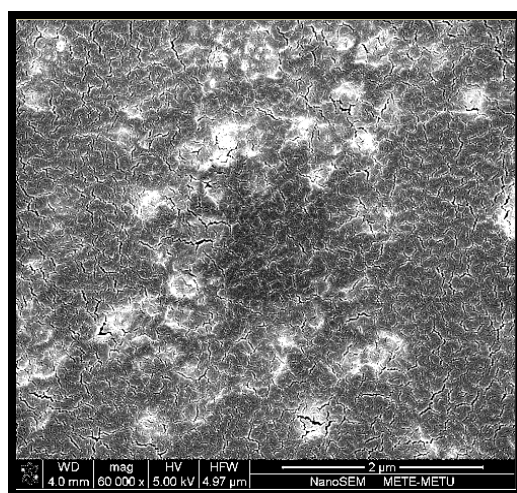
(C)



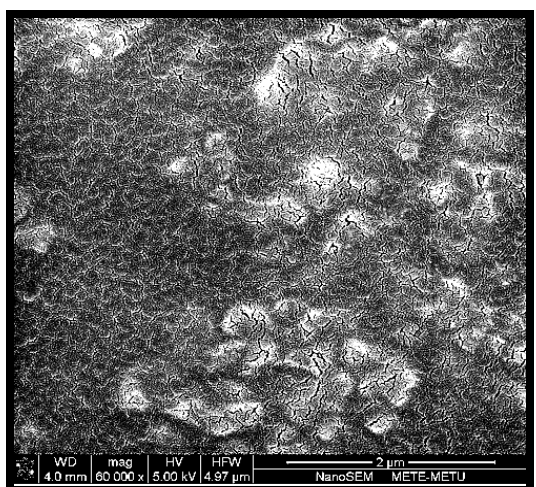
(D)



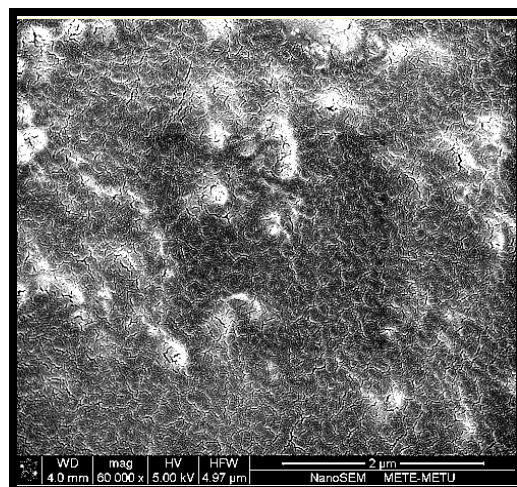
(E)



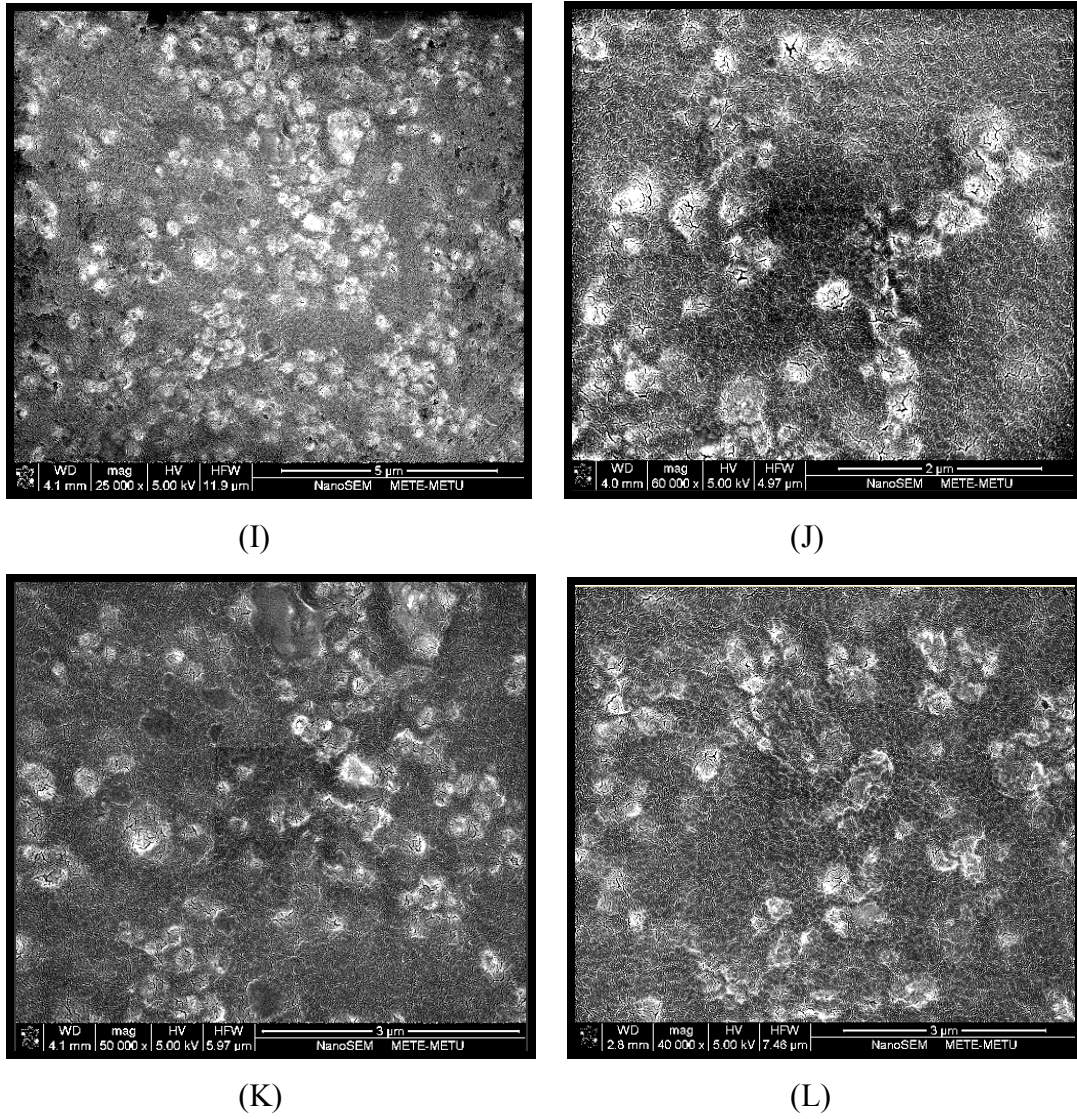
(F)



(G)



(H)



Şekil 4.15 Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin SEM fotoğrafları (A: PLA_1+5_{BK} , B: $PLA_1+5_{BK}+5-FU$, C: PLA_1+10_{BK} , D: $PLA_1+10_{BK}+5-FU$, E: $PLGA+5_{BK}$, F: $PLGA+5_{BK}+5-FU$, G: $PLGA+10_{BK}$, H: $PLGA+10_{BK}+5-FU$, I: PLA_2+5_{BK} , J: $PLA_2+5_{BK}+5-FU$, K: PLA_2+10_{BK} , L: $PLA_2+10_{BK}+5-FU$ nanopartikülleri)

4.5.2. Partikül Büyüklüğü Tayini

Tez çalışmalarımız kapsamında hazırlanan etkin madde içeren ve içermeyen nanopartiküllerin partikül büyüklükleri Bölüm 3.2.5.2’de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür. Her bir formülasyona ilişkin tayin edilen partikül büyüklükleri ortalama partikül büyüklüğü $\pm$ standart sapma; partikül büyüklüğü dağılımı ise polidispersite indeksi şeklinde Tablo 4.10’da verilmiştir. Polidispersite indeksi, partikül büyüklüğü dağılımı hakkında bilgi veren bir parametredir ve 0.5’nin altında görülen polidispersite indeksi değerleri, homojen nanopartikül dispersiyonlarının oluştuğuna işaret etmektedir.

Nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, düşük molekül ağırlıklı PLA₁ polimeri için kullanılan blok kopolimer konsantrasyonunun iki katına çıkmasıyla birlikte etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarında 178 nm’den 182 nm’ye, etkin madde içeren nanopartikül formülasyonlarında ise 193 nm’den 197 nm’ye çıkmıştır. PLGA polimeri için kullanılan blok kopolimer konsantrasyonunun iki katına çıkmasıyla birlikte etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarında 156 nm’den 159 nm’ye, etkin madde içeren nanopartikül formülasyonlarında ise 167 nm’den 171 nm’ye çıkmıştır. PLA₂ polimeri için ise kullanılan blok kopolimer konsantrasyonunun iki katına çıkmasıyla birlikte etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarında 145 nm’den 147 nm’ye, etkin madde içeren nanopartikül formülasyonlarında ise 153 nm’den 155 nm’ye çıkmıştır.

Nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PLA₁+5_{BK} kodlu formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 178 nm’den 193 nm’ye, PLA₁+10_{BK} kodlu formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 182 nm’den 197 nm’ye, PLGA+5_{BK} kodlu formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 156 nm’den 167 nm’ye, PLGA+10_{BK} kodlu formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 159 nm’den 171 nm’ye, PLA₂+5_{BK} kodlu formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 145 nm’den 153 nm’ye, PLA₂+10_{BK} kodlu

formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 147 nm'den 155 nm'ye çıkmıştır.

Elde edilen verilere bakıldığında kullanılan amfifilik triblok kopolimer miktarının değişmesinin, partikül büyüklüğü üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülürken ($p>0.05$); partiküllere etkin madde yüklenmesinin partikül boyutunu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırdığı görülmektedir ($p<0.05$).

Tez çalışmalarımız kapsamında hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri incelendiğinde (Tablo 4.10), bütün formülasyonların partikül büyüklüklerinin 145-197 nm aralığında yer aldığı görülmüştür. Bu veriler doğrultusunda, hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü açısından enjekte edilebilir özellikte olduğu anlaşılmaktadır (41,217) .

Tablo 4.10. 5-FU içeren ve içermeyen nanopartikül formülasyonlarına ilişkin partikül büyüklüğü ölçüm sonuçları

Formülasyon Kodu	Partikül Büyüklüğü (nm) X±SS* (n=3)	Polidispersite indeksi X±SS* (n=3)
PLA ₁ +5 _{BK}	178.77±1.42	0.22±0.02
PLA ₁ +5 _{BK} +5-FU	193.03±1.72	0.20±0.01
PLA ₁ +10 _{BK}	182.37±1.77	0.22±0.01
PLA ₁ +10 _{BK} +5-FU	197.02±1.36	0.21±0.02
PLGA+5 _{BK}	156.83±0.58	0.21±0.02
PLGA+5 _{BK} +5-FU	167.25±1.87	0.22±0.00
PLGA+10 _{BK}	159.43±0.49	0.21±0.01
PLGA+10 _{BK} +5-FU	171.71±0.95	0.36±0.03
PLA ₂ +5 _{BK}	145.84±0.63	0.27±0.02
PLA ₂ +5 _{BK} +5-FU	153.54±0.99	0.26±0.01
PLA ₂ +10 _{BK}	147.86±0.14	0.21±0.02
PLA ₂ +10 _{BK} +5-FU	155.51±0.62	0.21±0.01

*X: Ortalama, SS: Standart Sapma

4.5.3. Zeta Potansiyel Tayini

Etkin madde içeren ve içermeyen nanopartiküllerin zeta potansiyeli Bölüm 3.2.5.3’de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür. Her bir formülasyona ilişkin tayin edilen zeta potansiyel değerleri Tablo 4.11’de verilmiştir.

Bir kolloidal sistemin sahip olduğu zeta potansiyel değeri, o kolloidal sistemin olası dayanıklılığı hakkında bilgi vermektedir ve zeta potansiyeli mutlak değer olarak yüksek olan kolloidal dağılımların stabilitesinin daha iyi olduğu bilinmektedir (218) . Partiküller yüksek negatif ya da pozitif zeta potansiyele sahiplerse, birbirlerini iterler ve dispersiyon kararlılığı oluşur. Partiküller düşük zeta potansiyel değerlerine sahiplerse, partiküllerin bir araya gelmesini sağlayacak güç oluşmaz ve dispersiyon kararsız olur. Kararlı ve kararsız dispersiyon ortamları arasındaki potansiyel aralığı +30 mV ile -30 mV’tur.

Tablo 4.11. 5-FU içeren ve içermeyen nanopartikül formülasyonlarına ilişkin zeta potansiyel değerleri

Formülasyon Kodu	Zeta potansiyel (mV) X±SS* (n=3)
PLA ₁ +5 _{BK}	0.21±0.02
PLA ₁ +5 _{BK} +5-FU	0.22±0.01
PLA ₁ +10 _{BK}	-13.70±0.92
PLA ₁ +10 _{BK} +5-FU	-13.27±0.35
PLGA+5 _{BK}	0.21±0.02
PLGA+5 _{BK} +5-FU	0.22±0.00
PLGA+10 _{BK}	-12.60±0.15
PLGA+10 _{BK} +5-FU	-12.47±0.21
PLA ₂ +5 _{BK}	0.20±0.17
PLA ₂ +5 _{BK} +5-FU	0.20±0.02
PLA ₂ +10 _{BK}	-11.82±0.52
PLA ₂ +10 _{BK} +5-FU	-11.11±0.47

*X: Ortalama, SS: Standart Sapma

Nanopartikül formülasyonlarına ilişkin zeta potansiyel değerleri incelendiğinde (Tablo 4.11) açıkça görülmektedir ki formülasyona giren amfifilik triblok kopolimer miktarı arttıkça kolloidal sistemin sahip olduğu yük mutlak değer olarak artmıştır. Bu sonuç, amfifilik triblok kopolimerin çekirdek oluşturu polimerler ile 1:10 oranında kullanılmasıyla hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının sahip olduğu zeta potansiyel değerlerinin, stabilitenin sağlanması açısından uygun bulunduğunu göstermektedir.

4.5.4. Nanopartiküllerin Üretim Verimi

Bölüm 3.2.5.4’de anlatıldığı şekilde, formülasyonların üretilmesini takiben hesaplanan üretim verimleri sonuçları Tablo 4.12’de verilmiştir. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin üretim verimleri, % 72.4 ile % 87.6 arasında değişmektedir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12’de görüldüğü üzere çekirdek oluşturu polimer aynı kaldığı takdirde PLA₁, PLGA ve PLA₂ ile hazırlanan etkin madde yüklü nanopartiküllerin verimleri, blok kopolimer oranının artmasıyla beraber daha yüksek bulunmuştur ve fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu durumun, blok kopolimer miktarının artmasıyla beraber PEG ile daha iyi kaplanmış, daha dayanıklı ve daha yüksek verimde nanopartiküller elde edilmesinden kaynaklandığı düşünülebilir (95,219) .

Tablo 4.12. 5-FU içeren ve içermeyen nanopartikül formülasyonlarına ilişkin üretim verimi sonuçları

Formülasyon Kodu	Üretim Verimi (%) $\bar{X} \pm SS^* (n=3)$
PLA ₁ +5 _{BK}	75.46±0.80
PLA ₁ +5 _{BK} +5-FU	72.66±0.95
PLA ₁ +10 _{BK}	79.61±0.37
PLA ₁ +10 _{BK} +5-FU	80.54±0.68
PLGA+5 _{BK}	73.47±0.63
PLGA+5 _{BK} +5-FU	72.41±1.39
PLGA+10 _{BK}	80.56±1.20
PLGA+10 _{BK} +5-FU	81.24±1.40
PLA ₂ +5 _{BK}	83.13±0.82
PLA ₂ +5 _{BK} +5-FU	80.16±0.65
PLA ₂ +10 _{BK}	87.30±1.13
PLA ₂ +10 _{BK} +5-FU	87.68±1.11

* $\bar{X}$: Ortalama, SS: Standart Sapma

4.5.5. Nanopartiküllere Yüklenen 5-FU Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Nanopartikül formülasyonlarına yüklenen 5-FU miktarının belirlenmesi için Bölüm 3.2.5.5’de verilen yöntem kullanılmış ve analizler sonucunda elde edilen yükleme etkinliği değerleri Tablo 4.13’de verilmiştir. Etkin madde yükleme etkinliği nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için önemli bir karakterizasyon parametresi olup, analizler sonucunda hesaplanan etkin madde miktarının başlangıçtaki etkin madde miktarına oranlanması ile bulunmaktadır.

Nanopartikül formülasyonlarına yüklenen 5-FU miktarı incelendiğinde (Bölüm 4.5.5, Tablo 4.13); PLA₁, PLGA ve PLA₂ olmak üzere tüm polimer çeşitlerinde, formülasyona giren amfifilik triblok kopolimer konsantrasyonunun artması ile nanopartiküllere yüklenen 5-FU miktarındaki artış göze çarpmakta olup, fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu artışın ve 5-FU’in hidrofilik

bir etkin madde olmasına karşın yüksek yükleme etkinliği elde edilmesi, nanopartiküllerin yüzeyini kaplayan ve yine hidrofilik bir madde olan PEG ile 5-FU'in etkileşmesi olarak açıklanabilir.

Tablo 4.13. 5-FU içeren nanopartikül formülasyonlarına ilişkin yükleme etkinliği sonuçları

Formülasyon Kodu	5-FU Yükleme Etkinliği (%) X $\pm$ SS* (n=3)
PLA ₁ +5 _{BK} +5-FU	90.90 $\pm$ 0.29
PLA ₁ +10 _{BK} +5-FU	95.23 $\pm$ 0.27
PLGA+5 _{BK} +5-FU	89.33 $\pm$ 0.20
PLGA+ 10 _{BK} +5-FU	93.93 $\pm$ 0.16
PLA ₂ + 5 _{BK} +5-FU	83.61 $\pm$ 0.42
PLA ₂ +10 _{BK} +5-FU	88.16 $\pm$ 0.37

*X: Ortalama, SS: Standart Sapma

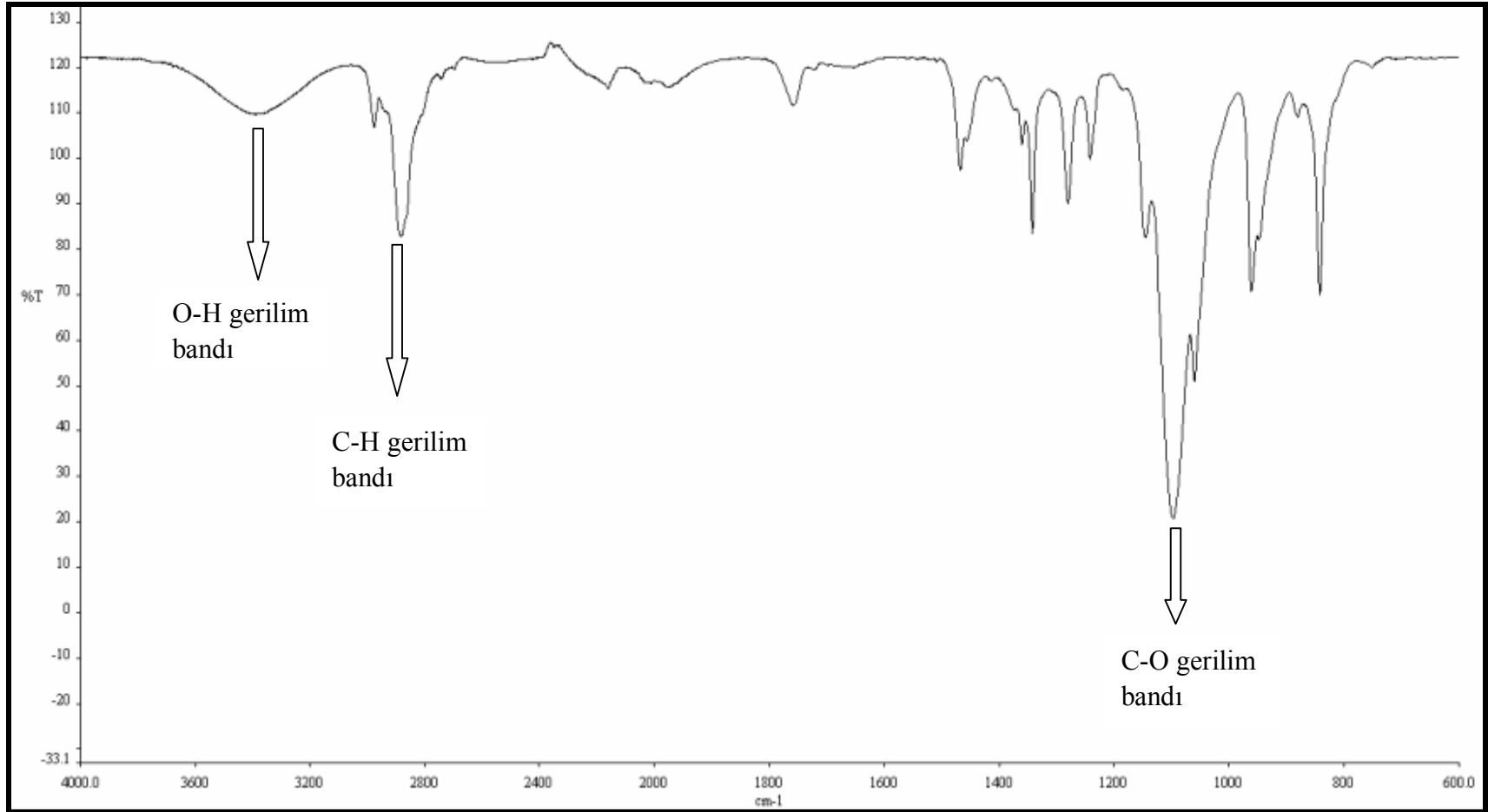
4.5.6. Nanopartiküllerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin Araştırılması

4.5.6.1. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

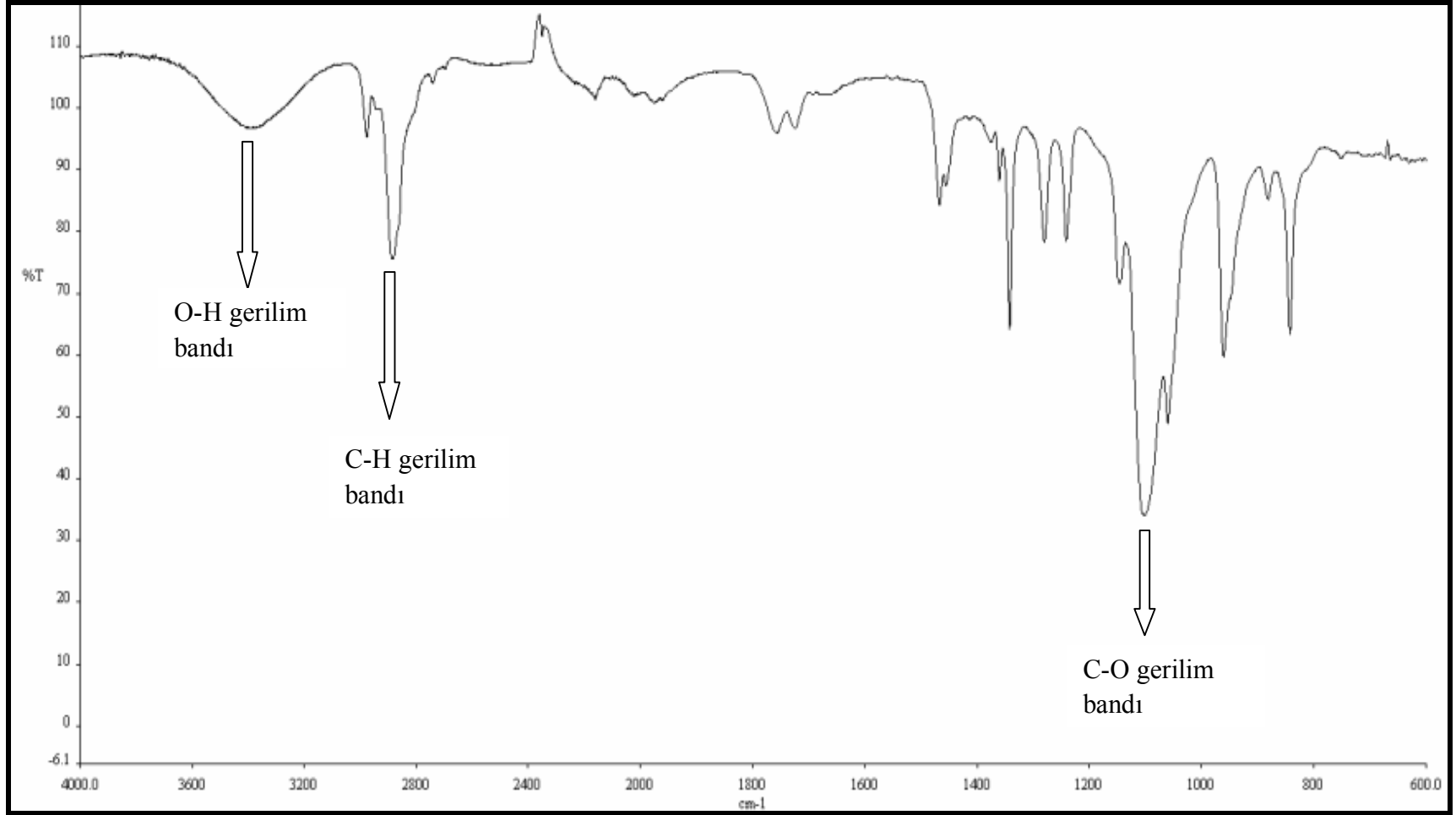
Nanopartikül formülasyonlarının Bölüm 3.2.5.6.1'de verildiği şekilde gerçekleştirilen FT-IR spektrumlarından, PLA₁, PLGA ve PLA₂ polimerleri ile hazırlanan formülasyonlara ait birer örnek spektrum Şekil 4.16'da, 4.17'de ve 4.18'de gösterilmiştir.

- PLA₁+10_{BK}+5-FU'in FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.16) 3388 (O-H gerilim), 2975 ve 2882 (C-H gerilim) ve 1097 cm⁻¹'de (C-O gerilim) karakteristik pikler görülmektedir.
- PLGA+10_{BK}+5-FU'in FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.17) 3388 (O-H gerilim), 2975 ve 2885 (C-H gerilim) ve 1102 cm⁻¹'de (C-O gerilim) karakteristik pikler görülmektedir.

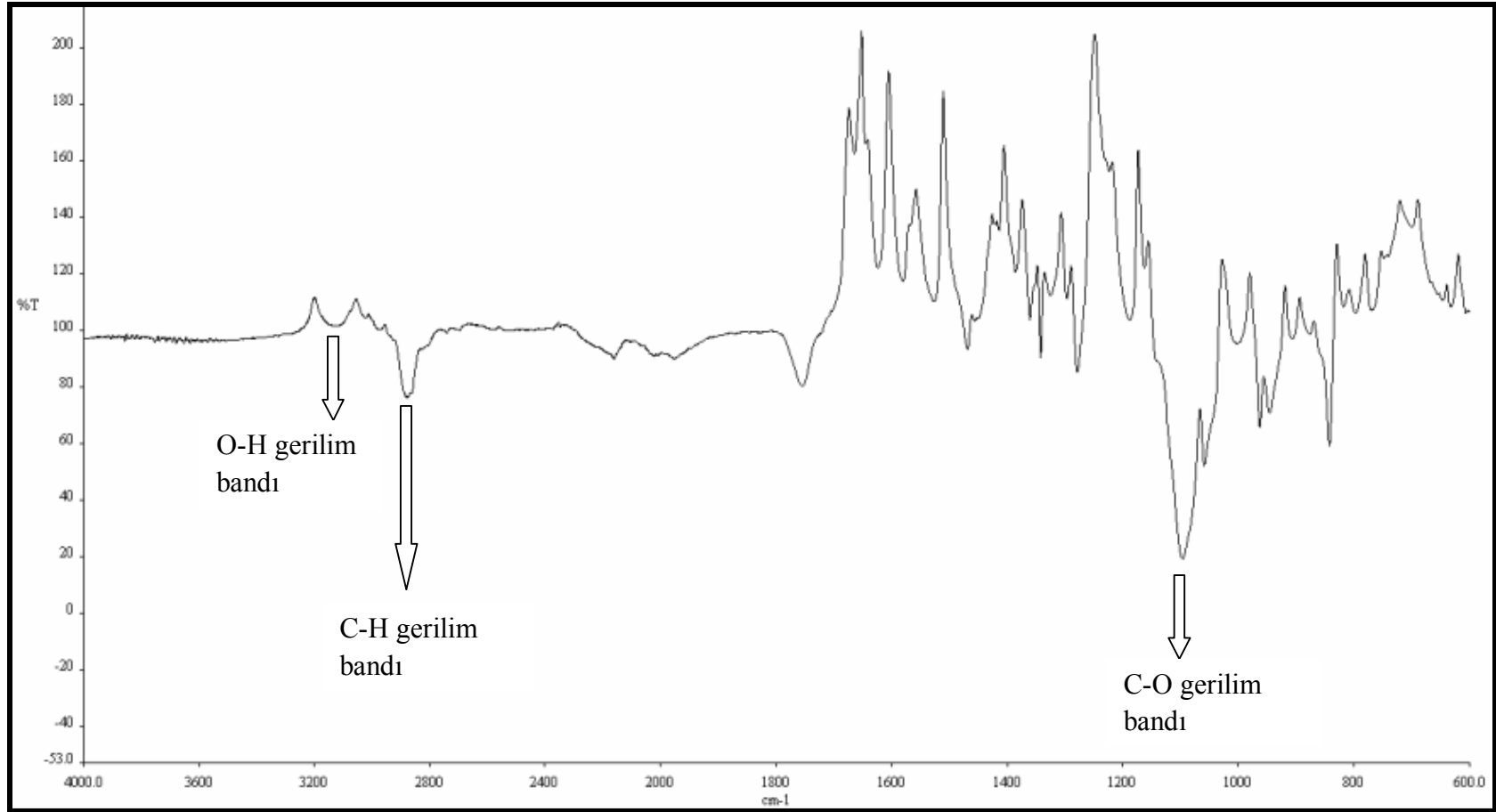
- PLA₂+10_{BK}+5-FU'in FT-IR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.18) 3275 (O-H gerilim), 2877 (C-H gerilim) ve 1096 cm⁻¹'de (C-O gerilim) karakteristik pikler görülmektedir.



Şekil 4.16. PLA₁+10BK+5FU formülasyonuna ilişkin FT-IR spektrumu



Şekil 4.17. PLGA+10_{BK}+5-FU formülasyonuna ilişkin FT-IR spektrumu



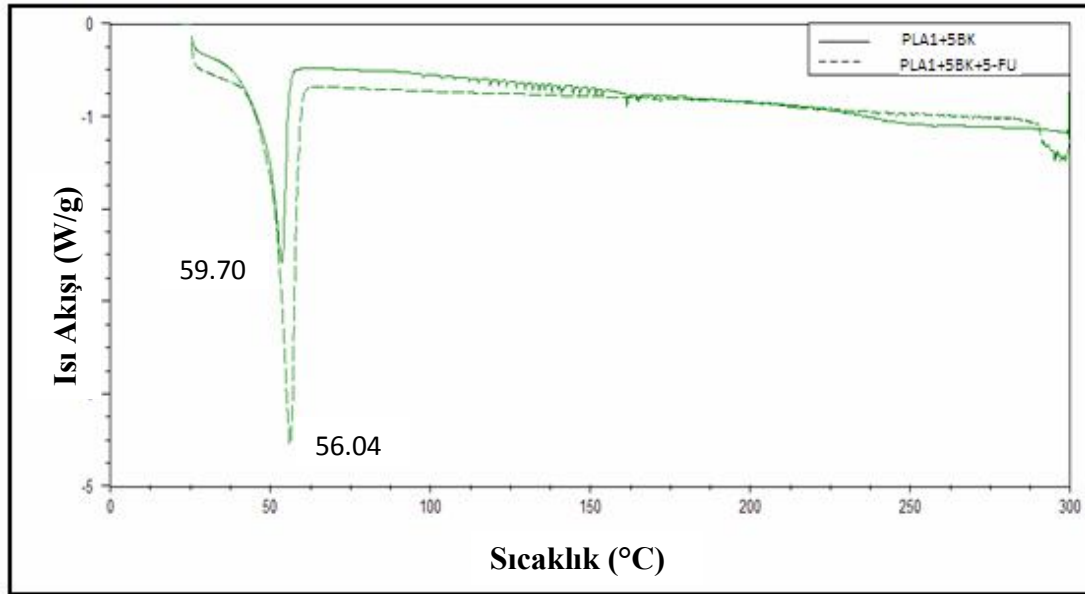
Şekil 4.18. PLA₂+10BK+5FU formülasyonuna ilişkin FT-IR spektrumu

4.5.6.2. DSC Termogramlarının İncelenmesi

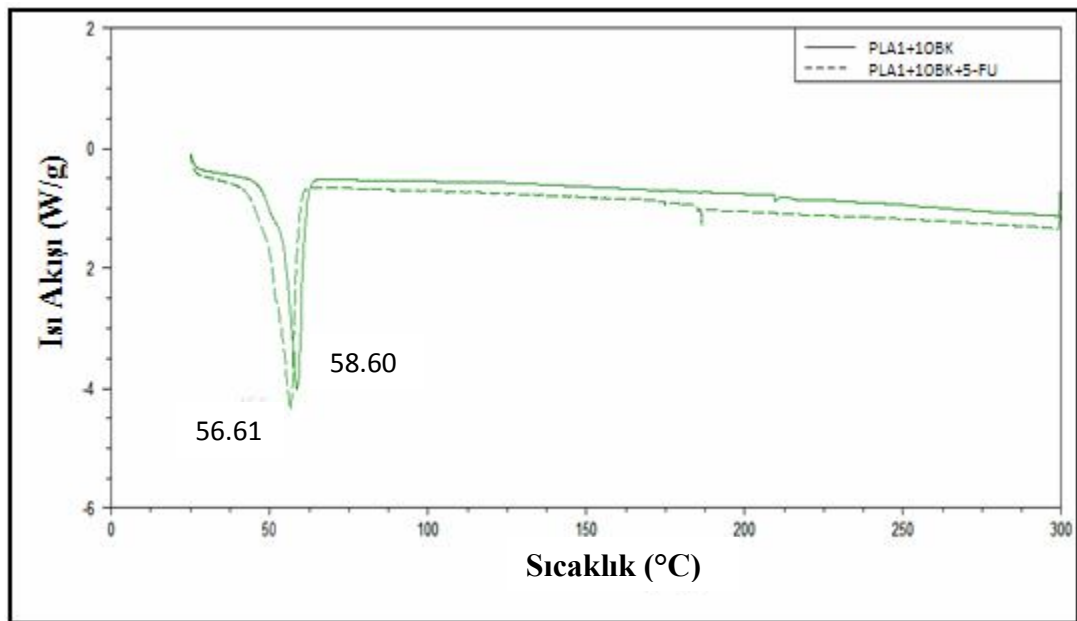
Nanopartikül formülasyonlarının Bölüm 3.2.5.6.2’de verildiği şekilde gerçekleştirilen, DSC analizlerinin termogramları Şekil 4.19’da gösterilmiştir.

Nanopartikül formülasyonlarının DSC termogramları incelendiğinde gözlenen pikler; PLA₁+5_{BK} için (A) 59.7 °C, PLA₁+5_{BK}+5-FU için (A) 56.04 °C, PLA₁+10_{BK} için (B) 58.60 °C, PLA₁+10_{BK}+5-FU için (B) 56.61 °C, PLGA+5_{BK} için (C) 56.04 °C, PLGA+5_{BK}+5-FU (C) için 50.36 °C, PLGA+10_{BK} için (D) 58.03 °C, PLGA+10_{BK}+5-FU için (D) 52.35 °C, PLA₂+5_{BK} için (E) 51.49 °C, PLA₂+5_{BK}+5-FU için (E) 50.97 °C, PLA₂+10_{BK} için (F) 50.96 °C, PLA₂+10_{BK}+5-FU için (F) 50.69 °C değerinde elde edilmiştir.

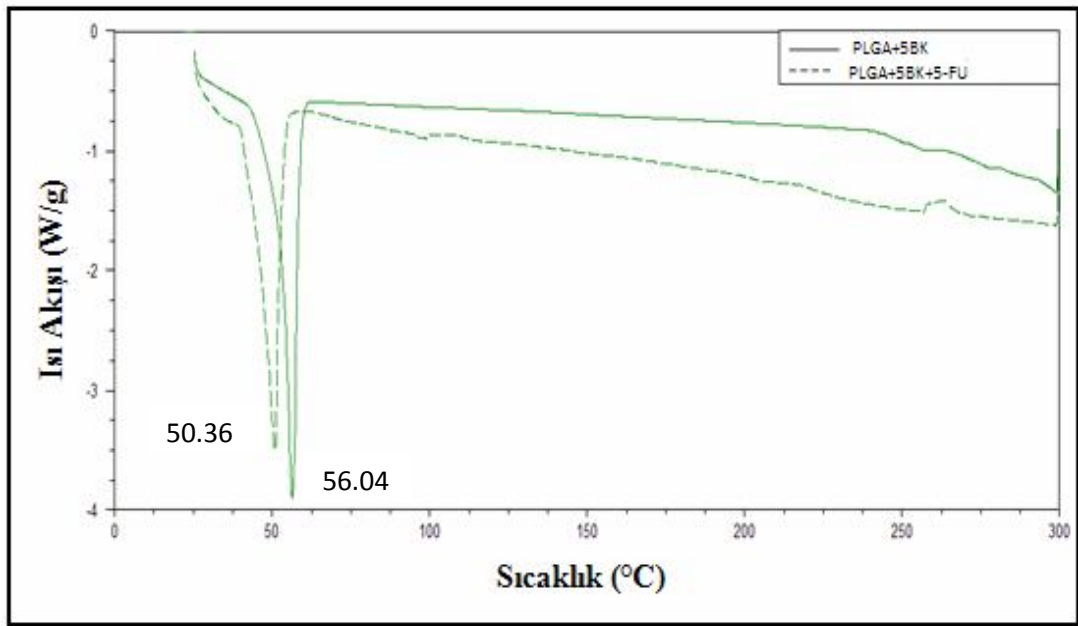
Çekilen DSC termogramları incelendiğinde (Şekil 4.19) etkin madde içermeyen nanopartiküller ile etkin madde içeren nanopartiküllerin termogramlarının hemen hemen birbirleriyle örtüştüğü gözlemlenmiştir. Formülasyona giren polimerlerin tek başına 5-FU’in 288 °C’de vermiş olduğu erime piki ile bir etkileşme yapmadığı gösterilmiştir. Etkin madde yüklenmiş nanopartiküllerde ise 5-FU’e ilişkin erime piki ortadan kaybolmuştur. Bu durumun, etkin maddenin misel yapıdaki nanopartiküllerin yapısına girmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



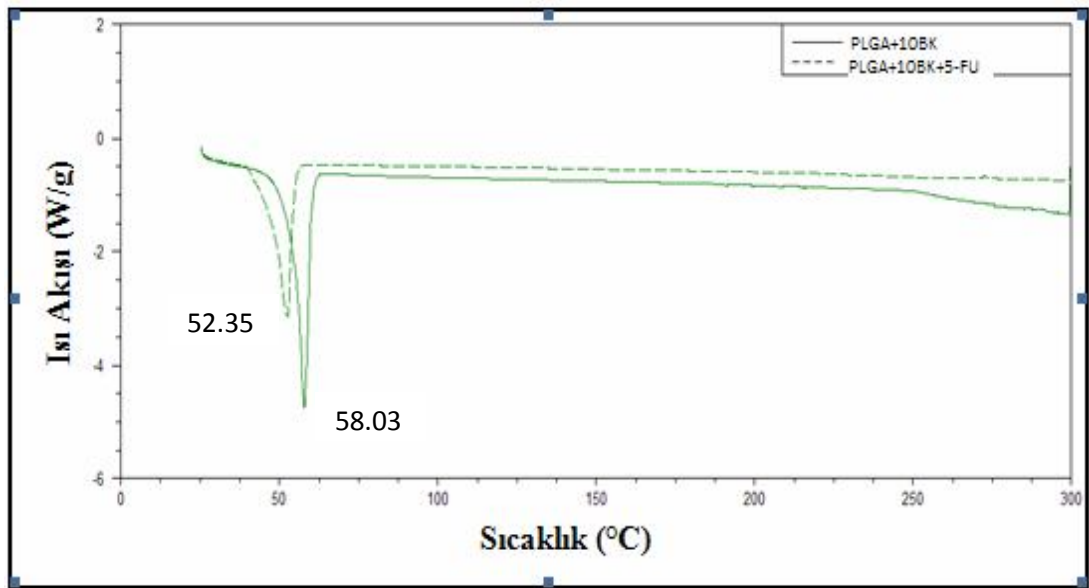
(A) PLA₁+5_{BK} ve PLA₁+5_{BK}+5-FU



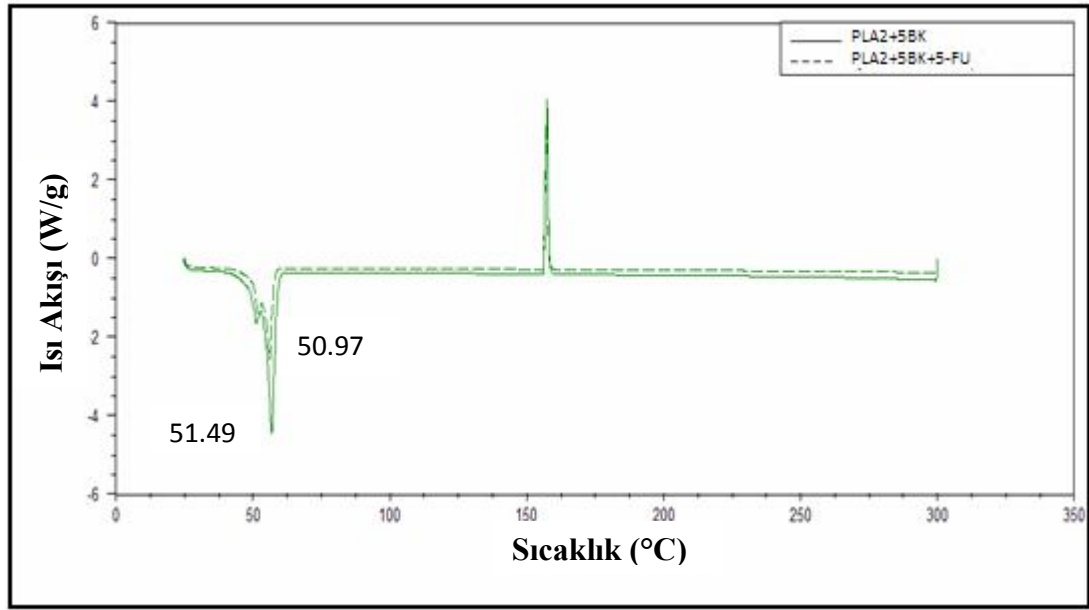
(B) PLA₁+10_{BK} ve PLA₁+10_{BK}+5-FU



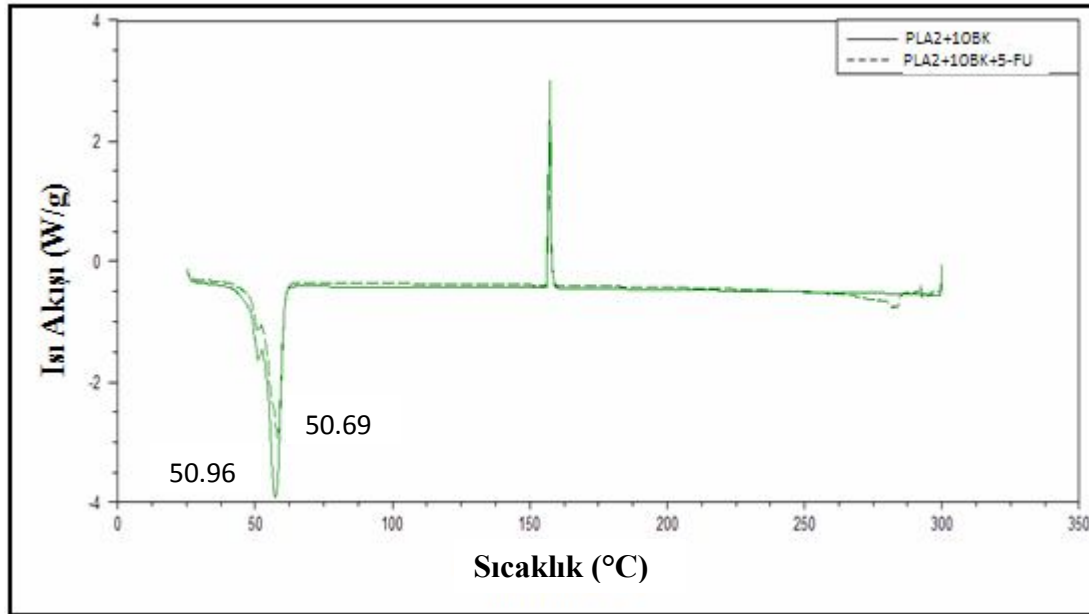
(C) PLGA+5_{BK} ve PLGA+5_{BK}+5-FU



(D) PLGA+10_{BK} ve PLGA+10_{BK}+5-FU



(E) PLA₂+5_{BK} ve PLA₂+5_{BK}+5-FU



(F) PLA₂+10_{BK} ve PLA₂+10_{BK}+5-FU

Şekil 4.19. Nanopartikül formülasyonlarına ilişkin DSC termogramları (A: PLA₁+5_{BK} ve PLA₁+5_{BK}+5-FU, B: PLA₁+10_{BK} ve PLA₁+10_{BK}+5-FU, C: PLGA+5_{BK} ve PLGA+5_{BK}+5-FU, D: PLGA+10_{BK} ve PLGA+10_{BK}+5-FU, E: PLA₂+5_{BK} ve PLA₂+5_{BK}+5-FU, F: PLA₂+10_{BK} ve PLA₂+10_{BK}+5-FU nanopartikülleri)

4.5.7. İn Vitro Salım Deneyleri

4.5.7.1. Salım Ortamı ve Deneyin Yapılışı

5-FU'in nanopartikül formülasyonlarından salım çalışmaları Bölüm 3.2.5.7.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen nanopartikül formülasyonlarından 5-FU'in salım grafikleri Şekil 4.20'de verilmiştir.

Formülasyonlar arasında 72. saatin sonunda elde edilen en yüksek orandaki salım %94.4 ile, düşük molekül ağırlıklı PLA kullanılarak hazırlanan, $PLA_2+10_{BK}+5-FU$ kodlu nanopartikül formülasyonunda; 72. saatin sonunda elde edilen en düşük orandaki salım ise % 90.9 ile, yüksek molekül ağırlıklı PLA kullanılarak hazırlanan, $PLA_1+10_{BK}+5-FU$ kodlu nanopartikül formülasyonunda gözlenmiştir.

Yüksek molekül ağırlıklı PLA ve 5 katı oranda PEG-PPG-PEG kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerden ($PLA_1+5_{BK}+5-FU$) 5-FU salım grafiği Şekil 4.18'de verildiği gibidir. Bu profile göre 1.8. saatte etkin maddenin % 50'si salınırken, 72. saat sonunda ise % 92'si salınmıştır. Salım verilerine göre $PLA_1+10_{BK}+5-FU$ nanopartiküllerinde 2.9. saatte etkin maddenin % 50'si salınırken, 72. saat sonunda ise % 90'ı salınmıştır. Düşük molekül ağırlıklı PLA kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin salım profili incelendiğinde ise $PLA_2+5_{BK}+5-FU$ nanopartiküllerinde 7.9. saatte etkin maddenin % 50'si salınırken, 72. saat sonunda ise % 92'si salınmış; $PLA_2+10_{BK}+5-FU$ nanopartiküllerinde de 6.7. saatte etkin maddenin % 50'si salınırken, 72. saat sonunda ise % 94'ünün salındığı tespit edilmiştir.

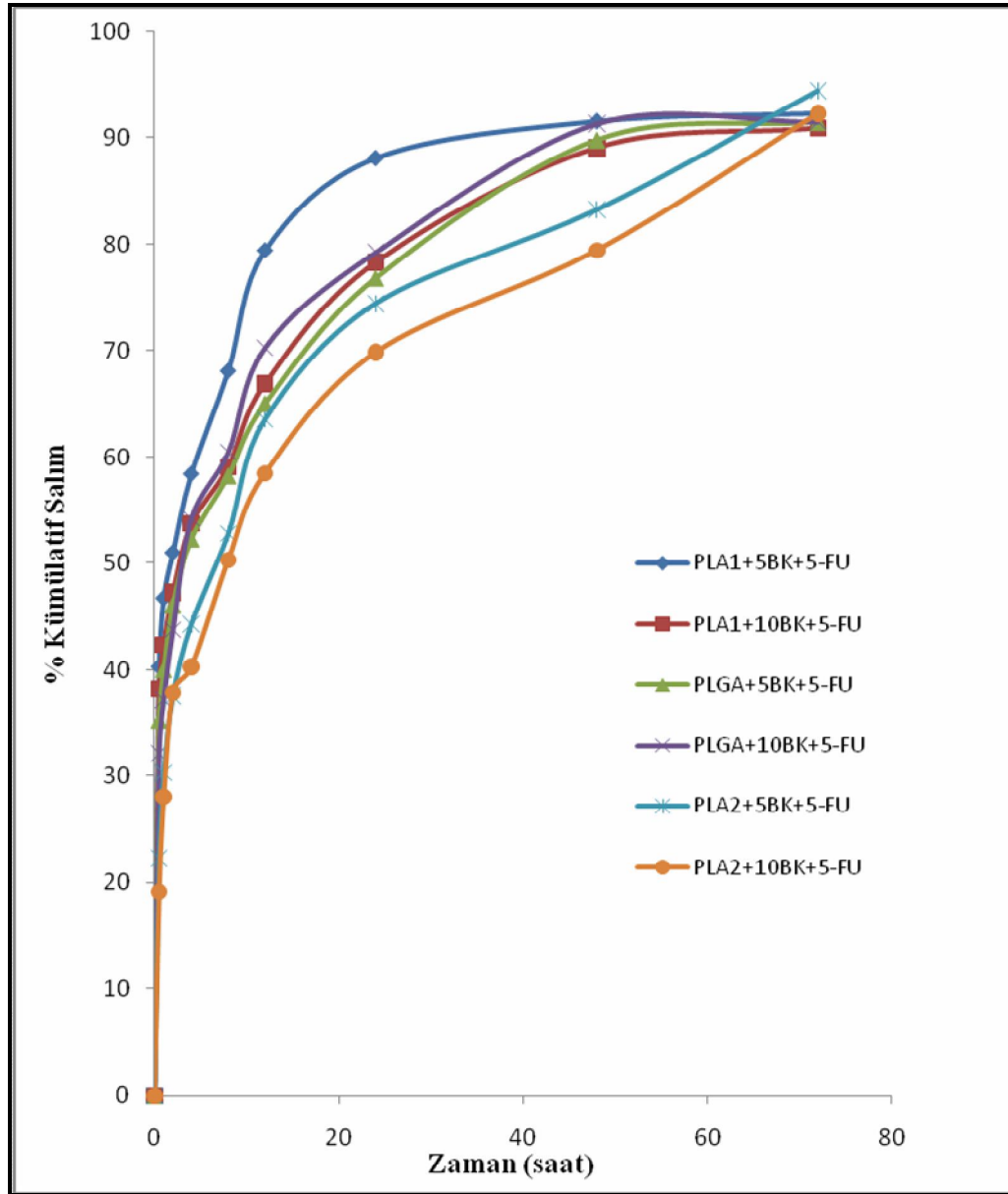
PLGA kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin salım grafiği incelendiğinde, $PLGA+5_{BK}+5-FU$ nanopartiküllerinde 3.27. saatte etkin maddenin % 50'si, 72. saat sonunda ise % 91'inin salındığı görülmüştür. $PLGA+10_{BK}+5-FU$ nanopartiküllerinde ise 3.19. saatte etkin maddenin % 50'si, 72. saat sonunda ise % 91'inin salındığı görülmüştür.

Sonuç olarak in vitro salım çalışmalarında, 1:10 oranında PLA ($M_w=10000$ Da) ve PEG-PPG-PEG kullanılarak hazırlanan formülasyon 6.7. saatte etkin maddenin % 50'sini salarken, 72. saat sonunda en yüksek oranda (% 94) 5-FU salan formülasyon olmuştur.

Nanopartiküllerden etkin maddenin salımının hangi kinetik modele göre gerçekleştiğinin tayini için 0. derece, Higuchi ve Hixon-Crowell modelleri uygulanmış ve nanopartikül formülasyonları için en büyük R^2 değeri Higuchi kinetiğinden elde edilmiştir (Tablo 4.14). Nanopartiküllerden etkin madde salımının uyduğu Higuchi kinetiği matriksten ilaç salımını öngören bir kinetiktir (1) .

Tablo 4.14. Nanopartikül formülasyonlarının salım kinetiklerinin değerlendirilmesine ilişkin veriler

Formülasyon	Uygulanan Kinetik Model								
	Higuchi			0.derece			Hixon-Crowell		
	m	n	R ²	m	n	R ²	m	n	R ²
PLA ₁ +5 _{BK} +5-FU	6.87	44.23	0.86	0.66	55.86	0.67	0.03	1.13	0.78
PLA ₁ +10 _{BK} +5-FU	7.04	38.05	0.96	0.71	49.35	0.82	0.03	0.92	0.91
PLGA+5 _{BK} +5-FU	7.42	35.47	0.96	0.75	47.34	0.82	0.03	0.87	0.92
PLGA+ 10 _{BK} +5-FU	7.83	34.66	0.92	0.77	47.51	0.75	0.03	0.89	0.87
PLA ₂ + 5 _{BK} +5-FU	8.70	22.18	0.96	0.89	35.99	0.83	0.03	0.60	0.95
PLA ₂ +10 _{BK} +5-FU	8.83	27.75	0.95	0.89	38.90	0.81	0.03	0.66	0.94



Şekil 4.20. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarından 5-FU salımı (n=6)

* Formülasyon kodlarının açıklaması için bkz. Tablo 4.9.

4.5.7.2. İn Vitro Salım Deneylerinin Validasyonu

Bölüm 3.2.5.7.2’de anlatılan in vitro salım deneylerinin validasyon çalışmalarına göre tüm nanopartikül formülasyonlarının, in vitro salım deneyi sonunda salınan % kümülatif 5-FU miktarları için hesaplanan varyasyon katsayıları Tablo 4.15’de verilmiştir.

Tablo 4.15. Nanopartikül formülasyonlarından in vitro salım deneylerinin validasyonuna ilişkin bulgular

Formülasyon Kodu	Varyasyon Katsayısı (%)
PLA ₁ +5 _{BK} +5-FU	0.16
PLA ₁ +10 _{BK} +5-FU	0.16
PLGA+5 _{BK} +5-FU	0.09
PLGA+ 10 _{BK} +5-FU	0.06
PLA ₂ + 5 _{BK} +5-FU	0.16
PLA ₂ +10 _{BK} +5-FU	0.14

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde tüm formülasyonlarda varyasyon katsayısı değerinin % 1'den küçük olduğu görülmüştür.

4.5.8. Caco-2 Hücreler ile Sitotoksite Çalışmaları

Tez çalışmalarımızda değerlendirmeye alınan formülasyonlara ilişkin sitotoksite çalışmaları, deneysel kısımda (Bölüm 3.2.5.8) belirtildiği gibi yapılmıştır. Bu kapsamda, etkin madde içermeyen ve etkin madde içeren nanopartikül formülasyonları Caco-2 hücrelerine uygulanmıştır.

Bu konuya ilişkin çalışmalarda, etkin madde içermeyen formülasyonlar kontrol grubu olarak kullanılmış, 10 µg ve 100 µg 5-FU içeren formülasyonlar ile direkt kuyucuklara eklenen formülasyonların Caco-2 hücreleri üzerinde % hücre canlılığı değerleri grafiklenmiş ve sitotoksite sonuçları gösterilmiştir.

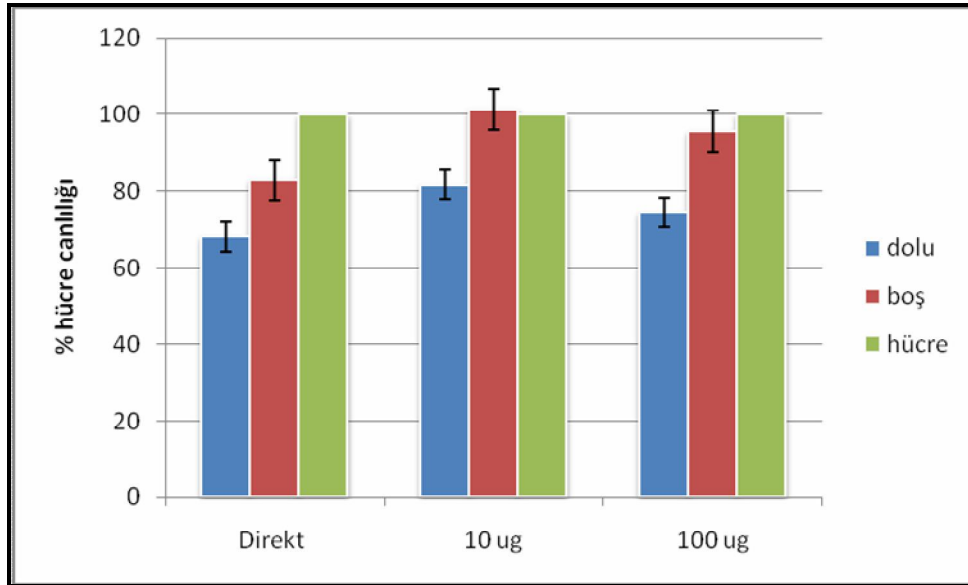
PLGA+5_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksite sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.21), direkt formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 68.19, 10 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 81.74, 100 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı ise % 74.50 olarak bulunmuştur.

PLGA+10_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksosite sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.22), direkt formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 68.41, 10 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 93.12, 100 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı ise % 73.70 olarak bulunmuştur.

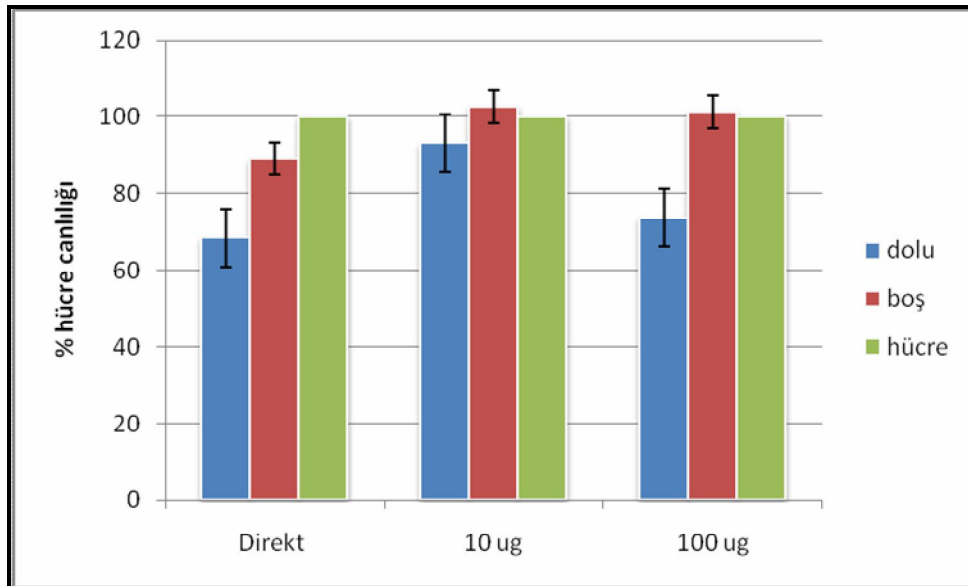
PLA₂+5_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksosite sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.23), direkt formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 38.70, 10 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 82.33, 100 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı ise % 66.01 olarak bulunmuştur.

PLA₂+10_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksosite sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.24), direkt formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 36.52, 10 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 47.83, 100 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı ise % 51.88 olarak bulunmuştur.

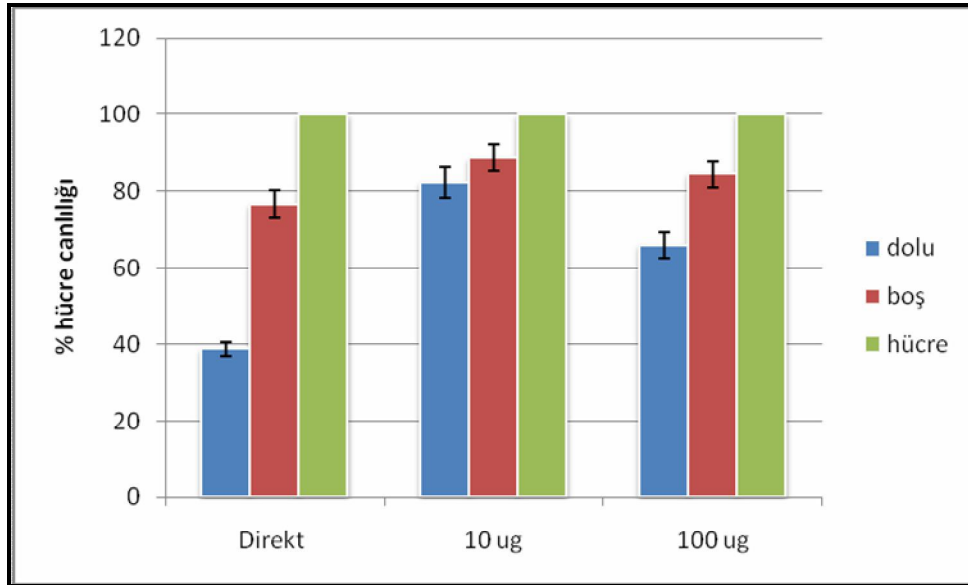
Sonuç olarak PLA₂+10_{BK}+5-FU kodlu formülasyon, Caco-2 hücreleri üzerinde en yüksek sitotoksositeye sahip olduğu için antikanser etkinlik bakımından en uygun bulunan formülasyon olmuştur.



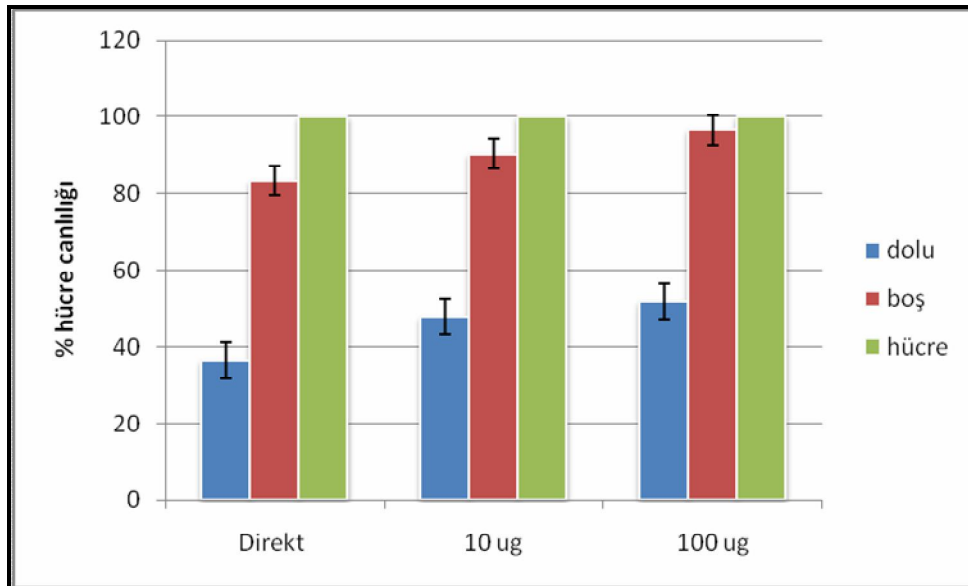
Şekil 4.21. PLGA+5_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksosite sonuçları (n=3)



Şekil 4.22. PLGA+10_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksosite sonuçları (n=3)



Şekil 4.23. $PLA_2+5_{BK}+5-FU$ formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksosite sonuçları (n=3)



Şekil 4.24. $PLA_2+10_{BK}+5-FU$ formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksosite sonuçları (n=3)

5. TARTIŞMA

Tez çalışmaları boyunca sürdürülen deneysel çalışmaların ve bu çalışmalardan elde edilen bulguların değerlendirmesi bu bölümde yapılacak ve bu sonuçlar literatür verileriyle karşılaştırılarak tartışılacaktır. Bu amaçla etkin madde 5-FU'in ve kullanılan polimerlerin fizikokimyasal özellikleri üzerinde yapılan çalışmalar, nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması ve üretilen nanopartiküllerin in vitro karakterizasyonları (morfolojik özellikleri, partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, üretim verimi, yüklenen etkin madde miktarı, FT-IR spektrumu, DSC termogramı, in vitro salım sonuçları, sitotoksosite çalışmaları) değerlendirilmiştir.

5.1. Etkin Maddenin Fizikokimyasal Özellikleri ile İlgili Çalışmalar

Tez çalışmamızda, formülasyon çalışmalarına başlamadan önce 5-FU'in fizikokimyasal özellikleri incelenmiş ve sonuçlar literatür verileri ile karşılaştırılarak etkin maddenin karakterizasyonu ve saflık kontrolleri tamamlanmıştır. Bu amaçla, etkin maddenin iki farklı ortamda UV spektrumu çekilmiş, erime derecesi tayini yapılmış, DSC analizi gerçekleştirilmiş ve FT-IR spektrumu çekilmiştir.

5-FU için literatürde yer alan yöntemler içinden pratik olması ve uygulama kolaylığı açısından UV spektroskopisi seçilmiş ve çalışmalarda bu yöntem ile miktar tayini yapılmıştır (220) . 5-FU'in miktar tayini yönteminin validasyonu ve nanopartiküllerde etkin madde içeriği tayini deneyleri için PBS (pH 7.4) çözeltisinde ve distile suda UV spektrumları çekilmiştir. 5-FU, distile suda 266.0 nm'de (Bölüm 4.1.1, Şekil 4.1), PBS (pH 7.4) çözeltisinde ise 266.4 nm'de (Bölüm 4.1.1, Şekil 4.2) $\lambda_{\max}$ vermiştir ve bu değerler literatürde yer alan değerlerle uyum içinde bulunmuştur (210) .

5-FU'in 400–4000 cm^{-1} dalga sayısı aralığında çekilen FT-IR spektrumunda (Bölüm 4.1.2, Şekil 4.3) karakteristik madde pikleri görülmektedir. Çekilen FT-IR spektrumu referans spektrumla karşılaştırılmış, farklı dalga sayılarına karşılık gelen

absorbsiyon bantlarının, 5-FU'in kimyasal yapısıyla ve referans spektrumla uyum içinde olduğu görülmüştür (211) .

5-FU'in erime derecesine ilişkin, erime derecesi tayin cihazı kullanılarak elde edilen değer, (Bölüm 4.1.3) kaynak literatürlerde 5-FU'in erime derecesi olarak verilen 283-285 °C değerleri ile uyum içinde bulunmuştur (212) . Aynı şekilde, Bölüm 4.1.4'de verilen, etkin maddeye ilişkin DSC termogramında (Şekil 4.4), etkin maddenin keskin bir pik verdiği ve bu pikin de erime derecesine ait olduğu literatürde yer alan veriler ile doğrulanmıştır (212) .

5.2. 5-FU'in Spektrofotometrik Miktar Tayini ve Analitik Yöntem Validasyonu

5-FU'in miktar tayini, UV spektrofotometrik yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 2-12 µg/ml konsantrasyon aralığında kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Kullanılan analitik yöntemin validasyonu (Bölüm 4.2) için yapılan çalışmalarda 5-FU'in distile su ve PBS (pH 7.4) tamponu olmak üzere iki farklı ortamda kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Hazırlanan altı farklı konsantrasyonda çizilen kalibrasyon doğruları ve bu doğrulara ilişkin denklemler Şekil 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir. Validasyon parametrelerinden regresyon katsayısı her iki ortam için de 0.999 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ile, çalışılan aralıkta 5-FU için elde edilen kalibrasyon doğrusunun doğrusallığı gösterilmiştir. Bu kapsamda ayrıca diğer validasyon parametreleri olan tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve doğruluk için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen değerlere ilişkin varyasyon katsayıları ile tayinin hassas ve tekrarlanabilir olduğu kanıtlanmış, ayrıca formülasyonlarda kullanılacak maddelerin ve ortamların analiz esnasında birbiriyle herhangi bir girişim oluşturmadığı da gösterilmiştir (207) .

Tez çalışmalarımızda, 5-FU için kullandığımız analitik yöntemin validasyon sonuçları değerlendirildiğinde, bilimsel güvenilirliği olan söz konusu UV spektrofotometri metodunun, 5-FU'in kantitatif miktar tayini gerektiren tüm deneysel aşamalarında kullanılabilecek bir yöntem olduğu gösterilmiştir.

5.3. Kullanılan Polimerlerin Fizikokimyasal Özellikleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar

Tez çalışmamızın bu kapsamında, nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan polimerlerin spesifikasyonlara uygunluğunun belirlenmesi amacıyla termal davranışları ve kimyasal yapıları incelenmiştir. Bu amaçla DSC termogramları ve FT-IR spektrumları çekilmiştir. Bilindiği üzere FT-IR spektrumu yapı tayininde kullanılan bir analizdir. Bölüm 4.3.1’de, nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan PLA₁ (Şekil 4.7), PLA₂ (Şekil 4.8), PLGA (Şekil 4.9) ve PEG-PPG-PEG’in (Şekil 4.10) FT-IR spektrumları verilmiştir. Bu polimerlerin yapısında yer alan kimyasal bağlara ait bantlar elde edilmiş olup, bu sonuçlar referanslar ile uyum içinde bulunmuştur (221-224) .

Nanopartiküllerin termal özelliklerini incelemek amacıyla da DSC termogramları çekilmiştir. Bilindiği üzere, polimerleri karakterize etmek için kullanılan, erime sıcaklığı (T_m) ve camsı geçiş sıcaklığı (T_g) olmak üzere iki ana geçiş sıcaklığı vardır. Amorf polimerler T_g gösterirken, kristal polimerler ise T_m sıcaklığını gösterirler. Sert ve camsı polimerin, yumuşak durumdaki hali ile dengede olduğu sıcaklığa camsı geçiş sıcaklığı denir. Polimer zincirleri camsı geçiş sıcaklığı T_g ’nin altında sert ve kırılğan, T_g ’nin üzerinde yumuşak ve esnek durumdadır. Kristal polimerlerin termal özelliklerini tanımlamak için kullanılan erime sıcaklığı ise polimer zincirlerinin erimeye başladığı sıcaklık olarak kabul edilir. Bu kapsamda DSC analizi yardımıyla tez çalışmamızda kullanılan polimerlerin termal özelliklerini tanımlayan uygun sıcaklık değerleri (T_g / T_m) analiz edilmiştir.

Bölüm 4.3.2’de, nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan PLA₁ (Şekil 4.11), PLA₂ (Şekil 4.12), PLGA (Şekil 4.13) ve PEG-PPG-PEG’in (Şekil 4.14) DSC termogramları verilmiştir. DSC analizleri sonucunda, nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan PLA₁, PLGA, PLA₂’nin camsı geçiş, PEG-PPG-PEG’in ise erime derecesi tayin edilmiştir. Bu sonuçlar referanslar ile uyum içindedir (213-215) .

5.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

5.4.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Tez çalışmalarımız kapsamında amacımıza uygun olarak geliştirilecek nanopartikül formülasyonlarının hazırlanabilmesi için gerekli ön denemeleri (Bölüm 4.4.1) gerçekleştirmek üzere; toksik özellik göstermeyen, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen PLA ve PLGA polimerleri seçilmiştir. Nanopartikül formülasyon çalışmalarında kullanılan amfifilik triblok kopolimer PEG-PPG-PEG'in iki farklı molekül ağırlığına sahip tipleri (M_n :8400 ve M_n :14600 Da) hem düzgün şekilli nanopartiküllerin hazırlanabilmesi hem de uygun salım profiline ulaşabilmek için ön formülasyon çalışmalarında kullanılmıştır.

PLA ve PLGA polimerleri ile farklı üretim yöntemleri kullanılarak hazırlanmış olan nanopartikül çalışmaları literatürde yer almaktadır (116-118) . Tez çalışmamızda PLA ve PLGA polimerleri, amfifilik triblok kopolimer PEG-PPG-PEG ile birlikte karıştırılarak, karışım (blend) şeklinde formüle edilmiş, nanopartikül üretim yöntemi olarak emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi tercih edilmiştir (41) .

Öncelikle çekirdek oluşturu polimer olarak PLA (M_w =75000-120000 Da) ve yüzey aktif madde olarak da PEG-PPG-PEG (M_n :8400) kombinasyonu; 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 ve 1:10 olmak üzere farklı oranlarda kullanılmıştır. İlk olarak mümkün olan en düşük yüzey aktif madde konsantrasyonundan başlanmış, nanopartikül elde edilemediği için konsantrasyon giderek artırılmış ve nanopartikül oluşumu izlenmiştir.

Bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı üzere, nanopartikül formülasyonları hazırlanırken mekanik karıştırıcı ile karıştırma basamağını takiben elde edilen nanopartikül süspansiyonu incelendiğinde homojen bir yapıda olmadığı ve dipte tortu benzeri yapılar olduğu gözlemlenmiştir. Bu süspansiyondan alınan bir damla örnek, optik mikroskop yardımıyla incelendiğinde lifsi yapılar gözlemlenmiş ve bu yapıların

nanopartikül oluşturmamayan polimerlerin artıkları olabileceği düşünülmüştür. Nanopartiküller optik mikroskop ile görüntülenemeyecek kadar küçük yapılar olduğu için aslında amaçlanan optik mikroskopta bir görüntü elde etmek değil aksine elde etmemektir. Ancak, nanopartikülün oluşmuş olma olasılığı da bulunduğu için partikül boyutunun ölçülmesi ya da uygun görüntüleme teknikleri (SEM, TEM, AFM) gibi diğer karakterizasyon yöntemleri ile nihai karar verilebilmektedir. Ön formülasyon çalışmalarımızda, PLA ($M_w=75000-120000$ Da) ve PEG-PPG-PEG'in çeşitli konsantrasyonları kullanılarak yapılan denemelerin hiçbirinden ($M_n:8400$) olumlu sonuç alınamadığı için, bu polimer kombinasyonunun formülasyon için uygun bir seçim olmadığına karar verilmiştir.

Daha sonra çekirdek oluşturu polimer [PLA ($M_w=75000-120000$ Da)] ve üretim koşulları aynı tutulmuş, yüzey aktif madde olarak kullanılan PEG-PPG-PEG'in daha yüksek molekül ağırlığına sahip olan tipi ($M_n:14600$) denemeye alınarak 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 ve 1:10 olmak üzere farklı oranlarda kombinasyonlar kullanılmıştır. 1:1, 1:2, 1:3 ve 1:4 oranlarında homojen bir nanopartikül süspansiyonu elde edilememekle beraber, yüzey aktif madde oranı arttıkça süspansiyonda oluşan lifsi yapılar ve tortu oluşumunun azaldığı gözlenmiş, 1:5 ve 1:10 oranları kullanılarak hazırlanan süspansiyonlarda bu yapı ve oluşumların tamamen kaybolmasını takiben homojen bir nanopartikül süspansiyonu elde edilebilmiştir.

Daha sonra, çekirdek oluşturu olarak kullanılan polimer değiştirilmiş ve diğer bir polimer PLGA ($M_w=34000$ Da), amfifilik triblok kopolimer PEG-PPG-PEG'in her iki farklı molekül ağırlığına sahip tipi ($M_n:8400$ ve $M_n:14600$ Da) ile aynı oranlarda (1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 ve 1:10) karıştırılarak nanopartikül formülasyonu hazırlanması amaçlanmıştır. Her iki molekül ağırlığına sahip blok kopolimer ile elde edilen sonuçlar benzer olup, homojen bir nanopartikül süspansiyonu elde edilememekle beraber, yüzey aktif maddenin oranı ve molekül ağırlığının artmasıyla süspansiyonda oluşan lifsi yapılar ve tortu oluşumu azalmış fakat bu yapı ve oluşumlar tamamen kaybolmamıştır.

Ön formülasyon çalışmaları kapsamında son olarak çekirdek oluşturuu polimer olarak PLGA ($M_w=12500-30000$ Da) kullanılmış ve önce PEG-PPG-PEG'in düşük molekül ağırlığına sahip tipi ($M_n:8400$), daha sonra ise daha yüksek molekül ağırlığına sahip olanı ($M_n:14600$) ile 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 ve 1:10 oranlarında karıştırılarak formülasyon denemeleri yapılmıştır. PEG-PPG-PEG ($M_n:8400$) ile gerçekleştirilen formülasyon denemelerinden olumlu sonuç alınamamış, PEG-PPG-PEG ($M_n:14600$) ile yapılan formülasyon çalışmalarında ise Tablo 4.8'den de anlaşılacağı üzere PEG-PPG-PEG ($M_n:14600$)'in PLA ($M_w=75000-120000$ Da) ile birlikte verdiği sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiş yani sadece 1:5 ve 1:10 oranlarında istenen homojen özelliğe sahip nanopartikül formülasyonlarına ulaşılabilmiştir.

Ön formülasyon çalışmaları incelendiğinde görülmektedir ki kullanılan amfifilik triblok kopolimerin oranının ve molekül ağırlığının artmasıyla ve çekirdek oluşturuu polimerin molekül ağırlığının düşmesi ile daha homojen görünümlü nanopartikül süspansiyonları elde edilmiştir. Bu durumda misel yapısına sahip nanopartiküllerin oluşumunu sağlayan ve oluşan yapının dayanıklılığını artıran yüzey aktif madde miktarının nanopartikül oluşumu açısından önemli olduğu ve yüzey aktif madde miktarı yeterli olmadığı takdirde istenilen formülasyonlara ulaşamadığı sonucunu çıkarmak mümkün görülmektedir.

5.4.2. Emülsifikasyon ve Çözücü Buharlaştırma Yöntemi ile Nanopartiküllerin Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmaları sonucundaki verilere dayanarak nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesi için PLA₁ [PLA ($M_w=75000-120000$ Da)] ve PLGA ($M_w=12500-30000$ Da) polimerlerinin PEG-PPG-PEG ($M_n:14600$) ile 1:5 ve 1:10 oranlarında kullanılmasına karar verilmiştir. Zira, elde edilen veriler bize çekirdek oluşturuu polimerin düşük molekül ağırlıklı olmasının nanopartikül oluşumu açısından elverişli olduğunu göstermiştir. Bu bilgi ışığı altında, Bölüm 4.4.2'de görüleceği üzere düşük molekül ağırlıklı üçüncü bir polimerin (PLA₂) [PLA ($M_w=10000$ Da)], PEG-PPG-PEG ($M_n:14600$) ile 1:5 ve 1:10 oranlarında

kullanılmasıyla iki adet daha yeni formülasyonun denenebileceği düşünülmüştür. Böylece, Tablo 4.9’da görüldüğü gibi elde edilen dört adet formülasyona iki tane daha eklenmiş, sonuç formülasyonlara etkin madde yüklemesi de yapılarak toplam 12 adet formülasyon tez çalışmalarımız kapsamında değerlendirmeye alınmıştır.

PLGA ve PLA polimerleri biyoparçalanır, biyouyumlu ve FDA tarafından onaylı olmaları gibi üstün özelliklerinden dolayı, tez çalışmamızda geliştirilecek nanopartikül formülasyonlarında kullanılmak üzere, polikaprolakton, poliakrilik asit ve polistiren (35,40,42) gibi farklı alternatifler arasından seçilmişlerdir. Ancak, daha önemlisi misel yapıdaki nanopartiküler sistemler için uygun çekirdek oluşturu polimerler olmaları ve literatürde bu amaçla, amfifilik blok kopolimerler ile beraber kullanıldıkları belirtildiği için de tercih edilmişlerdir (41,225-226) . PLA ve PLGA kullanılarak üretilen nanopartiküller için hazırlama yöntemi olarak emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi seçilmiştir (41) .

Kunii ve diğ. (41) de PEG-PPG-PEG ve PLA kullanarak hazırladıkları formülasyonlar için üretim yöntemi olarak emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemini seçmişlerdir. Hem hazırlanan formülasyonun dayanıklılığını artırdığı bilinen, hem de yüzey aktif özellik gösterdiği için sulu faz ve organik faz arasındaki ara yüzey gerilimini düşürerek, başka bir sürfaktana gereksinim olmaksızın bu iki fazın karışmasını sağlayan PEG-PPG-PEG kullanıldığı takdirde “emülsifikasyon” olayı kendiliğinden gerçekleşmekte, bu da yöntemin tercih edilmedeki üstünlüğünü açıklayabilmektedir.

5.5. Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

5.5.1. Morfolojik Özellikler

PLA₁, PLGA, PLA₂ polimerleri (Tablo 4.9) ve amfifilik triblok kopolimer kullanılarak hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının yüzey özelliklerinin izlenebilmesi için SEM fotoğrafları çekilmiştir (Bölüm 4.5.1, Şekil 4.15). SEM fotoğrafları incelendiğinde, etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlarda

amfifilik triblok kopolimer konsantrasyonunun ve çekirdek oluşturuucu polimerin türü ile çekirdek oluşturuucu polimerin molekül ağırlığının nanopartiküllerin yüzey özelliklerinde belirgin bir değişiklik oluşturmadağı gözlenmiştir. Formülasyonlara etkin madde yüklenmesinin de morfolojik özellikler üzerinde gözlenebilen bir etki oluşturmadağı görülmüştür. Partikül büyüklüğü analiz çalışmalarında, formülasyonların homojene yakın bir dağılım gösterdağı ve partiküler yapıda olduğı görülmüştür fakat SEM fotoğrafları çekimi sırasında uygulanan yüksek elektron bombardımanı, polimerlerin yapısına zarar verdağı için görüntülerin netlikleri beklenen düzeyde olmamıştır. Literatürde blok kopolimerler kullanılarak, emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi ile hazırlanan nanopartikül çalışmalarında da elde edilen nanopartiküllerin benzer şekilde bir yapıda olduğı bildirilmektedir (227-229) .

Wang ve diğ. (227) dekstran-blok-poli-ε-kaprolakton amfifilik blok kopolimerini kullanarak emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi ile doku ve hücrelerde görüntüleme yapmak amacıyla kullanılacak, manyetik demir oksit yüklü nanopartiküller hazırlamışlar ve SEM ile görüntüleme yapmışlardır. Küresel ve gözeneksiz bir yapı elde etmişler fakat Malvern Nanosizer ile elde ettikleri partikül boyutu sonuçları ile, elde ettikleri görüntü karşılaştırıldığında, SEM fotoğraflarında az da olsa daha büyük boyutta partiküller gözleddağı dikkati çekmektedir. Tez çalışmamız kapsamında hazırlamış olduğumuz nanopartikül formülasyonlarında da görülmekte olan bu durumun, bahsi geçen çalışmada da belirtildiğı üzere, sulu ortamda partikül boyutu ölçülen nanopartiküller kurutulduktan sonra görüntülendikleri için, bu arada oluşabilecek agregasyondan kaynaklanabileceğı düşünölmektedir.

5.5.2. Partikül Büyüklüğü Tayini

Tez çalışmalarımız kapsamında hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri incelendiğinde (Bölüm 4.5.2, Tablo 4.10), bütün formülasyonların partikül büyüklüklerinin 145-197 nm aralığında yer aldaiğı görülmüştür. Aynı polimer konsantrasyonunda farklı polimer tipine sahip olan

nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri karşılaştırıldığında polimer tipinin istatistiksel olarak partikül büyüklüğü üzerinde etkili olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Literatürde polimer tipine, oranına ve hazırlama yöntemine göre farklılık gösteren, amfifilik blok kopolimerler kullanılarak hazırlanan, çeşitli boyutlarda misel yapıda nanopartiküllerin elde edildiği bildirilmektedir (41,230-231) .

Wei ve diğ. (232) Pluronic[®] kullanarak film kaplama yöntemi ile nanopartikül formülasyonları hazırlamışlar, antikanser amaçla kullanılmak üzere paklitaksel yüklemişler ve formülasyonlara ait in vitro karakterizasyon çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmalardan partikül büyüklüğü tayin sonuçları incelendiğinde oldukça küçük boyutta (~25 nm) partiküller elde ettikleri dikkati çekmektedir. Kunii ve ark. (41) ise yine Pluronic[®] kullanarak nanopartikül formülasyonları hazırlamışlar fakat yöntem olarak emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemini seçmişler ve 217 nm ile 234 nm arasında değişen boyutlarda nanopartiküller elde etmişlerdir. Venkatraman ve diğ. (233) ise, emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemini kullanarak farklı bir polimer olan PLA-PEG-PLA ile misel yapıda nanopartiküller hazırlamışlar ve 63 nm'den 219 nm'ye kadar değişen boyutlarda nanopartiküller elde etmişlerdir. Blok kopolimerler kullanılarak hazırlanan polimerik misel yapısındaki nanopartiküllerin çeşitli faktörlere göre farklılık gösteren boyutlara sahip olduğu literatürde bildirilmekte olup, tez çalışmamız kapsamında hazırladığımız nanopartiküllerin genel olarak, emülsifikasyon ve çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak hazırlanan misel yapıda nanopartiküller ile benzer partikül boyutlarına sahip olduğu görülmüştür (233) .

Nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, düşük molekül ağırlıklı PLA₁ polimeri için kullanılan blok kopolimer konsantrasyonunun iki katına çıkmasıyla birlikte etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarında 178 nm'den 182 nm'ye, etkin madde içeren nanopartikül formülasyonlarında ise 193 nm'den 197 nm'ye çıkmıştır. PLGA polimeri için kullanılan blok kopolimer konsantrasyonunun iki katına çıkmasıyla birlikte etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarında 156 nm'den 159 nm'ye, etkin madde içeren

nanopartikül formülasyonlarında ise 167 nm'den 171 nm'ye çıkmıştır. PLA₂ polimeri için ise kullanılan blok kopolimer konsantrasyonunun iki katına çıkmasıyla birlikte etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarında 145 nm'den 147 nm'ye, etkin madde içeren nanopartikül formülasyonlarında ise 153 nm'den 155 nm'ye çıkmıştır.

Nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü, PLA₁+5_{BK} kodlu formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 178 nm'den 193 nm'ye, PLA₁+10_{BK} kodlu formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 182 nm'den 197 nm'ye, PLGA+5_{BK} kodlu formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 156 nm'den 167 nm'ye, PLGA+10_{BK} kodlu formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 159 nm'den 171 nm'ye, PLA₂+5_{BK} kodlu formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 145 nm'den 153 nm'ye, PLA₂+10_{BK} kodlu formülasyon için etkin madde yüklenmesiyle birlikte 147 nm'den 155 nm'ye çıkmıştır.

Elde edilen verilere bakıldığında kullanılan amfifilik triblok kopolimer miktarının değişmesinin, partikül büyüklüğü üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmadığı görülürken ($p>0.05$); partiküllere etkin madde yüklenmesinin partikül boyutunu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırdığı görülmektedir ($p<0.05$).

5.5.3. Zeta Potansiyel Tayini

Bir kolloidal sistemin sahip olduğu zeta potansiyel değeri, o kolloidal sistemin olası dayanıklılığı hakkında bilgi vermektedir (9,112) .

Nanopartikül formülasyonlarına ilişkin zeta potansiyel değerleri incelendiğinde (Bölüm 4.5.3, Tablo 4.11) açıkça görülmektedir ki formülasyona giren amfifilik triblok kopolimer miktarı arttıkça kolloidal sistemin sahip olduğu yük negatifleşmiştir. Bu negatif yükün, nanopartiküllerin yüzeyini kaplayan PEG zincirlerinin sıklaşmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Aynı zamanda elde edilen zeta potansiyel değeri sayısal olarak da artmış ve bu artış, istatistiksel olarak anlamlı

bulunmuştur ($p<0.05$). Yüksek zeta potansiyele sahip, yani yüklü partiküllerde, nanopartikül dispersiyonları, partiküller arasındaki yüksek itme gücü sayesinde agregasyona eğilimli olmamakta ve dolayısıyla daha dayanıklı bir yapı sergilemektedir. Bu durumda, amfifilik triblok kopolimer miktarının artmasıyla birlikte zeta potansiyel değerinin de sayısal olarak artması, sistemin daha dayanıklı bir hal aldığını gösterir ve PEG-PPG-PEG'in stabilizan etkisi ile açıklanabilir (31,95,225) .

Chang ve diğ. (225) yaptıkları çalışmada amfifilik PEG-PLGA-PEG [polietilen glikol-poli(laktik-ko-glikolik) asit-polietilen glikol] triblok kopolimerini kullanarak hazırladıkları nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerlerini tayin etmişler ve oldukça negatif yüklü partiküller elde ettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca formülasyonun yapısına giren PEG-PLGA-PEG triblok kopolimerinin artmasıyla beraber zeta potansiyel değerinin sayısal olarak da arttığı çalışmada bildirilmektedir, tez çalışmamız kapsamında hazırladığımız nanopartiküllerin bu açıdan literatür ile benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Kumar ve diğ. (234) ise PLGA polimeri ile, gen tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanmış nanopartikül formülasyonları hazırlamışlardır. Formülasyonlara hem organik faz ve sulu faz arasındaki ara yüzey gerilimini düşürerek emülsiyon oluşturmak, hem de daha dayanıklı formülasyonlar elde etmek amacıyla yüzey aktif madde eklemişler ve negatif yüklü nanopartiküller elde etmişlerdir.

5.5.4. Nanopartiküllerin Üretim Verimi

Nanopartiküllerin üretim verimi Bölüm 3.2.5.4'te verildiği üzere, formülasyonların üretilmesini takiben hesaplanmıştır. Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarına ilişkin üretim verimleri, % 72.4 ile % 87.6 arasında değişmektedir (Bölüm 4.5.4, Tablo 4.12). Nanopartikül formülasyonlarının üretim verimleri, düşük molekül ağırlıklı PLA₁ polimeri için, kullanılan blok kopolimer konsantrasyonunun iki katına çıkmasıyla birlikte, etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarında % 75.4'den % 79.6'ya, etkin madde içeren nanopartikül

formülasyonlarında ise % 72.6'dan % 80.5'e çıkmıştır. PLGA polimeri için, kullanılan blok kopolimer konsantrasyonunun iki katına çıkmasıyla birlikte, etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarında % 73.4'den % 80.5'e, etkin madde içeren nanopartikül formülasyonlarında ise % 72.4'den % 81.2'ye çıkmıştır. PLA₂ polimeri için, kullanılan blok kopolimer konsantrasyonunun iki katına çıkmasıyla birlikte, etkin madde içermeyen nanopartikül formülasyonlarında % 83.1'den % 87.2'ye, etkin madde içeren nanopartikül formülasyonlarında ise % 80.1'den % 87.6'ya çıkmıştır.

Çekirdek oluşturuucu polimer aynı kaldığı takdirde PLA₁, PLGA ve PLA₂ ile hazırlanan etkin madde yüklü nanopartiküllerin verimleri, blok kopolimer oranının artmasıyla beraber daha yüksek bulunmuştur ve fark istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu durum göstermektedir ki, blok kopolimer miktarının artmasıyla beraber PEG miktarı da arttığı için, daha iyi kaplanmış, daha dayanıklı ve daha yüksek verimde nanopartiküller elde etmek mümkün olmaktadır (95,219) . Bununla beraber tüm formülasyonlar için üretim verimlerindeki kayıplar, homojen bir partikül büyüklüğü dağılımı elde etmek amacıyla gerçekleştirilen, 0.8 µm'lik membran filtre kullanılarak yapılan süzme işleminden de kaynaklanabilir.

Khoeve ve diğ. (219) PEG-PBA-PEG (polietilen glikol-polibutilen adipat-polietilen glikol) amfifilik triblok kopolimerini kullanarak, çoklu emülsiyon yöntemi ile misel yapıda nanopartiküller hazırlamışlar ve bir noktaya kadar artan blok kopolimer oranı ile birlikte üretim veriminin de arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca, herhangi bir yüzey aktif madde yerine amfifilik blok kopolimerler kullanarak nanopartikül formülasyonu geliştirmenin, üretim verimi açısından üstünlük sağladığını belirtmişlerdir. Çünkü PVA ve Tween 80 gibi toksik yüzey aktif maddelerin uzaklaştırılması için formülasyonların defalarca kez yıkanması gerekirken, PEG içeren amfifilik blok kopolimerle hazırlanan formülasyonlar için böyle bir gereklilik bulunmamaktadır.

5.5.5. Nanopartiküllere Yüklenen 5-FU Miktarının ve Etkin Madde Yükleme Etkinliğinin Belirlenmesi

Nanopartikül formülasyonlarına yüklenen 5-FU miktarı incelendiğinde (Bölüm 4.5.5, Tablo 4.13); PLA₁, PLGA ve PLA₂ olmak üzere tüm polimer çeşitlerinde, formülasyona giren amfifilik triblok kopolimer konsantrasyonunun artması ile nanopartiküllere yüklenen 5-FU miktarındaki artış göze çarpmakta olup istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu artışın ve 5-FU'nin hidrofilik bir etkin madde olmasına karşın yüksek yükleme etkinliği elde edilmesinin sebebi, nanopartiküllerin yüzeyini kaplayan ve yine hidrofilik bir madde olan PEG ile 5-FU'nin etkileşmesi olarak düşünülebilir.

Literatürde blok kopolimerler kullanılarak hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler ile taşınması hedeflenen etkin maddelerin genellikle 5-FU'nin aksine hidrofobik özellikte olduğu görülmektedir (70,75,84). Her ne kadar bu sistemlerin, miselin çekirdeğinin hidrofobik olmasından dolayı, hidrofobik etkin maddeler için uygun taşıyıcı sistemler olduğu düşünülse de, literatürde bu sistemler etkin madde yükleme etkinliği açısından incelendiğinde, her zaman için hedeflenen yüksek yükleme kapasitelerine ulaşamadığı ve yükleme etkinliğinin blok kopolimeri oluşturan komponentlerin oranından çeşidine kadar pek çok faktörden etkilendiği dikkati çekmektedir. Bu duruma örnek olarak, bu sistemler için uygun bir model ilaç olacağı düşünülen doksorubisin ile yapılan bir çalışma incelendiğinde (72), MPEG-b-PCL (metoksi-PEG-blok- poli ϵ -kaprolakton) blok kopolimerini kullanarak beş farklı misel formülasyonu hazırlamışlar, liyofilize toz haline getirdikten sonra ilaç yükleme kapasitesini tayin etmişler ve % 3.29 ile % 4.30 arasında değişen değerler elde etmişlerdir. Araştırmacıların kullandığı, farklı oranlarda PEG içeren blok kopolimerlerle hazırlanan formülasyonlara bakıldığında, en yüksek yükleme etkinliğine (% 4.30) en düşük oranda PEG içeren blok kopolimer ile hazırlanan formülasyonda ulaşıldığı görülmektedir. Literatürde, hidrofobik etkin madde misel yapısındaki hidrofobik gruplar ile etkileştiği için, hidrofilik PEG komponenti yerine misel içindeki hidrofobik yapının artmasıyla beraber etkin maddenin de misel yapısı ile etkileşiminin arttığı ve yükleme kapasitesinin artmasının bu şekilde

açıklanabileceği belirtilmektedir. Buradan yola çıkarak bizim sistemimizde de PEG miktarının artmasıyla yükleme etkinliğinin artmasının, hidrofilik bir etkin madde olan 5-FU ile sistem içerisindeki hidrofilik komponent olan PEG'in etkileşmesi ile açıklanabileceği düşünülmektedir.

5.5.6. Nanopartiküllerin Termal ve Yapısal Özelliklerinin Araştırılması

Nanopartikül formülasyonlarının yapısal özelliklerinin tayin edilmesi için çekilen FT-IR spektrumları incelendiğinde (Bölüm 4.5.6.1, Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18), etkin madde içermeyen nanopartiküller ile etkin madde içeren nanopartiküllerin spektrumlarının hemen hemen birbirleriyle örtüştüğü gözlemlenmiştir. Bu durum, etkin madde yüklemenin nanopartiküllerin yapısında bir değişiklik yaratmadığını göstermektedir. Etkin madde yüklenmiş nanopartiküllerde ise 5-FU'e ait bantlar ortadan kaybolmuştur. Bu durum etkin maddenin misel yapıdaki nanopartiküllerin yapısına girdiğini göstermektedir.

Hazırlanan formülasyonların termal özelliklerinin incelenmesi için gerçekleştirilen DSC analizlerinin sonuçları da FT-IR spektrumlarını destekler nitelikte çıkmıştır. Çekilen DSC termogramları incelendiğinde (Bölüm 4.5.6.2, Şekil 4.19) etkin madde içermeyen nanopartiküller ile etkin madde içeren nanopartiküllerin termogramlarının hemen hemen birbirleriyle örtüştüğü gözlemlenmiştir. Formülasyona giren polimerlerin tek başına 5-FU'in 288 °C'de vermiş olduğu erime piki ile bir etkileşme yapmadığı gösterilmiştir. Etkin madde yüklenmiş nanopartiküllerde ise 5-FU'e ilişkin erime piki ortadan kaybolmuştur. Bu durumun yine aynı şekilde, etkin maddenin misel yapıdaki nanopartiküllerin yapısına girmesinden kaynaklandığı düşünülebilir.

5.5.7. İn Vitro Salım Deneyleri

Literatürde, nanopartiküler sistemlerden 5-FU'e ilişkin salım çalışmalarında genellikle salım ortamı olarak PBS (pH 7.4) kullanıldığı ve deneylerin yatay çalkalayıcılı su banyosunda 37 °C'de gerçekleştirildiği görülmüştür (96,235) . Tez

çalışmalarımız kapsamında da, in vitro salım deneyleri sonucunda elde edilen 5-FU'e ilişkin in vitro salım profillerine (Bölüm 4.5.7.1, Şekil 4.20), PBS (pH 7.4) salım ortamı içerisinde ve sink koşullar altında ulaşılmıştır. Formülasyonlar arasında 72. saatin sonunda elde edilen en yüksek orandaki salım %94.4 ile, düşük molekül ağırlıklı PLA kullanılarak hazırlanan, $PLA_2+10_{BK}+5-FU$ kodlu nanopartikül formülasyonunda; 72. saatin sonunda elde edilen en düşük orandaki salım ise % 90.9 ile, yüksek molekül ağırlıklı PLA kullanılarak hazırlanan, $PLA_1+10_{BK}+5-FU$ kodlu nanopartikül formülasyonunda gözlenmiştir. Nanopartikül formülasyonlarından 72. saatin sonunda ortama salınan 5-FU miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Çalışmalarımızda tüm formülasyonlar için, in vitro salım süresi boyunca 5-FU'in aktivitesinin korunduğu ve ortamda stabil bulunduğu gösterilmiştir (Tablo 4.7).

Yüksek molekül ağırlıklı PLA ve 5 katı oranda PEG-PPG-PEG kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerden ($PLA_1+5_{BK}+5-FU$) 5-FU salım grafiği Şekil 4.20'de verildiği gibidir. Bu profile göre 1.8. saatte etkin maddenin % 50'si salınırken, 72. saat sonunda ise % 92'si salınmıştır. Salım verilerine göre $PLA_1+10_{BK}+5-FU$ nanopartiküllerinde 2.9. saatte etkin maddenin % 50'si salınırken, 72. saat sonunda ise % 90'ı salınmıştır. Düşük molekül ağırlıklı PLA kullanılarak hazırlanan nanopartiküllere bakıldığında ise $PLA_2+5_{BK}+5-FU$ nanopartiküllerinde 7.9. saatte etkin maddenin % 50'si salınırken, 72. saat sonunda ise % 92'si salınmış; $PLA_2+10_{BK}+5-FU$ nanopartiküllerinde de 6.7. saatte etkin maddenin % 50'si salınırken, 72. saat sonunda ise % 94'ü salınmıştır.

PLGA kullanılarak hazırlanan nanopartiküllerin salım grafiği incelendiğinde, $PLGA+5_{BK}+5-FU$ nanopartiküllerinde 3.27. saatte etkin maddenin % 50'si, 72. saat sonunda ise % 91'inin salındığı görülmüştür. $PLGA+10_{BK}+5-FU$ nanopartiküllerinde ise 3.19. saatte etkin maddenin % 50'si, 72. saat sonunda ise % 91'inin salındığı görülmüştür.

Tez çalışmalarımız kapsamında hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının in vitro salım profilleri benzerlik göstermektedir. Ancak, elde edilen bu verilere göre

düşük molekül ağırlıklı PLA kullanılarak hazırlanan, PLA₂+5_{BK}+5-FU ve PLA₂+10_{BK}+5-FU kodlu formülasyonlar, içeriğindeki etkin maddenin % 50'sini en uzun sürede salmış ve amacımıza en uygun olarak bulunmuştur.

Nanopartiküllerden 5-FU'in in vitro salım kinetiklerinin belirlenmesi için 0. derece, Higuchi, ve Hixon-Crowell kinetik modelleri uygulanmıştır. İstatistiksel inceleme sonucunda nanopartiküllerden salınan 5-FU'in salım kinetiğinin Higuchi kinetiğine uyduğu görülmektedir (Bölüm 4.5.7.1, Tablo 4.14). En yüksek R² değeri bu model için elde edilmiştir. Nanopartiküllerden etkin madde salımının uyduğu Higuchi kinetiği matriksten ilaç salımını öngören bir kinetiktir (1) . Matriks tipi sistemlerde etkin madde polimer yapısı içinde hapsolmuş durumdadır. İn vitro salım çalışmalarında nanopartiküllerin salım ortamıyla teması sonucunda, öncelikle nanopartiküllerin yüzeyinde ve yüzeye yakın kısımlarındaki etkin madde salınmakta, bu yüzden bir patlama etkisi görülmektedir. Sonrasında ise polimer içine gömülü olan etkin maddenin dışarı çıkışı ve ortama salınması gözlenmektedir. Etkin maddemizin nanopartiküllerden salımının Higuchi kinetiğine uyması, salımın daha çok difüzyon kontrollü olduğunu göstermektedir. Bunun sebebinin nanopartiküllerin sulu ortamda şişmeleri ve matriks yapıları oluşturmaları olabileceği düşünülmektedir (233,236) .

5.5.8. Caco-2 Hücreler ile Sitotoksosite Çalışmaları

Antikanser ilaçları içeren ve blok kopolimerler kullanılarak hazırlanan misel yapıda nanopartikül formülasyonları ile yapılan çalışmalarda, hazırlanan formülasyonların sitotoksitesinin değerlendirilmesi için hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır (237-238) . 5-FU, başta kolon kanseri olmak üzere çok çeşitli kanser türlerinde kullanılmaktadır. 5-FU'in, kolon adenokarsinomasından elde edilen Caco-2 hücreleri üzerindeki toksisitesine bakılarak kolon kanseri üzerine etkinliği değerlendirilmeye çalışılmıştır (239) . Sitotoksitenin değerlendirilmesinde hücre yaşayabilirliğinin belirlenmesi için MTT testi kullanılmıştır (240) .

Sitotoksisite çalışmaları Bölüm 3.2.5.8’de açıklandığı gibi yapılmış, etkin madde içermeyen formülasyonlar kontrol grubu olarak kullanılmış, 10 µg ve 100 µg 5-FU içeren formülasyonlar ile direkt kuyucuklara eklenen formülasyonların Caco-2 hücreleri üzerinde % hücre canlılığı değerleri Bölüm 4.5.8’de grafiklenmiştir.

PLGA+5_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksisite sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.21), direkt formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 68.19, 10 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 81.74, 100 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı ise % 74.50 olarak bulunmuştur. PLGA+10_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksisite sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.22), direkt formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 68.41, 10 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 93.12, 100 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı ise % 73.70 olarak bulunmuştur.

PLA₂+5_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksisite sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.23), direkt formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 38.70, 10 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 82.33, 100 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı ise % 66.01 olarak bulunmuştur. PLA₂+10_{BK}+5-FU formülasyonunun Caco-2 hücreleri üzerinde 24 saat sonunda kontrol grubuna karşı elde edilen sitotoksisite sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.24), direkt formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 36.52, 10 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı % 47.83, 100 µg 5-FU içeren formülasyonun eklendiği kuyucuklardaki hücre canlılığı ise % 51.88 olarak bulunmuştur.

PLGA ve düşük molekül ağırlıklı PLA (PLA₂) kullanılarak hazırlanan formülasyonların sitotoksisitelerinin genel olarak değerlendirilmesi sonucunda, PLA₂+10_{BK}+5-FU kodlu formülasyon, Caco-2 hücreleri üzerinde en yüksek

sitotoksositeye sahip olduğu için antikanser etkinlik bakımından en uygun bulunan formülasyon olmuştur.

Grafiğe geçirilen % hücre canlılığı değerleri incelendiğinde (Şekil 4.21, 4.22, 4.23 ve 4.24), tüm formülasyonlar için en yüksek sitotoksosite değerlerine direkt kuyucuklara eklenen formülasyonlarda ulaşılmış, bunu sırasıyla 100 µg ve 10 µg 5-FU içeren formülasyonlar takip etmiştir. Caco-2 hücreleri üzerine eklenen 5-FU miktarının artması ile beraber, % hücre canlılığı değerlerinin düşmesi yani sitotoksitenin artması beklenen bir durumdur. Sitotoksik etkinin formülasyon bileşenlerinden mi yoksa etkin madde yüklü formülasyonlardan mı kaynaklandığını anlamak amacıyla formülasyonların sitotoksiteleri arasında anlamlı bir fark olup olmadığı karşılaştırılmıştır. Direkt kuyucuklara eklenen formülasyonlar ve 100 µg 5-FU içeren formülasyonlar ile yapılan çalışmalar için, etkin madde yüklü olan ve olmayan formülasyonlar karşılaştırıldığında, etkin madde yüklü olanlar boşlara göre anlamlı derecede sitotoksik bulunmuştur ($p<0.05$). Bu durum, sitotoksik etkinin etkin maddeden kaynaklandığını ve 5-FU yüklü nanopartiküllerin antikanser amaçla kullanılabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmaları kapsamında elde edilen bulgular ışığında:

- Öncelikle kolon kanserinde kullanılmaya aday formülasyonlar, 5-FU yüklü PLA/PEG-PPG-PEG ve PLGA/PEG-PPG-PEG nanopartikülleri geliştirilmiş; geliştirilen formülasyonların partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli, yükleme etkinliği, yüzey morfolojisi, salım özellikleri, termal ve yapısal özellikleri ile sitotoksitesi değerlendirilmiştir.
- Çalışmada kullanılan PEG-PPG-PEG amfifilik triblok kopolimerinin yapısında yer alan hidrofobik kısım (PPG) ve çekirdek oluşturu polimerler (PLA/PLGA) sulu ortamda kendiliğinden biraraya gelerek misel yapının çekirdeğini oluştururken, hidrofilik PEG segmenti yüzeyde yer almıştır. Böylece nanopartikülün, yüzeyinde yer alan PEG sayesinde korunması amaçlanmış ve RES organları tarafından sistemik dolaşımdan uzaklaştırılması engellenmeye çalışılmıştır.
- Bütün formülasyonların ortalama partikül büyüklükleri 200 nm'nin altında bulunmuştur. Geliştirilen nanopartiküllerin, sahip olduğu partikül boyutları nedeni ile etkin bir şekilde tümör dokusuna hedeflendirmeye uygun olacağı düşünülmektedir.
- Yükleme ve in vitro salım çalışmaları, etkin madde olarak kullanılan 5-FU'in, PLA/PEG-PPG-PEG ve PLGA/PEG-PPG-PEG nanopartiküllerine yüklenebileceğini ve 5-FU'in tez kapsamında hazırlanmış olan nanopartiküler sistemlerden uygun süre içinde salınabileceğini göstermiştir.
- Hazırlanmış olan 5-FU yüklü PLA/PEG-PPG-PEG ve PLGA/PEG-PPG-PEG nanopartiküllerinin yüzeyinin PEG ile kaplı olması sebebiyle, 5-FU'in kan dolaşımındaki kalış süresini uzatabileceği ve in vivo stabilitesini artırabileceği düşünülmektedir.
- Caco-2 hücreleri üzerinde yapılan sitotoksite çalışmalarına göre, nanopartikül formülasyonlarının sitotoksitesinin taşıyıcı sistemden değil, etkin maddeden kaynaklandığı gösterilmiştir.

- Caco-2 hücrelerine karşı 5-FU yüklü nanopartiküllerin antikanser aktivitelerinin değerlendirilmesi sonucu, düşük molekül ağırlıklı PLA ile hazırlanan karışım formülasyonlarından en yüksek etkinlik sağlandığı gösterilmiştir.
- PLA₂+10_{BK}+5-FU kodlu formülasyon, Caco-2 hücreleri üzerinde en yüksek sitotoksositeye sahip olduğu için antikanser etkinlik bakımından en uygun bulunan formülasyon olmuştur.
- Tez çalışmamızda formülasyonu gerçekleştirilen karışım sistemin, yalnız bu çalışmada kullanılan antikanser madde olan 5-FU için değil, başta antikanser özellik gösteren ekin maddeler olmak üzere farklı pek çok bileşik için de uygun bir sistem olabileceği düşünülmektedir.
- **Gelecekte**, in vitro çalışmalar sonucunda elde edilen veriler daha öteye götürülerek, in vivo çalışmalar ile formülasyonların kolorektal tümör oluşturulmuş fareler üzerindeki antikanser aktivitesine bakılıp kan dolaşımındaki kalış süresi incelenebilir, böylece formülasyonların etkinliği ile yan etkiler ve dolayısıyla PEG ile kaplama işleminin getirdiği üstünlük hakkında daha net bir sonuca ulaşılabilir.
- Ayrıca hazırlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sisteme çeşitli ligandlar bağlanmak suretiyle aktif hedeflendirme de yapılması alternatifler içinde düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

- 1.Gürsoy, A.Z. (2002) Kontrollü Salım Sistemleri: İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler. *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını*, 4, 65-102.
- 2.Mainardes, R.M.,Silva, L.P. (2004) Drug delivery systems: Past, present, and future. *Current Drug Targets*, 5 (5), 449-455.
- 3.Ritu M Gilhotra, V.p.B., D.N.Mishra. (2009) A Comparative review of recently developed particulate drug carrier systems
- 4.Garcia-Fuentes, M., Torres, D.,Alonso, M.J. (2005) New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. *International Journal of Pharmaceutics*, 296 (1-2), 122-132.
- 5.Meilander, N.J., Yu, X.J., Ziats, N.P.,Bellamkonda, R.V. (2001) Lipid-based microtubular drug delivery vehicles. *Journal of Controlled Release*, 71 (1), 141-152.
- 6.Lee, M.,Kim, S.W. (2005) Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery. *Pharmaceutical Research*, 22 (1), 1-10.
- 7.Li, S., Wang, A.X., Jiang, W.Q.,Guan, Z.Z. (2008) Pharmacokinetic characteristics and anticancer effects of 5-Fluorouracil loaded nanoparticles. *Bmc Cancer*, 8, -.
- 8.Lambert, G., Fattal, E.,Couvreur, P. (2001) Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47 (1), 99-112.
- 9.Mohanraj, V.J.a.C., Y. . (2006) Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (1), 561-573.
- 10.Allemann, E., Gurny, R.,Doelker, E. (1993) Drug-Loaded Nanoparticles - Preparation Methods and Drug Targeting Issues. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 39 (5), 173-191.
- 11.Panyam, J.,Labhasetwar, V. (2003) Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55 (3), 329-347.
- 12.Manisha P. Desai, V.L. (1997) The Mechanism of Uptake Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells Is Size Depent. *Pharmaceutical Research*, 14 (11).
- 13.<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. (Erişim Tarihi: 26.08.2010)
- 14.Kreuter, J. (1994) Colloidal Drug Delivery Systems. *Nanoparticles*, 219-342.
- 15.Memisoglu-Bilensoy, E.,Hincal, A.A. (2006) Sterile, injectable cyclodextrin nanoparticles: Effects of gamma irradiation and autoclaving. *International Journal of Pharmaceutics*, 311 (1-2), 203-208.
- 16.Pathak Y., T.D. (2009) Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization. 191, 1.
- 17.<http://www.worldfoodscience.org/cms/?pid=1004083>.(Erişim Tarihi: 26.08.2010)
- 18.http://www.vet.purdue.edu/cpr/images/what_we_do/nanotechnology/figure2_small.jpg. (Erişim Tarihi: 26.08.2010)

19. http://wesrch1.wesrch.com/User_images/wiki/dea1f972eaca39cc0ff0229cfd408cab1268680227.jpg. *Institute of Nanotechnology, Co-Nanomet European Workshop Session 5: Nanobiotechnology*. (Erişim Tarihi: 26.08.2010)
20. Wandee Im-Emsap, J.S. (2002) Disperse Systems. *Modern Pharmaceutics, Fourth Edition*
21. Martin, A. (1993) *Physical Pharmacy* 4th Ed., 393-422.
22. Garrec, D.L., Ranger, M., Leroyx, J-C. (2004) Micelles in Anticancer Drug Delivery. *Am. Jour. Dr. Del.*, 2 (1), 15-42.
23. Uchegbu, I.F. (2006) *Polymers in Drug Delivery*.
24. Desai, N.P., Trieu, V., Hwang, L.Y., Wu, R.J., Soon-Shiong, P., Gradishar, W.J. (2008) Improved effectiveness of nanoparticle albumin-bound (nab) paclitaxel versus polysorbate-based docetaxel in multiple xenografts as a function of HER2 and SPARC status. *Anti-Cancer Drugs*, 19 (9), 899-909.
25. Desai, N., Trieu, V., Hwang, L., Wu, R., Hawkins, M., Soon-Shiong, P. ve diğerleri. (2008) HER2 and SPARC status in tumors may play an important role in the relative effectiveness of nanoparticle albumin-bound (nab (R)) paclitaxel versus polysorbate-based docetaxel. *Ejc Supplements*, 6 (7), 186-186.
26. Barauskas, J., Misiunas, A., Gunnarsson, T., Tiberg, F., Johnsson, M. (2006) "Sponge" nanoparticle dispersions in aqueous mixtures of diglycerol monooleate, glycerol dioleate, and polysorbate 80. *Langmuir*, 22 (14), 6328-6334.
27. Zhang, Y., Jin, T., Zhuo, R.X. (2005) Methotrexate-loaded biodegradable polymeric micelles: Preparation, physicochemical properties and in vitro drug release. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 44 (2-3), 104-109.
28. Doğan, E. (2010) İlaç Taşınmasında Kullanılan Polimerlerin Farmasötik Uygulamaları. *Tıbbi Ürünlerde Ruhsatlandırma Esasları Programı Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara*.
29. Torchilin, V.P. (2004) Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61 (19-20), 2549-2559.
30. http://www.gkss.de/imperia/md/images/gkss/zentrale_einrichtungen/genf/instrumentierung/sans1_micelle_120x120.gif. (Erişim Tarihi: 26.08.2010)
31. Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Alakhov, V.Y. (2002) Pluronic (R) block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 82 (2-3), 189-212.
32. Kataoka, K., Harada, A., Nagasaki, Y. (2001) Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47 (1), 113-131.
33. Kang Moo Huh, Y.W.C., Kinam Park. (2003) *Drug Delivery Technology*. 3 (5).
34. Jones, M.C., Leroux, J.C. (1999). Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers.

35. Kim, S.Y., Shin, I.L.G., Lee, Y.M., Cho, C.S., Sung, Y.K. (1998) Methoxy poly(ethylene glycol) and epsilon-caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. II. Micelle formation and drug release behaviours. *Journal of Controlled Release*, 51 (1), 13-22.
36. Jeong, Y.I., Cheon, J.B., Kim, S.H., Nah, J.W., Lee, Y.M., Sung, Y.K. ve diğerleri. (1998) Clonazepam release from core-shell type nanoparticles in vitro. *Journal of Controlled Release*, 51 (2-3), 169-178.
37. Kwon, G., Naito M. (1996) Block copolymer micelles for drug delivery: loading and release of doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, 48, 195-201.
38. Liaw, J., Aoyagi, T., Kataoka, K., Sakurai, Y., Okano, T. (1999) Permeation of PEO-PBLA-FITC polymeric micelles in aortic endothelial cells. *Pharmaceutical Research*, 16 (2), 213-220.
39. Aoyagi, T., Sugi, K., Sakurai, Y., Okano, T., Kataoka, K. (1999) Peptide drug carrier: studies on incorporation of vasopressin into nano-associates comprising poly(ethylene glycol)-poly(L-aspartic acid) block copolymer. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 16 (1-4), 237-242.
40. Zhang, L.F., Eisenberg, A. (1996) Multiple morphologies and characteristics of "crew-cut" micelle-like aggregates of polystyrene-b-poly(acrylic acid) diblock copolymers in aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society*, 118 (13), 3168-3181.
41. Kunii, R., Onishi, H., Machida, Y. (2007) Preparation and antitumor characteristics of PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles loaded with camptothecin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67 (1), 9-17.
42. Wilhelm, M., Zhao, C.L., Wang, Y.C., Xu, R.L., Winnik, M.A., Mura, J.L. ve diğerleri. (1991) Polymer Micelle Formation .3. Poly(Styrene-Ethylene Oxide) Block Copolymer Micelle Formation in Water - a Fluorescence Probe Study. *Macromolecules*, 24 (5), 1033-1040.
43. Allen, C., Maysinger, D., Eisenberg, A. (1999) Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 16 (1-4), 3-27.
44. Inoue, T., Chen, G.H., Nakamae, K., Hoffman, A.S. (1998) An AB block copolymer of oligo(methyl methacrylate) and poly(acrylic acid) for micellar delivery of hydrophobic drugs. *Journal of Controlled Release*, 51 (2-3), 221-229.
45. Calis, S., Jeyanthi, R., Mehta, R.C., Deluca, P.P. (1994) Development of a Controlled Peptide Delivery System, Release Behavior of Sct from Plga Microspheres of Different Matrix Characteristics. *Minutes of the 9th Symposium on Microencapsulation*, 45-49 228.
46. Saito, N., Murakami, N., Takahashi, J., Horiuchi, H., Ota, H., Kato, H. ve diğerleri. (2005) Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (7), 1037-1048.
47. Calis, S., Bozdag, S., Kas, H.S., Tuncay, M., Hincal, A.A. (2002) Influence of irradiation sterilization on poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing anti-inflammatory drugs. *Farmaco*, 57 (1), 55-62.

- 48.Calis, S., Jeyanthi, R., Tsai, T., Mehta, R.C.,Deluca, P.P. (1995) Adsorption of Salmon-Calcitonin to Plga Microspheres. *Pharmaceutical Research*, 12 (7), 1072-1076.
- 49.Tuncay, M., Calis, S., Kas, H.S., Ercan, M.T., Peksoy, I.,Hincal, A.A. (2000) Diclofenac sodium incorporated PLGA (50 : 50) microspheres: formulation considerations and in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 195 (1-2), 179-188.
- 50.Tang, Y.,Singh, J. (2009) Biodegradable and biocompatible thermosensitive polymer based injectable implant for controlled release of protein. *International Journal of Pharmaceutics*, 365 (1-2), 34-43.
- 51.Anderson, J.M.,Shive, M.S. (1997) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28 (1), 5-24.
- 52.Kim, D., El-Shall, H., Dennis, D.,Morey, T. (2005) Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 40 (2), 83-91.
- 53.Shenoy, D.B., Antipov, A.A., Sukhorukov, G.B.,Mohwald, H. (2003) Layer-by-layer engineering of biocompatible, decomposable core-shell structures. *Biomacromolecules*, 4 (2), 265-272.
- 54.Arnold, M.M., Gonnar, E.M., Schieber, L.J., Munson, E.J.,Berkland, C. (2007) NanoCipro encapsulation in monodisperse large porous PLGA microparticles. *Journal of Controlled Release*, 121 (1-2), 100-109.
- 55.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.
- 56.Cirpanli, Y., Bilensoy, E., Calis, S.,Hincal, A.A. (2007) Stabilization of camptothecin in PLGA nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32 (1), S18-S19.
- 57.Cirpanli, Y., Unlu, N., Calis, S.,Hincal, A.A. (2005) Formulation and in-vitro characterization of retinoic acid loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 22 (8), 877-889.
- 58.Zhang, H., Bei, J.,Wang, S. (2007) Preparation and drug release Behaviors of 5-fluorouracil loaded poly(glycolide-co-lactide-co-caprolactone) nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 106 (6), 3757-3767.
- 59.Wang, N., Wu, X.S., Li, C.,Feng, M.F. (2000) Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers I. Synthesis and characterization. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 11 (3), 301-318.
- 60.Erin Lavik, Y.D.T., Evan Snyder, and Robert Langer. Seeding Neural Stem Cells on Scaffolds of PGA, PLA, and Their Copolymers. *Methods in Molecular Biology*, 198.
- 61.Tice, T. (1984) Biodegradable Controlled-Release Parenteral Systems. *Pharmaceutical Technology*, 11, 26-35.

62. Wu, X.S. (2004) Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers: Part III. Drug delivery application. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology*, 32 (4), 575-591.
63. Wu, X.S., Wang, N. (2001) Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 12 (1), 21-34.
64. Pillai, O., Panchagnula, R. (2001) Polymers in Drug Delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5, 447-451.
65. Jalil, R., Nixon, J.R. . (1990) Biodegradable Poly (Lactic Acid) and Poly (Lactide-co-Glycolide) Microcapsules: Problems Associated with Preparative Techniques and Release Properties. *Journal of Microencapsulation*, 7 (3), 297-325.
66. Lewis, D. (1990) Controlled Release of Bioactive Agents from Lactide/Glycolide Polymers. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, 1-41.
67. Gilding, D.K., Reed, A.M. (1979) Biodegradable Polymers for Use in Surgery - Polyglycolic-Poly(Lactic Acid) Homopolymers and Copolymers .1. *Polymer*, 20 (12), 1459-1464.
68. Torchilin, V.P. (2000) Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, S81-S91.
69. Croy, S.R., Kwon, G.S. (2006) Polymeric micelles for drug delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 12 (36), 4669-4684.
70. Yoo, H.S., Park, T.G. (2001) Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer. *Journal of Controlled Release*, 70 (1-2), 63-70.
71. Yasugi, K., Nakamura, T., Nagasaki, Y., Kato, M., Kataoka, K. (1999) Sugar-installed polymer micelles: Synthesis and micellization of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers having sugar groups at the PEG chain end. *Macromolecules*, 32 (24), 8024-8032.
72. Shuai, X.T., Ai, H., Nasongkla, N., Kim, S., Gao, J.M. (2004) Micellar carriers based on block copolymers of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) for doxorubicin delivery. *Journal of Controlled Release*, 98 (3), 415-426.
73. Jette, K.K., Law, D., Schmitt, E.A., Kwon, G.S. (2004) Preparation and drug loading of poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) micelles through the evaporation of a cosolvent azeotrope. *Pharmaceutical Research*, 21 (7), 1184-1191.
74. Shin, I.L.G., Kim, S.Y., Lee, Y.M., Cho, C.S., Sung, Y.K. (1998) Methoxy poly(ethylene glycol) ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin. I. Preparation and characterization. *Journal of Controlled Release*, 51 (1), 1-11.
75. Liggins, R.T., Burt, H.M. (2002) Polyether-polyester diblock copolymers for the preparation of paclitaxel loaded polymeric micelle formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (2), 191-202.

76. Kim, S.C., Kim, D.W., Shim, Y.H., Bang, J.S., Oh, H.S., Kim, S.W. ve diğ erleri. (2001) In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 72 (1-3), 191-202.
77. Nishiyama, N., Kataoka, K. (2003) Polymeric micelle drug carrier systems: PEG-PAsp(Dox) and second generation of micellar drugs. *Bio-Applications of Nanoparticles*, 519, 155-177.
78. Bae, Y., Nishiyama, N., Fukushima, S., Koyama, H., Yasuhiro, M., Kataoka, K. (2005) Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: Tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy. *Bioconjugate Chemistry*, 16 (1), 122-130.
79. Bae, Y., Fukushima, S., Harada, A., Kataoka, K. (2003) Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change. *Angew Chem Int Ed Engl*, 42 (38), 4640-4643.
80. Li, Y., Kwon, G.S. (2000) Methotrexate esters of poly(ethylene oxide)-block-poly(2-hydroxyethyl-L-aspartamide). Part I: Effects of the level of methotrexate conjugation on the stability of micelles and on drug release. *Pharm Res*, 17 (5), 607-611.
81. Yu, B.G., Okano, T., Kataoka, K., Sardari, S., Kwon, G.S. (1998) In vitro dissociation of antifungal efficacy and toxicity for amphotericin B-loaded poly(ethylene oxide)-block-poly(beta benzyl L aspartate) micelles. *J Control Release*, 56 (1-3), 285-291.
82. Jeong, Y.I., Cheon, J.B., Kim, S.H., Nah, J.W., Lee, Y.M., Sung, Y.K. ve diğ erleri. (1998) Clonazepam release from core-shell type nanoparticles in vitro. *J Control Release*, 51 (2-3), 169-178.
83. Opanasopit, P., Yokoyama, M., Watanabe, M., Kawano, K., Maitani, Y., Okano, T. (2004) Block copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for passive tumor targeting. *Pharm Res*, 21 (11), 2001-2008.
84. Yokoyama, M., Opanasopit, P., Okano, T., Kawano, K., Maitani, Y. (2004) Polymer design and incorporation methods for polymeric micelle carrier system containing water-insoluble anti-cancer agent camptothecin. *J Drug Target*, 12 (6), 373-384.
85. Krishna, R., Mayer, L.D. (2000) Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci*, 11 (4), 265-283.
86. Batrakova, E.V., Li, S., Vinogradov, S.V., Alakhov, V.Y., Miller, D.W., Kabanov, A.V. (2001) Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J Pharmacol Exp Ther*, 299 (2), 483-493.

87. Alakhov, V., Klinski, E., Li, S.M., Pietrzynski, G., Venne, A., Batrakova, E. ve diğerleri. (1999) Block copolymer-based formulation of doxorubicin. From cell screen to clinical trials. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 16 (1-4), 113-134.
88. Venne, A., Li, S.M., Mandeville, R., Kabanov, A., Alakhov, V. (1996) Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. *Cancer Research*, 56 (16), 3626-3629.
89. Danson, S., Ferry, D., Alakhov, V., Margison, J., Kerr, D., Jowle, D. ve diğerleri. (2004) Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer. *Br J Cancer*, 90 (11), 2085-2091.
90. Alakhov, V.Y., Moskaleva, E.Y., Batrakova, E.V., Kabanov, A.V. (1996) Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by pluronic P85 block copolymer. *Bioconjugate Chemistry*, 7 (2), 209-216.
91. Croy, S.R., Kwon, G.S. (2004) The effects of Pluronic block copolymers on the aggregation state of nystatin. *Journal of Controlled Release*, 95 (2), 161-171.
92. Dwyer, C., Viebke, C., Meadows, J. (2005) Propofol induced micelle formation in aqueous block copolymer solutions. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 254 (1-3), 23-30.
93. Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Meliknubarov, N.S., Fedoseev, N.A., Dorodnich, T.Y., Alakhov, V.Y. ve diğerleri. (1992) A New Class of Drug Carriers - Micelles of Poly(Oxyethylene)-Poly(Oxypropylene) Block Copolymers as Microcontainers for Drug Targeting from Blood in Brain. *Journal of Controlled Release*, 22 (2), 141-157.
94. Kwon, G.S., Okano, T. (1999) Soluble self-assembled block copolymers for drug delivery. *Pharmaceutical Research*, 16 (5), 597-600.
95. Batrakova, E.V., Kabanov, A.V. (2008) Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release*, 130 (2), 98-106.
96. Bozkir, A., Saka, O.M. (2005) Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies. *Farmaco*, 60 (10), 840-846.
97. Adams, M.L., Lavasanifar, A., Kwon, G.S. (2003) Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92 (7), 1343-1355.
98. Baysal, B. Polimer Kimyası (Genişletilmiş 2. Baskı). *Orta Doğu Teknik Üniversitesi*.
99. Wesley, R.D., Dreiss, C.A., Cosgrove, T., Armes, S.P., Thompson, L., Baines, F.L. ve diğerleri. (2005) Structure of a hydrophilic-hydrophobic block copolymer and its interactions with salt and an anionic surfactant. *Langmuir*, 21 (11), 4856-4861.
100. Riess, I. (2003) Mixed ionic-electronic conductors - material properties and applications. *Solid State Ionics*, 157 (1-4), 1-17.

101. Agrawal, S.K., Sanabria-DeLong, N., Coburn, J.M., Tew, G.N., Bhatia, S.R. (2006) Novel drug release profiles from micellar solutions of PLA-PEO-PLA triblock copolymers. *Journal of Controlled Release*, 112 (1), 64-71.
102. Tang, Y.Q., Liu, S.Y., Armes, S.P., Billingham, N.C. (2003) Solubilization and controlled release of a hydrophobic drug using novel micelle-forming ABC triblock copolymers. *Biomacromolecules*, 4 (6), 1636-1645.
103. Hruby, M., Konak, C., Ulbrich, K. (2005) Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, 103 (1), 137-148.
104. Xie, Z., Guan, H.L., Chen, X., Lu, C., Chen, L., Hu, X. ve diğerleri. (2007) A novel polymer-paclitaxel conjugate based on amphiphilic triblock copolymer. *Journal of Controlled Release*, 117 (2), 210-216.
105. He, G.S., Ma, L.L., Pan, J., Venkatraman, S. (2007) ABA and BAB type triblock copolymers of PEG and PLA: A comparative study of drug release properties and "stealth" particle characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 334 (1-2), 48-55.
106. The United States Pharmacopeia, USP 27. (2004) *Washington, D.C.*, 2149-2152.
107. European Pharmacopeia. (2002), 1777.
108. Pluronic® Block Copolymer NF Grades (Poloxamer NF Grades). (2004) *BASF Corporation*.
109. Nagarajan, R. (1999) Solubilization of hydrocarbons and resulting aggregate shape transitions in aqueous solutions of Pluronic (R) (PEO-PPO-PEO) block copolymers. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 16 (1-4), 55-72.
110. http://www.vcbio.science.ru.nl/images/fesem_amphiphiles_aggregates.jpg. *Radboud University Nijmegen*. (Erişim Tarihi: 26.08.2010)
111. Naito, S., Yokomizo, A., Koga, H. (1999) Mechanisms of drug resistance in chemotherapy for urogenital carcinoma. *International Journal of Urology*, 6 (9), 427-439.
112. Couvreur, P., Vauthier, C. (2006) Nanotechnology: Intelligent design to treat complex disease. *Pharmaceutical Research*, 23 (7), 1417-1450.
113. Langer, R. (1998) Drug delivery and targeting. *Nature*, 392 (6679), 5-10.
114. Batrakova, E.V., Dorodnych, T.Y., Klinskii, E.Y., Kliushnenkova, E.N., Shemchukova, O.B., Goncharova, O.N. ve diğerleri. (1996) Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: In vivo evaluation of anti-cancer activity. *British Journal of Cancer*, 74 (10), 1545-1552.
115. Kreuter, J. (1983) Evaluation of Nanoparticles as Drug-Delivery Systems .1. Preparation Methods. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 58 (7), 196-209.
116. Costantino, L., Gandolfi, F., Tosi, G., Rivasi, F., Vandelli, M.A., Forni, F. (2005) Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release*, 108 (1), 84-96.

- 117.Schroeder, U., Sabel, B.A.,Schroeder, H. (1999) Diffusion enhancement of drugs by loaded nanoparticles in vitro. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 23 (5), 941-949.
- 118.Schroeder, U., Schroeder, H.,Sabel, B.A. (2000) Body distribution of H-3-labelled dalargin bound to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after i.v. injections to mice. *Life Sciences*, 66 (6), 495-502.
- 119.Calvo, P., RemunanLopez, C., VilaJato, J.L.,Alonso, M.J. (1997) Chitosan and chitosan ethylene oxide propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical Research*, 14 (10), 1431-1436.
- 120.Calvo, P., Gouritin, B., Brigger, I., Lasmezas, C., Deslys, J.P., Williams, A. ve diğ erleri. (2001) PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as vector for drug delivery in prion diseases. *Journal of Neuroscience Methods*, 111 (2), 151-155.
- 121.Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V.,Langer, R. (1994) Biodegradable Long-Circulating Polymeric Nanospheres. *Science*, 263 (5153), 1600-1603.
- 122.Spiers, I.D., Alpar, H.O., Eyles, J.E., Bozkir, A., Miller, J.,Williamson, E.D. (1999) Studies on the co-encapsulation, release and integrity of two subunit antigens: rV and rF1 from Yersinia pestis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51 (9), 991-997.
- 123.Park, K. (2007) Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 120 (1-2), 1-3.
- 124.Peppas, N.A., Hilt, J.Z., Thomas, J.B. (2007) Nanotechnology in Therapeutics, Current Technology and Applications. 65-89.
- 125.Magenheim, B., Levy, M.Y.,Benita, S. (1993) A New in-Vitro Technique for the Evaluation of Drug-Release Profile from Colloidal Carriers - Ultrafiltration Technique at Low-Pressure. *International Journal of Pharmaceutics*, 94 (1-3), 115-123.
- 126.Chen, Y., Mcculloch, R.K.,Gray, B.N. (1994) Synthesis of Albumin-Dextran Sulfate Microspheres Possessing Favorable Loading and Release Characteristics for the Anticancer Drug Doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, 31 (1), 49-54.
- 127.Swarbrick, J. (2007) Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Nanoparticles, Third Edition. *Informa Healthcare Inc.*, 4, 2384-2397.
- 128.Torchilin, V.P. (2006) Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1532-1555.
- 129.Jabr-Milane, L.S., van Vlerken, L.E., Yadav, S.,Amiji, M.M. (2008) Multifunctional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. *Cancer Treatment Reviews*, 34 (7), 592-602.
- 130.Koo, Y.E.L., Reddy, G.R., Bhojani, M., Schneider, R., Philbert, M.A., Rehemtulla, A. ve diğ erleri. (2006) Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatforms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 (14), 1556-1577.

- 131.Kang, H.C., Kim, I.J., Park, H.W., Jang, S.G., Ahn, S.A., Yoon, S.N. ve diğ erleri. (2007) Regulation of MDK expression in human cancer cells modulates sensitivities to various anticancer drugs: MDK overexpression confers to a multi-drug resistance. *Cancer Letters*, 247 (1), 40-47.
- 132.Guillaume, N., Gouilleux-Gruart, V., Claisse, J.F., Troussard, X., Lepelley, P., Damaj, G. ve diğ erleri. (2007) Multi-drug resistance mediated by P-glycoprotein overexpression is not correlated with ZAP-70/CD38 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 48 (8), 1556-1560.
- 133.Hruby, M., Etrych, T., Kucka, J., Forsterova, M.,Ulbrich, K. (2006) Hydroxybisphosphonate-containing polymeric drug-delivery systems designed for targeting into bone tissue. *Journal of Applied Polymer Science*, 101 (5), 3192-3201.
- 134.Soderquist, R.G., Sloane, E.M., Loram, L.C., Harrison, J.A., Dengler, E.C., Johnson, S.M. ve diğ erleri. (2010) Release of Plasmid DNA-Encoding IL-10 from PLGA Microparticles Facilitates Long-Term Reversal of Neuropathic Pain Following a Single Intrathecal Administration. *Pharmaceutical Research*, 27 (5), 841-854.
- 135.Varde, N.K.,Pack, D.W. (2007) Influence of particle size and antacid on release and stability of plasmid DNA from uniform PLGA microspheres. *Journal of Controlled Release*, 124 (3), 172-180.
- 136.Zhou, X.F., Liu, B., Yu, X.H., Zha, X., Zhang, X.Z., Wang, X.Y. ve diğ erleri. (2008) Controlled release of PEI/DNA complexes from PLGA microspheres as a potent delivery system to enhance immune response to HIV vaccine DNA prime/MVA boost regime. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68 (3), 589-595.
- 137.Gref, R., Couvreur, P., Barratt, G.,Mysiakine, E. (2003) Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling. *Biomaterials*, 24 (24), 4529-4537.
- 138.Stella, B., Arpicco, S., Peracchia, M.T., Desmaele, D., Hoebeke, J., Renoir, M. ve diğ erleri. (2000) Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89 (11), 1452-1464.
- 139.Lukyanov, A.N., Gao, Z.G., Mazzola, L.,Torchilin, V.P. (2002) Polyethylene glycol-diacyllipid micelles demonstrate increased acculumation in subcutaneous tumors in mice. *Pharmaceutical Research*, 19 (10), 1424-1429.
- 140.Bilensoy, E., Gurkaynak, O., Ertan, M., Sen, M.,Hincal, A.A. (2008) Development of nonsurfactant cyclodextrin nanoparticles loaded with anticancer drug paclitaxel. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 (4), 1519-1529.
- 141.Wang, B., Siahaan, T., Soltero, R.A. (2005) Drug Delivery Principles and Applications. *John Wiley&Sons, Inc.*, 192-193.
- 142.Schreier, H. (2001) Drug Targeting Technology, Physical-Chemical-Biological Methods. *Marcel Dekker Inc., New York*.
- 143.Kohori, F., Sakai, K., Aoyagi, T., Yokoyama, M., Sakurai, Y.,Okano, T. (1998) Preparation and characterization of thermally responsive block copolymer micelles comprising poly(N-isopropylacrylamide-b-DL-lactide). *Journal of Controlled Release*, 55 (1), 87-98.

- 144.Torchilin, V.P., Lukyanov, A.N., Gao, Z.G.,Mazzola, L. (2002) Polymer-lipid micelles as non-targeted and targeted pharmaceutical carriers. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 224, U471-U472.
- 145.Kataoka, K., Kwon, G.S., Yokoyama, M., Okano, T.,Sakurai, Y. (1993) Block-Copolymer Micelles as Vehicles for Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*, 24 (1-3), 119-132.
- 146.Todd, C.W., Pozzi, L.A.M., Guarnaccia, J.R., Balasubramanian, M., Henk, W.G., Younger, L.E. ve diğerleri. (1997) Development of an adjuvant active nonionic block copolymer for use in oil-free subunit vaccines formulations. *Vaccine*, 15 (5), 564-570.
- 147.Newman, M.J., Balusubramanian, M.,Todd, C.W. (1998) Development of adjuvant-active nonionic block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32 (3), 199-223.
- 148.Kabanov, A.V.,Kabanov, V.A. (1998) Interpolyelectrolyte and block ionomer complexes for gene delivery: Physicochemical aspects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 30 (1-3), 49-60.
- 149.Torchilin, V.P. (2001) Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73 (2-3), 137-172.
- 150.Moghimi, S.M.,Szebeni, J. (2003) Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipid Research*, 42 (6), 463-478.
- 151.Veronese, F.M. (2001) Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions. *Biomaterials*, 22 (5), 405-417.
- 152.McNeil, J.B.H.M.A.D.A.K.P.S.E. (2007) Characterization of Nanoparticles for Therapeutics. *Nanomedicine*, 2 (6), 789-803.
- 153.Bhadra, D., Bhadra, S., Jain, P.,Jain, N.K. (2002) Pegnology: a review of PEG-ylated systems. *Pharmazie*, 57 (1), 5-29.
- 154.Harris, J.M.,Chess, R.B. (2003) Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2 (3), 214-221.
- 155.Feng, S.S., Mu, L., Win, K.Y.,Huang, G.F. (2004) Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel. *Current Medicinal Chemistry*, 11 (4), 413-424.
- 156.RI., F. (1994) Culture of animal cells. 4. Canada: Wiley-Liss,inc.
- 157.Harrison, R. (1907) Observations on the Living Developing Nerve Fiber. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 4, 140-143.
- 158.Eagle, H. (1955) Nutrition Needs of Mammalian Cells in Tissue Culture. *Science*, 122 (3168), 501-504.
- 159.Rosenfield, A., Yoshimura, K., Trapnell, B.C., Yoneyama, K. (1992) In Vivo Transfer of the Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene to the Airway Epithelium. *Cell* 68, 143-155.

160. Snyder, E.Y., Deitcher, D.L., Walsh, C., Arnoldaldea, S., Hartweg, E.A., Cepko, C.L. (1992) Multipotent Neural Cell-Lines Can Engraft and Participate in Development of Mouse Cerebellum. *Cell*, 68 (1), 33-51.
161. Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., Oconnell, C., Quon, D. ve diğeri. (1978) Isolation of Structural Genes from Libraries of Eukaryotic DNA. *Cell*, 15 (2), 687-701.
162. Artursson P, B.R. (1997) Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond. *Pharm Res*, 14, 1655-1658.
163. Audus, K.L., Bartel, R.L., Hidalgo, I.J., Borchardt, R.T. (1990) The Use of Cultured Epithelial and Endothelial-Cells for Drug Transport and Metabolism Studies. *Pharmaceutical Research*, 7 (5), 435-451.
164. Mather, I.H., Keenan, T.W. (1998) Introduction - The cell biology of milk secretion: Historical notes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 3 (3), 227-232.
165. Waymout, C. (1966) Cell, Tissue and Organ Culture (<http://www.informatics.jax.org/greenbook/chapters/chapter25.shtml>). *Biology of The Laboratory Mouse, By The Staff of The Jackson Laboratory, Ed.E.L. Green Second Edition, Dover Publications, Inc., New York*, (Adapted for the web by: Mouse Genome Informatics The Jackson Laboratory Bar Harbour, Maine, December, 2007. (Erişim Tarihi: 26.08.2010)
166. Muller, R.H., Ruhl, D., Runge, S., SchulzeForster, K., Mehnert, W. (1997) Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharmaceutical Research*, 14 (4), 458-462.
167. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
168. Hussain, R.F., Nouri, A.M.E., Oliver, R.T.D. (1993) A New Approach for Measurement of Cytotoxicity Using Colorimetric Assay. *Journal of Immunological Methods*, 160 (1), 89-96.
169. Brannon-Peppas, L., Blanchette, J.O. (2004) Nanoparticles and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1649-1659.
170. Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P. (2002) Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54 (5), 631-651.
171. Haley, B., Frenkel, E. (2008) Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*, 26 (1), 57-64.
172. World Health Organization, Department of Measurement and Health Information. (2004) *Mortality and Health Databases*.
173. <http://www.tuba.gov.tr/index.php?id=443>. (Erişim Tarihi: 26.08.2010)
174. Chabner B.A, R.D.P., Paz-Ares L, Garcia-Carbanera R, Calabresi P. (2001) Chemotherapy of neoplastic diseases. In: Hardman J.G, Limbird L.E, Gilman A.G. Goodman&Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.

- 175.Feng, S.S.,Chien, S. (2003) Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science*, 58 (18), 4087-4114.
- 176.Brown, J.M.,Giaccia, A.J. (1998) The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Research*, 58 (7), 1408-1416.
- 177.Pinto-Alphandary, H., Andremont, A.,Couvreur, P. (2000) Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13 (3), 155-168.
- 178.Vauthier, C., Dubernet, C. Chauvierre, C., Brigger, I., Couvreur, P. (2003) Drug delivery to resistant tumors: the potential of poly (alkyl cyanoacrylate) nonoparticles. *Journal of Controlled Release*, 93, 151-160.
- 179.Jain, R.K. (2001) Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46 (1-3), 149-168.
- 180.Inoue, Y., Ojima, E., Watanabe, H., Hiro, J., Toiyama, Y., Kobayashi, M. ve diğ erleri. (2007) Does preoperative chemo-radiotherapy enhance the expression of vascular endothelial growth factor in patients with rectal cancer? *Oncol Rep*, 18 (2), 369-375.
- 181.Süreyya Ölgen, I.B., Doğu Nebioğlu. (2002) Anjiyogenezis ve Kanser Tedavisinde Yeni Yaklaşımlar. *J. Fac. Pharm, Ankara*, 31 (3), 193-214.
- 182.The United States Pharmacopeia, USP 27. (2004) *Washington, D.C.*, 820.
- 183.Martindale, The Extra Pharmacopoeia. (2007) *The Pharmaceutical Press*, 628.
- 184.Svobaite, R., Solassol, I., Pinguet, F., Ivanauskas, L., Bres, J.,Bressolle, F.M.M. (2008) HPLC with UV or mass spectrometric detection for quantifying endogenous uracil and dihydrouracil in human plasma. *Clinical Chemistry*, 54 (9), 1463-1472.
- 185.Marunaka, T., Umeno, Y., Yoshida, K., Nagamachi, M., Minami, Y., Fujii, S. (1980) High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of Ftorafur [1-(Tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil] and GLC-Mass Spectrometric Determination of 5-Fluorouracil and Uracil in Biological Materials After Oral Administration of Uracil Plus Ftorafur. *J. Fac. Pharm, Ankara*, 1296-1299.
- 186.Sasaki, H., Nakamura, J., Konishi, R.,Shibasaki, J. (1986) Intestinal-Absorption Characteristics of 5-Fluorouracil, Ftorafur and 6-Mercaptopurine in Rats. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 34 (10), 4265-4272.
- 187.Machover, D., Grison, X., Goldschmidt, E., Zittoun, J., Lotz, J.P., Metzger, G. ve diğ erleri. (1992) Fluorouracil Combined with the Pure (6s)-Stereoisomer of Folinic Acid in High-Doses for Treatment of Patients with Advanced Colorectal-Carcinoma - a Phase-I-Ii Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 84 (5), 321-327.
- 188.Correale, P., Cerretani, D., Marsili, S., Pozzessere, D., Petrioli, R., Messinese, S. ve diğ erleri. (2003) Gemcitabine increases systemic 5-fluorouracil exposure in advanced cancer patients. *European Journal of Cancer*, 39 (11), 1547-1551.

- 189.Glavas-Dodov, M., Fredro-Kumbaradzi, E., Goracinova, K., Simonoska, M., Calis, S., Trajkovic-Jolevskaa, S. ve diğeri. (2005) The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *International Journal of Pharmaceutics*, 291 (1-2), 79-86.
- 190.Chabner, B.A., Meyers, C.E. (1989) Clinical Pharmacology of cancer chemotherapy. Cancer principles and practice of oncology.
- 191.Dodov, M.G., Calis, S., Crcarevska, M.S., Geskovski, N., Petrovska, V.,Goracinova, K. (2009) Wheat germ agglutinin-conjugated chitosan-Ca-alginate microparticles for local colon delivery of 5-FU: Development and in vitro characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 381 (2), 166-175.
- 192.Ferguson M.J, A.F.Y., Cassidy J. (2001) The role of pro-drug therapy in the treatment of cancer. 4, 225-232.
- 193.Arica, B., Calis, S., Kas, H.S., Sargon, M.F.,Hincal, A.A. (2002) 5-fluorouracil encapsulated alginate beads for the treatment of breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 242 (1-2), 267-269.
- 194.Kayaalp, S.O. (2000) Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. *Ankara,Hacettepe-Taş Kitapçılık*, 372-400.
- 195.Macmillan, W.E., Wolberg, W.H.,Welling, P.G. (1978) Pharmacokinetics of Fluorouracil in Humans. *Cancer Research*, 38 (10), 3479-3482.
- 196.Yang, Y.W., Lee, J.S., Kim, I., Jung, Y.J.,Kim, Y.M. (2007) Synthesis and properties of N-nicotinoyl-2-(5-fluorouracil-1-yl)-D,L-glycine ester as a prodrug of 5-fluorouracil for rectal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66 (2), 260-267.
- 197.Quebbeman, E.J., Hamid, A.A.R., Hoffman, N.E.,Ausman, R.K. (1984) Stability of Fluorouracil in Plastic Containers Used for Continuous Infusion at Home. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 41 (6), 1153-1156.
- 198.Monnot, E.A., Kindberg, C.G., Johnson, T.S., Riley, C.M., Stobaugh, J.F.,Slavik, M. (1990) Stability of Intravenous Admixtures of 5-Fluorouracil and Spirogermanium, a Novel Combination of Cytotoxic Agents. *International Journal of Pharmaceutics*, 60 (1), 41-52.
- 199.Benvenuto, J.A., Anderson, R.W., Kerkof, K., Smith, R.G.,Loo, T.L. (1981) Stability and Compatibility of Anti-Tumor Agents in Glass and Plastic Containers. *American Journal of Hospital Pharmacy*, 38 (12), 1914-1918.
- 200.Vincke, B.J., Verstraeten, A.E., Eleini, D.I.D.,Mccarthy, T.M. (1989) Extended Stability of 5-Fluorouracil and Methotrexate Solutions in Pvc Containers. *International Journal of Pharmaceutics*, 54 (3), 181-189.
- 201.FDA,Orange Book.
(<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/docs/tempai.cfm>). (Erişim Tarihi: 26.08.2010)

- 202.Loos, W.J., de Bruijn, P., van Zuylen, L., Verweij, J., Nooter, K., Stoter, G. ve diğerleri. (1999) Determination of 5-fluorouracil in microvolumes of human plasma by solvent extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 735 (2), 293-297.
- 203.United States Pharmacopeia National Formulary, Twenty-Second Revision,. (1990).
- 204.Bressolle F., B.-P.M., Audran M. (1996) Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 686 (1), 3-10.
- 205.Guideline for Industry Text on Validation of Analytical Procedures, ICH Q-2A. (1995).
- 206.Spray-dried carbamazepine-loaded chitosan and HPMC microspheres: preparation and characterisation. (2003).
- 207.Sayın, B. (2003) Antibiyotik Yüklü Allogreftler ve Biyopolimerik Mikropartiküllerin Enfekte Kemik Defektlerine İmplantasyonu ve Etkinliklerinin Değerlendirilmesi. *Farmasötik Teknoloji Programı Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara*.
- 208.Bozdog, S., Capan, B., Vural, I., Dalkara, T., Dogan, A.L., Guc, D. ve diğerleri. (2005) Formulation and in vitro bioactivity of mitoxantrone-loaded biodegradable microspheres on rat glioma (RG2) cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 15 (3), 201-206.
- 209.Wang, X.Y., Du, Y.M.,Luo, J.W. (2008) Biopolymer/montmorillonite nanocomposite: preparation, drug-controlled release property and cytotoxicity. *Nanotechnology*, 19 (6), -.
- 210.Wang, H., Zhang, J.Y., Zhang, W.P.,Yang, Y.J. (2009) Host-guest interactions of 5-fluorouracil in supramolecular organogels. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73 (3), 357-360.
- 211.Selvaraj, V.,Alagar, M. (2007) Analytical detection and biological assay of antileukemic drug 5-fluorouracil using gold nanoparticles as probe. *International Journal of Pharmaceutics*, 337 (1-2), 275-281.
- 212.Singh, P., Tyagi, G., Mehrotra, R.,Bakhshi, A.K. (2009) Thermal stability studies of 5-fluorouracil using diffuse reflectance infrared spectroscopy. *Drug Testing and Analysis*, 1 (5-6), 240-244.
- 213.Thermal properties of selected (co-)polymers. (2008) *Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG*.
- 214.http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&N4=542342%7CALDRICH&N25=0&QS=ON&F=SPEC. (Erişim Tarihi: 26.08.2010)
- 215.http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?D7=0&N5=SEARCH_CONCAT_PNO%7CBRAND_KEY&N4=P1691%7CSIGMA&N25=0&QS=ON&F=SPEC. (Erişim Tarihi: 26.08.2010)

- 216.Kunii, R., Onishi, H., Ueki, K., Koyama, K.,Machida, Y. (2008) Particle characteristics and biodistribution of camptothecin-loaded PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles. *Drug Deliv*, 15 (1), 3-10.
- 217.Tenzel, R.A., Aitcheson, David F. (1991) Preparation of uniform-size liposomes. *United States Patent 5000887*
- 218.W.Adamson, A. (1997) Physical Chemistry of Surfaces. *Department of Chemical Engineering, Stanford University*.
- 219.Khooe, S.,Hossainzadeh, M.T. (2010) Effect of O/S/W process parameters on 17 beta-EV loaded nanoparticles properties. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 75 (1), 133-140.
- 220.Quaglia, M.G., Carlucci, G., Maurizi, G.,Mazzeo, P. (1988) Determination of 5-Fluorouracil in 5-Fluorocytosine by High-Performance Thin-Layer Chromatography and Derivative Uv-Spectrophotometry. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 63 (12), 347-349.
- 221.Pamula, E., Blazewicz, M., Paluszkiewicz, C.,Dobrzynski, P. (2001) FTIR study of degradation products of aliphatic polyesters-carbon fibres composites. *Journal of Molecular Structure*, 596, 69-75.
- 222.Jang, W.Y., Shin, B.Y., Lee, T.X.,Narayan, R. (2007) Thermal properties and morphology of biodegradable PLA/starch compatibilized blends. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 13 (3), 457-464.
- 223.Loo, S.C.J., Ooi, C.P.,Boey, Y.C.F. (2004) Radiation effects on poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA). *Polymer Degradation and Stability*, 83 (2), 259-265.
- 224.Gong, C.Y., Shi, S.A., Dong, P.W., Kan, B., Gou, M.L., Wang, X.H. ve diğ erleri. (2009) Synthesis and characterization of PEG-PCL-PEG thermosensitive hydrogel. *International Journal of Pharmaceutics*, 365 (1-2), 89-99.
- 225.Chang, C.W., Choi, D.H., Kim, W.J., Yockman, J.W., Christensen, L.V., Kim, Y.H. ve diğ erleri. (2007) Non-ionic amphiphilic biodegradable PEG-PLGA-PEG copolymer enhances gene delivery efficiency in rat skeletal muscle. *Journal of Controlled Release*, 118 (2), 245-253.
- 226.Zhang, H.W., Bei, J.Z.,Wang, S.G. (2009) Multi-morphological biodegradable PLGE nanoparticles and their drug release behavior. *Biomaterials*, 30 (1), 100-107.
- 227.Wang, Q.Y., Su, H.Y., Xia, C.C., Sun, J.Y., Liu, C., Wang, Z.Y. ve diğ erleri. (2009) Amphiphilic dextran/magnetite nanocomposites as magnetic resonance imaging probes. *Chinese Science Bulletin*, 54 (17), 2925-2933.
- 228.Zhang, W.L., Li, Y.L., Liu, L.X., Sun, Q.Q., Shuai, X.T., Zhu, W. ve diğ erleri. (2010) Amphiphilic Toothbrushlike Copolymers Based on Poly(ethylene glycol) and Poly(epsilon-caprolactone) as Drug Carriers with Enhanced Properties. *Biomacromolecules*, 11 (5), 1331-1338.

229. Zhang, Y., Huo, M.R., Zhou, J.P., Yu, D., Wu, Y.P. (2009) Potential of amphiphilically modified low molecular weight chitosan as a novel carrier for hydrophobic anticancer drug: Synthesis, characterization, micellization and cytotoxicity evaluation. *Carbohydrate Polymers*, 77 (2), 231-238.
230. Wang, X., Xie, X., Cai, C., Rytting, E., Steele, T., Kissel, T. (2008) Biodegradable branched polyesters poly(vinyl sulfonate-co vinyl alcohol)-graft poly(D,L-lactic-co glycolic acid) as a negatively charged polyelectrolyte platform for drug delivery: Synthesis and characterization. *Macromolecules*, 41 (8), 2791-2799.
231. Lin, W.J., Juang, L.W., Lin, C.C. (2003) Stability and release performance of a series of pegylated copolymeric micelles. *Pharmaceutical Research*, 20 (4), 668-673.
232. Wei, Z., Hao, J.G., Yuan, S., Li, Y.J., Juan, W., Sha, X.Y. ve diğerleri. (2009) Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles: Formulation, optimization and in vitro characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 376 (1-2), 176-185.
233. Venkatraman, S.S., Jie, P., Min, F., Freddy, B.Y., Leong-Huat, G. (2005) Micelle-like nanoparticles of PLA-PEG-PLA triblock copolymer as chemotherapeutic carrier. *Int J Pharm*, 298 (1), 219-232.
234. Ravi Kumar, M.N., Bakowsky, U., Lehr, C.M. (2004) Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*, 25 (10), 1771-1777.
235. Chouhan, R., Bajpai, A.K. (2009) An in vitro release study of 5-fluoro-uracil (5-FU) from swellable poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) nanoparticles. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 20 (5), 1103-1114.
236. Desai, K.G.H., Park, H.J. (2005) Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 22 (2), 179-192.
237. Chung, J.E., Yokoyama, M., Okano, T. (2000) Inner core segment design for drug delivery control of thermo-responsive polymeric micelles. *Journal of Controlled Release*, 65 (1-2), 93-103.
238. Wu, X.L., Kim, J.H., Koo, H., Bae, S.M., Shin, H., Kim, M.S. ve diğerleri. (2010) Tumor-Targeting Peptide Conjugated pH-Responsive Micelles as a Potential Drug Carrier for Cancer Therapy. *Bioconjugate Chemistry*, 21 (2), 208-213.
239. Ojima, E., Inoue, Y., Watanabe, H., Hiro, J., Toiyama, Y., Miki, C. ve diğerleri. (2006) The optimal schedule for 5-fluorouracil radiosensitization in colon cancer cell lines. *Oncology Reports*, 16 (5), 1085-1091.
240. Zhang, Y., Zhuo, R.X. (2006) Synthesis, characterization, and in vitro 5-Fu release behavior of poly(2,2-dimethyltrimethylene carbonate)-poly(ethylene glycol)-poly(2,2-dimethyltrimethylene carbonate) nanoparticles. *J Biomed Mater Res A*, 76 (4), 674-680.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Harika Öcal

Doğum Tarihi: 03.04.1985

Doğum Yeri: Iğdır, Türkiye

Tabiyeti: T.C.

Yabancı Dili: İngilizce (İyi derecede)

Bilgisayar Becerisi: Microsoft® Office Uygulamaları (İyi derecede)

Adresi (Ev): Kent Koop Mahallesi, 1777.Cadde, 1843.Sokak, Yıldızkent-Güzelbahçe Küme Evleri, 5.Blok, 32/1, Batıkent/Ankara

Adresi (İş): Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 06100 Sıhhiye/Ankara

Telefon (Ev): +90 312 250 24 83

Telefon (İş): +90 312 305 12 41

Telefon (GSM): +90 535 726 65 60

E-Posta: hocal@hacettepe.edu.tr
eczharikaocal@hotmail.com

Eğitim Durumu:

2007 – : Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans
Danışman: Prof. Dr. Sema Çalış
Tez: Amfifilik Blok Kopolimerler Kullanılarak Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve İn Vitro Değerlendirilmesi

2003 – 2007: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Lisans
Akademik Ortalama: 92.5 / 100.0

1999 – 2002: Iğdır Lisesi
Mezuniyet Derecesi: Bölüm birincisi
Akademik ortalama: 4.98/5.00

Profesyonel İş Deneyimi ve Stajlar:

- 2007 –:** Araştırma Görevlisi
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
- 2003, Yaz:** Baykal Eczanesi (Kızılay/Ankara) Staj (8 hafta)
- 2004, Yaz:** Handan Eczanesi (Demetevler/Ankara) Staj (8 hafta)
- 2005, Yaz:** Gök Eczanesi (Sıhhiye/Ankara) Staj (4 hafta)
- 2005, Yaz:** Pfizer İlaç San.A.Ş (Ortaköy/İstanbul) Ruhsatlandırma Departmanı Staj (4 hafta)

Çalışma Alanları:

- İlaç taşıyıcı nanopartiküler sistemler
- Antikanser ilaçların formülasyonu
- Amfifilik blok kopolimerler

Ödüller ve Burslar:

1. TÜBİTAK Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu, 2008-2009
2. Mezuniyet Derecesi 7. lik Ödülü, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 2006
3. Hedef Alliance Eğitim Bursu, 2006
4. TEB Eğitim Bursu, 2005
5. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Fakülte Bursu 2004

Katıldığı Bilimsel Toplantılar:

- 2007 – 2010:** Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Seminerleri, Ankara, Türkiye.
- Mart 26-27, 2009:** HETEK Workshop in: Patent in Pharmaceutical Industry, Ankara, Türkiye.

- Eylül 8-10, 2008:** 14. Uluslararası Farmasötik Teknoloji Sempozyumu, Antalya, Türkiye.
- Ocak 24-25, 2008:** FATUM Workshop in: Pharmacoeconomics – Basic Principles and Applications in Reference Health Systems, Ankara, Türkiye.
- Kasım, 2007:** FATUM Workshop in: Drug Pricing and Current Reimbursement Policies in Turkey, Ankara, Türkiye.

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

- Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği (TÜFTAD)
- Hacettepe Eczacılık Teknolojisi Derneği (HETEK)

Projeler:

1. Antikanser İlaçların Hedeflendirilmesi ve /veya Kombine Kemoterapi ya da Gen Terapisinde Amfifilik Taşıyıcıların Kullanılması, TÜBİTAK Projesi, SBAG-108S146, 2008 –