



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEDEFLENDİRİLMİŞ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU ve İLAÇ SALIM KİNETİĞİNİN
İNCELENMESİ

Sherif Domingo TİETİLÜ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Serkan EMİK

II. DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ayça BAL ÖZTÜRK

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimyasal Teknolojiler Programı

İSTANBUL-2020

Bu alışma 02.10.2020 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Kimya Mühendisliğı Anabilim Dalı, Kimyasal Teknolojiler Programı Yüksek Lisans Tezi
olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Doç. Dr. Serkan EMİK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendilik Fakóltesi

Prof. Dr. Işıl ACAR
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakóltesi

Doç. Dr. Bengi ÖZKAHRAMAN
Hitit Üniversitesi
Mühendislik Fakóltesi

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa’nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 117Z732 numaralı TÜBİTAK projesi ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 34534 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



ÖNSÖZ

Bu tez çalışması boyunca emek, tecrübe ve tüm bilgileri ile bana destek olan saygıdeğer tez danışmanlarım Doç. Dr. Serkan EMİK ve Dr. Öğr. Üyesi. Ayça BAL ÖZTÜRK'e teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim sırasında ve tez çalışmalarımın her aşamasında bana desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Oğuz YÜCEL'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması sürecinde, desteklerinden ve yardımlarından dolayı Elif YÜCE ve Öğr. Gör. Eren YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her aşamasında sevgi ve desteğini esirgemeyen sevgili anneme, rahmetli babama ve kardeşlerime sonsuz teşekkürler. |

Eylül 2020

[Sherif Domingo TIETILU]

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. NANOTEKNOLOJİ VE BİYOTEKNOLOJİ.....	5
2.2. POLİMERLER VE AKILLI İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİ	6
2.3.1. Nanojeller	12
2.3.2. Dendrimerler.....	12
2.3.3. Dallanmış Polimerler.....	14
2.3.3.1. <i>Dallanmış Polimerlerin Sentez Yaklaşımları.....</i>	16
2.3.3.2. <i>Dallanmış Polimerlerin Uygulama Alanları</i>	18
2.3.4. Polimerik Miseller	20
2.3.4.1. <i>Polimerik Misellerin Hazırlama ve İlaç Yükleme Yöntemleri</i>	22
2.3.5. Nanopartiküller.....	24
2.3.5.1. <i>Önceden Oluşturulmuş Polimerin Dispersiyonundan Nanopartiküllerin Hazırlama Yöntemleri</i>	25
2.3.5.2. <i>Monomerlerin Polimerizasyonundan Nanopartiküllerin Hazırlanması.....</i>	32
2.3.5.3. <i>Hidrofilik Polimerlerin Koaservasyonu</i>	33
2.3.5.4. <i>Polimerik Nanopartiküllerin Uygulama Alanları.....</i>	33
2.4. İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİNDE BİYOBOZUNUR POLİMERLER.....	34
2.5. HEDEFLENDİRİLMİŞ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİ.....	36
2.5.1. Pasif Hedefleme Yaklaşımı	36
2.5.2. Aktif Hedefleme Yaklaşımı.....	38
2.6. KAYNAK ARAŞTIRMASI	39
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	46
3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	46

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR.....	47
3.3. SENTEZ VE MODİFİKASYON İŞLEMLERİ.....	47
3.3.1. 1-6-Hekzandiamin ve Metilakrilat ile oluşan AB ₂ Monomerin Hazırlanması	48
3.3.2. Dallanmış Poli(amino ester) (DPAE)'in Hazırlanması	48
3.3.3. Poli (etilen glikol)-b-polikaprolakton (MPEG-b-PCL) blok Kopolimerin Hazırlanması	50
3.3.4. Dallanmış Poli(amino ester) esaslı Amfifilik Blok Kopolimerin (DPAE-MPEG-b-PCL) Hazırlanması.....	51
3.3.5. DPAE-PCL-b-MPEG Ürünlerine Ligand Konjugasyonu	53
3.3.6. İlaç Yükleme Çalışmaları	54
3.3.6.1. Nanopartiküllerin İlaç Yükleme Kapasitesi ve Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi	54
3.3.7. In Vitro İlaç Salım Çalışmaları için Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	55
3.3.7.1. pH=5,5 Asetat tampon çözeltisinin Hazırlanışı.....	55
3.3.7.2. pH=7,4 Fosfat tampon tuz çözeltisinin Hazırlanışı.....	56
3.3.8. İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması	56
3.3.9. In Vitro İlaç Salım Çalışmaları.....	56
3.3.10. In Vitro Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri.....	57
3.3.10.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	57
3.3.10.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi (MTT Testi)	58
3.3.10.3. Tümörlü Hücrelere Hedeflendirilen Nanopartiküllerin Hücresel Alımlarının İncelenmesi	59
4. BULGULAR.....	61
4.1. SENTEZLENEN ÜRÜNLERİN KARAKTERİZASYONUNA AİT BULGULAR	61
4.1.1. DPAE Ürününün FTIR Analizi	61
4.1.2. DPAE Ürününün ¹ H-NMR ve ¹³ C-NMR Analizi	62
4.1.3. MPEG-b-PCL diblok Kopolimer Ürünlerinin FTIR Analizi	64
4.1.4. MPEG-b-PCL Ürünlerinin ¹ H NMR ve ¹³ C NMR Analizi	65
4.1.5. DPAE-PCL-b-MPEG Ürünlerinin FTIR Analizi	69
4.1.6. DPAE-PCL-b-PCL Ürünlerinin ¹ H NMR Analizi	70
4.1.7. Ligand Takılı DPAE-PCL-b-MPEG Ürünlerinin FTIR Analizi	70
4.1.8. Ligand Takılı DPAE-PCL-b-MPEG Ürünlerinin ¹ H NMR Analizi.....	71
4.2. DALLANMIŞ POLİ (AMİNO ESTER) ESASLI AMFİFİLİK DİBLOK KOPOLİMER NANOPARTİKÜL ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYONU	73

4.2.1. Dallanmış Poli (amino ester) Esaslı Amfifilik diblok Kopolimer Nanopartillerinin Partikül Boyutu, Dağılımı ve Zeta Potansiyeli Değerleri	73
4.2.2. SEM Görüntüleri	75
4.3. İLAÇ YÜKLÜ NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ KARAKTERİZASYONU	76
4.3.1. Partikül Büyüklüğü Dağılımı	76
4.3.2. Nanopartiküllerin Morfolojik Görüntüleri	76
4.4. NANOPARTİKÜLLERİN İLAÇ YÜKLEME ETKİNLİĞİNİN VE İN VİTRO SALIM DAVRANIŞLARININ BELİRLENMESİ.....	77
4.4.1. Nanopartiküllerin İlaç Yükleme Etkinliği ve Kapasitesinin Belirlenmesi	77
4.4.2. Nanopartiküllerin <i>In Vitro</i> Salım Davranışlarının Belirlenmesi	78
4.5. İLAÇ SALIM KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ.....	83
4.6. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HELA VE L929 HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNE AİT BULGULAR.....	85
4.7. İLAÇ YÜKLÜ NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HÜCRESEL ALIMLARINA AİT BULGULAR	87
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	91
KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Polimerlerin sınıflandırılması.	7
Şekil 2.2: Birçok araştırmanın konusu olan farklı ilaç taşıma sistemlerin şematik gösterimi; A) polimerik misel, B) dendritik polimer, C) nanojel [25].	12
Şekil 2.3: Dendrimlerin yapısı [30].	13
Şekil 2.4: Dendrimelerin sentez yaklaşımları a) diverjent (ıraksak), b) konverjent (yakınsak) [25].	14
Şekil 2.5: Farklı polimerik yapılar.	16
Şekil 2.6: İki temel HBP sentez yaklaşımları: (a) tek-monomer metodoloji ve (b) çift-monomer metodolojisi [33].	18
Şekil 2.7: Konuk molekülün dendritik polimerlerde enkapsülasyonu [51].	19
Şekil 2.8: Dallanmış polimerlerin özellikleri ve kullanım alanları [60].	20
Şekil 2.9: Polimerik misellerin hazırlanmasında uygulanan iki temel yöntemlerin şematik gösterimi [73].	23
Şekil 2.10: Çözücü buharlaştırma yönteminin şematik gösterimi [111].	27
Şekil 2.11: Tuzla çöktürme yönteminin şematik gösterimi [111].	28
Şekil 2.12: Çözücü difüzyon yönteminin şematik gösterimi [111].	29
Şekil 2.13: Nanoçöktürme yönteminin şematik gösterimi [111].	30
Şekil 2.14: Tümör damar yapısı ve artan geçirgenlik ve tutulma etkisinin şematik gösterimi [147].	37
Şekil 2.15: Tümör damar yapısı ve aktif hücresel hedeflendirme yaklaşımının şematik gösterimi [143].	39
Şekil 3.1: Dallanmış poli(amino ester) sentezi.	49
Şekil 3.2: Poli (etilen glikol)-b-polikaprolakton (MPEG-b-PCL) blok kopolimerin hazırlanması.	51
Şekil 3.3: İlaç salım düzeneği [60].	57
Şekil 4.1: DPAAE ürününe, HDTE ve Et-TMP'ye ait FTIR spektrumu.	61

Şekil 4.2: DPAE polimerinin sentez prosesi, (B) DPAE polimerinin ¹ H NMR spektrumu ve (C) DPAE polimerinin ¹³ C NMR spektrumu.	63
Şekil 4.3: MPEG-b-PCL diblok kopolimer ürünlerine ait FTIR spektrum.....	64
Şekil 4.4: 2A-MPEG-b-PCL, 2B-MPEG-b-PCL, 2C-MPEG-b-PCL ve 2D-b-MPEG-PCL kopolimerlerinin ¹ H NMR spektrumları.....	66
Şekil 4.5: 2A-MPEG-b-PCL, 2B-MPEG-b-PCL, 2C-MPEG-b-PCL ve 2D-MPEG-b-PCL kopolimerlerinin 3-5 ppm aralığındaki ¹³ C NMR spektrumları.	67
Şekil 4.6: 2A-MPEG-b-PCL-COOH, 2B-MPEG-b-PCL-COOH, 2C-MPEG-b-PCL-COOH ve 2D-MPEG-b-PCL-COOH kopolimerlerinin ¹ H NMR spektrumları.	68
Şekil 4.7: DPAE ve DPAE-PCL-b-MPEG ürünlerine ait FTIR spektrum.	69
Şekil 4.8: (A) 2B-DPAE-MPEG-b-PCL ve (B) 2D-DPAE-MPEG-b-PCL polimerlerinin ¹ H NMR spektrumları.	70
Şekil 4.9: DPAE-PCL-b-MPEG ve DPAE-PCL-b-MPEG-FOL ürünlerine ait FTIR spektrumu.	71
Şekil 4.10: 2B-DPAE-MPEG-b-PCL-FA ve 2D-DPAE-MPEG-b-PCL-FA polimerlerinin ¹ H NMR spektrumları.	72
Şekil 4.11: Nanopartiküllerin partikül boyutu grafikleri: (a) DPAE-MPEG-b-PCL (MPEG-2000) (b) DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-2000) (c) DPAE-MPEG-b-PCL (MPEG-5000) (d) DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-5000).....	74
Şekil 4.12: DPAE-MPEG-b-PCL-FA nanopartikülüne ait SEM görüntüleri.	75
Şekil 4.13: DOX yüklü DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-2000) nanopartiküllerinin TEM görüntüleri; (A) x30000 büyütme ve (B) x100000 büyütme.	77
Şekil 4.14: DOX – DMSO Standart Kalibrasyon Eğrisi.....	78
Şekil 4.15: DOX – PBS Standart Kalibrasyon Eğrisi.	79
Şekil 4.16: DOX – Asetat Standart Kalibrasyon Eğrisi.	80
Şekil 4.17: DOX yüklü DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000) nanopartikül formülasyonuna ait salım grafiği.....	81
Şekil 4.18: DOX yüklü DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000) nanopartikül formülasyonuna ait salım grafiği.....	82
Şekil 4.19: DOX yüklü DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000) nanopartikül formülasyonuna ait salım grafiği.....	82
Şekil 4.20: DOX yüklü DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000) nanopartikül formülasyonuna ait salım grafiği.....	83

Şekil 4.21: DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-2000) nanopartikülleri ile 6, 24 ve 48 saat inkübe edilmiş L929 hücrelerinin canlılığı (%).	86
Şekil 4.22: DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-2000) nanopartikülleri ile 6, 24 ve 48 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin canlılığı (%).	87
Şekil 4.23: DOX yüklü nanopartiküllerin hücresel alım ve hücre hedefleme özellikleri. DOX yüklü DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-2000) nanopartikülleri ile 10 dakika, 30 dakika, 1 saat ve 4 saat inkübe edilen HeLa hücreleri ve L929 hücrelerinin floresans mikroskop görüntüsü.	88
Şekil 4.24: DOX yüklü DPAE-MPEG-b-PCL (MPEG-2000) nanopartiküllerin hücresel alım ve hücre hedefleme özellikleri.	89
Şekil 4.25: DOX yüklü 2B-DPAE-MPEG-b-PCL-FA nanopartiküllerinin LysoTracker ve DAPI boyama sonuçları.	90

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Önceden oluşturulmuş polimerlerden nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerin genel avantajları ve dezavantajları.	31
Tablo 2.2: Biyobozunur polimerlerin sınıfları ve ortak örnekleri.	35
Tablo 3.1: MPEG-b-PCL-COOH hazırlanması için gerekli kimyasalların miktarları.	52
Tablo 3.2: DPAE-PCL-b-PEG hazırlanması için gerekli kimyasalların miktarları.	52
Tablo 3.3: DPAE-PCL-b-MPEG-FA ürünlerinin hazırlanması koşulları.	53
Tablo 3.4: Anti kanser ilacı içerikli nanopartiküllerinin hazırlanma koşulları.....	54
Tablo 4.1: Dallanmış poli(amino ester) esaslı amfifilik diblok kopolimer ürünlerinin partikül boyutları, dağılımları ve zeta potansiyeli değerleri.....	73
Tablo 4.2: Antikanser etken madde içerikli nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı (nm), polidispersite indeksleri ve zeta potansiyeli değerleri.....	76
Tablo 4.3: DOX – DMSO Standart Kalibrasyon Değerleri.....	77
Tablo 4.4: Farklı oranlarda DOX yüklenen DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-5000) nanopartiküllerinin yükleme etkinlikleri ve yükleme kapasiteleri.	78
Tablo 4.5: 96 saat % salım değerleri.	81
Tablo 4.6: DOX yüklü nanopartiküllerin salım kinetiği tablosu.	84

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
MPEG	: Poli(etilen glikol)monometil
PCL	: Poli(ε-kaprolakton)
DMF	: N,N-di-metilformamid
Et-TMP	: Etoksil trimetilolpropan
DMAP	: 4-di-metiaminopirin
EDAC	: N-(3-dimetilaminopropil-N' –etilkarbodiimid)
FA	: Folik Asit
DOX	: Doksorubisin

Kısaltmalar	Açıklama
DMSO	: Dimetilsulfoksit
SA	: Süksinik Anhidrit
EA	: Etil Asetat
AA	: Asetik Asit
DB	: Dallanma derecesi
%YE	: Yüzde yükleme etkinliği
%YK	: Yüzde yükleme kapasitesi

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HEDEFLENDİRİLMİŞ İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE İLAÇ SALIM KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

Sherif Domingo TİETİLU

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimyasal Teknolojiler Programı

Danışman : Doç. Dr. Serkan EMİK

II. Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ayça BAL ÖZTÜRK

Kanser günümüzde önde gelen hastalıklardan birisidir. Giderek artan sayıda kanser vakasına karşı mücadelede etkili tedavi süreçleri giderek gelişmektedir. Bu tez kapsamında dallanmış poli(amino ester) esaslı amfifilik kopolimer sentezlenerek, kanser hücresi hedeflendirilmiş nano yapıda ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımı araştırılmıştır. Yapılan çalışmada model ilaç olarak DOX kullanılmıştır. Nanopartikül sentezi, karakterizasyonu ve *in vitro* ilaç salım çalışmaları sonucunda sentezlenmiş yapının başarılı bir şekilde hedef kanser hücrelerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Eylül 2020, 123 sayfa.

Anahtar kelimeler: Polimerik miseller, folik asit, HeLA, L929, doksorubisin

SUMMARY

M.Sc. THESIS

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF TARGETED DRUG
DELIVERY SYSTEMS AND INVESTIGATION OF KINETIC DRUG
RELEASE**

Sherif Domingo TİETİLÜ

Istanbul University-Cerrahpasa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemical Engineering

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Serkan EMİK

Co-Supervisor : Assist. Prof. Dr. Ayça BAL ÖZTÜRK

Cancer is one of the leading diseases today. Effective treatment processes are gradually improving in the fight against a growing number of cancer cases. Within the scope of this thesis, branched poly (amino ester) based amphiphilic copolymer was synthesized. Its potential usage as a cancer cell-targeted nanostructure drug delivery system was investigated. DOX was used as model drugs in the study. As a result of nanoparticle synthesis, characterization, and in vitro drug release studies, it concluded that the synthesized structure was effective in the terms of targeting property and could be used as an effective carrier for cancer cells.

September 2020, 123, pages.

Keywords: Polymeric micelles, folic acid, HeLa, L929, doxorubicin

1. GİRİŞ

Bilindiği üzere kanser, dünya çapında yüksek ölüm oranına neden olan hastalıklardan olup mücadele edilmesi en zor hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir. Bu hastalık, hücre büyüme ve bölünmesini kontrol eden genlerin hasar görmesi ile tümör olarak adlandırılan bir büyümeye neden olabilmektedir. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi, kanser tedavisinde başlıca uygulanan yöntemlerdir. Günümüzde genel olarak, kanser hastalığının tedavisinde kemoterapi yöntemi kullanılmaktadır. Kemoterapi, kanserli hücreleri öldüren veya kanserli hücrelerin çoğalmalarını kontrol altında tutan paklitaksel, doksorubisin vs. gibi antikanser ilaçlarının kullanılması ile gerçekleştirilen bir tedavi yöntemidir. Bu yöntem, kanser tedavisinde en sık kullanılan tedavi yöntemi olmasına rağmen güvenilirlik ve etkinlik açısından arzu edilen başarıya ulaşamamaktadır. Bu durumun ana nedeni kemoterapide kullanılan antikanser ilaçların vücutta gösterdiği toksisitedir. Ayrıca, antikanser ilaçlarının sağlıklı organlarda patolojik sürece dahil olmayan toksik etkileri yaratmasıdır. Bir diğer durum ise, bu tür ilaçların eylem bölgesine ulaşana kadar etkinliğini kaybedebilmesi ve kan dolaşımında kısa bir yarı ömrüne sahip olabilmesi, arzu edilen başarıyı kısıtlayan etkenlerdir. Son yıllarda bu sorunlar giderilebilmek amacıyla nanoteknoloji, biyoteknoloji, polimer bilimi ve diğer benzer alanlardaki kaydedilen gelişmeler ve ilerlemelerden yararlanarak, kanser kemoterapisinde kullanılan kemoterapötik ajanları tümör hücrelerine spesifik bir biçimde taşıyabilen polimerik ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmektedir.

Genel anlamda bir polimerik ilaç taşıyıcı sistemi, vücut içinde biyoaktif molekülü veya ilaçları taşıyabilen ve aynı zamanda bunların salımını sağlayabilen mühendislik polimerlerinin ürünüdür. Bu sistemlerin en büyük avantajlarından biri; terapötik ajanların tümör, iltihaplı doku veya spesifik organ gibi vücudun istenilen bölgelerine taşınması, arzu edilen sürelerde salınmasını sağlayarak spesifik bir hastalık için hedeflenebilir olmasıdır. Polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerin önemli başka bir avantajı lipofilik maddelerin çözünürlüğünü, biyoyumluluğunu ve stabilitesini arttırarak, ilacın özgün özellikleri değiştirebilir ve arttırabilmektedir.

İlaç taşıyıcı sistemlerinin kullanılmasını gerektiren ve bu nedenle yeni ve daha etkili sistemler geliştirmek için araştırmaları sürekli olarak hızlandıran başlıca nedenler aşağıdaki gibi verilmektedir;

- ✓ İlaçların çözünmesinin çok yavaş olması,
- ✓ İlaçların fiziksel olarak eylem bölgesinden çok hızlı bir şekilde uzaklaştırılabilir olması,
- ✓ İlaçların atılımının hızlı olması,
- ✓ İlaçların belirli hücre zarlarında taşınmasını hızlandırmak veya önlemek,
- ✓ Hedef dokuların haricinde diğer dokuların ilaçlarla maruz kalmasını en aza indirerek yan etkileri önlemek,
- ✓ İlaçların eylem bölgesinde maksimum fayda sağlayabileceği konsantrasyon aralığında tutulması,

Bu nedenle tüm ilaç taşıyıcı sistemlerin, terapötik ajanların geçerliliğini artırmak amacı ile aşağıda verilen noktalardan birini veya daha fazlasını yerine getirmesi gerekir.

- ✓ Çözünürlüğü artırarak, bağışıklık tepkisini ve/veya bozunmasını önleyerek uygulanan terapötik ajanların biyoyararlanımını arttırabilir olması,
- ✓ Terapötik ajanları istenilen eylem bölgesine spesifik olarak taşıyarak, dolayısıyla tüm vücuda yayılmasını engelleyerek sistemik toksisiteyi azaltabilir olması,

Eylem bölgesinde bulunan veya vücudun dışından bölgesel olarak uygulanan bir uyarıcıya karşılık olarak taşıdığı terapötik ajanın salınımını gerçekleştirebilir olması,

Bu sistemlerin kullanımı ile ilgili en büyük zorluklardan biri, terapötik ajan taşındıktan ve salınımı gerçekleştirdikten sonra taşıyıcıların vücuttan atılmasıdır. Bir yandan ilaç taşıyıcı sistemler, hedeflenen bölgeye ulaşılana kadar kararlılığını korumalıdır; öte yandan ilaç taşıyıcı sistemler, taşıdığı terapötik ajanın salınımı gerçekleştikten sonra, organlarda istenmeyen birikimi engellemek için vücuttan atılmalı veya bozulmalıdır. Biyobozunur polimer esaslı ilaç taşıyıcı sistemler, enzimlerin varlığında veya asidik pH ortamlarda polimerin omurgasının yıkımını sağlar. Böylece enkapsüle olmuş terapötik ajanların

salınmasına ve vücuttan kolay bir şekilde elimine edilmesine olanak sağlamaktadır. Biyobozunur polimerlerden tasarlanan sistemlerin uygun özellikleri sebebi ile son yıllarda oldukça sık araştırılan konular haline gelmiştir.

Yapılan çalışmalarda, polimerik miseller, dendritik polimerler ve nanojeller gibi en önemli polimer türleri ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu polimer türleri arasında polimerik miseller, son zamanlarda ilaç taşıyıcı teknolojisinde umut verici gelişmelere sebep olmuştur. Polimerik misellerin yapısında bulunan hidrofobik segmentler sayesinde hidrofobik özelliği taşıyan ilaçlarla etkileşimleri artmaktadır. Polimerik misellerin önemli bir başka özelliği sulu çözeltelerde kendiliğinden bir araya gelerek nanopartiküller oluşturulabilmeleridir. Bu özelliklerden dolayı, polimerik misellerin hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı teknolojisinde ilgi odağı olmaktadır. Nanopartikül sistemlerin mikropartikül gibi diğer partikül sistemlerle karşılaştırıldığında, yüzey alanları daha geniş, boyutları daha küçük ve hücresel alımları daha yüksektir. Buna bağlı olarak da, ilaç taşınım teknolojisine birçok avantaj sunmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında belirtilen sorunlarda göz önünde bulundurularak, çekirdek çoklu – kabuk (CMS) amfifilik kopolimer nanopartikül taşıyıcı sistem olarak seçilmiştir. Bu amaçla çalışmalar kapsamında dallanmış poli(amino ester) (DPAE) çekirdek olarak, polikaprolakton ve metoksi poli(etilen glikol) sırasıyla iç ve dış kabuk olarak kullanılmıştır.

Çalışmada; molekül ağırlıkları bakımında birbirlerini farklı iki metoksi poli(etilen glikol) kullanılarak çekirdek çoklu-kabuk amfifilik kopolimer nanopartiküllerin hazırlanması ve *in vitro* karakterizasyonunun değerlendirilmesi, PEG'un molekül ağırlığının çekirdek çoklu-kabuk amfifilik kopolimer nanopartiküllerin hücresel alımları ve ilaç taşıma potansiyelleri üzerine etkisinin belirlenmesi ve sonuç olarak da hazırlanan çekirdek çoklu-kabuk amfifilik kopolimer nanopartiküllerin daha güvenilir ve daha etkili kemoterapi sağlanması beklenmektedir.

Tez çalışması kapsamında, tümörlü hücrelere spesifik hedeflendirme amacıyla folik asit fonksiyonel, dallanmış poliester esaslı amfifilik blok kopolimer ilaç taşıyıcı polimerler hazırlanarak, ¹H NMR, ¹³C NMR, FTIR ve DLS gibi teknikler kullanılarak karakterize edilmiştir. Karakterize edilen polimerlerden nanoçöktürme yöntemi yardımıyla nanopartiküller hazırlanmıştır. Bu polimerler doksorubisin (DOX) gibi bir anti kanser ilacı kullanılarak *in*

vitro ilaç tutma kapasiteleri ve çeşitli pH değerlerinde salım özellikleri incelenmiştir. Uygun özelliklerdeki nanopartikül formülasyonlarının güvenilirlikleri, etkinlikleri ve hücresel alım yetenekleri hücre kültürü çalışmalarında HeLa kanser hücreleri kullanılarak *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. |



2. GENEL KISIMLAR

2.1. NANOTEKNOLOJİ VE BİYOTEKNOLOJİ

Nanoteknoloji, atomik ve moleküler düzeydeki maddelerin kontrolünü ve kullanımı ile ilgilenen, uygulamalı bilim ve teknolojinin kuramsal ve deneysel bir alanı olarak tanımlanmaktadır. Nanoteknoloji sözcüğünde milyarda bir (10^{-9}) olarak kabul edilen 'nano' ön eki, cüce veya çok küçük anlamına gelen Yunanca 'nanos' kelimesinden türetilmiştir. Nano boyuttaki malzemelerin özellikleri, daha büyük boyutlardaki aynı malzemelerin özelliklerinden önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Nano boyutlu malzemelerin özellikleri ile ilgili yapılan ilk çalışmalar fizik, mekanik, elektrik, manyetik, kimya ve biyoloji gibi uygulamalar olmasına rağmen, son yıllarda özellikle ilaç ve gen taşınımı gibi farmasötik alanlarda da çalışılmaktadır [1-4]. Nanoteknolojinin tıp uygulamaları; tanı ve görüntüleme, ilaç taşınımı, tanısal uygulamalar ve birleştirilmiş tedaviler ile terapötik ajanların etkinliğinin rapor edilmesi gibi uygulama alanlarını kapsamaktadır. Son yıllarda nanoteknoloji ve nano malzemeler, kanser teşhis ve tedavisinde erken tanılamada ve etken maddenin tümörlü hücrelere etkili bir şekilde taşınmasında önemli roller üstlenmektedir.

Kanser, hücre içindeki genom ve proteom varyasyonu sonucu, tümörlü hücrelerin sağlıklı hücrelerin izlediği normal hücresel kontrol mekanizmalarından kaçınması ve kontrolsüz büyümeyi başlatmasına neden olmaktadır. Mevcut teknolojiler, bilim insanlarının kanser nedenini ve farklı ortamlarda tümörlü dokunun davranış biçimini anlamalarına yardımcı olmaktadır. Ayrıca, kanserlerin büyüme oranını artıran ve azaltan faktörler hakkında bilgi sağlamaktadır [5]. Bu hastalığın tedavisindeki başarı, teşhiste yaşanan güçlükler ve genel bir tedavinin bulunamaması nedeniyle sınırlıdır.

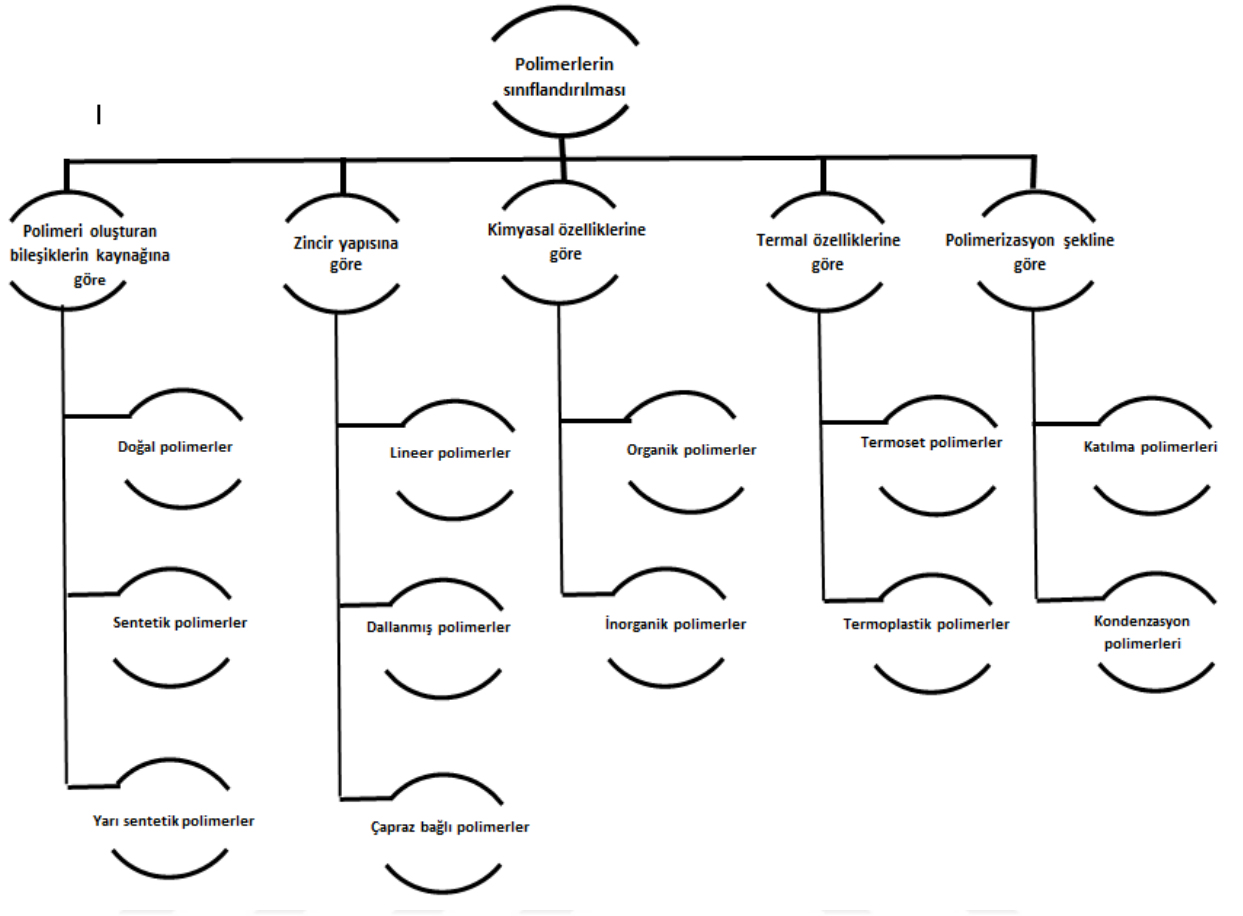
Biyoteknolojinin kanser araştırmalara katkısı, mevcut kısıtlamaları büyük ölçüde kaldırmış, ayrıca, kontrol ve önleme yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamıştır. Elde edilen gözlem sonuçları kullanılarak uygun teşhis ve tedavinin geliştirilmesi, biyoteknoloji metotları ile yürütülen kanser araştırmaların ana amacıdır [5, 6].

Kanser tedavisinde kullanılan ilaç taşıma sistemlerinde büyük boyutlara sahip malzemelerin kullanımları; zayıf biyoyararlanım, çözünürlük, emilim, ilacın hedef bölgeye taşınımı, sürekli salım, terapötik etkinlik ve ilacın yan etkileri gibi sorunlara neden olmaktadır. Biyoteknoloji

ve Nanoteknoloji ile nano boyutlu yapıların üretimi ve geliştirilmesinde kaydedilen gelişmeler sayesinde, tedavilerde hali hazırda var olan bu sorunlara karşı yenilikçi çözümler ile nano ölçekli taşıyıcı sistemlerinin tasarlanması mümkün olmuştur.

2.2. POLİMERLER VE AKILLI İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİ

Polimerler, insan hayatında vazgeçilmez öneme sahip malzemeler sınıfından birini oluşturmaktadır. Polimer kelimesi, çok anlamına gelen Yunanca “polus” ve tanecik, küçük parça anlamına gelen “meros” kelimelerinden türetilmiştir. Polimer, yüksek molekül ağırlıklı çok sayıda malzemeye verilen genel bir addır. Monomer veya tekrarlanan birim olarak adlandırılan düşük molekül ağırlıklı kimyasal maddeler, birbirlerine kovalent bağlarla bağlanarak polimer adı verilen yüksek molekül ağırlıklı malzemeleri oluşturmaktadır. Yapılarında çok sayıda çeşitli atomların bulunabilmesi, malzemelerin çok çeşitli özellikler kazanabilmesine olanak tanımaktadır. Polimerler, farklı kimyasal yapılara, fiziksel özelliklere, mekanik davranışlara, termal özelliklere vb., sahip olabilmekte ve buna göre sınıflandırılabilmektedir. (Şekil 2.1) [7-8].



Şekil 2.1: Polimerlerin sınıflandırılması.

➤ Polimeri oluşturan bileşiklerin kaynağına göre

Bileşiklerin kaynağına göre polimerler doğal, sentetik ve yarı sentetik olmak üzere üç tipte sınıflandırılır;

❖ Doğal Polimerler:

Biyopolimerler olarak da adlandırılan bu polimerler doğada doğal olarak oluşmaktadır. Doğal kauçuk, proteinler, nişasta, selüloz vs. gibi polimerler doğal polimerdir.

❖ Yarı Sentetik Polimerler:

Bu polimerler kimyasal olarak modifiye edilmiş doğal polimerlerdir. Selüloz asetat, selüloz nitrat gibi polimerlerdir.

❖ Sentetik Polimerler:

Bu polimerler, laboratuvar ortamında sentezlenmiş polimerlerdir. Polietilen, polivinil klorür, polistiren vs. gibi polimerler sentetik polimerlerdendir.

➤ Polimerlerin Zincir Yapısına Göre

Yapısındaki diziliş göz önüne dikkate alındığında polimerler düz zincirli, dallanmış ve çapraz bağlı olmak üzere üç şekilde sınıflandırılırlar.

❖ Düz zincirli polimerler:

Monomer birimlerinin lineer olarak dizildiği yapılardır. Aynı tür monomer birimlerinden oluşabildiği gibi farklı tür monomer birimlerinin dizilmesinden de oluşabilirler. Polivinil klorür düz zincirli polimerlerdendir.

❖ Dallanmış polimerler:

Monomer birimlerinin düz zincirli polimerlerin yanında dallanmış olarak dizildiği polimerlerdir. Aynı ya da farklı monomerlerden oluşabilmektedirler.

❖ Çapraz bağı polimerler:

Monomer birimlerinin çapraz bağlanmalar vasıtasıyla bir araya geldiği polimer yapısıdır. İki ve üç fonksiyonel grubu bulunduran monomerlerden oluşabilmektedirler.

➤ Polimerlerin Kimyasal Özelliklerine Göre

Polimer ana zincirinde yer alan atomların türüne dikkate alındığında polimerler; organik ve anorganik polimerler olmak üzere iki şekilde sınıflandırılmaktadırlar. Yapısında başta karbon atomu olmak üzere hidrojen, oksijen ve halojen (F, Cl, Br, I) gibi atomları bulunduran polimerlere, organik polimerlerdir.

Polimerlerin ana zincirinde karbon atomu yerine fosfor, silisyum, sülfür gibi periyodik cetvelde yer alan 4. ve 6. grup elementler bulunduğu polimerlere, anorganik polimerlerdir.

➤ Termal Özelliklerine Göre

Polimerler ısıya karşı gösterdikleri davranışlara göre iki grupta sınıflandırılabilirler

❖ Termoplastik polimerler:

Genel olarak plastik adıyla da anılan termoplastikler, ısıtıldığı zaman eriyebilen ve yeniden şekillendirilebilen polimerlerdir. Poliolefinler, naylonlar, lineer poliesterler, polieterler vs. gibi polimerler bu grupta yer almaktadır.

❖ Termoset polimerler:

Isıtıldıkları zaman kimyasal değişime uğrayan ve tekrar şekillendirmenin mümkün olmadığı polimerler termoset polimerler olarak adlandırılmaktadır.

Günümüzde polimer biliminde kaydedilen gelişmeler ve ilerlemeler, konvansiyonel sistemlerin modern ilaç taşıma teknolojilerine dönüşebilmesine olanak tanımıştır. Bu gelişmeler ve ilerlemeler, polimerlerin sahip olduğu eşsiz özelliklerin bir sonucudur. Polimerler ilk olarak ilaçları çözündürmek ve stabilize etmek için katkı maddeleri olarak veya sürekli ilaç salımı için mekanik destekleyici maddeler olarak kullanılmıştır [9]. Son yıllarda ise, farklı alanlarda yapılan çalışmalarda polimerlerin rolleri değişkenlik göstermektedir. Yeni sentez yöntemleri vasıtasıyla elde edilmiş yapılar ile ilaç taşıma sistemlerinde kullanılabilecek polimerlerin üretilmesi mümkün olmuştur. Yeni özelliklere sahip polimerler geliştirildikçe, daha kompleks yapılar ortaya çıkmış ve çok daha karmaşık yapıları bir arada bulundurabilen polimerlerin önemi artmıştır. Polimerlerin etken maddenin çözünmesi, hedeflenmesi, salım özelliklerinin düzenlenebilmesi ve diğer sahip olması istenen özellikler ile spesifik birçok amaca hizmet etmesi, arzu edilen ve ilaç taşıma sistemi tasarımında göz önünde bulundurulmuş bir durumdur [9]. Ayrıca farklı özelliklere sahip yeni polimerlerin elde edilmesi ile tedavide kullanılacak polimerlerin seçimini de önemli bir konu haline gelmiştir.

Terapötik ajanların vücudun istenilen bölgelerine taşınmasını sağlayabilen, istenilen sürelerde salınmasını kontrol edebilen ve aynı zamanda terapötik ajanların etkinlikleri üzerinde önemli rolleri olabilen sistemler, ilaç taşıma sistemleri olarak tanımlanmaktadır [2]. Organik veya inorganik temelli olabilen bu sistemlerde polimerler oldukça yoğun şekilde araştırmaların konularında yer almaktadır.

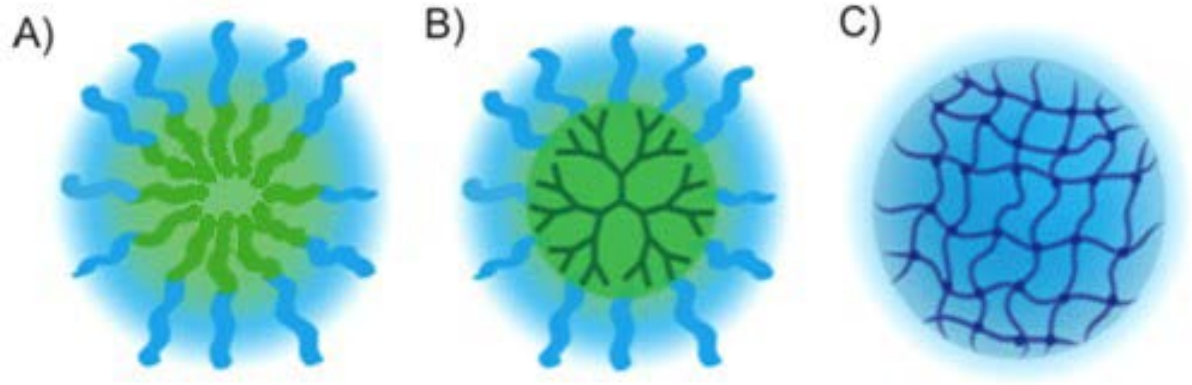
Uyarıya duyarlı polimerler, polimer sınıfının bir üyesi olup tıpta ve farmasötik uygulamalarda ilaç taşınımında ortam koşullardaki değişime karşılık kendi yapılarında değişim gösteren polimerlerdir [10]. Çevresel koşullardaki değişime bağlı olarak tepki verebilen bu polimerler ayrıca akıllı polimerler olarak isimlendirilir. Uyarıya duyarlı polimerler kullanılarak, ilaçların taşınması amacıyla dizayn edilen taşıma sistemleri ise akıllı ilaç taşıma sistemleri olarak da tanımlanmaktadır. Uyarıya duyarlı polimerlerde uyaran sıcaklık, pH, elektrik alan, manyetik alan, ışık, iyon gücü, redoks potansiyeli, vb olabilmektedir. Bu tür uyaranlara verilen yanıtlar ise çözünme, çökelme, şişme, hidrofobik ve hidrofilik özelliklerdeki değişimi kapsamaktadır. Özellikle kanser tedavisinde uyarıya duyarlı polimerlerin akıllı ilaç taşıma sistemleri olarak geliştirilme nedenleri, tümörlü hücrelerin veya dokuların normal hücrelere ya da dokulara göre gösterdikleri pH farklılıklarından kaynaklanmaktadır [11]. Tümörlerin hücre dışı pH değeri 6,5 ile 7 arasında değişmektedir. Waburg etkisi olarak adlandırılan ve artan aerobik

glikolizin bir sonucu olarak dokulardan (pH 7,4) daha düşüktür. Buna ek olarak, nanopartiküllerin endositoz mekanizması ile hücreler içine girmesi durumunda endozomlarda 5,0-6,0 ile lizozomlarda 4,5-5,0 pH değerlerine maruz kalmaktadır [12]. Endozomal ve lizozomal bölmelerdeki asidik ortamın yanı sıra normal dokular ve tümör dokuları arasındaki pH farklılıkları, asidik koşullar altında ilaç salımı tetikleyebilen iç uyarıcı olarak kullanılabilir [13-16]. Tümörlerin gösterdikleri pH farklılıklarının yanı sıra, iç ve/veya dış uyarılar etkisi ile de (pH, sıcaklık, manyetik alan, glikoz ve spesifik enzimler) ilacın salınması akıllı ilaç taşıma sistemlerinin araştırma konusu olmuştur [17-21]. Ayrıca günümüzde, pasif ya da aktif hedeflendirme ile kanser tedavi ve teşhisi için inorganik veya organik malzemelerden üretilmiş yapılar da kullanılmaktadır. Bu yapıların kullanımında amaçlanan durum, tedavide uygulanan yöntemden biri olan kemoterapi yönteminin sağlıklı hücrelere gösterdikleri yan etkilerin azaltılması ve hedef hücre grubuna etkili bir şekilde ulaştırılmasıdır. Bununla birlikte bu sistemler kullanılarak, hedef tümördeki ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak yan etkilerin düşük bir seviye altında tutularak, ilacın maksimum fayda gösterebileceği konsantrasyon aralığında tedavi gerçekleştirilebilir olmasıdır [22]. Bunun için kullanılan organik malzeme grupları: polimerik nanopartiküller ve miseller, lipozomlar, dendritik polimerlerdir.

Akıllı ilaç taşıma sistemlerinde bahsedilen bu gelişmelerin yanı sıra, dozaj formlarının güvenilir etkinliği ile tedavi maliyetlerini de düşürebilme potansiyeli, sistemin geçerliliğine büyük oranda katkı sunmaktadır. Ayrıca, tedavi gelişimleri nispeten yavaş olan çeşitli hastalıkların tedavisindeki potansiyeli yadsınmamalıdır. Kanser, HIV gibi tedavisi zorlu hastalıkların yanında astım, hipertansiyon ve diyabet gibi kronik hastalıkların tedavisi için kullanılan, konvansiyonel ilaçların getirdikleri zorlukların giderilmesine katkısı da araştırılmaktadır. Bu değerlendirmeler neticesinde akıllı ilaç sistemleri, nanoteknoloji ve nano boyutlu ilaçların gelişimi ile doğrudan etkilenmektedir [23]. Polimerler ve ilaç taşınımı birlikte değerlendirildiğine biyoteknoloji ve nanoteknoloji alanlarındaki gelişmeler, gelecekteki polimerler ve polimer temelli ilaç taşıma sistemlerini doğrudan etkileyecektir [9, 24].

2.3. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERDE KULLANILAN POLİMER YAPILARI

Polimer bilimi ve teknolojisinde kaydedilen gelişmeler ve ilerlemeler sayesinde ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabilen polimerik malzemelerden aranan özelliklere sahip polimerlerin sentezlenmesi mümkün olmuştur. Makroskopik yapıdan nano boyutlara uzanan bir skalada elde edilebilen polimerler ilaç taşınımında nano taşıyıcı olarak kullanılabilir. Buna göre nano boyutta birçok polimer çeşidi olmasına rağmen, üzerlerinde en çok çalışılan polimerler (Şekil 2.2); Nanojeller, Dendritik ve polimerik misellerdir.



Şekil 2.2: Birçok araştırmanın konusu olan farklı ilaç taşıma sistemlerinin şematik gösterimi; A) polimerik misel, B) dendritik polimer, C) nanojel [25].

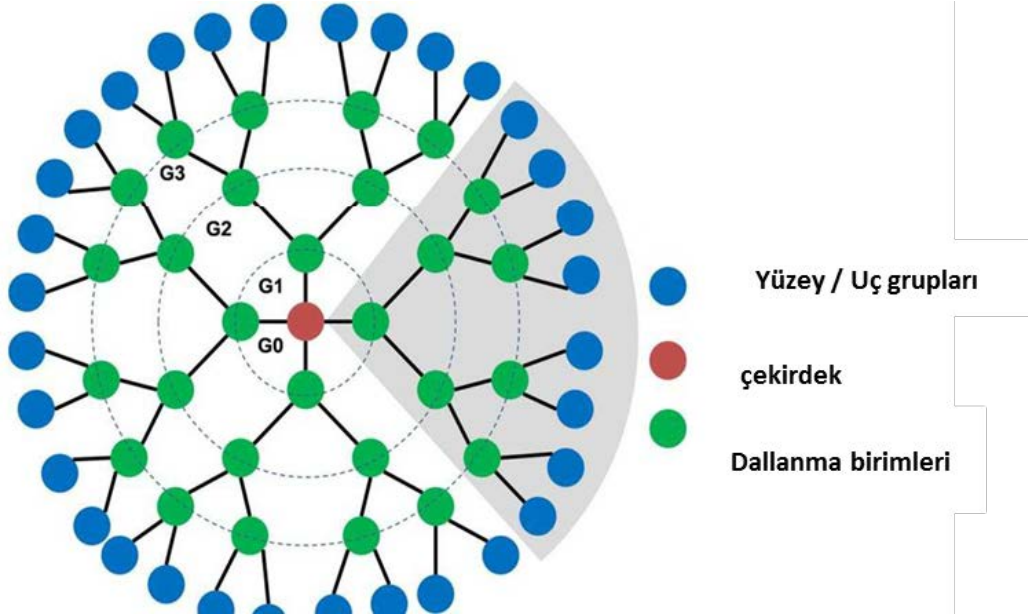
2.3.1. Nanojeller

Nanojel terimi, polimer ağların fiziksel ya da kimyasal olarak çapraz bağlanmasından oluşan ve uygun bir çözücünde şişebilen nano-boyutlu partikül olarak tanımlanmaktadır. Nanojel esaslı malzemeler yüksek ilaç yükleme kapasitesine, biyouyumluluğa ve biyobozunurluğa sahiptir. Bu özellikleri, nanojellerin ilaç taşıma sistemlerinde en çok tercih edilen polimerler arasında yer alması nedeni olmaktadır [25-26].

2.3.2. Dendrimerler

Dendrimerler, bir çekirdek, çekirdek etrafındaki dallanma birimleri ve fonksiyonel grup olarak da adlandırılan yüzey gruplarından oluşan polimerik ilaç taşıyıcı sistemlerdir [200]. 1980'lerin başında Tomalia ve arkadaşları tarafından kullanılan dendrimer terimi,

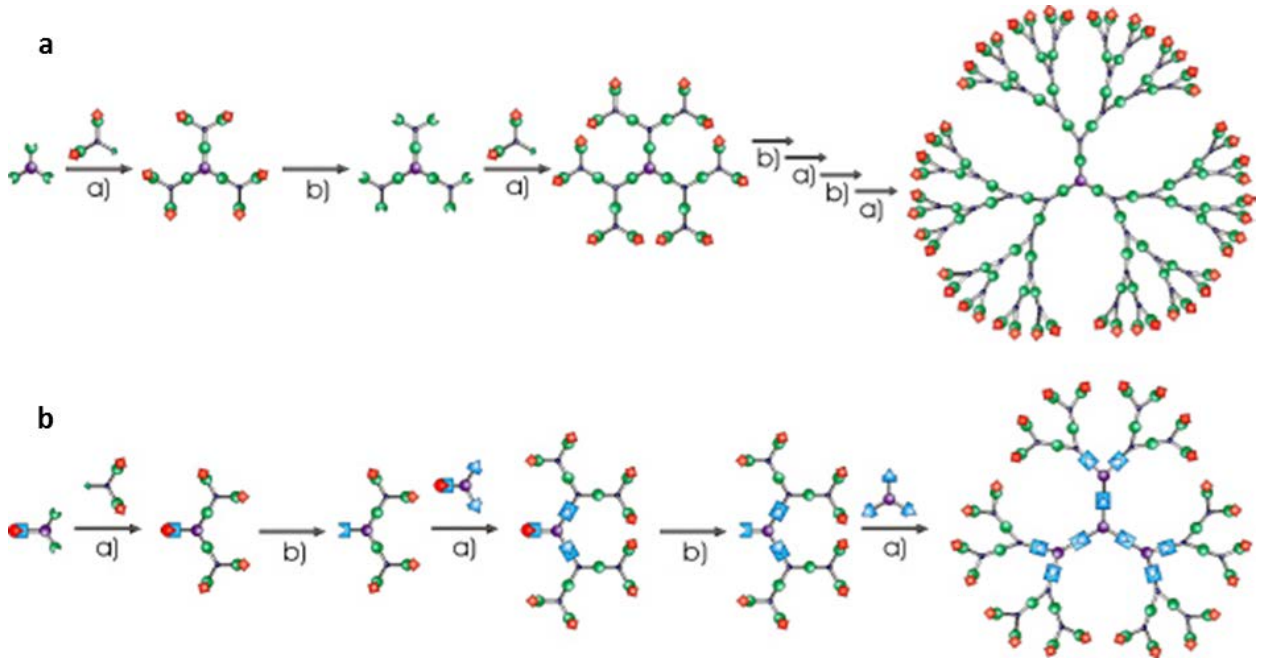
Yunanca kelimeleri “dendron” ve “meros” sırasıyla ağaç ve parça anlamına gelen kelimelerden türetilmiştir. Genel olarak dendrimerler, merkezi çekirdeğin etrafında tekrarlanan dallanmış birimleri bulunup, bunların yüzeylerinde fonksiyonel uç gruplar bulunduran küre şeklindeki geniş yapıli makromoleküller olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, fonksiyonel uç gruplar modifiye edilerek polimerlerin özellikleri dizayn edilebilmektedir. Dendrimerlerin sentezinde, dallanmış birimlerin tekrarlanma döngüsü jenerasyon olarak adlandırılır. Bu kavram, dendrimerlerin büyüklüğünün belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu gibi büyüme sentezi iki yaklaşıma göre yapılabilir; diverjent ve konverjent yaklaşımlarıdır (Şekil 2.4). [27-29, 25].



Şekil 2.3: Dendrimerlerin yapısı [30].

Diverjent (İraksak) yaklaşımı, dendrimerlerin büyümesinin merkezi çekirdekten başlayabilmesi ve yüzeye doğru ilerlemesini sağlar. Bu yaklaşımı genellikle, büyük miktarlarda dendrimerlerin hazırlanmasını gerektiren durumlarda tercih edilmektedir. Ancak, elde edilen ürünün saflaştırılması esnasında bazı zorluklar yaşanabilmektedir. Bu durum yaklaşımın bir dezavantajıdır. Konverjent (Yakınsak) yaklaşımı ise, dendrimerlerin büyümesi en son molekülden başlanarak iç kısma doğru bir şekilde ilerler. Bu yaklaşımda, elde edilen ürünün saflaştırılması kolayca yapılabilmektedir [31].

Dendrimeler, kusursuz yapıları ve eşsiz özellikleri nedeni ile ilaç ve gen taşıma sistemleri dâhil olmak üzere biyokimya ve biyomedikal gibi birçok uygulamalarda kullanılmaktadır. Dendrimeler, kimyasal sentezler ile moleküler düzeyden başlanarak nano boyutlarda ürünlere dönüştürülebilirler. İlaç ve gen taşıma sistemlerinde kullanılabilen dendrimeler 10 ile 100 nm aralığında olabilmektedir. Yapı yüzeyinde bulunan çok sayıda fonksiyonel uç grupları, hedeflendirilmiş ilaç taşıma uygulamalarında dendrimeleri ideal kılmaktadır. Bu işlem yapıdaki fonksiyonel uç grupların uygun ligandlar ile modifiye edilerek, tümör hücrelerinde eksprese olan uygun reseptörler ile birleşmeleri mümkün olmaktadır [32].



Şekil 2.4: Dendrimelerin sentez yaklaşımları a) diverjent (ıraksak), b) konverjent (yakınsak) [25].

2.3.3. Dallanmış Polimerler

Dallanmış polimerlerin (Hyperbranched polymers; HBPs) tarihi, 20. Yüzyıllarda Flory'nin ilk teorik çalışmasıyla başlamıştır. Daha sonra sentez yaklaşımları yanı sıra uygulamaları da geniş ölçüde geliştirilmiştir. Boltorn (HB poliester), Hybrane (HB poliester amine), HB polietilen imin (HB poliamine) ve HB (poligliserol)(HB polieter) gibi bazı dallanmış polimerler ticari olarak bulunmaktadır [33-34, 35].

Yüksek dallanmış polimerler, yapısal özellikleri dikkate alınarak, doğrusal (lineer) ve dendrimer polimerler arasına yerleştirilmesi mümkündür. Yapısında dendritik, doğrusal ve uç üniteler bulunmaktadır. Ancak, dendritik polimerler ailesi olarak dendrimeler ile ortak

özellığı, her tekrarlayan birimde dallanma potansiyeli olan çok yüksek dallanma yoğunluğuna sahip olmasıdır. Dallanmış polimerlerin dendrimerlere göre en büyük avantajı, tek basamaklı reaksiyonlar ve çöktürme ile saflaştırmaları içeren basit sentezleme yöntemiyle sentezlenebilmeleridir. Ayrıca, bu basit sentezleme yöntemi, üretim zamanı ve maliyetleri açısından büyük fayda sağlamaktadır. Ancak, bu tür reaksiyonlar, molar kütle ve dallanma doğruluğu kontrolünü sınırlar ve böylece homojen olmayan ürünler ortaya çıkmaktadır. Bu durum dendritik polimerler arasında yer alan dallanmış ve dendrimer polimerleri arasındaki en büyük farktır [33-34, 36-38]. Dallanmış polimerlerin, zayıf mekanik özellikleri, geniş moleküler ağırlık dağılımları ve amorf davranışları nedeniyle, ilk başta çok umut verici malzemeler olmaları beklenmiyordu. Ancak 1980'li yıllarda özellikleri tanındıktan ve dendrimerlerin sentezlenmesi için uygun teknikleri geliştirildikten sonra, dallanmış polimerlerin sentezlenmelerindeki kolaylığı ve ekonomik olarak düşük maliyetleri nedeniyle dendrimerlere alternatif olmaya başlamışlardır [34].

Dendrimerler, dallanmış polimerlere göre iyi tanımlanmış yapıya sahip olmalarına rağmen birden fazla basamakla sentezlenirken, dallanmış polimerler tek basamak ile sentezlenebilmektedir. Dallanmış polimerler ana zincirinde bulunan bazı kusurlara rağmen düşük viskoziteleri, iyi çözünürlükleri, termal özellikleri ve yüksek kimyasal reaktiviteleri gibi özellikleri bakımından dendrimerler ile benzer özellikler göstermektedirler.

Dendritik ailesinde yer polimerlerin düşük viskoziteleri, sahip oldukları küresel şekil ve görece düzenli yapılara sahip olmasından ileri gelmektedir. Bunun yanında çoğu dallanmış polimerler amorf olmasına rağmen kristal yapıda bulunan dallanmış polimerler de mevcuttur. Dallanmış polimerlerin özellikleri büyük ölçüde yapı yüzeyinde bulunan zincir uçlarına bağlıdır. Dolayısıyla uç grupları modifiye edilerek, polimerlerin çeşitli özellikleri kontrol edilebilmektedir [34, 39-41].

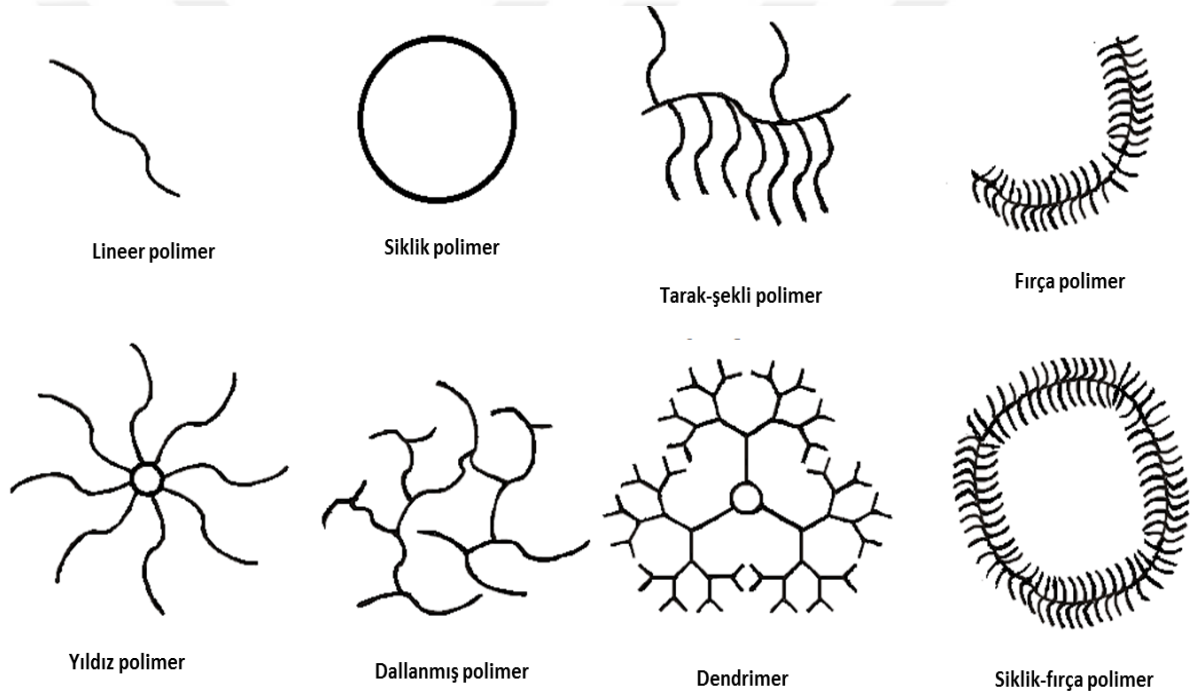
Dallanmış polimerlerin yapılarını, dendrimerler ile kıyaslamak için, Fréchet ve arkadaşları tarafından ortaya atılan “dallanma derecesi” (DB) [25], dendritik polimerlerin karakterizasyonunda dikkate alınması gereken önemli parametrelerden biridir. Lineer ve dendrimer polimerlerin dallanma dereceleri sırasıyla 0 ve 1 olurken, dallanmış polimerlerin dallanma dereceleri 0,4 - 0,6 arası değerler almaktadır. Bu değerler ile dallanmış polimerler lineer ve dendrimer polimerler arasına yerleştirilebilmektedir. Ayrıca, DB değeri, dallanmış polimerlerin özellikleri üzerinde büyük etkiye sahiptir [33, 37-38]. Dallanmış polimerlerin

DB değeri genellikle NMR spektrumlarında belirli sinyallerin integral yoğunlukları kullanılarak belirlenmektedir. DB değerinin hesaplanması için Fréchet ve Frey tarafından tanımlanan iki genel ifade bulunmaktadır (Eşitlik 2.1).

$$DB_{Frechet} = \frac{D+T}{D+L+T} \quad (2.1a)$$

$$DB_{Frey} = \frac{2D}{2D+L} \quad (2.1b)$$

Burada L, lineer grupların sayısıdır, T terminal gruplarının sayısıdır ve D ise dendritik grupların sayısıdır.



Şekil 2.5: Farklı polimerik yapılar.

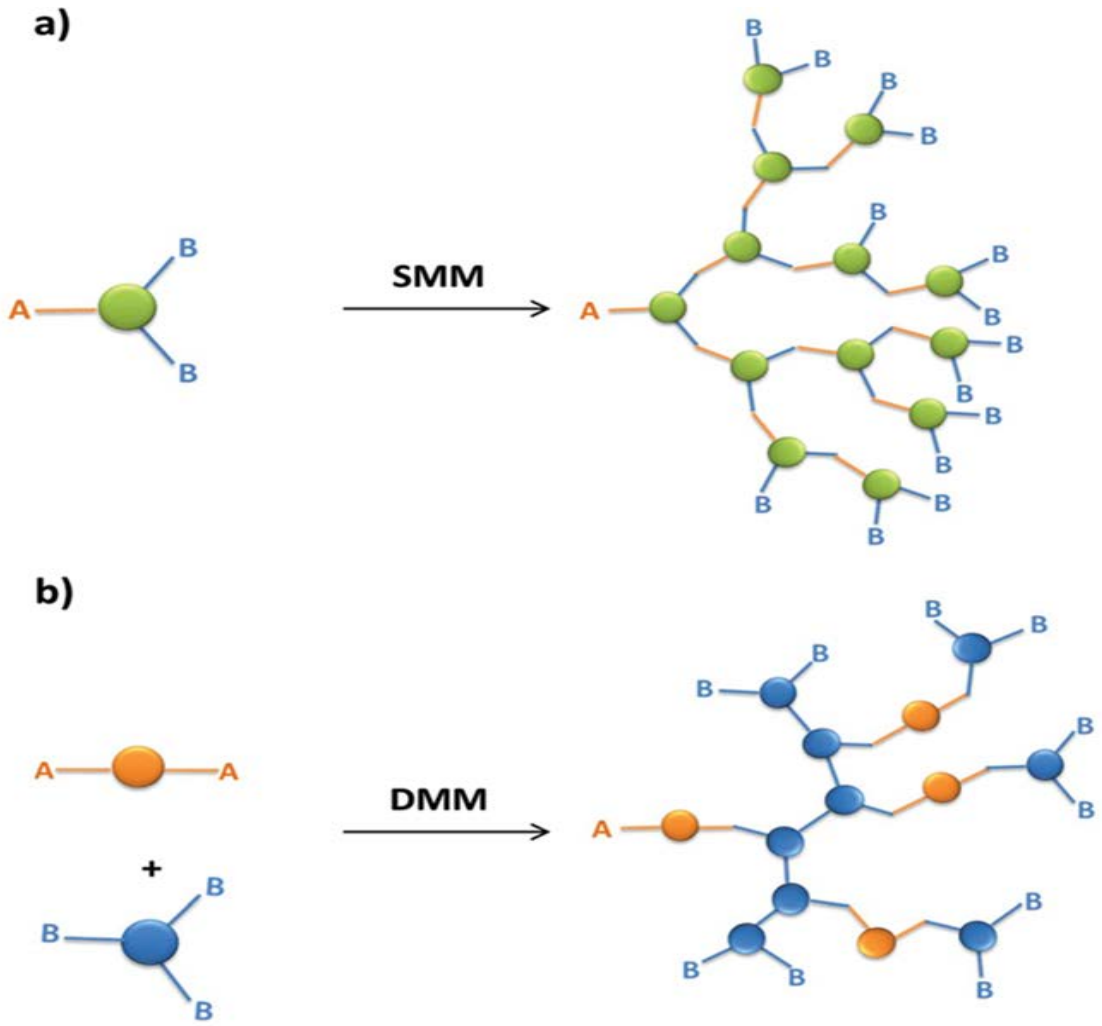
2.3.3.1. Dallanmış Polimerlerin Sentez Yaklaşımları

Genel olarak dallanmış polimerlerin hazırlanmasında, tek monomer metodolojisi (single-monomer methodology; SMM) ve çift monomer metodolojisi (double-monomer methodology DMM) başta olmak üzere iki ana sentez yaklaşımı mevcuttur (Şekil 2.5). Ayrıca, her iki yaklaşım temelde bottom-up stratejisine dayanmaktadır.

Tek monomer metodolojisi (SSM) tekniği; AB_n monomerlerin polikondensasyonu ($n>1$), vinil polimerizasyonu (self-condensing vinyl polymerization (SCVP)) [42-44], halka açılma polimerizasyonu (self-condensing ring opening polymerization SCROP) [45-46], atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) [43-44, 47-49] ve proton transfer polimerizasyonu [50] gibi farklı yaklaşımları kapsamaktadır. AB_n polikondensasyon yaklaşımında, n sayısı 6 olacak şekilde AB_6 'ya kadar monomerler kullanılarak yüksek dallanma derecesi dallanmış polimerler sentezlenebilir. Dikkat edilmesi gerek bir durum da vinil polimerizasyonu (SCVP) esnasında meydana gelebilecek yan reaksiyonların jelleşmeye yol açabilmesidir. Bu metod ile elde edilen polimerler genellikle yüksek polidispersiteye sahiptir [34,51]. Çift monomer metodoloji tekniği (DMM) iki farklı tür monomerin polimerizasyonunu içerir. Bu teknik, klasik çift Monomer tekniği ve ko-monomer stratejisi (CMM) olmak üzere iki alt kategoriye ayrılmaktadır.

Klasik çift monomer metodolojisi A_2 ve B_n ($n> 2$) monomerlerin (" $A_2 + B_3$ " yaklaşımı) polimerizasyonunu içermektedir. Bu yaklaşımla çözünebilir dallanmış polimerlerin hazırlanmasında ilk kez Jikei ve Emrick tarafından kullanılmıştır [33]. Reaksiyon koşullarının kontrol altında tutulması, polimerizasyon sonuçlarına büyük ölçüde etkilemektedir. Simetrik monomerlerin kullanıldığı " $A_2 + B_3$ " yaklaşımının ticari olarak dönüştürülmesi, yüksek çapraz bağlanma riski nedeniyle sınırlanmaktadır. Ancak bu sınırlamalar, yöntemin uygulaması esnasında monomer konsantrasyonu düşük olması ve yavaş yavaş ilavesi ve ayrıca, reaksiyonun jelleşme noktasından önce durdurulmasıyla önlenabilmektedir.

Tek monomer metodolojisi ile klasik çift monomer metodolojisinin birleşimi olarak da düşünülebilen ko-monomer stratejisinde (CMM), reaktivite açısından birbirinden farklı fonksiyonel gruplara sahip monomer çiftlerinin kullanılması nedeniyle alternatif bir sentez yaklaşımı oluşturmuştur. Ko-monomer stratejisi yaklaşımının uygulanmasında kullanılan iki tip monomer tercihen polimerizasyonun ilk aşamasında AB_n ara ürünü oluşturmasıyla birlikte jelleşme sorunu azaltmaktadır [34, 52-53, 47, 51].



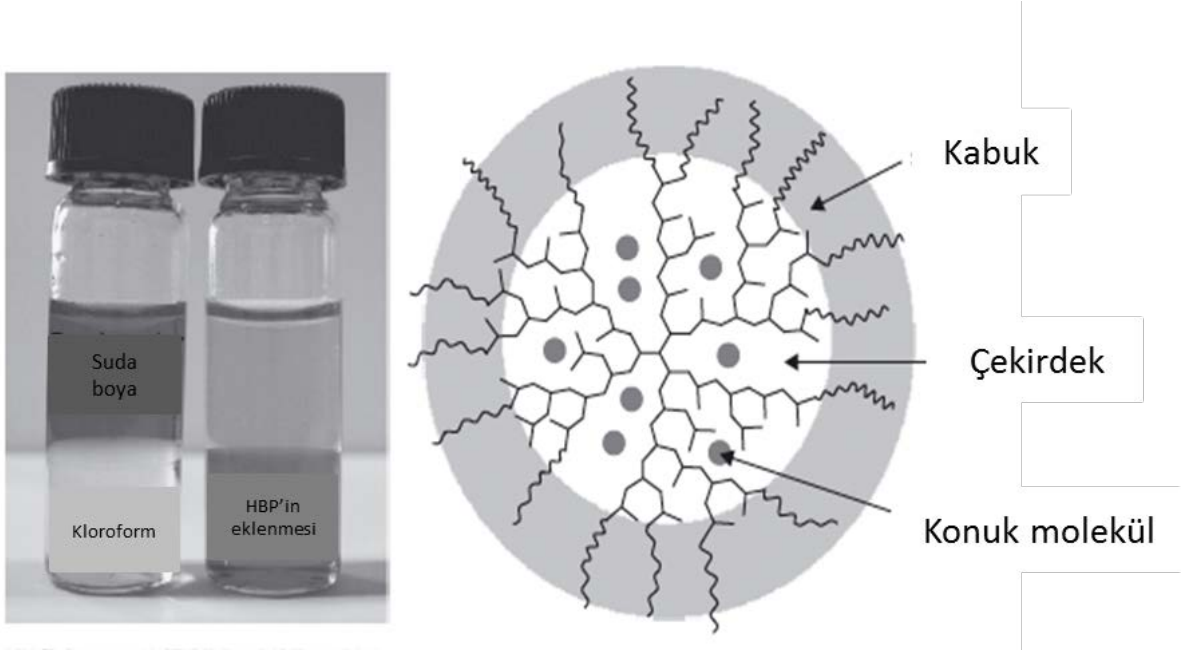
Şekil 2.6: İki temel HBP sentez yaklaşımları: (a) tek-monomer metodoloji ve (b) çift-monomer metodolojisi [33].

2.3.3.2. Dallanmış Polimerlerin Uygulama Alanları

Dallanmış polimerler, eşsiz yapıları ve özelliklerinden dolayı katkı ajanları, kaplamalar, nanoreaktörler, nanokapsüller, işlevsel çapraz bağlayıcılar, yapısal hidrojeller ve diş kompozitleri gibi birçok uygulama için kullanılmaktadır. Ayrıca, dallanmış polimerler, nano boyutlu reaksiyon parçaları için bir yapı taşları olarak kullanılması nedeniyle nanoteknolojide kullanımları da mevcuttur. Bununla birlikte biyokimya ve biyomedikal uygulamalarındaki ilaç ve gen taşıma sistemleri olarak da kullanılmaktadır.

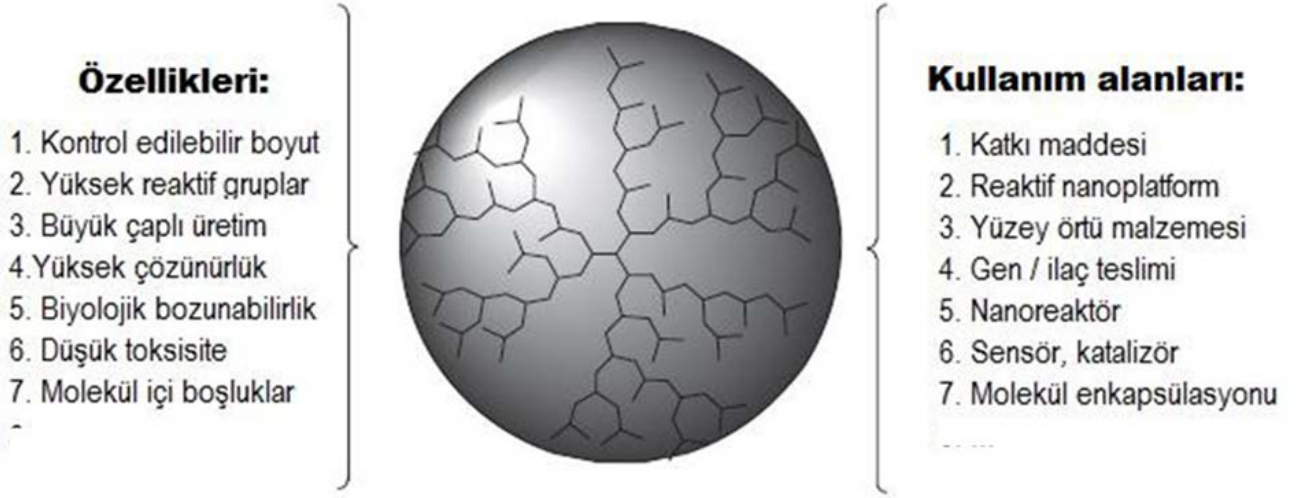
Son yıllarda, dallanmış polimerlerin uygulamalarındaki kullanımı araştırmacılar için ilgi odağı olmaktadır. Çekirdek-kabuk amfifilik dallanmış polimerlerin sahip olduğu moleküller

arası boşlukları, supramoleküler kapsüllemeye aktif molekülü yüklemek için kullanılmaktadır (Şekil 2.6). Gerçekleştirilen birçok çalışmada boyalar, ilaçlar, metal-iyon kompleksleri ve inorganik nanopartiküller başarılı bir şekilde, poli(amidoamin) (PAMAM), poli(sulfoneamin), poli(etilen imin) (PEİ) ve poli(ester amide) gibi amfifilik dallanmış polimerlerin içlerine yüklenmiştir [34, 51, 54-55, 56-57]. Buna ek olarak, dallanmış polimerlerin kendilerine, molekül ağırlığı ve işlevselliği açısından aynı olan lineer polimerlerden daha düşük viskozite özelliği gösterir ve bu nedenle, polimer reoloji kontrol ajanı olarak da kullanılabilmektedir [58]. Günümüzde, dallanmış polimerler çeşitli amaçlarda kullanılmak üzere yoğun bir şekilde incelenmektedir [59].



Şekil 2.7: Konuk molekülün dendritik polimerlerde enkapsülasyonu [51].

Şekil 2.8’de dallanmış polimerlerin sahip olduğu çok sayıda fonksiyonel uç grupları ve birçok özelliği nedeniyle çeşitli alanlarda kullanımları gösterilmektedir



Şekil 2.8: Dallanmış polimerlerin özellikleri ve kullanım alanları [60].

2.3.4. Polimerik Miseller

Polimerik miseller, hidrofobik ve hidrofilik kısımlardan oluşan eşsiz çekirdek-kabuk yapısına sahip küresel, koloidal ve nanoboyutlu parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Polimerik misellerin iç çekirdeği, polimerlerin birleşmesiyle oluşan hidrofilik dış kabukla çevrelenmiş hidrofobik moleküller için bir nanotaşıyıcı olarak görev yapar [61-63]. Yapıyı oluşturan kısımlardan biri olan hidrofilik kısmının oluşturduğu dış kabuk sulu ortamda intravenöz (damardan) olarak uygulanabilen kararlı bir dispersiyon oluşturur. Polimerik miseller, sistemik uygulamalarda kan dolaşımında yüksek dayanıklılık ve tümör dokusunda etkili birikim gösterebilmişlerdir dolayısıyla bu durum polimerik miselleri kanser ilaçlar için ideal bir taşıma sistemi kılmaktadır. Ancak uzun süreli sistemik dolaşımı destekleyebilmek için, polimerik miseller, fizyolojik sıvılarda biyouyumlu ve termodinamik olarak kararlı olacak şekilde dizayn edilmelidir. *In vitro* şartlarda hızlı çözünmeyi önleyen düşük kritik misel konsantrasyonu (CMC), polimerik misellerin üstün termodinamik kararlılığı olarak kabul edilmektedir.

Polimerik misel esaslı anti kanser ilaç taşıma sistemlerinin diğer ilaç taşıma sistemlerine göre gösterdiği üstünlükler; ilaç çözünürlüğü, uzatılmış yarı ömür, etkili ilaç yükleme, tümörlü bölgede seçici birikim ve düşük toksisite olarak sırlanabilir. Polimerik miseller diğer taşıma sistemler gibi, yüzeylerine spesifik ligandlar yerleştirilerek hedefe yönelik kanser tedavisinde de kullanılabilir ve ayrıca, kontrollü salım için pH duyarlı ilaç bağlama bağlayıcıları da ilave

edilebilmektedir. Ayrıca tedavi süreçlerinin takibi açısından eş zamanlı ilaç taşıma ve gerekli görüntülemeyi kolaylaştırmak için multi fonksiyonel polimerik miseller dizayn edilmekte ve geliştirebilmektedir [64-68].

Polimerik miseller moleküller arası kuvvetlerin türü esas alınarak polimerik miseller; konvansiyonel, poli iyon kompleks ve non-kovalent etkileşimli miseller (non-covalently connected micelles (NCCMs) şeklinde üç ana gruba ayrılabilir.

➤ Konvansiyonel Miseller

Bu misellerin, çekirdek kısmı ve korona bölgesi arasındaki hidroforik etkileşimlerden oluşur. En basit amfifilik blok kopolimerlerden biri olan poli (etilen oksit)-b-poli (propilen oksit), hidroforik etkileşimlerinin bir sonucu olarak oluşan polimerik misellere örnek verilebilir [54].

➤ Poli iyon Kompleks Miseller

Polielektrolitler gibi iki zıt yüklü kısımlar arasında oluşan elektrostatik etkileşimler misel oluşumuna olanak sağlar. Zıt yüklü polimerler, çözelti ortamına koyulduğunda misellerin kabuğuna nüfuz eder ve poli iyon miselleri oluşur. Elektrostatik kuvvetler ve Van der Waals etkileşim kuvvetleri yüklü miselin kabuk yapısını ve boyutunu kontrol eder. Bu miseller, sulu ortamlarda kolay bir şekilde kendiliğinden oluşmaktadır. Ayrıca, yapısal olarak da kararlı ve yüksek bir ilaç yükleme kapasitesine sahiptir [69-70].

➤ Non-kovalent etkileşimli miseller

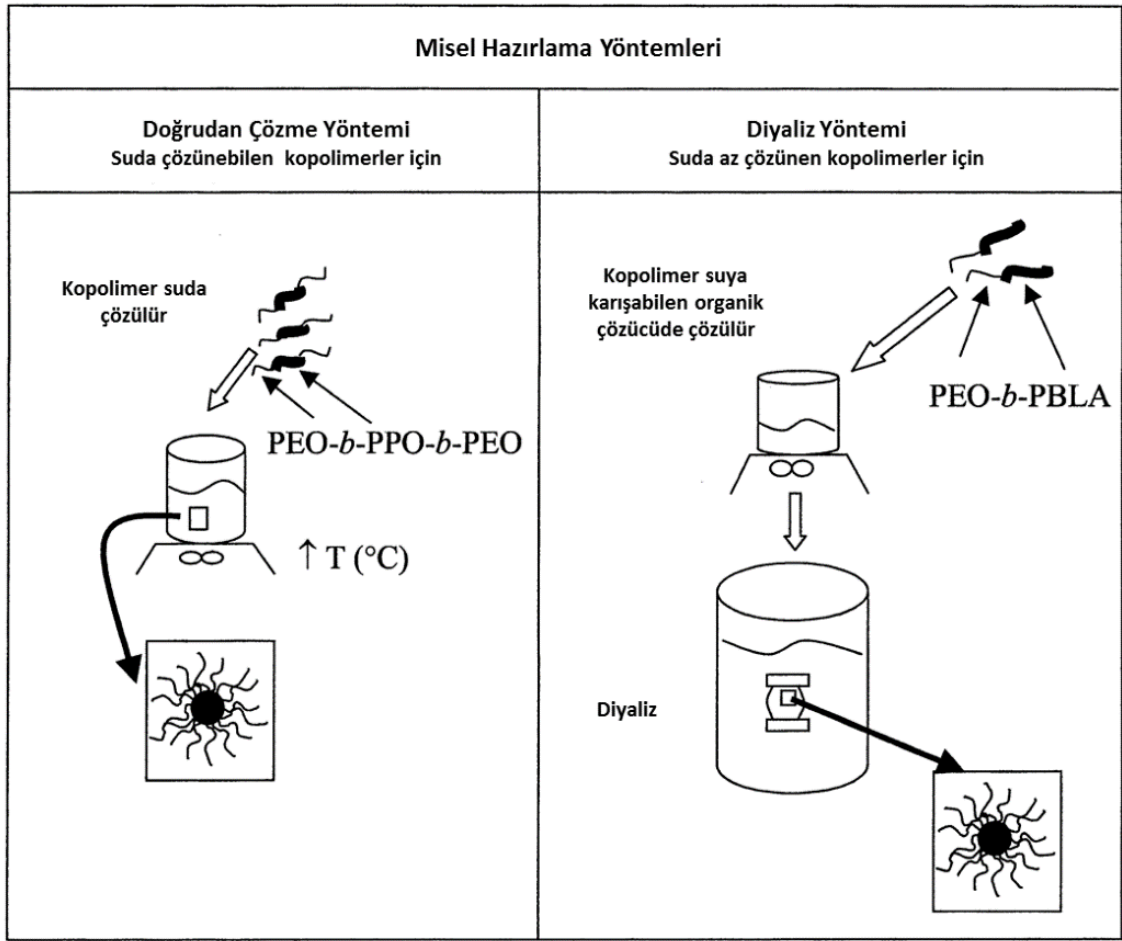
Bu tür miseller, interpolimerlerin hidrojen bağı kompleksleşmesinin bir itici gücü görevi gördüğü homopolimer, rastgele kopolimer, greft kopolimeri ya da oligomerin kendiliğinden bir gelmesiyle elde edilmektedir. Elde edilen yapılarda çekirdek ve kabuk birbirine, hidrojen bağı ya da metal-ligand etkileşimleri gibi spesifik moleküller arası etkileşimler tarafından kovalent olmayan bir şekilde bağlanmaktadır [69].

2.3.4.1. Polimerik Misellerin Hazırlama ve İlaç Yükleme Yöntemleri

Blok kopolimer misellerin genel olarak doğrudan çözme ve diyaliz yöntemi başta olmak üzere iki yöntemle hazırlanır (Şekil 2.8). Yöntemin seçimi, büyük ölçüde blok kopolimerin sudaki çözünürlüğüne bağlıdır. Doğrudan çözme yöntemi, genel olarak suda çözünebilen kopolimerler için uygulanır. Diyaliz yöntemi ise, suda az miktarda çözünebilen kopolimerler için uygulanmaktadır.

Doğrudan çözme yönteminde, kopolimerin katı bir örneğinin çözünebileceği seçici bir çözücü içinde doğrudan çözündürülür. Oluşan misel çözeltisi durularak tavlana bırakılır. Ancak, bazı durumlarda misel oluşumu sağlamak için tavlama işlemi, ısı işlemi ile ultrasonik karıştırma eşliğinde yapılır.

Eğer misellerin suda kolayca çözünmeyen blok kopolimerler ile oluşturulacaksa, diyaliz yöntemi tercih edilmektedir. Bu durumda, miselleri oluşturacak hem hidrofobik hem de hidrofilik kısımların çözünebileceği dimetilasetamid (DMA), dimetilformamid (DMF) veya tetrahidrofur (THF) gibi suyla karışabilen ortak bir organik çözücüde çözündürülür. Ardından, oluşan kopolimer çözücü karışımı karıştırılır ve saf suya karşı diyaliz edilir. Diyaliz işlemi, misel oluşumu ve organik çözücünün uzaklaştırılmasını sağlar. Ayrıca, diyaliz yöntemi kullanılarak hazırlanan misellerin boyut ve boyut dağılımı, kullanılan organik çözücüye bağlı olarak değişebilmektedir. Buna ek olarak, elde edilen misellerin ağırlık fraksiyonu ve veriminin, çözücü seçimine bağlı olarak değiştiği bulunmuştur [72-75].



Şekil 2.9: Polimerik misellerin hazırlanmasında uygulanan iki temel yöntemlerin şematik gösterimi [73].

Polimerik misellerin hazırlanmasında, poli(etilen oksit) [76] ve poli(etilen glikol) [77-79] hidrofilik bloklar olarak kullanılırken, hidrofobik bloklar olarak kullanılan bazı polimerler aşağıda verilmektedir.

- Poli(aspartik asit) [80]
- Poli kaprolaktone [77-79]
- Poli(gamma-benzil-L-aspartat) [76]
- Poli(beta-benzil-L-aspartat) [81]
- Poli(D,L-laktid) [82]
- Poli(L-lizin) [83]
- Poli(propilen oksit) [84]
- Oligo(metil metakrilat) [85]
- Polistiren [86]

Uygulanacak ilaç yükleme yöntemi büyük ölçüde, blok kopolimer misellerin hazırlanmasında kullanılan misel hazırlama yöntemine bağlıdır. Eğer miseller, su içinde doğrudan çözme yöntemi ile oluşursa, genellikle oluşan bu kopolimer-su stok çözeltisinin bir miktarı alınıp blok kopolimerin içine yüklenmesi istenen ilacın olduğu küçük şişenin üzerine ilave edilmektedir. Örnek olarak, ilacın çözünebileceği aseton gibi organik çözücü ile stok çözeltisi hazırlanıp bir miktarı alınıp boş bir şişeye aktarılır, aseton buharlaşmaya bırakılır ve daha sonra üzerine, kopolimer-su stok çözeltisinin bir miktarı da ilave edilir. Bununla birlikte, ilacın yağ/su şeklindeki emülsiyon yöntemi ile yüklenmesi de mümkündür; bu durumda, kloroform gibi organik çözücü ile ilaç çözeltisi hazırlanır ve sudaki misel çözeltisinin üzerine damla damla ilave edilir ve son olarak, kullanılan organik çözücü buharlaştırılır [77-78].

Diyaliz yöntemi ile elde edilen misellere ilaç yüklenecekse, bu durumda ilaç ve kopolimer, ikisi de çözünebileceği ortak bir organik çözücü içinde çözündürülür, oluşan ilaç/kopolimer karışımı karıştırılır ve daha sonra, saf suya karşı diyalize edilir. Bazı durumlarda, yağ/su emülsiyon yöntemi uygulanarak, ilaçların diyaliz yöntemi ile hazırlanmış misellere yüklenmesi yapılabilmektedir [77].

2.3.5. Nanopartiküller

Nanopartiküller çözünmüş, hapsedilmiş, enkapsüle olmuş ya da yüzeye tutulmuş ilaçların taşınması ve ayrıca, kontrollü bir şekilde salınmasına olanak sağlayabilen, boyutları 10 ile 1000 nm arasında değişen katı koloidal partiküller olarak tanımlanmaktadır [87-88]. Bu tanımlama ile birlikte tıp, biyoteknoloji, elektronik, iletken malzemeler, sensörler ve çevresel teknoloji gibi alanlarda kullanımları önem kazanmaktadır [89-94]. Polimerik nanopartiküller, hedeflendirilmiş kanser tedavisinde ilaçları spesifik bir şekilde hedeflenen bölgeye ulaştırmak amacıyla kullanılan umut verici bir ilaç taşıyıcı olarak da bilinmektedir [95]. Buna ek olarak polimer esaslı nanopartiküller, DNA, ilaç etken maddesi ve proteinleri etkili bir şekilde hedef hücrelere ve organlara taşımaktadır. Nano boyutları ile, hücre zarları boyunca etkili geçirgenliği ve kan dolaşımında stabiliteyi arttırmaktadır. Polimerler, birçok potansiyel tıbbi uygulamaya sahip eşsiz nanopartikül yapılarına entegre olabilen sayısız ve çeşitli moleküler tasarımların üretimi için uygun malzemelerdir [96].

Tıbbi uygulamalarda kullanılmak amacıyla hazırlanan nanopartiküllerde kullanılan polimerler için aranan özellikler; vücutla uyumlu olması, antijenik özelliği olmaması, biyouyumlu ve mümkünse biyobozunur olmasıdır [97]. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında arzu edilen özelliklere sahip birçok doğal ve sentetik polimer bulunmaktadır. Doğal polimerlerden en yaygın kullanılan polimerler; kitosan, gelatin, sodyum alginat ve albümindir [98-101]. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bazı sentetik polimerlere ise polilaktitler (PLA), poliglikolidler (PLG), poli(laktid-ko-glikolidler) (PLGA), polianhidridler, poli ortoesterler, poli siyanoakrilat, polikaprolakton (PCL), poli(etilen glikol) (PEG)'dir [98-100].

Elde edilecek polimerik nanopartiküllerin özellikleri, kullanılacağı uygulama alanına göre hazırlanma aşamasında optimize edilmelidir. Buna bağlı olarak, belirli bir uygulama için istenen özelliklere sahip polimerik nanopartiküllerin elde edilmesine olanak veren hazırlama yöntemleri son derece önemlidir. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında; monomerlerin polimerizasyonu, önceden oluşturulmuş polimerlerin dispersiyonu veya iyonik jelasyon gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır.

2.3.5.1. Önceden Oluşturulmuş Polimerin Dispersiyonundan Nanopartiküllerin Hazırlama Yöntemleri

Önceden oluşturulmuş polimerin dispersiyonundan nanopartiküllerin hazırlama yöntemleri, genel olarak poli (laktik asit), poli (D,L-glikolid), poli (D,L-laktid-ko-glikolid), Polikaprolakton vb gibi polimerler ya da kopolimerlerden biyolojik olarak parçalanabilen nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmaktadır [102-104]. Polimerizasyon ortamındaki kalıntı moleküller (monomer, oligomer, yüzey aktif maddeler vb) az veya çok toksik olabilir, bu da kolloidal malzemenin titiz bir şekilde saflaştırılmasını gerektirmektedir. Dolayısıyla bu gibi sınırlamalardan kaçınmak için, monomer yerine önceden oluşturulmuş polimerlerin kullanıldığı yöntemler önerilmiştir [105]. Önceden oluşturulmuş polimerlerden nanopartiküllerin hazırlama yöntemleri; çözücü buharlaştırma, tuzla çöktürme, çözücü difüzyon, diyaliz, nano çöktürme ve süper kritik akışkan teknolojisi gibi yöntemleri kapsamaktadır. Bu yöntemler, hazırlama sırasında iç faz olarak işlev gören nanopartikül bileşenlerini içeren organik bir çözeltiyi ve nanopartiküller için dispersiyon ortamını oluşturan

stabilizatörleri içeren sulu çözeltiyi içermeleri bakımından benzerdir [105]. Ayrıca yöntemlerin arasındaki başka bir benzerlik ise, hidrofilik özellik taşıyan ilaçlar için düşük enkapsülasyon etkinliğini göstermeleridir [106]. Yöntemin içerdiği tüm hazırlama teknikleri ile nanoküreler elde edilebiliyor olsa da, nanokapsüllerin hazırlanması ancak nanoçöktürme ve çözücü difüzyonu teknikleri ile gerçekleştirilebilmektedir [106].

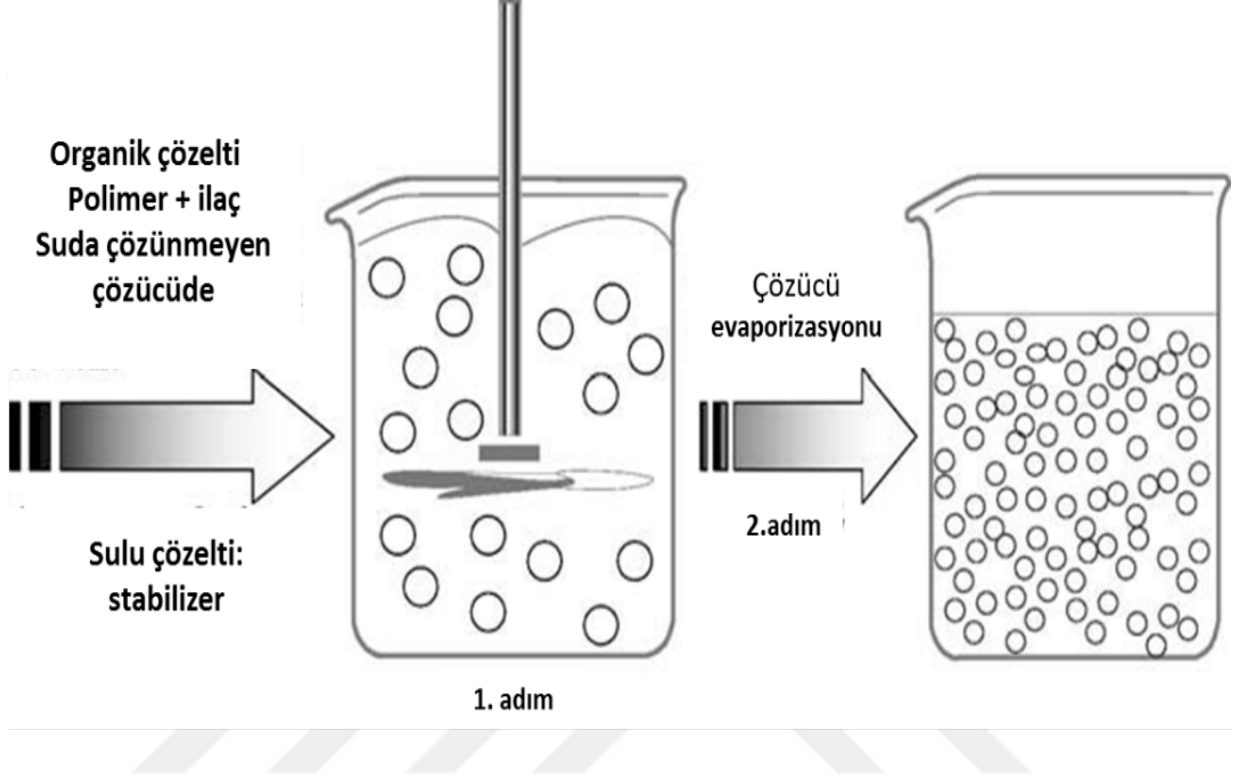
➤ *Çözücü Buharlaştırma Yöntemi*

Çözücü buharlaştırma yöntemi, önceden oluşturulmuş polimerlerden nanopartiküllerin hazırlanması için ilk geliştirilen yöntem olarak bilinmektedir [107]. Bununla birlikte, polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Çözücü buharlaştırma yöntemi; tekli emülsiyon ve çoklu emülsiyon başta olmak üzere iki şekilde uygulanabilir.

Tekli emülsiyon yöntemi iki basamak içermektedir. İlk basamakta polimer ve ilaç, suyla kısmen karışabilen, uçucu bir organik faza alınır ardından, hacimce daha fazla olan ve emülsifiye edici maddeleri içeren sulu faz içine emülsifiye edilir. İkinci basamakta ise formülasyonda bulunan organik çözücü buharlaştırılarak, polimerin nanoküreler şeklinde çökmesi sağlanır. Oluşan nanopartiküller, ultrasantrifügasyon yoluyla toplanır ve stabilizatör kalıntısı veya herhangi bir serbest ilacı uzaklaştırılmak amacıyla destile su ile birkaç kez yıkanır ve ardından, nanopartiküllerin stabilitelerini uzun süre koruyabilmek için liyofilize edilir [108].

Çoklu emülsiyon yöntemi, çözücü buharlaştırma yöntemindeki hidrofilik ilaçların düşük enkapsülasyon sorununu giderebilmek için, tekli emülsiyon yönteminin değiştirilmiş halidir. Hidrofilik özellik taşıyan ilaçların enkapsülasyonu için uygun bir yöntemdir. Bu yöntemde, yağ içinde su (water in oil; w / o) şeklindeki emülsiyonları oluşturmak için şiddetli bir şekilde karıştırılmakta olan organik polimer çözeltisi içine sulu ilaç çözeltileri eklenir. Elde edilen w / o şeklindeki emülsiyon, su-yağ-su (water/oil/water; w / o / w) emülsiyon şekline dönüşmesi için sürekli karıştırılmakta olan ve hacimce daha fazla sulu faz içine eklenir. Daha sonra buharlaştırma ile organik çözücü uzaklaştırılır ve nanopartiküller yüksek hızda santrifüjleme yoluyla izole edilebilir. Oluşan nanopartiküller liyofilize işlemine tabi tutulmadan önce iyice yıkanmalıdır [109]. Bu yöntemde enkapsüle edilecek hidrofilik ilaç miktarı, kullanılan

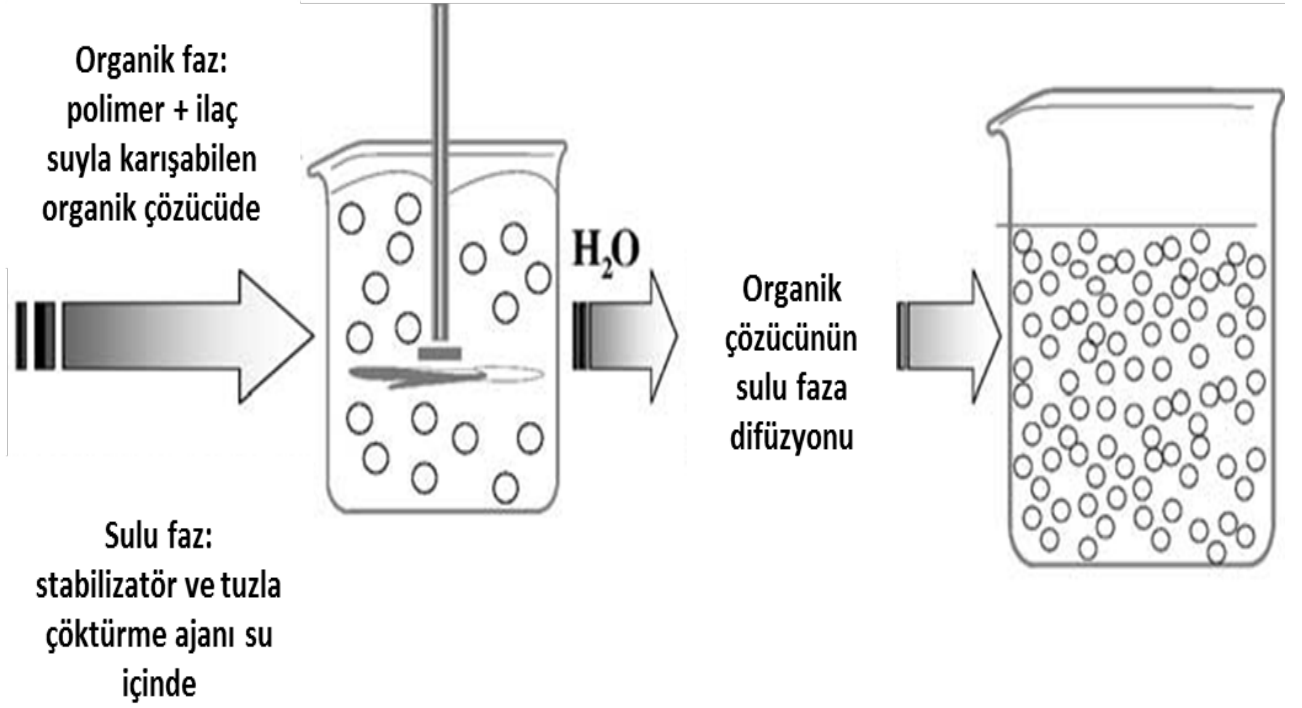
stabilizatör konsantrasyonu, polimer konsantrasyonu ve sulu fazın hacmi, nanopartiküllerin özelliklerini etkileyen değişkenlerdir [110].



Şekil 2.10: Çözücü buharlaştırma yönteminin şematik gösterimi [111].

➤ Tuzla Çöktürme Yöntemi

Yaygın olarak uygulanan emülsiyon ve nano-çöktürme bazlı yöntemlerin alternatifi olan tuzla çöktürme yöntemi, normal koşullarda su ile karışabilen aseton gibi organik bir çözücünün uygun tuz konsantrasyonu varlığında suda çözünmemesi prensibine dayanmaktadır. Polimer veya kopolimer ve ilaç ile birlikte aseton, tetrahidrofuran (THF) [106] vb. gibi su ile karışabilen organik çözücü içinde çözündürülür, oluşan organik faz elektrolit (magnezyum klorür, kalsiyum klorür vb.) ve gerekirse kolloidal stabilizatör içeren şiddetli bir şekilde karıştırılmakta olan sulu faza emülsifiye edilir. Ardından elde edilen yağ / su emülsiyonu organik çözücünün sulu faza difüzyonunu arttırmak için yeterli miktarda su veya sulu çözelti ile seyreltilir, böylece nanopartiküllerin oluşumuna neden olur. Elde edilen nanopartiküllerin iyi bir saflaştırma gerektirmesi yanı sıra, formülasyonda kullanılan tuzların çoğunu etken madde bileşikleriyle uyumsuzluk göstermesi, yöntemin fazla tercih edilmemesine neden olmaktadır [112].

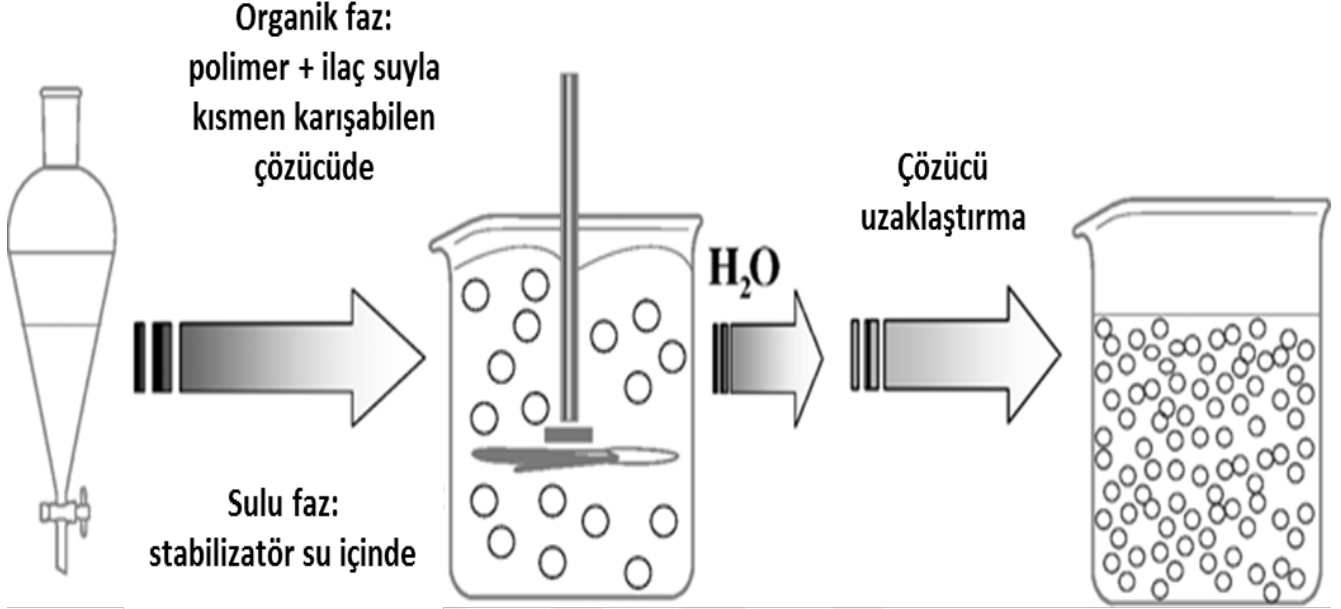


Şekil 2.11: Tuzla çöktürme yönteminin şematik gösterimi [111].

➤ Çözücü Difüzyon Yöntemi

Çözücü difüzyon yöntemi, uygulanması sırasında yüksek tuz konsantrasyonunu ve uzun süreli bir saflaştırma işlemini gerektiren tuzla çöktürme yönteminin değiştirilmiş halidir [104]. Metot, biyolojik olarak parçalanabilen nanopartiküllerin verimli bir şekilde hazırlanmasında başarı ile kullanılmıştır [113]. Bu yöntemin nanopartiküllerin hazırlanmasındaki başarısı, kullanılan polimerin su ile kısmen karışabilirliğine bağlıdır [114-115]. Bununla birlikte organik fazı oluşturan su ile kısmen karışabilen organik çözücü ve sulu fazı oluşturan su ile karşılıklı olarak doyurulması, yöntemin ilk adımını oluşturmaktadır. Daha sonra polimer ve ilaç, doymuş organik çözücü içinde çözündürülür ve ardından, stabilizatör içeren hacimce daha fazla sulu faza emülsifiye edilip, organik faz sulu fazda dağıtılarak, yağ / su şeklindeki kararlı bir emülsiyon elde edilir. Son aşama olarak oluşan yağ / su şeklindeki kararlı emülsiyon sistemine yeterli miktarda suyun ilave edilmesi, organik çözücünün dış faza difüze olmasına ve malzemelerin (polimer ve ilaç) nanopartikül formda çökmesine neden olmaktadır. Son olarak sistemdeki organik çözücünün uzaklaştırılması, çözücünün kaynama noktasına bağlı olarak buharlaştırma ya da filtrasyon ile yapılır [116]. Bu yöntemde

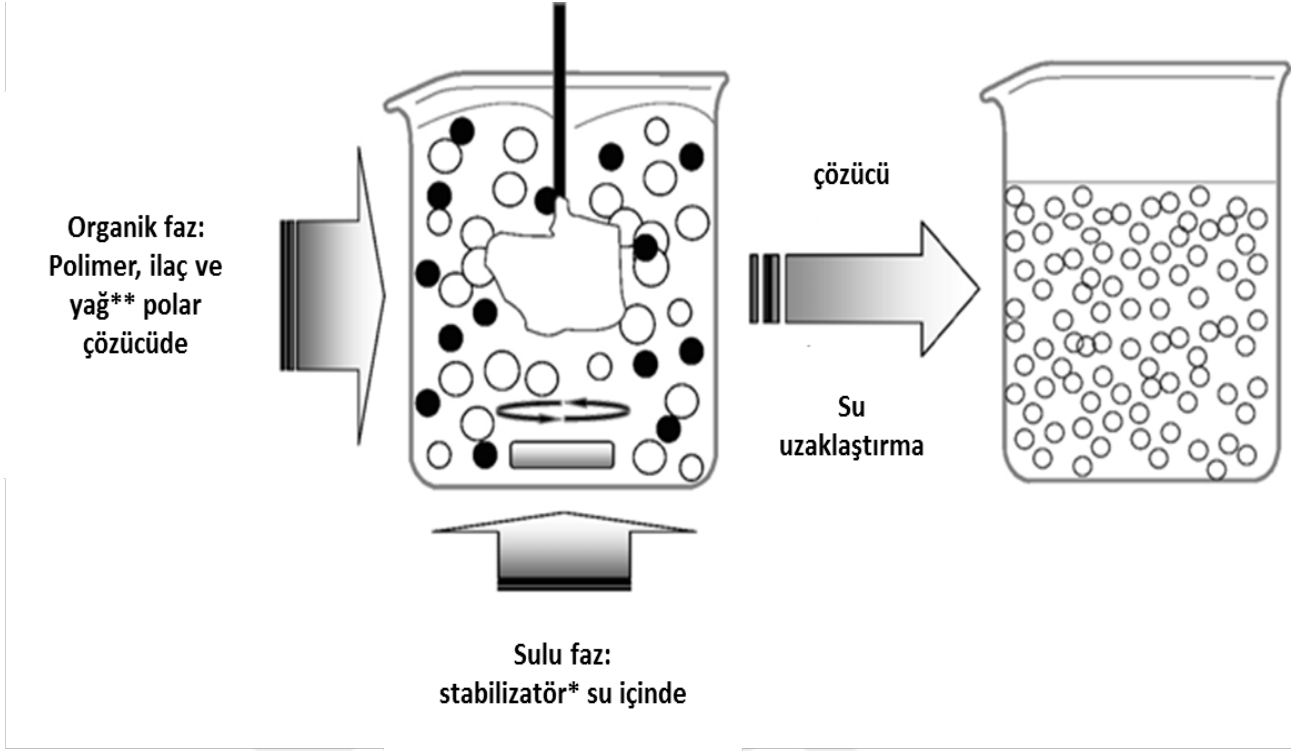
kullanılabilen uygun çözücüler arasında benzil alkol, propilen karbonat [117], etil asetat [118], izopropil asetat, metil asetat, metil etil keton [119] vb. gibi çözücüler bulunmaktadır.



Şekil 2.12: Çözücü difüzyon yönteminin şematik gösterimi [111].

➤ Nanoçöktürme Yöntemi

Çözücü yer değiştirme metodu olarak da adlandırılan nanoçöktürme yöntemi ilk olarak Fessi ve çalışma arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır [120-121]. Nanoçöktürme yöntemi, önceden oluşturulmuş polimerin organik bir çözeltiden çökeltilmesi ve organik çözücünün, stabilizatör varlığında ya da olmadığında sulu faza difüze olmasından ibarettir. Bu yöntemle partikül hazırlanırken, polimer ya da kopolimeri ve ilaç ile birlikte aseton, etanol vb. gibi orta seviye polariteye sahip suyla karışabilen organik çözücü içinde çözündürüldükten sonra, manyetik karıştırma altında karıştırılmakta olan stabilizatör içeren sulu çözelti içine eklenir. Çözücünün sistemde hızlı difüze olmasından kaynaklanan su ve organik çözücü arasındaki ara yüzeyde polimer birikmesi, nanopartiküllerin anlık oluşumuna yol açmaktadır. Ardından, organik çözücü ve suyun bir kısmı düşük basınç altında süspansiyonlardan uzaklaştırılır. Organik fazın sulu faza ilave edilme oranları, elde edilecek nanopartiküllerin boyutunu etkiler ve bununla birlikte iki fazın karıştırma oranındaki değişim hem partikül boyutunda hem de ilaç enkapsülasyonunda bir azalma olmasına neden olabilmektedir [120-123].



Şekil 2.13: Nanoçöktürme yönteminin şematik gösterimi [111].

Nanoçöktürme yönteminde, az miktarda toksik olmayan yağ organik faza ilave edilir ve böylece nanokapsüllerin hazırlanmasına olanak sağlar. Ayrıca bu yöntemde nanokapsüllerin yağ – esaslı merkezi boşlukları dikkate alındığında, elde edilen nanokapsüllerin lipofilik ilaçlar için genel olarak yüksek bir yükleme oranı olduğu rapor edilmiştir [124].

Bu yöntemde kullanılan organik çözücünün sulu faz ile karıştırılabilir olması, yöntemin lipofilik ilaçlar için uygun olmasına neden olur. Ancak, suda çözünebilen ilaçlar için uygulanması uygun değildir. Günümüzde çözücü yer değiştirme metodu poli (laktik-koglikolid asit) (PLGA), poli (laktid asit) (PLA), polikaprolakton (PCL) vb. gibi çeşitli polimerik malzemelere uygulanmaktadır [124-126]. Nanoçöktürme yönteminin ana problemi, stabilizatör yokluğundan dolayı sıvı içindeki kolloidal parçacıkların küre biçiminde kümeleşmesidir. Bu sorun, organik fazın sulu faza yavaşça ilave edilmesi ve uygun bir çözücü sisteminin seçilmesi ile hızlı ve etkili bir karıştırma sağlanarak giderilebilmektedir.

Önceden sentezlenmiş polimerlerden nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan tüm yöntemlerin kendi aralarında karşılaştırıldığında, birbirlerine karşı üstünlüklere sahip olduğu görülmektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.1: Önceden oluşturulmuş polimerlerden nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerin genel avantajları ve dezavantajları.

Metot	Avantajlar	Dezavantajlar
Çözücü buharlaştırma (tekli emülsiyon)	- Nanopartikül boyutu ayarlanabilir olması - Lipofilik ilaçlar için yüksek enkapsülasyon	- Hidrofilik ilaçların düşük enkapsülasyonu - partikül boyutunun ayarlaması zordur.
Çözücü buharlaştırma (çoklu emülsiyon)	Hidrofilik ve lipofilik ilaçlar için kapsülleme olanağı	İri ve homojen olmayan nanopartiküller iki basamaklı işlem partikül boyutunun ayarlaması zordur
Tuzla çöktürme	- Isıya duyarlı ilaçlara uygulanabilir - Lipofilik ilaçlar için yüksek enkapsülasyon - Partikül boyutunu büyütmesi kolaydır	- Tuzlar ve ilaçlar arasında olası uyumsuzluk - Kapsamlı yıkama basamakları - Genelde hidrofobik ilaçların enkapsülasyonuna sınırlıdır
	- Isıya duyarlı ilaçlara uygulanabilir	- Hidrofilik ilaçların düşük

Çözücü difüzyonu	- Lipofilik ilaçlar için yüksek enkapsülasyon - Nanokapsüllerin elde edilebilmesi - Partikül boyutunu büyütme kolay	enkapsülasyonu - Uzun süreli proses - Nihai formülasyonun konsantrasyonu gereklidir
Nanoçöktürme	- Basit, hızlı - Fazla toksik olmayan çözücülerin kullanılması - Nanokapsüllerin elde edilebilmesi - Partikül boyutunu büyütmesi kolay	- Genelde hidrofobik ilaçların enkapsülasyonuna sınırlıdır - Organik fazda polimer konsantrasyonu düşüktür

2.3.5.2. Monomerlerin Polimerizasyonundan Nanopartiküllerin Hazırlanması

Monomerlerin polimerizasyonuna dayanan yöntemler, önceden oluşturulmuş polimerlerden nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerin aksine polimerizasyon işlemleri içermektedir. Bu yöntemde monomerler, sulu bir çözelti içinde nanopartiküller oluşturulmak üzere polimerize edilmektedir. Etkin madde, polimerizasyon ortamında çözündürülerek ya da polimerizasyon işlemi tamamlandığında nanopartiküller üzerine adsorpsiyon yoluyla dâhil edilmektedir. Daha sonra elde edilen nanopartikül süspansiyonu ultrasonikasyon yoluyla, monomerlerin polimerizasyonu esnasında kullanılan çeşitli stabilizatörleri ve yüzey aktif

maddelerini uzaklaştırmak amacıyla saflaştırılır ve partiküller, eşit konsantrasyonda yüzey aktif maddeleri bulundurmeyen bir ortamda yeniden süspansiyon haline getirilir [127]. Belirli bir uygulamada kullanılmak üzere arzu edilen özelliklere ulaşmak için, monomerlerin polimerizasyonu sırasında uygun polimerik nanopartiküller tasarlanmalıdır [128]. Bu yöntemde nanokapsül oluşumu ve parçacık boyutu, kullanılan yüzey aktif maddeleri ve stabilizatörlerin konsantrasyonuna bağlıdır [129]. Monomerlerin polimerizasyonu ile polimerik nanopartikül hazırlama yöntemleri; mikro emülsiyon, mini emülsiyon, emülsiyon, ara yüzey polimerizasyonu ve kontrollü / yaşayan radikal polimerizasyonudur.

2.3.5.3. Hidrofilik Polimerlerin Koaservasyonu

İyonik jelasyon metodu olarak da adlandırılan koaservasyon yöntemi genel olarak, kitosan [130], jelatin [131], sodyum aljinat [132] vb. gibi biyobozunur hidrofilik polimerlerden biyolojik olarak parçalanabilen polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Günümüze kadar yapılan pek çok araştırma, bahsedilen biyobozunur hidrofilik polimerler kullanılarak nanopartiküllerin hazırlanmasına odaklanmıştır [127]. Bu metod yoluyla hidrofilik kitosan nanopartiküllerinin hazırlanması, ilk kez Colva ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır [133-134]. Kitosan gibi hidrofilik polimer nanopartikül oluşum mekanizması, hidrofilik polimerin pozitif yüklü grubu ile tripolifosfat gibi negatif yüklü bir polianyon grubu arasındaki elektrostatik etkileşime dayanmaktadır. Yöntemin uygulanması kolay olmakla birlikte, sulu ortamda basit bir hazırlama metodu sunmaktadır. İlk olarak kitosan, polianyon ilavesinden önce ya da sonra kitosan çözeltisine ilave edilebilen stabilizatörün varlığında ya da yokluğunda asetik asit çözeltisi içinde çözündürülür. Ardından, polianyon veya anyonik polimerler eklenir ve nanopartiküller, oda sıcaklığında mekanik karıştırıcı altında kendiliğinden oluşmaktadır. İyonik jelasyon yöntemi kullanılarak elde edilecek biyobozunur nanopartiküllerin boyutu ve yüzey yükü, hidrofilik polimer ve stabilizatör oranı değiştirilerek modifiye edilebilir [131].

2.3.5.4. Polimerik Nanopartiküllerin Uygulama Alanları

Nanoboyutlu malzemeler otomotiv, enerji, çevresel, kataliz, biyomedikal vb. gibi birçok uygulamalarda kullanılmaktadır. Buna ek olarak nanomalzemeler, etken madde taşımasında büyük bir terapötik potansiyel gösterir ve bilimsel araştırma alanlarında önem kazanmaktadır.

Polimer esaslı nanomalzemeler, eşsiz özellikler, iyi biyouyumluluk, yapı çeşitliliği, tasarlanması ve elde edilişindeki kolaylık nedeniyle ilaç taşıma sistemleri için ilgi çekici bir seçenek haline gelmektedir [135-138]. Ayrıca nanomalzemeler ilaçların, doğrudan etki bölgesine verilmesinde, iyileştirme özelliğini arttırmada ve olası yan etkilerini azaltmada önemli bir rol oynamaktadır [135]. Polimerler, ilaçların enkapsüle olabileceği ya da kimyasal olarak bağlanabileceği bir taşıyıcı olarak kullanılabilirler için uygun malzemelerdir. Kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi yönteminde kullanılan antikanser ilaçların, polimerik nanopartiküller tarafından daha az sitotoksikite ve daha iyi verim ile tümör hücrelerine ya da dokularına verilmektedir [139].

2.4. İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİNDE BİYOBOZUNUR POLİMERLER

Bozunma, bir maddenin veya bir molekülün sahip olduğu bir veya daha fazla bağın kırılması ve molekülün daha küçük moleküle parçalanmasıdır. Polimer gibi yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerde bozunma, daha düşük molekül ağırlıklı bileşiklere ya da yapıyı oluşturan monomer birimlerine dönüşmesi anlamına gelmektedir. Vücudun fizyolojik şartlarında bozunabilen veya doğada mevcut bulunan mikroorganizmaların faaliyetleriyle bozunabilen polimerler, biyobozunur polimerler olarak adlandırılmaktadır. Biyobozunur polimerlerde bozunma çoğunlukla erozyon veya kimyasal değişikliklere dayanmaktadır. Bu iki bozunma için literatürde “biyobozunma” ve “biyoerozyon” gibi terimler çoğunlukla birbiriyle aynı anlamda kullanıldığı gibi bazen de bozunma süreçlerini ayırt edebilmek için kullanılır. “Biyobozunma” terimi, polimerin molekül ağırlığını ve çözünürlüğünü değiştiren kimyasal süreçlerin tanımlanması ile sınırlıyken “biyoerozyon”, bir polimerik taşıma sisteminin ağırlık kaybına neden olan fiziksel süreçlerinin tanımlanması ile sınırlandırılabilir [27, 140-141]. Erozyonla bozunma genel olarak, çözünabilir polimerlerden hazırlanan sistemlerde gerçekleşir. Sistemi oluşturan polimerin içine su girdikçe bağlar zayıflar, aşınır, çözünür ve dozaj formundan ayrılır.

Biyobozunur polimerlerde bozunma ürünleri genelde karbondioksit, metan ve biyokütle gibi vücuda ve çevreye zararlı olmayan bileşiklerdir. Poli (glolik asit) gibi sentetik biyobozunur polimerler ilk olarak 1950’li yıllarda geliştirilmiştir. Ancak, zayıf hidrolitik stabiliteleri nedeniyle kalıcı uygulamalar için uygun görülmemiştir. Ancak bu bozunma kabiliyetleri sütür (ameliyat ipliği) gibi uygulamalar için faydalı olmuştur. Poli (glolik asit) ve poli (laktik-ko-

glikolid)'den hazırlanan dextran ve vicryl gibi ameliyat iplikleri biyobozunur polimerlerden hazırlanmaktadır. Son yıllarda biyoteknoloji alanında yaşanan kayda değer gelişmeler, birçok protein ve gen esaslı makromoleküller ilacın geliştirilmesine olanak sağlamıştır [27]. Biyobozunur polimerler de geliştirilen bu ilaçların formülasyonlarda da kendine yer bulmuştur [10, 27].

İlaç taşıma sistemlerinin hazırlanmasında kullanılan çeşitli biyobozunur polimerler Tablo 2.1' de verilmektedir.

Tablo 2.2: Biyobozunur polimerlerin sınıfları ve ortak örnekleri.

Türler	Sınıflar	Örnekler
Sentetik polimerler	Poli amid	Poli aminoasit, polipeptidler
	Poliester	Poli (glikolid)
		Poli (D,L-laktid)
		Poli (D,L-laktid-ko-glikolid)
		Poli (epsilon-kaprolaktone)
		Poli(dioksanone)
		Poli(hidroksibutirat)
	Polianhidrid	Polifosfat
	Poliortoester	Polifosfanat
	Polifosfazen	Polifosfit
Doğal polimerler	Polifosfoester	
	Polisakkaritler	Dekstran
		Aljinat
		Kitosan

	Nişasta
	Hiyalüronik asit

Proteinler, polipeptidler	Gelatin
	kollagen
	Sığır serum albümin (BSA)
	İnsan serum albümini (HSA)

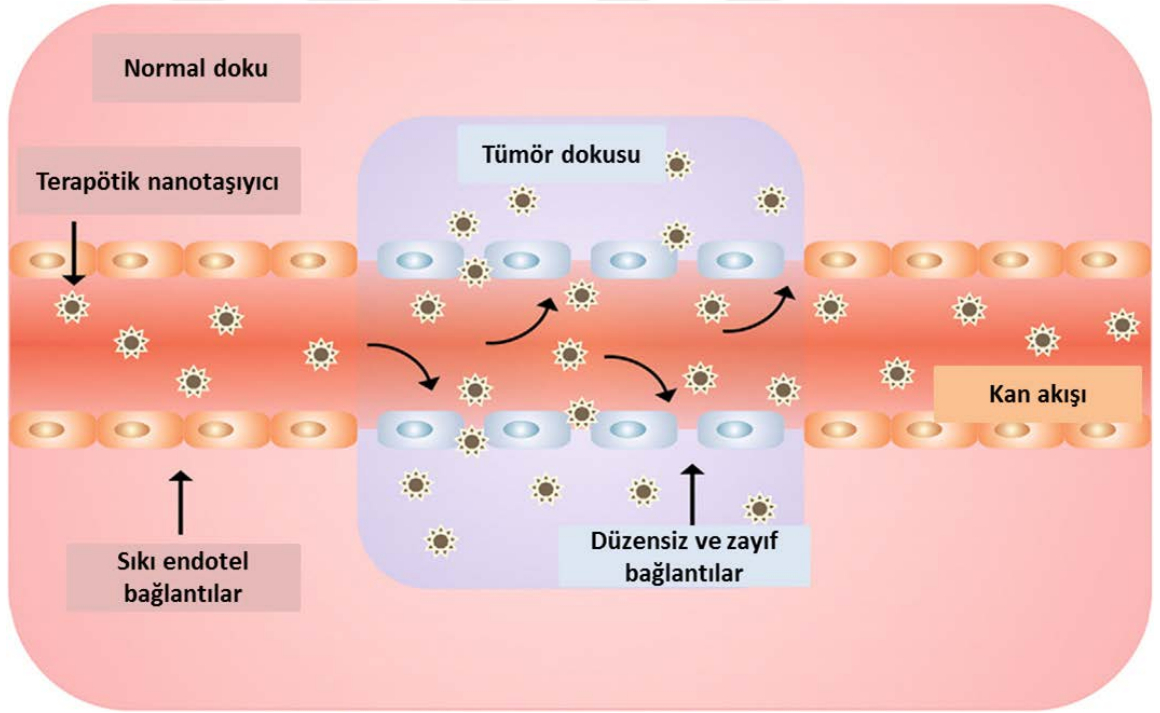
2.5. HEDEFLENDİRİLMİş İLAÇ TAşIYICI SİSTEMLERİ

İlaçların taşınması için polimerik malzemelerin kullanılması, ilaçların enkapsüle edilebileceği ve korunabileceği nanometrik boyut sistemleri elde etmeyi mümkün kılmaktadır. Bunun yanı sıra, hedeflendirilmiş kanser tedavisinde kullanılmak üzere yüzeylerine spesifik ligandlar bağlanan sistemler ise hedeflendirilmiş ilaç taşıma sistemleri olarak tanımlanmıştır. Bilindiği üzere mevcut anti kanser ilaçların çoğu, tümörlü ve sağlıklı hücreler arasında büyük farklılıklar göstermemektedir. Bu da sistemik toksisiteye ve yan etkilere neden olmaktadır. Anti kanser ilaçların sağlıklı hücrelere veya dokulara karşı gösterdikleri yan etkileri, pasif ya da aktif hedefleme yaklaşımları uygulanarak giderilebilmektedir [142-144].

2.5.1. Pasif Hedefleme Yaklaşımı

Tümörlü dokularda, hücrelerin çoğalması çok hızlı ve kontrolsüz bir şekilde ilerlemektedir. Buna bağlı olarak belirli bir boyutun üzerinde kanserli hücreler, beslenme ihtiyaçlarını gidermek ve büyümelerini hızlandırmak için kendi damar ağlarını (anjyogenez olayı) oluştururlar. Tümör neo-damarları normal kan damarlarının aksine, tümörlü hücrelerin büyümeleri için gerekli oksijen ve besin maddelerinin interstisyel boşluktan akışına olanak sağlayan geçirgenliği arttırmaktadır. Bazı tümör damarlarının, tümör damarlarının sızdırabilirliğine katkıda bulunan düzensiz, gevşek bağlanmış, dallanmış, örtüşen ya da filizlenen endotelial hücrelerinden oluşan kusurlu bir hücre astarına sahip olduğu gözlenmiştir. Tümör bölgesindeki damar düzeni bozukluğunun varlığı, nanoboyutlu

taşıyıcıların damar dışına çıkmasını kolaylaştıracaktır. Organlar arasında sıvıların geçmesinde işlev gören lenfatik sistemin tümörlerdeki yokluğu, damar yoluyla geçirilen nanotaşıyıcıların çoğunlukla tümörde hapsolmasına neden olmaktadır [145]. Artan geçirgenlik ve tutulma (EPR) etkisi, kan dolaşımında yüksek stabilite özelliğine sahip 200 nm' den küçük nano boyutlu taşıyıcıların tümör bölgesinde akümüle olmasına neden olmaktadır (Şekil 2. 14) [138-139, 142, 145]. EPR etkisi genel olarak karaciğer tümörü, akciğer tümörü, böbrek kanseri ve beyin tümörleri dâhil olmak üzere birçok deneysel ve insan katı tümöründe gözlenmiştir [145]. Kanser tedavisinde taşıyıcı sistemi olarak kullanılan polimerik miseller, tümörde EPR etkisi tarafından özellikle hidrofobik anti kanser ilaçlarını taşıyabilen en umut verici nanotaşıyıcılardan biri olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte sadece birkaç polimerik misel formülasyonları, dâhil edilen anti kanser ilacının katı tümörlere pasif hedeflemesinde başarı göstermiştir [145, 146].



Şekil 2.14: Tümör damar yapısı ve artan geçirgenlik ve tutulma etkisinin şematik gösterimi [147].

Pasif hedefleme yaklaşımı, kullanılan taşıyıcı sisteminin sadece (< 200 nm) partikül boyutuna dayanması haricinde sistemin herhangi bir ilave işlevselleştirilmesini gerektirmemesinden dolayı gen tedavisi çalışmalarında ilgi odağı olmaktadır. Ancak bu yaklaşımının etkinliğinde

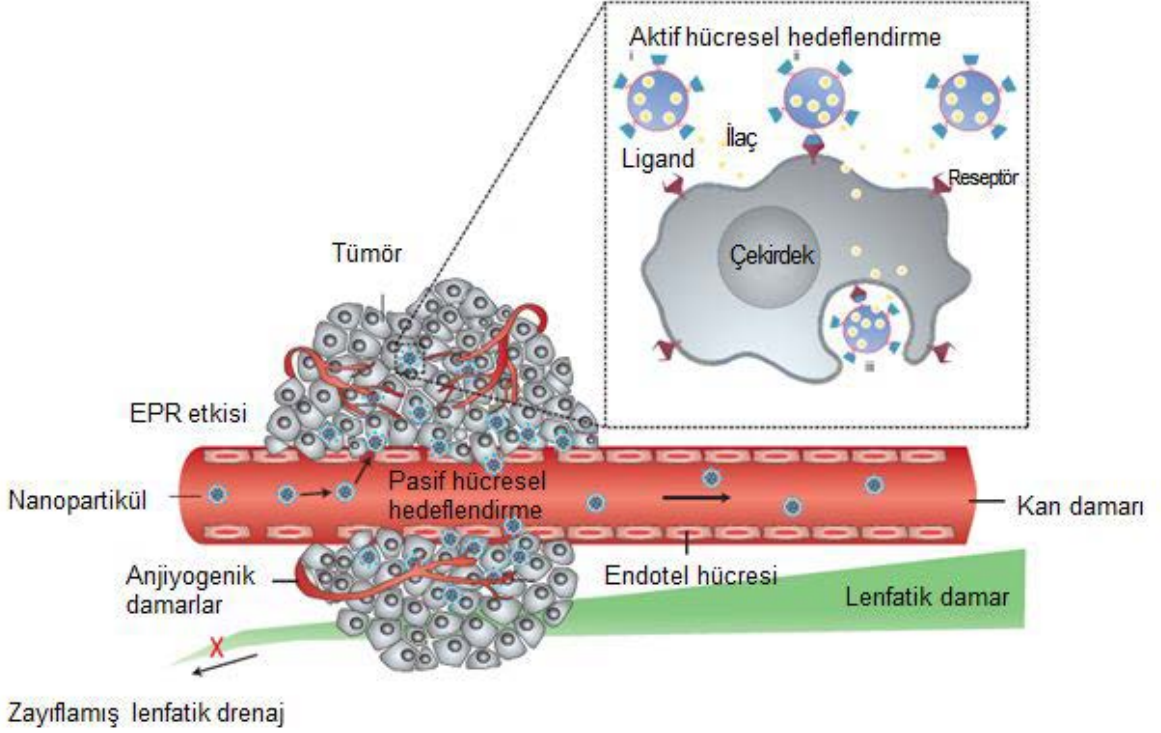
tümör türünün söz konusu olması, gerek kanser gerekse gen tedavisinin etkinliğinin her tümör türüne göre değişmesine neden olur. Buna ek olarak yaklaşımın hedef tümör dokularındaki etkinliği, kullanılacak taşıyıcının kan dolaşımındaki stabilitesi ve taşıdığı terapötik ajanları hedef tümör dokularına ulaştırana kadar herhangi bir degradasyona uğramamasına bağlıdır.

2.5.2. Aktif Hedefleme Yaklaşımı

Artan geçirgenlik ve tutulma (EPR) etkisinin bir sonucu olarak gerçekleşen pasif hedefleme, kullanılan nanoboyutlu taşıyıcının tümör dokusunda yüksek miktarda birikmesini sağlamaktadır. Bu durum partiküle yüklenmiş ilacın, hücrelere doğrudan girebilmesini garanti etmemektedir [145]. Buna ek olarak pasif hedefleme sürecinde, mukozal bariyerler başta olmak üzere nanopartiküllerin spesifik olarak tümörlü hücrelere taşınamaması ve alınamaması gibi birçok zorluk ve kısıtlama fark edilmektedir. Bu durum aktif hedefleme yaklaşımının kanser kemoterapisinde tercih edilmesine neden olmaktadır [148]. Reseptör-aracılı kanser tedavisinde, etkili bir tedavi için çok defa uygulanan yöntem, ilaç taşıyıcı sistemine antikorlar, büyüme faktörleri veya folik asit gibi birçok spesifik ligand bağlanarak ilaç taşıyıcının hücresel alım yetenekleri artırılmasıdır. Folat reseptörü genel olarak over, kolorektal ve meme kanserleri gibi epitelyal habis durumunda kanser hücrelerinin yüzeyinde aşırı bir şekilde bulunurken, çoğu sağlıklı hücrede ve dokuda çok düşük seviyelerde bulunmaktadır [149].

Aktif hedefleme yaklaşımı, antikor-antijen, ligand-reseptör vb. spesifik etkileşimlere dayanmaktadır. Bu yaklaşım, etken maddenin ya da taşıyıcı sistemin bir dokuya veya hücreye spesifik ligand ile konjuge edilerek, etken maddenin dizayn edilmesini gerektirmektedir. Bununla birlikte aktif hedefleme ile uygulanan kanser kemoterapisinde taşıyıcı olarak kullanılan nano boyutlu malzemeler, folik asit vb. gibi çeşitli afinite ligandları kullanılarak spesifik bölgeye bağlanmaya yönlendirilebilmektedir [148]. Hedeflenen taşıyıcı-ligand konjugatlarının hedef hücrelere spesifik olarak bağlandıktan sonra özümsemenin olup olmayacağı, kullanılacak uygun hedefleme ligandlarının seçiminde önemli bir kriterdir. Hücresel alım süreci (özümseme) genellikle reseptör aracılı endositoz vasıtası ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.15) [139]. Özetlenecek olursa, pasif hedefleme yaklaşımına bir tamamlayıcı yaklaşım olarak kabul edilen aktif hedefleme, taşıyıcının hücresel alımını teşvik ederek; taşıyıcının özgüllüğünü ve tedavinin etkinliğini arttırmaktadır [144]. Bugüne kadar

birçok polimerik nanopartikül taşıyıcıları, ligandlar ile konjuge edilip *in vitro* ve / veya *in vivo* çalışmalarda kullanılmıştır.



Şekil 2.15: Tümör damar yapısı ve aktif hücresel hedeflendirme yaklaşımının şematik gösterimi [143].

2.6. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarla ilgili geçmişten günümüze kadar yapılan literatür araştırmalarından çeşitli çalışmalar aşağıda özetlenerek verilmiştir.

Denis D. Ve ark., 2002, hedeflendirilmiş kanser tedavisinde kullanılmak üzere N-izopropil akrilamid (NIPAM) ve N'-etilendioksi-bis(etilakrilamid) monomerlerden pH'a duyarlı folat konjuge amfifilik blok kopolimeri (PNIPAM-NH-FA) sentezlemişlerdir. Kopolimerin kimyasal bileşimi $^1\text{H-NMR}$ ve UV/Vis spektroskopisi ile karakterize etmişlerdir. Hücresel alım çalışmalarda KB-31 tümörlü hücreleri kullanarak (PNIPAM-NH-FA) blok kopolimerin hücresel alım yeteneklerini incelemişlerdir. Kopolimerin hücresel alımının sıcaklığa bağlı olduğunu ve serbest folik asit ile rekabetçi bir şekilde azaldığını rapor etmişlerdir [149].

Seong E ve ark., 2002, poli(L-histidin) poliHis-5000/PEG-2000 ve PLLA-5000/PEG-2000 blok kopolimerleri kullanarak diafiltrasyon yöntemi ile pH'a duyarlı folat reseptörü aracılı hedeflendirilmiş polimerik misel blok kopolimerleri sentezlemişlerdir. Ürünlerin yapısını ¹H-NMR, FTIR ve DLS karakterize etmişlerdir. Sulu çözeltide nanopartikül hazırlanırken adriamisinini (ADR) enkapsüle etmişler ve *in vitro* şartlarda farklı pH ortamlarda salım özelliklerini incelemişlerdir. MCF-7 meme kanser hücrelerini kullanarak *in vitro* şartlarda polimerik misellerin hücresel alım ve sitotoksikite özelliklerini incelemişlerdir. Bu taşıyıcı sistemleri, katı tümörlerin *in vivo* tedavisi için yararlı olduğunu rapor etmişlerdir [150].

Xintao S. ve ark., 2004, hidrofobik özelliği taşıyan kanser etken maddenin taşıyıcısı olarak kullanılmak üzere amfifilik blok kopolimeri sentezlemişlerdir. Sentezledikleri amfifilik diblok kopolimeri, poli(ε-kaprolakton) ve poli(etilen glikol) sırasıyla hidrofobik ve hidrofilik kısımlardan oluşmuştur. Sulu çözeltilerde nanopartikül hazırlanırken hidrofobik özelliği taşıyan antikanser ilacı olan doksorubisin ile enkapsüle etmişler ve *in vitro* şartlardaki farklı pH ortamlarda salım davranışlarını incelemişlerdir. Kopolimer bileşiminde hidrofobik kısmı oluşturan PCL'un zincir uzunluğunu arttıkça diblok kopolimerin partikül boyutunun büyüdüğünü rapor etmişlerdir. 37 °C de pH 5.0 ortamda doksorubisin'in salınması, pH 7.4 ortamdan daha hızlı olduğunu rapor etmişler ve hidrofobik ilaçlar için uygun bir ilaç taşıyıcısı olduğunu rapor etmişlerdir [151].

Hyuk Sang Y. ve ark., 2004, hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemleri için amfifilik diblok kopolimeri sentezlemiştir. Sentezledikleri amfifilik diblok kopolimer, poli(laktid-ko-glikolid asit) ve poli(etilen glikol amin) sırasıyla hidrofobik ve hidrofilik kısımlardan oluşmuştur. Folat aracılı hedeflendirilmiş ilaç taşıma sistemleri elde etmek için sentezledikleri PLGA-b-PEG diblok kopolimerinin yapısında bulunan PLGA'nin anti kanser ilacının etken maddesi olan doksorubisin (DOX) kimyasal olarak konjuge etmişlerdir. Folat ligandı ise ayrı bir şekilde MPEG'nin terminal ucuna konjuge etmişlerdir. Ardından elde ettikleri DOX-PLGA-b-PEG ve PLGA-b-PEG-FOL şeklindeki iki diblok kopolimeri, serbest doksorubisin bulunduran sulu bir çözelti içinde fiziksel olarak karıştırarak karıştırılmış miselleri elde etmişlerdir. Misel yüzeyinde folat kısımları bulunurken, misellerin çekirdeğinde DOX'un fiziksel ve kimyasal olarak tutulduğunu gözlemledikleri rapor etmişlerdir. Hücresel alım çalışmalarda yüzeylerinde folat reseptörleri eksprese olan KB hücrelerini kullanarak, folat

takılı misellerinin hücrel tutulum yetenekleri, folat takılı olmayan misellerinkinden daha fazla olduğunu bulmuşlardır [152].

Eun K. ve ark, 2005, kontrollü salım ve tümör-hedefli ilaç taşıyıcı sistemleri olarak kullanılmak üzere amfifilik blok kopolimer miselleri hazırlamışlar ve hazırlanan blok kopolimerlerin yapıları; çekirdek kısmı ve kabuk kısmını sırasıyla hidrofobik poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) segmentleri ile poli(etilen glikol) (PEG) segmentleri oluşturmuştur. Ardından sentezledikleri kopolimer misellere, tümör hücrelerine özgü ilaç taşıma özelliğini kazandırmak amacı ile folik asit takmışlardır. Sulu çözeltilerde nanopartiküller hazırlanırken anti kanser ilacı olan paklitaksel'i, kopolimer misellere yüklemişlerdir. ¹H-NMR, FT-IR, GPC ve DLS teknikleri ile karakterize etmişlerdir. Sentezledikleri folat konjuge blok kopolimer misellerin partikül boyutlarının 50 ile 130 nm arasında değiştiğini bulmuşlardır. Hücrel alım ve sitotoksisite çalışmaları, MCF-7 ve HeLa iki farklı meme kanser hücrelerinin üzerinde yapmışlardır. Sentezlenen blok kopolimer misellerin hücrel alımlarını lazer taramalı konfokal mikroskobu ile doğrulamışlar ve MCF-7 meme kanser hücrelerinde folat konjuge blok kopolimer misellerin hücrel alım yeteneklerinin yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Tüm sonuçlar folat konjuge kopolimer misellerin hücrel alım yetenekleri tümörlü hücrelerin yüzeylerinde bulunan folat reseptörlerin miktarlarına bağlı olduğunun sonucuna varmışlardır [153].

Katherine J. ve ark, 2008, hedeflendirilmiş kanser tedavisinde kullanılmak amacı ile makromoleküller ligandları kullanarak poliester ve polieter esaslı dallanmış polimerleri modifiye ederek, anti kanser ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlamışlardır. Ürünlerin yapısını ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve GPC teknikleri ile karakterize etmişler, sulu çözeltilerde nanopartikül hazırlanırken anti kanser ilacı olan cisplatin (CisPt) enkapsüle etmişlerdir. Ardından *in vitro* şartlarda farklı pH ortamlarda salım davranışlarını incelemişlerdir. *In vitro* şartlarda yapmış oldukları ilaç salım çalışmalarından elde ettikleri sonuçlara göre, hazırladıkları dallanmış polimerlerinin cisplatin salımı için uygun olduğunu sonucuna varmışlardır [154].

Chen S. ve ark, 2008, kanser tedavisinde hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemi olarak kullanılabilecek amfifilik hiperdallanmış polimeri sentezlemişlerdir. Sentezlenen amfifilik hiperdallanmış kopolimerde, ticari olarak satılan hiperdallanmış alifatik poliester Boltorn H40 çekirdek olarak kullanılmıştır. Hidrofobik ve hidrofilik kısımlar olarak ise sırasıyla polikaprolakton (PCL) ve poli(etilen glikol) (PEG) kullanılmıştır. Elde ettikleri polimerin

yüzeyine, kanser hücresine karşı hedefleme özelliği kazandırmak için folik asit hedefleme ligandı olarak konjuge etmişlerdir. Ardından gerekli karakterizasyonlar yapıldıktan sonra, H40-PCL-PEG-FA nanopartiküllerine antikanser ilacı olan 5-Fu enkapsüle edilmiştir. İlaç salım özelliği ve yüklü ilaç nanopartiküllerin hücresel alım yeteneklerini farklı tümörlü hücrelerde *in vitro* şartlarda değerlendirilmiştir. Sentezledikleri amfifilik dallanmış polimeri, hücresel alım yeteneklerinin yüksek olduğunu ve kanser tedavisinde hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemi olarak kullanılabileceğini rapor etmiştir [155].

Zhao H. ve arkadaşları, 2008, folat konjuge polimer misellerinin farklı tümör hücrelerine karşı gösterdiği seçiciliği incelemek için, poli(D,L-laktid-ko-glikolid asit) (PLGA) ve poli(etilen glikol) (PEG) esaslı amfifilik diblok kopolimeri sentezlemişlerdir. Ardından sentezledikleri PLGA-ko-PEG diblok kopolimere hedefleme özelliği taşıyan folik asidi bağlamışlardır. Takiben poli(D,L-laktik-ko-glikolid)-b-poli(etilen glikol)-folat (PLGA-b-PEG-FOL) diblok kopolimeri kullanarak, miselleri oluşturup antikanser ilacı olan doksorubisini enkapsüle etmişlerdir. Elde ettikleri ilaç yüklü diblok kopolimerin, ilaç yükleme kapasitesi, enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* salım özelliklerini belirlemişlerdir. Folat konjuge misellerinin hedefleme yeteneğini değerlendirmek için, miktarca birbirlerine farklı folat reseptörü içeren (KB, MATB III, C6) üç kanser hattı ve normal fibroblast (CCL-110) hücreleri üzerinde DOX-yüklü misellerinin gösterdiği toksisite ve hücresel alım yeteneklerini karşılaştırmışlardır. Folat konjuge kopolimerin kanser hücrelerde gösterdiği toksisite, normal hücrelerdekinden daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Buna ek olarak normal hücrelerde, folat konjuge kopolimer ile folat konjuge olmayan kopolimer arasında herhangi bir hücresel alım farkı olmadığını rapor etmiştir. Farklı hücre hatları (KB, MATB III, C6) ve insan fibroblast hücreleri (CCL-110)'un yüzeyi üzerindeki eksprese olan folat reseptörünün miktarlarını akış sitometrisi ile değerlendirip, KB hücre hattının yüzeyi üzerindeki folat reseptörü diğer hücre hatlarına göre miktarca daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca da akış sitometrisinden elde ettikleri sonuç, yapılan *in vitro* hücresel alım çalışmalarda KB hücre hattının hücresel tutulum yetenekleri diğerlerine göre daha yüksek olduğunu bularak kanıtlamışlardır [156].

Anjan K. ve ark, 2010, metoksi poli etilen glikol (MePEG), ϵ -kaprolakton (CL) sırasıyla hidrofobik ve hidrofilik kısmı olarak, (Sn(Oct)₂) katalizör olarak kullanarak; ϵ -CL'un halka açılma polimerizasyon metodu kullanılarak amfifilik diblok kopolimerleri sentezlemişlerdir.

Ürünlerin yapısını ¹H-NMR, FT-IR ve GPC teknikleri ile karakterize etmişlerdir. Sulu çözeltilerde nanopartikül hazırlanırken diblok kopolimerlere antikanser ilacı olan etoposide bağlamışlardır. Sentezlenen diblok kopolimerlerin partikül boyutlarının 250 nm'den küçük olduğunu bulmuşlardır. Diblok kopolimerlere etoposidenin yükleme etkinliğinin %68 olduğunu bulmuşlardır. MIA-PaCa-2 pankreatik kanser hücrelerini kullanarak *in vitro* şartlarda polimerik misellerin hücresel alım ve sitotoksikite özelliklerini incelemişler ve buna olarak pankreatik kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediğini bulmuşlardır. Tüm sonuçlar sentezledikleri etoposide-yüklü MePEG/PCL blok kopolimerik misellerin, pankreas tümör tedavisinde etkili bir ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabileceğini sonucuna varmışlardır [157].

Wang T. Ve ark., 2010, anti kanser ilacı olan doksorubisin'in tümörlü hücrelerde kontrollü bir şekilde salınmasını sağlayabilen polikaprolakton ve dallanmış polimerler esaslı polimerik nanotaşıyıcıları sentezlemişlerdir. Sentezlenmiş amfifilik dallanmış kopolimeri, hiperdallanmış poli(amino ester) (HPAE) ve poli(epsilon-kaprolakton) ile oluşmuştur. Ardından doksorubisini, amfifilik kopolimerin hidrofobik çekirdeğine enkapsüle etmişlerdir. Dallanmış poli(amino ester)'in miktarını sabit tutarak, poli(e-kaprolakton)'un miktarlarını değiştirerek uzunluk açısından farklı PCL segmentlerden oluşan amfifilik dallanmış kopolimeri elde etmişlerdir. Ancak elde edilen nanopartikül boyutunun, kopolimer bileşimindeki PCL segmentleri arttıkça büyüdüğünü rapor etmişlerdir. *In vitro* ilaç salım çalışmaları, 37 °C de farklı ph ortamlarda (5.0 ve 7.4) gerçekleşmiştir. 37 °C de pH 5.0 ortamda doksorubisin'in salınması, pH 7.4 ortamdan daha hızlı olduğunu rapor etmişlerdir [158].

Xu Q., Liu Y., arkadaşları, 2012, suda çözünmeyen hidrofobik özelliği taşıyan anti kanser ilaçların taşınmasını sağlayabilen ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlamak amacı ile poli(amino ester) esaslı dallanmış polimerleri RGD peptid ve transferrin ile konjuge etmişlerdir. Sulu çözeltilerde anti kanser ilacı olan paklitaksel nanopartiküllere enkapsüle ederek anti kanser ilaç yüklü nanopartikülleri hazırlamışlar ve farklı pH ortamlarda salım davranışlarını incelemişlerdir. *In vitro* şartlarda yapmış oldukları hücresel alım çalışmalarından elde ettikleri sonuçlara göre, nano-boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin hücresel alım yetenekleri iyi olduğunu sonucuna varmışlardır. [159].

Muharrem S. ve ark.,2015, ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmak üzere poli(metil metakrilat-blok-poli(hidroksietil metakrilat) (PMMA-b-PHEMA) nano-boyutlu amfifilik

yıldız-dallanmış blok kopolimerlerin sıralı görünür ışıqla kendiliğinden yoğunlaşan vinil polimerizasyon (SCVP) ve konvansiyonel vinil polimerizasyon metotları ile sentezlemişlerdir. Elde edilen amfifilik yıldız dallanmış blok kopolimerlere hedefleme özelliği kazandırmak için başlangıçta hücre hedefleme (RGD) ile penetran peptidler (Cys TAT) EDC/NHS kullanarak birbirine bağlanmıştır. Ardından hücre hedefleme özelliği taşıyan peptidler (RGD/Cys-TAT) blok kopolimerlerin yüzeylerine bağlamışlardır. Takiben doxorubicin etken madde olarak kullanarak ilaç yükleme, *in vitro* şartlarda salım ve hücresel alım davranışları incelemişlerdir [160].

Karolina A. Ve ark., 2016, metoksi poli(etilen glikol), ϵ -kaprolakton, adipik asit ve gliserol kullanarak dallanmış poli ester esaslı biyobozunur çekirdek-çoklu kabuk nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlamışlardır. Çekirdek-çoklu kabuk nano taşıyıcının yapıları; çekirdek kısmını dallanmış poli ester, iç ve dış kabuk kısmını sırasıyla hidrofobik poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) segmentleri ile poli(etilen glikol) (PEG) segmentleri oluşturmuştur. Ürünlerin yapısını $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FTIR, DSC, DLS ve GPC ile karakterize etmişlerdir. Sulu çözeltilerde nanopartikül hazırlanırken hidrofobik özelliği taşıyan dezametazon ilacı enkapsüle etmişler ve NMR spektroskopisi yardımı ile enzim aracılı biyobozunabilirliğini incelemişlerdir. Tüm sonuçlar HPES-PCL-PEG çekirdek-çoklu kabuk nano taşıyıcı sistemleri, hidrofobik özelliği gösteren ilaçları taşıyabileceği ve 320C deri sıcaklığında bozunabileceğini sonucuna varmışlardır [161].

Fang D. ve ark., 2016, ticari dallanmış poli(gliserol amin), metoksi poli(etilen glikol) ve ϵ -kaprolakton kullanarak, deri hastalıklarında ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmak üzere biyobozunur dallanmış çekirdek-çoklu kabuk nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemleri hazırlamışlardır. Çekirdek-çoklu kabuk nano taşıyıcının yapıları; çekirdek kısmını dallanmış poli(gliserol amin), iç ve dış kabuk kısmını sırasıyla hidrofobik poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) segmentleri ile poli(etilen glikol) (PEG) segmentleri oluşturmuştur. Ürünlerin yapısını $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, FTIR, DLS ve GPC ile karakterize etmişlerdir. Sulu çözeltilerde nanopartikül hazırlanırken anti enflamasyon ilacı olan dezametazon (Dexa) enkapsüle etmişler ve PCL'un zincir uzunluğu arttıkça taşıma kapasitesinin iyileştiğini gözlemlemişlerdir. *In vitro* şartlarda yapmış oldukları deri geçirgenlik çalışmaları, HPG-PCL-PEG çekirdek-çoklu kabuk nanotaşıyıcı sistemleri deri hastalıklarının tedavisinde uygulandığında elde edilen sonuç diğer uygulanan konvansiyonel yöntemine göre daha etkili

olduğunu göstermişlerdir. Buna ek olarak çekirdek-çoklu kabuk nanotaşıyıcı; stabilitesi iyi ve düşük sitotoksistede olduğunu bulmuşlardır [162].

Hongliang C. ve ark., 2017, pH'a duyarlı polimerik ilaç taşıyıcı sistemi olarak kullanılmak üzere deaktivasyon arttırılmış atom transferi radikal polimerizasyonu ile hiperdallanmış amfifilik blok kopolimeri (PEG-200-b-PACD) sentezlemişlerdir. Sentezledikleri blok kopolimerin hidrofobik kısmına anti kanser ilacı olan doksorubisini enkapsüle etmişlerdi. DOX-yüklü blok kopolimerin boyutunun 70 ile 100 nm arasında olduğunu rapor etmişlerdir. *In vitro* salım ortamı olarak farklı pH çözeltiler hazırlanarak, elde ettikleri polimerik misellerin pH'a ne kadar duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Hücresel alım incelenmesi HeLa hücreleri üzerinde gerçekleştirerek, sentezlenen blok kopolimerin hücresel alım yetenekleri yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Buna ek olarak sentezledikleri dallanmış amfifilik kopolimeri, ileri ki yıllarda kanser tedavisi için kullanılabilecek umut verici bir taşıma sistemi olduğunu öngörmüşlerdir [163].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin sentezi, karakterizasyonu ve ilaç kinetiğinin incelenmesi konu başlıklı tez çalışmasında gerçekleştirilen sentez ve modifikasyon işlemleri için; Metil akrilat (Sigma-Aldrich), 1-6-hekzandiamin (Merck) ve Etoksi-trimetilol propan (Et-TMP, Perstorp) dallanmış poli (amino ester)'in (DPAE) sentezinde monomerler olarak kullanılmıştır. Poli(etilen glikol) monometil eter (MePEG-2000 ve MePEG-5000, Sigma-Aldrich) ve ϵ -kaprolakton (CL, Sigma-Aldrich) poli (etilen glikol)-b-polikaprolakton (MPEG-b-PCL) blok kopolimerin hazırlanmasında monomerler olarak kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında Metanol (Sigma-Aldrich), Kloroform (CHCl_3 , Merck), N,N-di-metilformamid (DMF, Sigma-Aldrich), Dimetil sülfoksit (DMSO, Merck), Diklorometan (DCM, Merck), 1,4-dioksan (Carlo Erba), Dietil eter (Et_2O , Sigma-Aldrich), Asetik asit (AA, Merck), Etil asetat (EA, Merck) ve n-hekzan (Merck) çözücü olarak kullanılmıştır. Alüminyum klorür (AlCl_3 , Merck), Dibutil kalay dilaurat (Merck) ve 4-dimetil amino piridin (DMAP, Sigma-Aldrich) katalizör olarak kullanılmıştır. Çalışmada süksinik anhidrit (SA, Sigma-Aldrich), hazırlanan blok kopolimerin yüzeyine karboksil grubunun modifikasyonu için kullanılmıştır. 1-Etil-3-(3-dimetil amino) propil) karbodiimid (EDAC, Sigma-Aldrich) karboksil gruplarının aktifleştirici maddesi olarak kullanılırken, Folik asit (FA, Sigma-Aldrich) hedefleme ajanı (ligand) olarak kullanılmıştır. Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4 , Sigma-Aldrich), Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich), Sodyum klorür (NaCl , Sigma-Aldrich), sodyum asetat (CH_3COONa , Sigma-Aldrich) gibi malzemeler ilaç salım çalışmalarında kullanılan tampon çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında anti kanser ilaç olarak Doksorubisin (DOX, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

Yapılan tez çalışmasında 1,6-hekzandiamin ve metil akrilat saflaştırılarak, diğer kimyasallar ise herhangi bir ön işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır.

3.2. KULLANILAN CİHAZLAR

Tez çalışmaları kapsamında sentez ve modifikasyon işlemleri ile karakterizasyon ve salım çalışmaları işlemlerinde çeşitli cihazlardan faydalanılmıştır. Buna göre, GLF-2008 marka su cihazı, çalışmada kullanılan saf su eldesinde kullanılmıştır. Tampon çözeltilerin hazırlanmasında ve diyaliz işlemlerinde Thermo Scientific, Barnstead ultra saf su cihazı kullanılmıştır. Çalışmalardaki hassa tartım işlemleri için Precise 205 A 5 CS ve Radwag AS 220/C/2 modellerindeki hassas teraziler kullanılmıştır. Salım çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan tampon çözeltilerin pH'larının belirlenmesinde Thermofisher Scientific™, Orion Star™ A111 Benchtop model pH-metre cihazı kullanılmıştır. Çalışma esnasında saflaştırma işlemleri için Buchi markalı vakum evaporatör kullanılmıştır. Elde edilen ürünlerin kurutulmasında Memmert markalı vakumlu etüv kullanılmıştır. Elde edilen bazı ürünler ve hazırlanan etken madde içerikli polimerik nanopartikülleri kurutulmak amacı ile Telstar, Lyoquest Liyofilizatör cihazı kullanılmıştır. Kullanılan bu cihazların yanı sıra tüm sentez ve modifikasyon işlemleri için standart laboratuvar cam malzemeleri ve ekipmanları kullanılmıştır.

Sentezlenmiş ürünlerin karakterizasyonları ve salım özelliklerini belirlemek için, hazırlanan antikanser ilaç içerikli polimerik nanopartiküllerden ortama salınan ilacın derişimini belirlemek ve salım özelliklerini incelemek amacıyla Thermofisher Scientific marka GENESYS 10S model UV-VIS Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Sentezlenen ürünlerin kimyasal yapı analizlerini gerçekleştirilmek üzere Jasco marka FT / IR-4600 model Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi kullanılmıştır. Hazırlanan örneklerin yüzey yüklerini ve partikül boyutlarını belirlemek amacı ile Malvern Zetasizer Nano series cihazı kullanılmıştır.

3.3. SENTEZ VE MODİFİKASYON İŞLEMLERİ

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, reseptör aracılı kanser tedavisinde tümör etken maddenin taşıyıcısı olarak kullanılmak üzere; dallanmış poli(amino ester) esaslı pH'a duyarlı amfilik lineer metoksi poli(etilen glikol)-b-polikaprolakton (DPAE-PCL-b-MPEG) blok kopolimer hazırlanmış ve daha sonra nanoçöktürme yönteminden yararlanarak etken madde içerikli polimerik nanopartiküller elde edilmiştir. Bununla birlikte elde edilen etken madde yüklü polimerik nanopartiküllerin, farklı pH değerlerindeki hazırlanmış tampon çözeltilerde

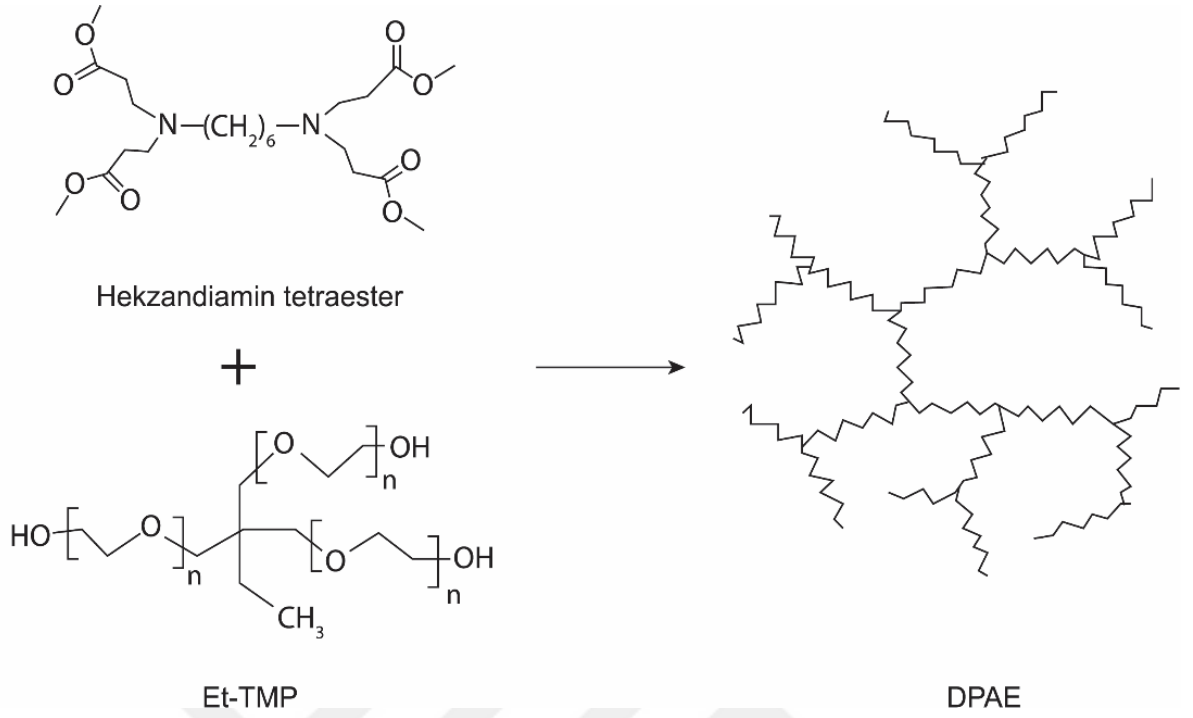
(pH=5,5 ve pH=7,4) ve sıcaklık değerleri 25⁰C salım ortamında salınan ilacın derişimi ölçülerek, farklı pH'larda polimerik nanopartiküllerin kümülatif ilaç salım miktarları ve salım kinetikleri incelenmiştir.

3.3.1. 1-6-Hekzandiamin ve Metilakrilat ile oluşan AB₂ Monomerin Hazırlanması

Tez çalışmasında, 1,6-hekzandiamin ve metil akrilat ile oluşan AB₂ monomerler hazırlanmıştır. 1,6-hekzandiamin (2,324 g, 20 mmol) tek boyunlu reaktöre alınıp 10 ml metanolle çözündürülmüş ardından saflaştırılmış metil akrilat (135 ml, 1,5 mol) ilave edilmiştir. Ardından elde edilen reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 52 saat boyunca karıştırılmıştır. Öngörülen reaksiyon süresinin sonunda, reaksiyon karışımı manyetik karıştırıcıdan alınıp metil akrilat'nın reaksiyona girmemiş kısmı vakum evaporatörde 26 ⁰C'de 110 ile 50 mbar arasında değişen basınçlarda destillenme işlemine tabi tutulmuştur ve ardında 25 ⁰C vakum etüvünde bir gün boyunca bekletilerek 1,6-hekzandiamin ve metil akrilat ile oluşan AB₂ monomeri elde edilmiştir. Elde edilen ürün +4⁰C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.3.2. Dallanmış Poli(amino ester) (DPAE)'in Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan dallanmış poli (amino ester) (DPAE) AB₂ monomer olarak 1,6-hekzandiamin ve metil akrilat ile hazırlanan üründen, çekirdek olarak, polifonksiyonel alkol grubu içeren Et-TMP ve AlCl₃ katalizörlüğünde hazırlanmıştır (Şekil. 3.1).



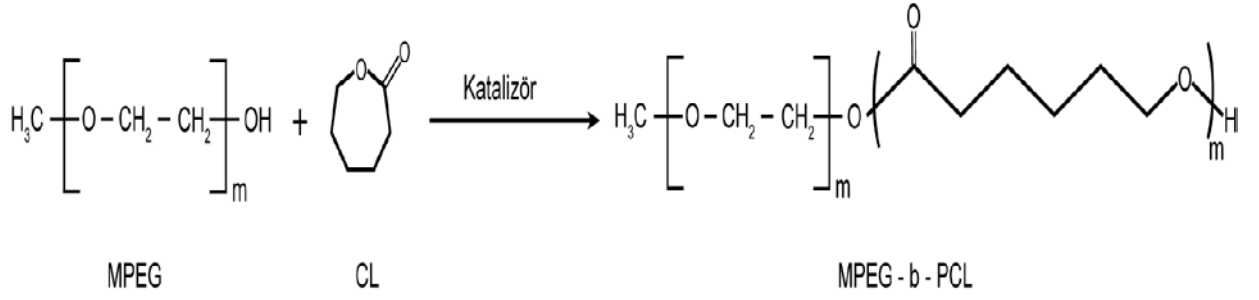
Şekil 3.1: Dallanmış poli(amino ester) sentezi.

Bu amaçla ilk olarak AlCl_3 (0,04 g, 0,3 mmol) tartılıp 100 ml'lik tek boyunlu cam reaktöre koyulmuş, üzerine 2 ml AB_2 monomer ve 1 ml Et-TMP ilave edilmiştir. Ardından reaksiyon karışımı, manyetik karıştırıcıda 120°C 'de gliserin banyosuna yerleştirilmiştir. Reaksiyon, 120°C 'de azot atmosferinde 5 saatte gerçekleştirilmiştir. Öngörülen reaksiyon süresinin sonunda, reaksiyon sıcaklığı 90 ile 100°C aralığına düşene kadar azot atmosferinde reaksiyon karışımı karıştırmaya devam edilmiştir. Elde edilen viskoz üründe bulunan AlCl_3 katalizörü uzaklaştırılmak üzere, viskoz ürünün üzerine 20 ml CHCl_3 ilave edilip ürün tamamen çözünene kadar oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ürünün tamamen çözündüğünde santrifüj tüplerine alınarak 7500 rpm'de 10°C de santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve takiben 0,45 μm 'lik filtrelerden geçirilerek katalizör uzaklaştırılmıştır. Ardından, çözücünün bir kısmı 26°C de 50 ile 110 mbar arasında değişen basınçlarda vakum evaporatörde uzaklaştırılıp diğer kısım da 25°C de vakum etüvünde uzaklaştırılarak nihai ürün elde edilmiş ve buzdolabında saklanmıştır.

3.3.3. Poli (etilen glikol)-b-polikaprolakton (MPEG-b-PCL) blok Kopolimerin Hazırlanması

MPEG-b-PCL diblok kopolimerin sentezi, ϵ -CL'un katalizör eşliğinde halka açılma polimerizasyonu ile gerçekleştirildi [151]. Bu çalışmada, molekül ağırlığı bakımından birbirinden farklı iki poli(etilen glikol) (MPEG2000 ve MPEG5000) homopolimer makro başlatıcı olarak kullanılarak molekül ağırlığı açısından birbirinden farklı iki blok kopolimer hazırlanmıştır (Şekil 3.2).

Mol oranı (MPEG2000/ ϵ -CL ve MPEG5000/ ϵ -CL=1/20 mol/mol) olacak şekilde 2,5 mmol MPEG ve 0,055 mol CL alınarak, 100 ml'lik bir cam reaktörüne aktarılmıştır. Katalizör olarak, (Dibütil kalay dilaurat) ϵ -kaprolaktonun molce %1'i kadar alınarak reaksiyon karışımının üzerine ilave edilmiştir. Ardından reaksiyon karışımı, manyetik karıştırıcıda 60 $^{\circ}$ C'de 10 dakika azot gazı geçirilmiştir. Ön görülen azot gazı geçirme süresi sona erdiğinde, azot gazı geçirme borusu çıkarılıp reaksiyon karışımının bulunduğu cam reaktörünün ağzı tamamen kapatılıp 120 $^{\circ}$ C'ye çıkarılmıştır ve 24 saat karıştırılma işlemi devam etmiştir. Reaksiyon süresinin sonunda reaksiyon sıcaklığı 90 $^{\circ}$ C'ye geldiğinde reaksiyon karışımının üzerine 40 ml CH_2Cl_2 ilave edilip 15 dakika daha karıştırma işlemi devam edilmiştir. Takiben elde edilen polimer çözeltisinin, çözücü-çöktürme yöntemi ile saflandırılmak amacı ile manyetik karıştırıcıda karıştırılmakta olan 150 ml soğuk metanol'ün üzerine mikro pipetle yardımıyla damlatılmıştır. Ardından, oluşan beyaz çökelti mavi süzgeç kağıdı ile vakumlu süzme işlemine tabi tutularak 40 $^{\circ}$ C de vakum etüvünde 24 saatte kurutulmuştur. Kurutulmuş polimer liyofilize edilmiş ve desikatörde saklanmıştır.



Şekil 3.2: Poli (etilen glikol)-b-polikaprolakton (MPEG-b-PCL) blok kopolimerin hazırlanması.

3.3.4. Dallanmış Poli(amino ester) esaslı Amfifilik Blok Kopolimerin (DPAE-MPEG-b-PCL) Hazırlanması

DPAE-MPEG-b-PCL ürünlerinin elde edilmesi için öncelikle kullanılacak olan MPEG-b-PCL; SA ile reaksiyona sokularak uçlarında karboksil grubu bulunduran blok kopolimer ürünü elde edilmiştir. İlk olarak aşağıdaki tabloda (Tablo 3.1) verilen kimyasalların miktarlarına göre, gerekli miktarda MPEG-b-PCL alınıp 1,4-dioksan'da oda sıcaklığında çözülerek homojen hale gelene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen homojen karışımın üzerine gerekli miktarda SA ve DMAP ilave edilip 30 dakika azot gazı geçirildikten sonra, oda sıcaklığında 50 saatte manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Öngörülen reaksiyon süresi sona erdiğinde, reaksiyon karışımı buz banyosuna yerleştirilmiş, hacimce eşit miktarlarda hazırlanmış soğuk (n-hekzan ve dietil eter) karışımının üzerine mikro pipetle yavaşça damlatılarak çöktürülmüştür. Çökeltilerin bulunduğu karışımın üst fazı ayrılarak kalan kısmı mavi süzgeç kağıdı ile vakumlu süzme işlemine tabi tutulmuştur. Takiben elde edilen ürüne vakum etüvünde 25 °C de 24 saat kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1: MPEG-b-PCL-COOH hazırlanması için gerekli kimyasalların miktarları.

Nihai ürün	MPEG-b-PCL		Çözücü	Süksinik	DMAP
	(1 eq)		(1,4-dioksan)	anhidrit	(1 eq)
	(g)		(ml)	(2 eq)	(g)
				(g)	
2B-COOH	2B	2	50	0,1713	0,1045
2D-COOH	2D	3	12	0,1567	0,0956

(2B=MPEG*-B-PCL, MPEG*-2000 g/mol) ve (2D=MPEG**-b-PCL, MPEG**-5000g/mol)

Tablo 3.2’de verilen miktarlarda karboksillenmiş MPEG-b-PCL (PEG-b-PCL-COOH) blok kopolimer DMF’te çözülerek oda sıcaklığında homojen karışım elde edene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Ardından, tamamen homojen bir şekilde çözünmüş polimer karışımının üzerine gerekli EDAC miktarı ilave edilip azot gazı geçirildikten sonra, oda sıcaklığında azot atmosferde 1 saat karıştırılmıştır. Takiben 2 ml DMF’te çözünmüş DPAE alınıp manyetik karıştırıcıda karıştırılmakta olan reaksiyon karışımının üzerine ilave edildikten sonra azot gazı geçirilip 24 saatte karıştırılmıştır. 24 saatin sonunda DMAP ilave edilip 15 dakika daha azot gazı geçirildikten sonra 72 saatte karıştırmaya devam edilmiştir. Öngörülen reaksiyon süresinin sonunda, elde edilen reaksiyon ürünü diyaliz membranına (MWCO: 12000 Da) alınarak ultra saf suya karşı 5 gün diyalize edilip, liyofilize işlemine tabi tutularak kurutulmuştur.

Tablo 3.2: DPAE-PCL-b-PEG hazırlanması için gerekli kimyasalların miktarları.

Nihai ürün	MPEG-b-PCL-COOH		EDAC	DMAP	DPAE	Çözücü (DMF)
	(1 mmol)		(1.1 mmol)	(1 mmol) (mg)	(0.1 mmol)	(ml)
	(g)		(mg)		(mg)	
DPAE-2B	2B-COOH	1	90,4	52,3	100	15
DPAE-2D	2D-COOH	1	55,2	32	100	10

(2B=MPEG*-B-PCL, MPEG*-2000 g/mol) ve (2D=MPEG**-b-PCL, MPEG**-5000g/mol)

3.3.5. DPAE-PCL-b-MPEG Ürünlerine Ligand Konjugasyonu

Bu çalışmada hedeflenme ajanı olarak kullanılacak folik asit, yapısında bulunan karboksilik asit (-COOH) grubu EDAC ile aktive edilip DPAE-PCL-b-MPEG ürünün (-OH) üç grupları ile reaksiyona sokularak yapıya konjuge edilmiştir.

Standart bir reaksiyon prosedürü olarak, belirli miktarda DPAE-PCL-b-MPEG ürünü DMF veya DMSO’te çözülerek homojen karışım elde edilene kadar oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ardından çözünmüş haldeki polimerlere folik asit ilave edilerek 30 dakika daha karıştırılmış ve takiben reaksiyon ortamına EDAC ilavesi yapıp 15 dakika azot gazı geçirilerek oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 24 saatte karıştırılmıştır. 24 saatin sonunda EDAC reaksiyon ortamına DMAP ilave edilip 15 dakika azot gazı geçirilerek, reaksiyon oda sıcaklığında 24 saat daha karıştırılmaya devam edilmiştir. Öngörülen reaksiyon süresinin sonunda, elde edilen reaksiyon ürünü diyaliz membranına (MWCO: 3,500 Da) alınıp ultra saf suya karşı 5 gün diyalize edilmiş ve liyofilize işlemine tabi tutularak kurutulmuştur.

DPAE-PCL-b-MPEG-FA ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan kimyasalların miktarları Tablo 3.3’te verilmiştir.

Tablo 3.3: DPAE-PCL-b-MPEG-FA ürünlerinin hazırlanması koşulları.

Nihai ürün	DPAE-PCL-b-MPEG	EDAC	DMAP	Folik asit	Çözücüler
	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(ml)
DPAE-2B-FA	DPAE-PCL-b-MPEG*	1,5	33	19,5	67,5 (DMF) 45
DPAE-2D-FA	DPAE-PCL-b-MPEG**	2	44	26	90 (DMSO) 40

(2B=MPEG*-B-PCL, MPEG*-2000 g/mol) ve (2D=MPEG**-b-PCL, MPEG**-5000g/mol)

3.3.6. İlaç Yükleme Çalışmaları

Tez çalışmasında etken madde içerikli nanopartiküllerin hazırlanmasında nanoçöktürme yöntemi uygulanmıştır.

İlk olarak deney tüpleri alınıp her birinin içerisine 10 mg polimer koyulmuştur. Ardından üzerlerine (10/10; 10/5; 10/2,5; 10/1; ve 10/0,5) polimer/ilaç oranlarında olacak şekilde farklı miktarlarda ilaç ilave edilip 1'er ml DMSO'da çözülerek homojen karışımı elde edene kadar oda sıcaklığında karıştırıcıda 48 saatte karıştırılmıştır. Elde edilen “polimer-ilaç” çözeltisi, manyetik karıştırıcıda sabit bir hızda “1500 rpm” karıştırılmakta olan 9 ml ultra saf suyun üzerine mikro pipet yardımıyla damla damla ilave edilmiştir. Ardından ilaç içerikli nanopartiküllerin oluşması için manyetik karıştırıcıda 2 saat karıştırılmıştır. Karıştırma sonucunda elde edilen ilaç içerikli nanopartikül çözeltisi, sadece serbest kalan ilacın uzaklaştırılması için diyaliz membranına (MWCO: 500-1000 Da) alınıp ultra saf suya karşı 24 saat diyaliz edilmiş ve liyofilize işlemine tabi tutularak kurutulmuştur.

Tablo 3.4: Anti kanser ilacı içerikli nanopartiküllerinin hazırlanma koşulları.

ÖRNEK	YÖNTEM	ÇÖZÜCÜ	ORTAM
DPAE-2B-FA-DOX	Nanoçöktürme	DMSO	Ultra saf su
DPAE-2D-FA-DOX	Nanoçöktürme	DMSO	Ultra saf su

Yukarıdaki metinde bu tabloda belirlenen koşullara göre anti kanser ilacı içerikli nanopartiküllerin hazırlanma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.6.1. Nanopartiküllerin İlaç Yükleme Kapasitesi ve Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada ilk olarak, 3.3.6 bölümünde anlatıldığı şekilde elde edilmiş liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuş, etken madde içerikli nanopartikül örneklerinin her birinden eşit miktarlarda

örnek alınıp ayrı ayrı farklı deney tüplerine koyulmuştur. Takiben sadece etken maddenin çözünebileceği bir organik çözücü kullanılarak, üzerlerine 5'er ml çözücü ilave edilmiştir. Ardından örnekler, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 72 saatte karıştırılmıştır. Öngörülen karıştırma süresi sona erdiğinde, örnekler, 8000 rpm'de 20 °C'de 1 saatte santrifüj edilerek supernatant kısımdan 1'er ml alınıp UV/VIS Spektrofotometresi ile 480 nm dalga boyunda DOX absorbans ölçümleri yapılmıştır. Ardından farklı konsantrasyonlardaki etken madde-çözücü çözeltileri elde edilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak, etken maddenin yükleme etkinliği (% YE) ve yükleme kapasitesi (% YK) aşağıdaki eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\%YE = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\%YK = \frac{W_1 - W_2}{W_3} \times 100 \quad (3.2)$$

W_1 toplam etken madde miktarı (mg), W_2 enkapsüle olmayan etken madde miktarı (mg), W_3 ise nanopartikül ağırlığıdır (mg).

3.3.7. *In Vitro* İlaç Salım Çalışmaları için Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

Tez çalışmasında sentezlenen polimerik nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemlerinin in vitro koşullarda salım davranışları, pH 5,5 ve pH 7,4 tampon çözeltilerde incelenmiştir.

3.3.7.1. *pH=5,5 Asetat tampon çözeltisinin Hazırlanışı*

Bu çalışmada ilk olarak 0,1 M sodyum asetat çözeltisi hazırlanıp (8,204 g CH_3COONa tartılıp ultra saf suda çözülerek 1000 ml'ye tamamlandı) A çözelti olarak adlandırıldı. Ardından, 0,1 M asetik asit çözeltisi hazırlanıp (% 99,9'luk saflıktaki asetik asitten 5,746 ml'si alınıp ultra saf su ile 1000 ml'ye tamamlandı) B çözelti olarak adlandırılmıştır.

Daha sonra, hazırlanan A çözeltiden 840 ml alınıp 1000 ml'lik bir balona aktarılıp üzerine 160 ml B çözelti ilave edilerek pH 5,5 asetat tampon çözeltisi hazırlanmıştır.

3.3.7.2. pH=7,4 Fosfat tampon tuz çözeltisinin Hazırlanışı

Çözelti eldesi için 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ ve 240 mg KH₂PO₄ tartılıp 1000 mL'lik bir balona aktarıldı ve üzerine az miktarda ultra saf su eklenip çözününceye kadar çalkalandı. Ardından pH'si kontrol edilip ultra saf su ile 1000 mL'ye seyreltilmiştir.

3.3.8. İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması

İlaç yüklü nanopartiküllerin hazırlanma işlemi, başlık 3.3.6.1'de açıklanan aşamadaki optimum polimer/ilaç oranı gösteren örneğin üzerinde gerçekleştirildi. Buna göre 10/5 en uygun polimer/ilaç oranı seçildi.

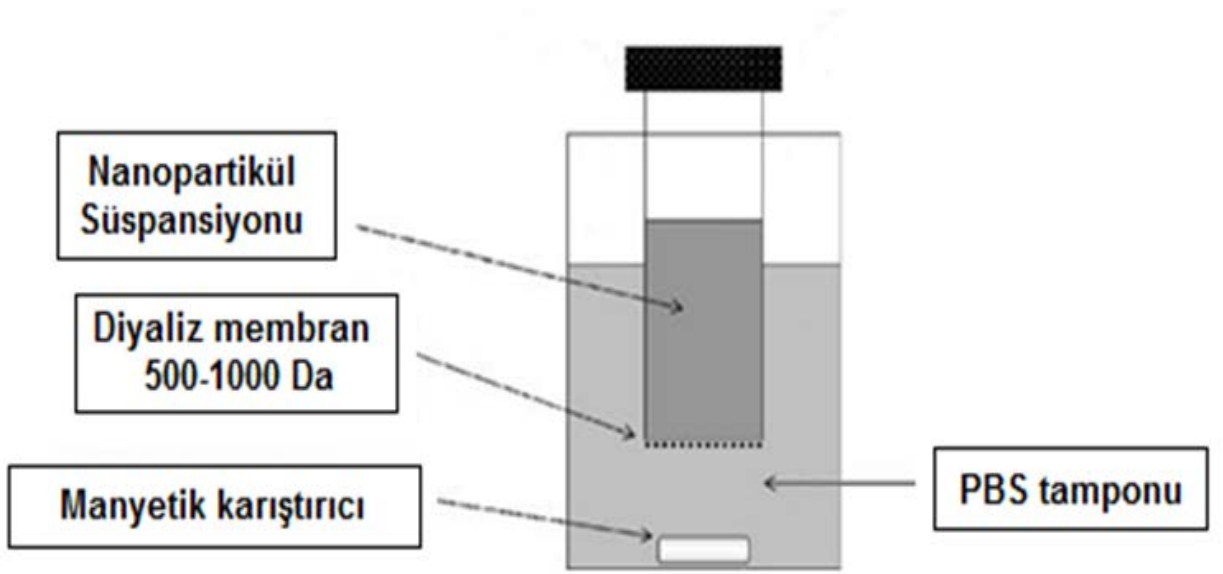
İlk olarak, 10 mg polimer ve 5 mg ilaç tartılıp 1 ml DMSO'da çözülerek manyetik karıştırıcıda 72 saatte karıştırıldı. Öngörülen karıştırma süresinin sonunda, elde edilen homojen polimer-ilaç çözeltisi, oda sıcaklığında 1500 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırılmakta olan 9 ml ultra saf suyun üzerine mikro pipet yardımıyla damla damla ilave edildi ve ardından ilaç içerikli nanopartiküllerin oluşması için manyetik karıştırıcıda 2 saatte karıştırıldı. Takiben elde edilen ilaç içerikli nanopartikül çözeltisi, diyaliz membranına (MWCO: 500-1000 Da) alınıp ultra saf suya karşı 24 saatte diyaliz işlemine tabi tutularak saflandırıldı ve liyofilizasyon işlemi ile kurutuldu. Elde edilen ilaç yüklü ürünler DPAE-2B-FA-DOX ve DPAE-2D-FA-DOX olarak adlandırıldı.

3.3.9. *In Vitro* İlaç Salım Çalışmaları

Tez çalışmasında nanopartiküllerin *in vitro* şartlardaki ilaç salım özelliklerinin incelenmesi için diyaliz membran kullanılmıştır. Nanopartiküllerin salım davranışları, 37 °C sıcaklıkta, pH 5,5 ve 7,4 olan ortamlarda incelenmiştir. Bu kapsamda ilk olarak, liyofilizasyon işlemi ile kurutulmuş kanser etken madde içerikli nanopartikül (DPAE-PCL-b-MPEG-FA-DOX) örneğinden belirli miktarda örnek alınıp etken maddenin geçişine izin verebilen diyaliz membrana (MWCO: 500-1000 Da) alınarak üzerine az miktarda salım ortamı olarak kullanılan tampon çözelti ilave edilmiş ve ardından salım ortamına yerleştirilmiştir. İlaç salım düzeneğinden (Şekil 3.3) belirli zaman aralıklarında 1'er ml örnekler alınmış ve ardından eşit miktarda taze salım ortamı sisteme ilave edilmiştir. Takiben alınan örneklerin UV/VIS

spektrofotometre kullanılarak 480 nm dalga boyunda DOX yüklü nanopartiküller için ölçümler yapılmıştır.

İlaç yüklü nanopartikül örneklerin farklı pH ortamlardaki ilaç salım miktarlarının hesaplanabilmesi için DOX antikanser etken maddesi pH 7,4 fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ve pH 5,5 asetat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 5, 7, 10, 15, 20 ve 25 ppm) 480 nm dalga boyunda DOX yüklü nanopartikül çözeltilerinin absorbans ölçümleri yapılarak standart kalibrasyon eğrisi hazırlanmıştır.



Şekil 3.3: İlaç salım düzeneği [60].

3.3.10. *In Vitro* Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri

3.3.10.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Nanopartiküllerin sitotoksitesinin değerlendirilmesinde ve hücresel alım yeteneklerin çalışmalarında insan servikal karsinoma hücreleri (HeLa) ve L929 fare fibroblast hücre hatları kullanılmıştır.

Tez çalışması kapsamında hücre kültürü çalışmalarında iki farklı hücre geliştirme ortamı kullanılmıştır. HeLa hücrelerinin kültürü için hücre geliştirme ortamı olarak, %10 Fetal Sığır Serum (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin ilave edilmiş Roswell Park Memorial Institute (RPM) 1640 besiyeri kullanılmıştır. L929 fare fibroblast hücreleri ise %10 Fetal Sığır Serum

(FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin ilave edilmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri kullanılmıştır. Hücreler, ilk olarak 37 °C'de, %5 CO₂ içeren atmosferik şartlarda 75 cm²'lik kültür kabında inkübe edilmiştir. Ortam iki günde bir değiştirilmiştir. Tek katlı hücre tabakası %80 yoğunluğa ulaştığında tripsin/EDTA çözeltisi ile kültür kabından ayrılmıştır. Ardından hücreler, 10 ml hücre medyumunu ile süspanse edilerek 1500 rpm de 5 dakikada santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Medium, pipet yardımıyla atıldıktan sonra hücreler tekrar medium ile süspanse edilmiş ve thoma lamı yardımıyla hücre sayımı yapılmıştır. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda kullanılan L929 fare fibroblast hücrelerinin pasaj numaraları 6'dır.

3.3.10.2. Nanopartikül Formülasyonlarının Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi (MTT Testi)

Sitotoksiste, kullanılan ilaç etkin maddesinin veya formülasyonun canlı hücreler üzerindeki toksik olma özelliği ifade etmektedir. MTT testi, sitotoksiste çalışmalarında uygulanan metotlardan biri olup uygulamada kolaylık göstermektedir. Diğer metotlara göre yaşayan hücre sayısının tespiti için yaygın kullanılmaktadır. Metot canlı hücrelerin MTT'yi (3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid) renkli formazan türevlerine (kırmızı-mor) dönüştürülmesi temeline dayanmaktadır. Tez çalışması kapsamında boş ve anti-kanser etken madde yüklü nanopartikül formülasyonlarının sitotoksiste çalışmaları HeLa ve L929 fare fibroblast hücreleri başta olmak üzere iki farklı hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak kültüre edilen hücreler 96 kuyulu doku kültür plakalarına her bir kuyucukta 5x10³ hücre/ml olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından, hazırlanan boş ve anti kanser etken madde yüklü nanopartikül formülasyonları besiyeri ile 6 farklı konsantrasyonlarda (0,01, 0,25, 0,5, 1, 2 ve 5 mg/ml) seyreltilmiştir. 96 kuyulu doku kültür plakalarındaki hücre medyumunu atılmış ve farklı konsantrasyonlarda nanopartikül formülasyonları içeren hücre medyumları ilave edilerek, belirli süreler boyunca (6, 24 ve 48 saat) 37 °C'de, %5 CO₂ içeren atmosferik şartlarda inkübe edilmiştir. Takiben kuyucuklardaki nanopartikül formülasyonları içeren hücre medyumunu, pipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve pH 7,4 fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından, her bir kuyucuğa 200 µl hücre medyumunu ve 20 µl MTT solüsyonu eklenmiştir. Plakalar alüminyum folyo ile sarılıp

37 °C’de 4 saatlik inkübasyon sonrası her bir kuyucuktaki hücre medyumunu ve MTT solüsyonu pipet ile dikkatle bir şekilde uzaklaştırılarak kuyucuklara 200 µl DMSO ilave edilmiştir daha sonra, plaklar tekrar alüminyum folyo ile sarılıp 37 °C’de 20 dakika inkübe edildikten sonra 570 nm’de mikro plaka okuyucu yardımı ile analiz edilmiştir. Nanopartikül formülasyonlarının sitotoksitesi aşağıdaki eşitlik (3.3) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = (\text{OD570}(\text{numune}) / \text{OD570}(\text{kontrol})) \times 100 \quad (3.3)$$

Bu tez çalışması kapsamında L929 fare fibroblast hücrelerine sitotoksitenin ve insan servikal karsinoma (HeLa) hücrelerine karşı antikanser etkinliğinin değerlendirilmesi amacı ile gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları, İstinye Üniversitesi Sağlık Birimleri Enstitüsü Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Ana Bilim Dalı’nda gerçekleştirilmiştir.

3.3.10.3. Tümörlü Hücrelere Hedeflendirilen Nanopartiküllerin Hücresel Alımlarının İncelenmesi

Çalışmada 3.3.10.1 bölümünde ayrıntılı bir biçimde anlatıldığı gibi kültüre edilen hücreler 24 kuyucuklu plaklara yaklaşık 100.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekimi yapılmış ve 37 °C’de, %5 CO₂ içeren atmosferik şartlarda 24 saatlik inkübasyon sonrası kuyucuklardaki besiyeri pipet ile uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine farklı konsantrasyonlarda DMEM ile seyreltilmiş DOX yüklü nanopartikül formülasyonları ilave edilmiştir. Bu aşamada Dox yüklü nanopartiküllerin kullanılmasının nedeni, DOX’un floresans ışık altında ışıma özelliği gösterebilmesidir. Kuyucuklar, farklı süreler (10 dakika, 30 dakika, 1 saat ve 4 saat) ile inkübasyona bırakılmış ve pH 7,4 fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 3 kez yıkanmıştır. Nanopartiküllerin hücrelere hücresel alımları, floresans mikroskop yardımı ile görüntülenmiştir.

Buna ek olarak “Lyso tracker green” ve “DAPI” boyamaları ile nanopartikül formülasyonlarının hücre-içi lokalizasyonlarına bakılmıştır. Bu kapsamda kültüre edilen HeLa hücreleri 24 kuyulu doku kültür plaklarına belirli bir konsantrasyonda ekimi yapılmış ve 24 saatlik inkübasyon sonrası kuyucuklardaki besiyeri pipet yardımı ile dikkatlice uzaklaştırılarak DOX yüklü nanopartikül formülasyonları eklenmiştir. Ardından kuyucuklar belirli bir süre ile inkübasyona bırakılmış ve pH 7,4 fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile 3

kez yıkanmıştır. Takiben %4'lük paraformaldehit ile fiksasyon işlemine tabi tutulduğunda sırasıyla Lyso Tracker Green (1 μ M, 30 dakika) ve DAPI (5 μ g/ml, 30 dakika) gibi boyamalar ile muamele edilerek hücreler floresans mikroskop ile görüntülenmiştir. |

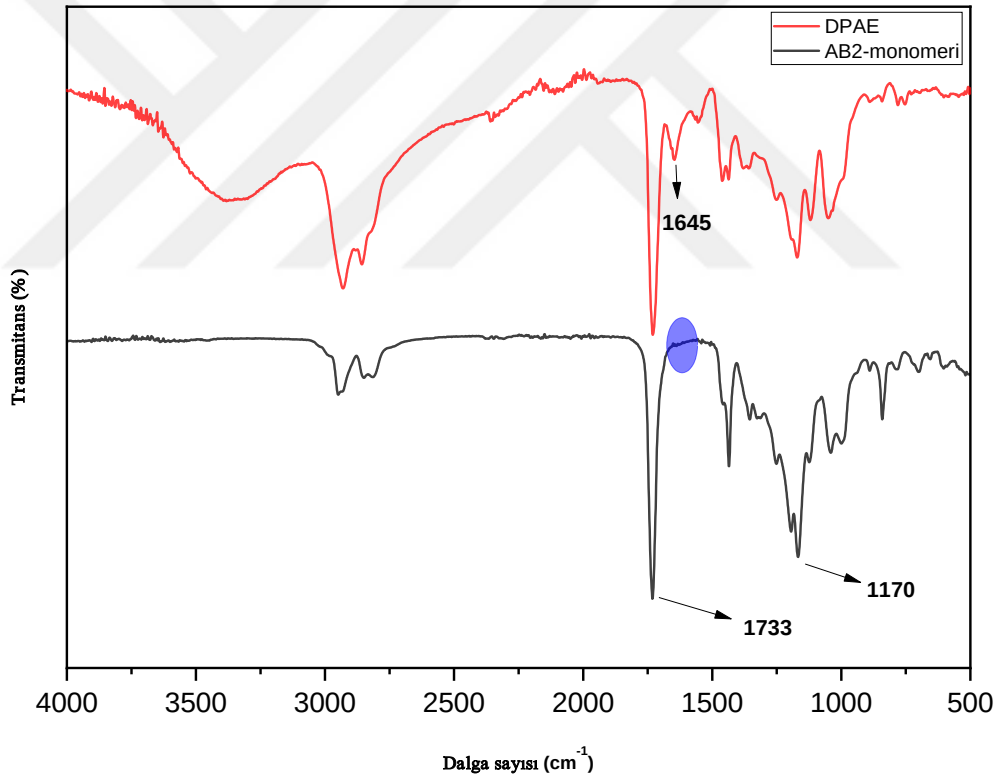


4. BULGULAR

4.1. SENTEZLENEN ÜRÜNLERİN KARAKTERİZASYONUNA AİT BULGULAR

4.1.1. DPAE Ürününün FTIR Analizi

Bölüm 3.3.2’de ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi hazırlanan DPAE ürününün analizi Bölüm 3.2’de belirtilen FTIR spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. DPAE ürününün, bu ürününün hazırlanmasında çekirdek molekülü ve AB₂ monomeri olarak kullanılan Et-TMP ve HDTE’ye ait FTIR spektrum aşağıdaki Şekil 4.1’de görülmektedir.



Şekil 4.1:DPAE ürününe, HDTE ve Et-TMP’ye ait FTIR spektrumu.

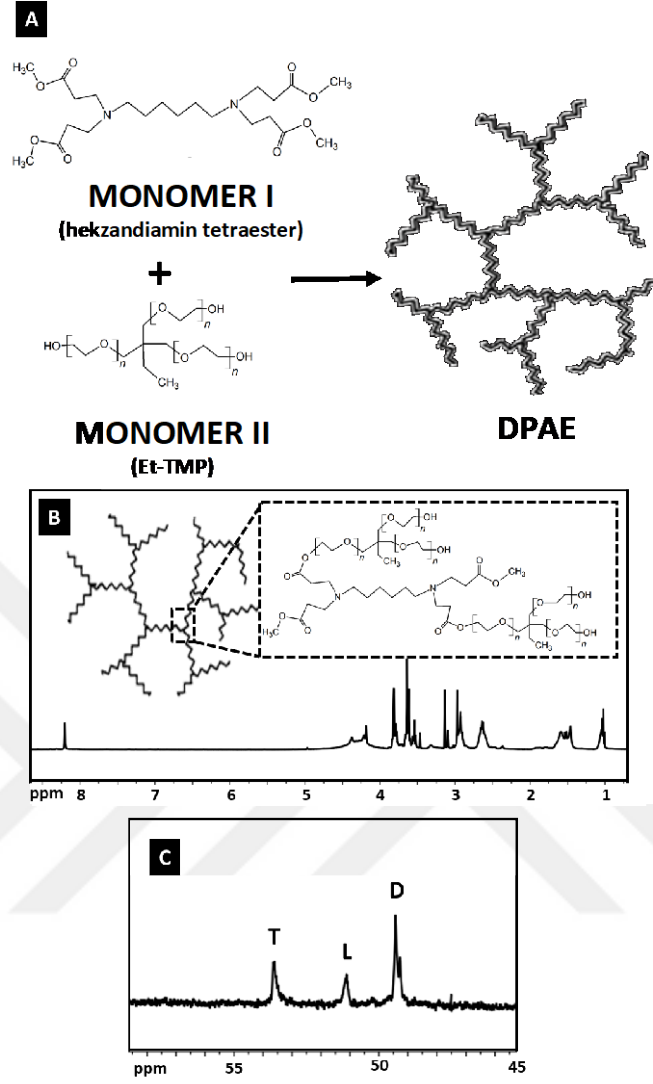
Sentezlenmiş yapıların karakterizasyonlarında kimyasal yapının aydınlatılması için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Buna göre hekzandiamin ve metil akrilat reaksiyonu sonucu elde edilen AB₂ Monomerine ait FTIR grafiği (Şekil 4.1) incelendiğinde, hekzandiamin ve metil akrilat reaksiyonu sonucu elde edilen üründe, reaktanlara ait spesifik C=C çifte bağına ait

karakteristik titreşimler görülmemektedir. Ayrıca Monomer I yapısında bulunan tersiyer amin grubuna ait C-N titreşimleri ise 1170 cm^{-1} bölgesindeki pikin şiddet artışına ve C=O titreşimlerinin moleküler yapının değişmesine bağlı olarak 1733 cm^{-1} 'de izlenmesine atfedilmiştir. Reaktanlara ait spesifik piklerin bulunmaması ve yeni sentezlenmiş yapıya ait belirtilen değişiklikler AB₂ monomerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini işaret etmektedir. Elde edilen AB₂ monomeri ile Et-TMP ile dallanmış poli(amino ester) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon sonucu elde edilen ürüne ait FTIR grafiği Şekil 4.1'de verilmiştir. Buna göre ester gruplarına bağlı titreşimler ve ayrıca olası hidrojen bağlarına ait titreşimler 1645 cm^{-1} bölgesine atfedilmiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde ve DPAE polimerinin başarı ile sentezlendiği kanaatine varılmıştır.

4.1.2. DPAE Ürününün ¹H-NMR ve ¹³C-NMR Analizi

Bölüm 3.3.2'de ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi sentezlenen DPAE ürününe ait ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları Şekil 4.2'de görülmektedir.

Bu tez çalışmasında çekirdek molekülü olarak kullanılan dallanmış poli (amino ester)'in hazırlanmasında Michael katılması ve polikondensasyon reaksiyonu olmak üzere iki aşamalı bir sentez prosedürü kullanılmıştır (Şekil 4.2A).



Şekil 4.2: DPAE polimerinin sentez prosesi, (B) DPAE polimerinin ^1H NMR spektrumu ve (C) DPAE polimerinin ^{13}C NMR spektrumu.

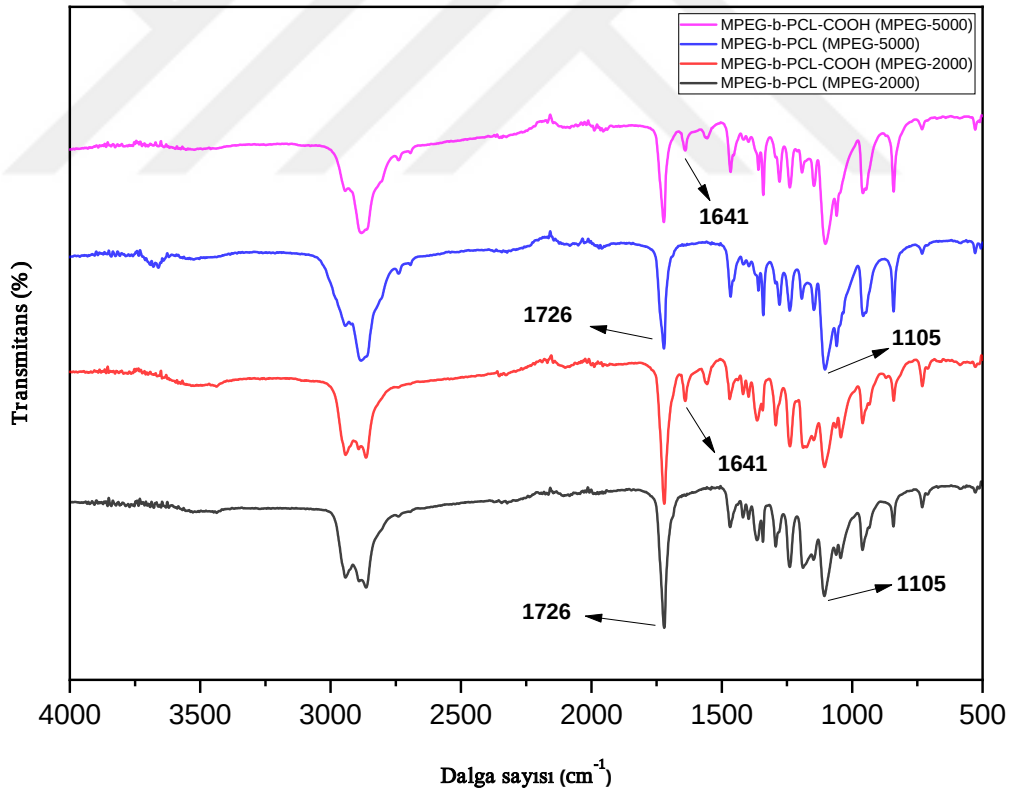
DPAE ürününün ^1H NMR spektrumunda, 1,02 ve 1,46 ppm aralığında yer alan karakteristik pikler, çekirdek molekülüne ait (Et-TMP) metilen ($-\text{CH}_2-$) ve metil ($-\text{CH}_3$) protonlarının olduğu görülmektedir. Buna ek olarak, 2,64, 3,54 ve 3,79 ppm'deki en yüksek pik değerleri sırasıyla $-\text{CH}_2 \text{COO}-$, $-\text{COOCH}_3$ ve $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-$ 'ya atfedilmiştir (Şekil 4.2B). Bu tez çalışması kapsamında dallanmış poli(amino ester) (DPAE)'in DB değeri aşağıda verilen eşitliğe (Eşitlik 4.1) göre hesaplanmıştır.

$$DB_{\text{Frechet}} = \frac{D+T}{D+L+T} \quad (2.1a)$$

Burada L, lineer grupların sayısıdır, T terminal gruplarının sayısıdır ve D ise dendritik grupların sayısıdır. DPAE ürününün ^{13}C NMR spektrumunda, 49,43, 51,13 ve 53,61 ppm'de meydana gelen en yüksek pik değerleri, sırasıyla dendritik, lineer ve terminal gruplarının sinyallerine atfedilmiştir. Bu tez çalışmasında, Hawker ve Fréchet tanımını kullanarak bu üç pikin (Şekil 4.2C) bazında hesaplanan DPAE polimerinin DB değerinin 0,66 olduğu bulunmuştur, bu da oldukça dallanmış ürününün oluşumunu doğrulamıştır.

4.1.3. MPEG-b-PCL diblok Kopolimer Ürünlerinin FTIR Analizi

Bölüm 3.3.3'de ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi hazırlanan MPEG-b-PCL ürünlerinin FTIR analizi Bölüm 3.2'de belirtilen FTIR spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu ürünlerinin FTIR spektrumları aşağıdaki Şekil 4.3'de görülmektedir.



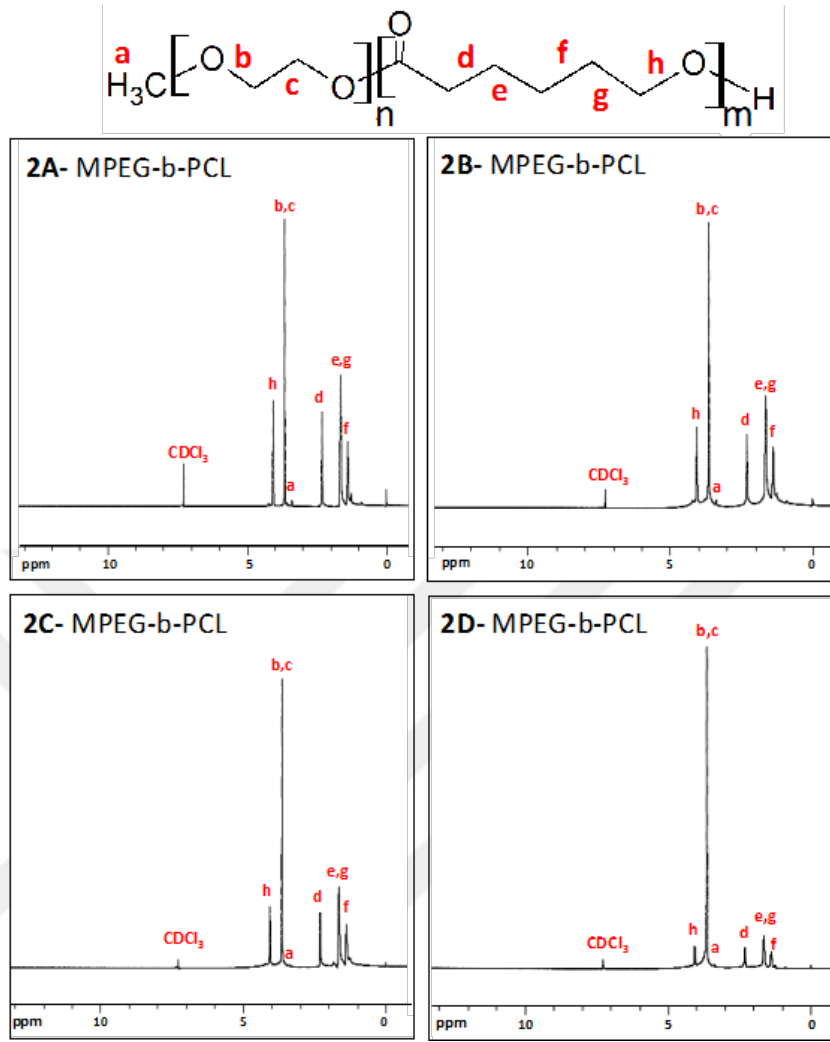
Şekil 4.3: MPEG-b-PCL diblok kopolimer ürünlerine ait FTIR spektrum.

MPEG-b-PCL diblok kopolimerin sentezine ait FTIR grafiği Şekil 4.3'te verilmiştir. Grafikte görüldüğü üzere, 1726 cm^{-1} dalga sayısında PCL yapısında bulunan ester C=O gerilme

titreşimleri ve 115 cm^{-1} dalga sayısında gözlemlenen MPEG yapısında bulunan C-O titreşimleri literatür ile de uyumludur [161]. Bu sonuçlar blok kopolimer sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini işaret etmektedir. MPEG-*b*-PCL diblok polimerleri, DPAE ürününe bağlanabilmesi için süksinik anhidrit ile reaksiyona sokulmuş ve karboksil uç gruplarına sahip olması sağlanmıştır. Bu reaksiyona ait FTIR grafiği Şekil 4.3'te verilmiştir. Buna göre 1641 cm^{-1} 'de gözlemlenmiş pik, molekül içi hidrojen bağlı karboksilik asit gruplarına atfedilmiştir.

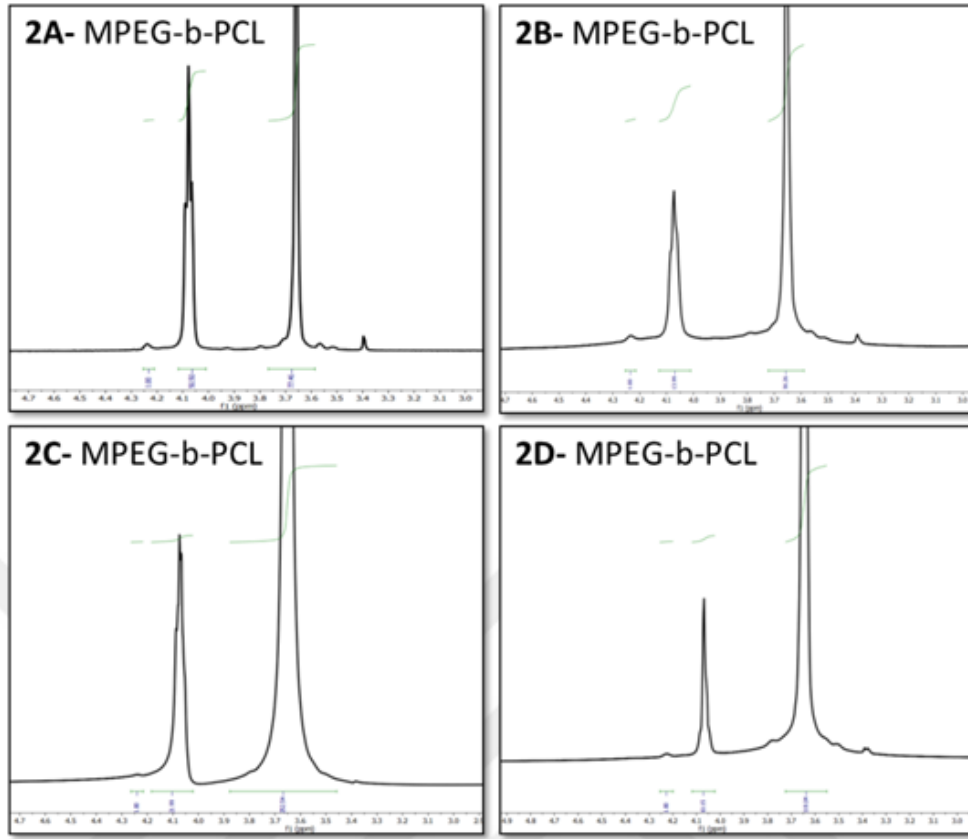
4.1.4. MPEG-*b*-PCL Ürünlerinin ^1H NMR ve ^{13}C NMR Analizi

Bölüm 3.3.3'de ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi sentezlenen MPEG-*b*-PCL ve MPEG-*b*-PCL-COOH ürünlerine ait ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektrumları Şekil 4.4 – Şekil 4.6'da görülmektedir.

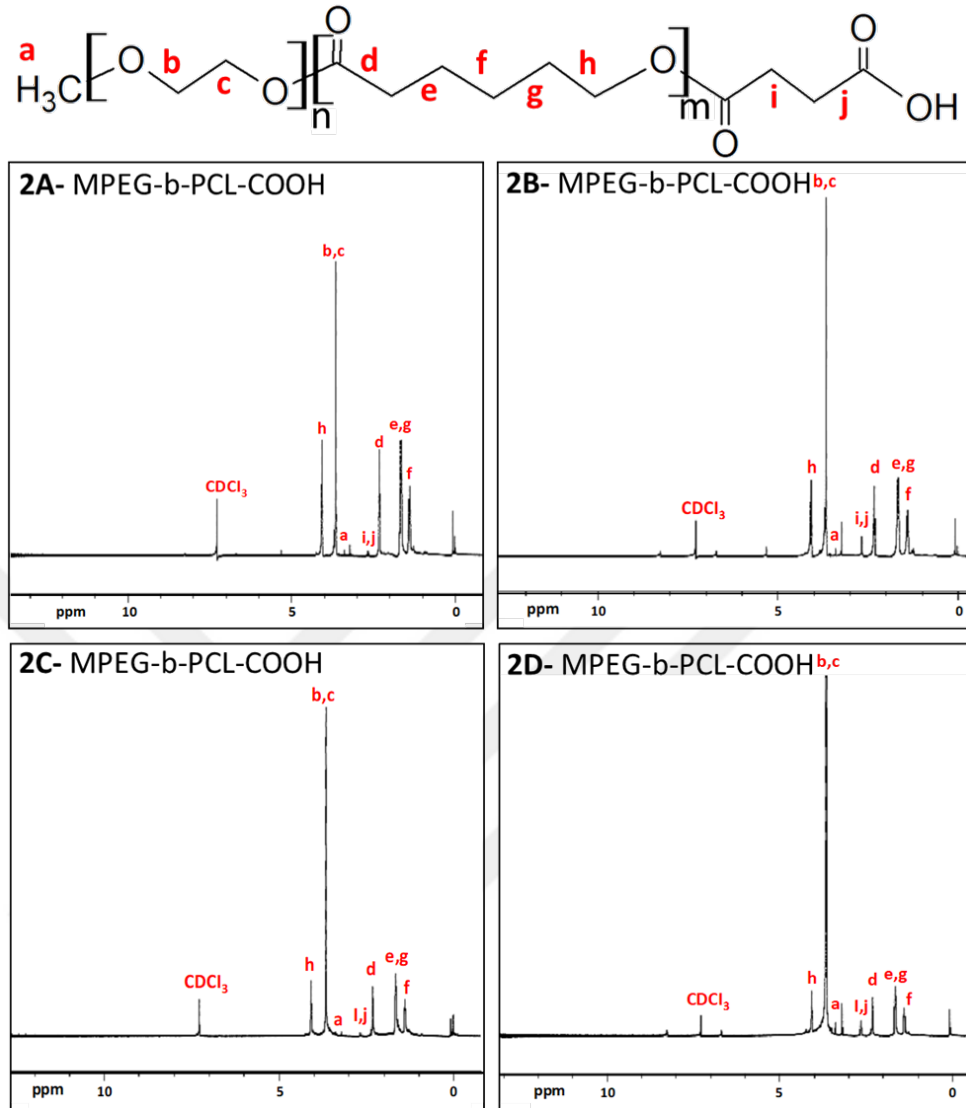


Şekil 4.4: 2A-MPEG-b-PCL, 2B-MPEG-b-PCL, 2C-MPEG-b-PCL ve 2D-b-MPEG-PCL kopolimerlerinin ¹H NMR spektrumları.

Sentezlenen MPEG-b-PCL kopolimer ürünlerinin ¹H NMR spektrumları, Şekil 4.4'te gösterildiği gibi 1,37, 1,64, 2,30 ve 4,05 ppm'deki karakteristik pikler, PCL bloklarında yer alan $[-(CH_2)_3-]$, $-OCCH_2-$ ve $-CH_2OOC-$ metilen protonlarına atfedilmiştir. 3,37 ve 3,63 karakteristik pikler ise PEG bloklarındaki CH_3- ve $-CH_2CHO-$ sinyallerine aittir. MPEG-b-PCL ürünlerine ait ¹H NMR spektrumu, sentezlenen MPEG-b-PCL kopolimer ürünlerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.5: 2A-MPEG-b-PCL, 2B-MPEG-b-PCL, 2C-MPEG-b-PCL ve 2D-MPEG-b-PCL kopolimerlerinin 3-5 ppm aralığındaki ¹³C NMR spektrumları.

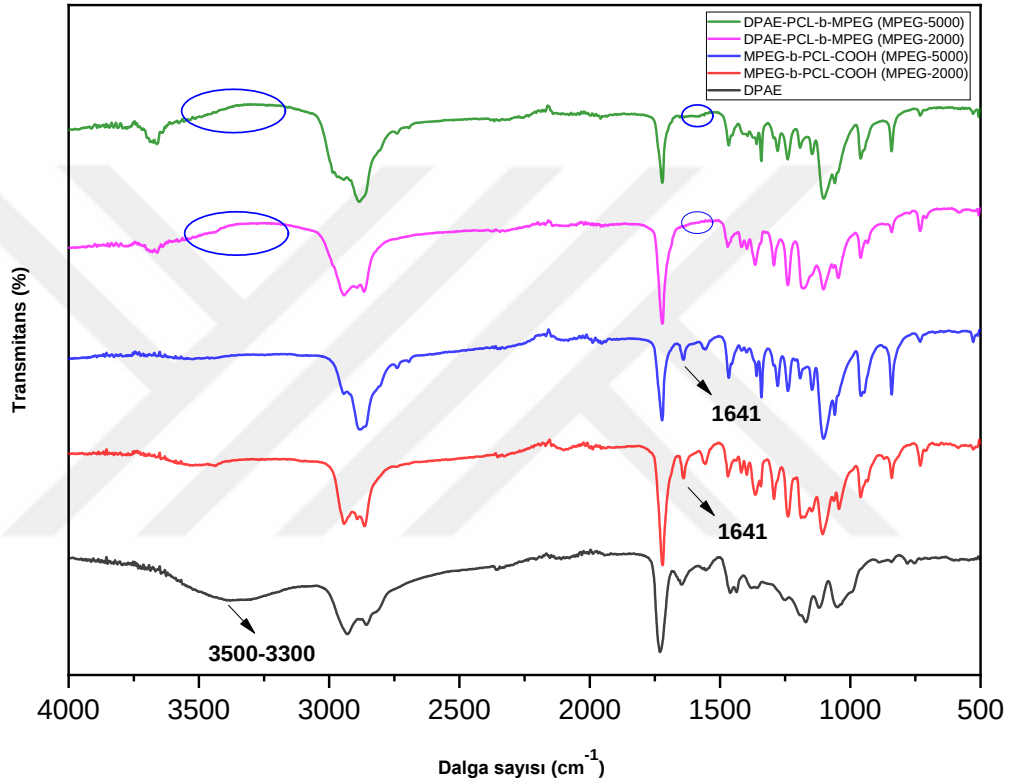


Şekil 4.6: 2A-MPEG-b-PCL-COOH, 2B-MPEG-b-PCL-COOH, 2C-MPEG-b-PCL-COOH ve 2D-MPEG-b-PCL-COOH kopolimerlerinin ¹H NMR spektrumları.

Sentezlenen MPEG-b-PCL-COOH ürünlerine ait ¹H NMR spektrumunda (Şekil 4.6) da görülebildiği gibi hem PCL hem de PEG birimlerine ait karakteristik titreşimler, MPEG-b-PCL spektrumunkilerle tamamen aynı olduğu gözlenmiştir. Buna ilave olarak, MPEG-b-PCL-COOH ürünlerinin spektrumunda 6,44 ve 6,56 ppm'de (-C(=O)CH=CHC(=O)-) gözlenmiş ve bu pikler, süksinik anhidrit ile modifiye edilmeyen MPEG-b-PCL kopolimer ürünlerine ait ¹H NMR spektrumunda gözlenmemiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde ve MPEG-b-PCL-COOH kopolimer ürünlerinin başarı ile sentezlendiği kanaatine varılmıştır.

4.1.5. DPAE-PCL-b-MPEG Ürünlerinin FTIR Analizi

Bölüm 3.3.4’de ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi hazırlanan DPAE-PCL-b-MPEG ürünlerinin FTIR analizi Bölüm 3.2’de belirtilen FTIR spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu ürünlerinin FTIR spektrumları aşağıdaki Şekil 4.7’de görülmektedir.

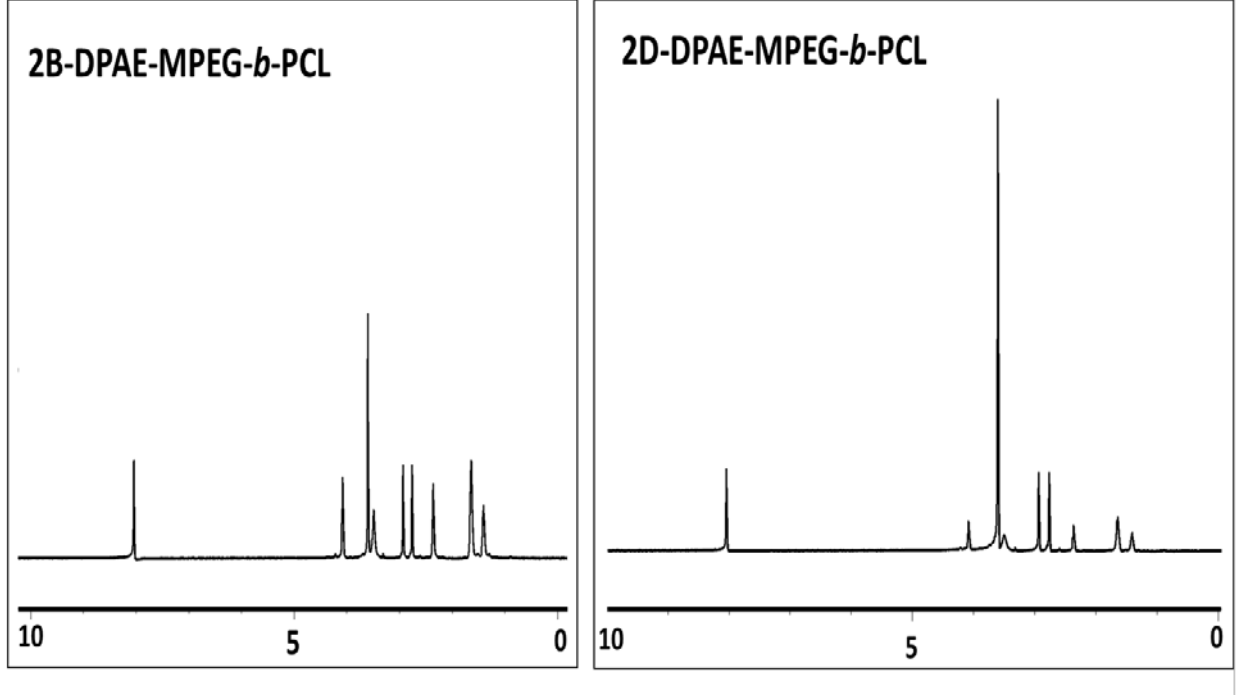


Şekil 4.7: DPAE ve DPAE-PCL-b-MPEG ürünlerine ait FTIR spektrum.

Dallanmış Poli(amino ester) esaslı Amfifilik Blok Kopolimerin FTIR spektrumları Şekil 4.7’de verilmiştir. Sentezlenmiş yapıya ait FTIR grafiği incelendiğinde; DPAE polimerinin FTIR spektrumunda izlenen $\sim 3300\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki -OH titreşimlerine ait geniş bant ve MPEG-*b*-PCL-COOH polimerinde bulunan karboksil uç gruplarından kaynaklanan 1641 cm^{-1} ’deki pik, DPAE-MPEG-*b*-PCL polimerlerinin spektrumlarında gözlenmemiştir. Ayrıca DPAE ve MPEG-*b*-PCL-COOH yapılarına ait diğer tüm spesifik IR piklerinin DPAE-MPEG-*b*-PCL polimerine ait spektrumda bulunması sentez reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini işaret etmektedir.

4.1.6. DPAE-PCL-b-PCL Ürünlerinin ^1H NMR Analizi

Bölüm 3.3.4’de ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi sentezlenen DPAE-PCL-b-MPEG ürünlerine ait ^1H NMR spektrumları Şekil 4.8’de görülmektedir.

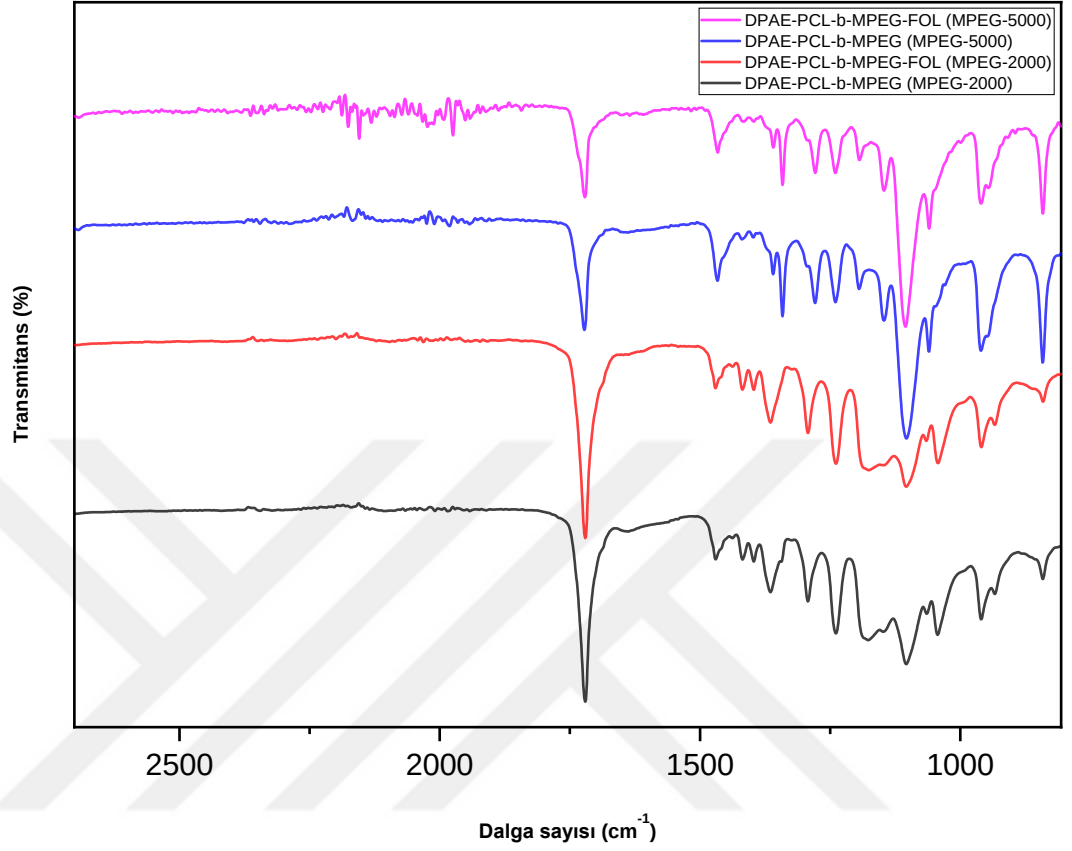


Şekil 4.8: (A) 2B-DPAE-MPEG-b-PCL ve (B) 2D-DPAE-MPEG-b-PCL polimerlerinin ^1H NMR spektrumları.

MPEG-b-PCL ve MPEG-b-PCL-COOH ürünlerine ait ^1H NMR spektrumları ile karşılaştırıldığında, DPAE-MPEG-b-PCL ürünlerine ait ^1H NMR spektrumunda 2,73 ppm’de yeni bir pik gözlenmiştir. Bu pik, DPAE’in yapısında bulunan $-\text{CH}_2\text{COO}-$ birimlerine atfedilmektedir. Buna ek olarak, DPAE’in MPEG-b-PCL-COOH kopolimerine eklendiğini göstermiştir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde ve DPAE-MPEG-b-PCL kopolimer ürünlerinin başarı ile sentezlendiği kanaatine varılmıştır.

4.1.7. Ligand Takılı DPAE-PCL-b-MPEG Ürünlerinin FTIR Analizi

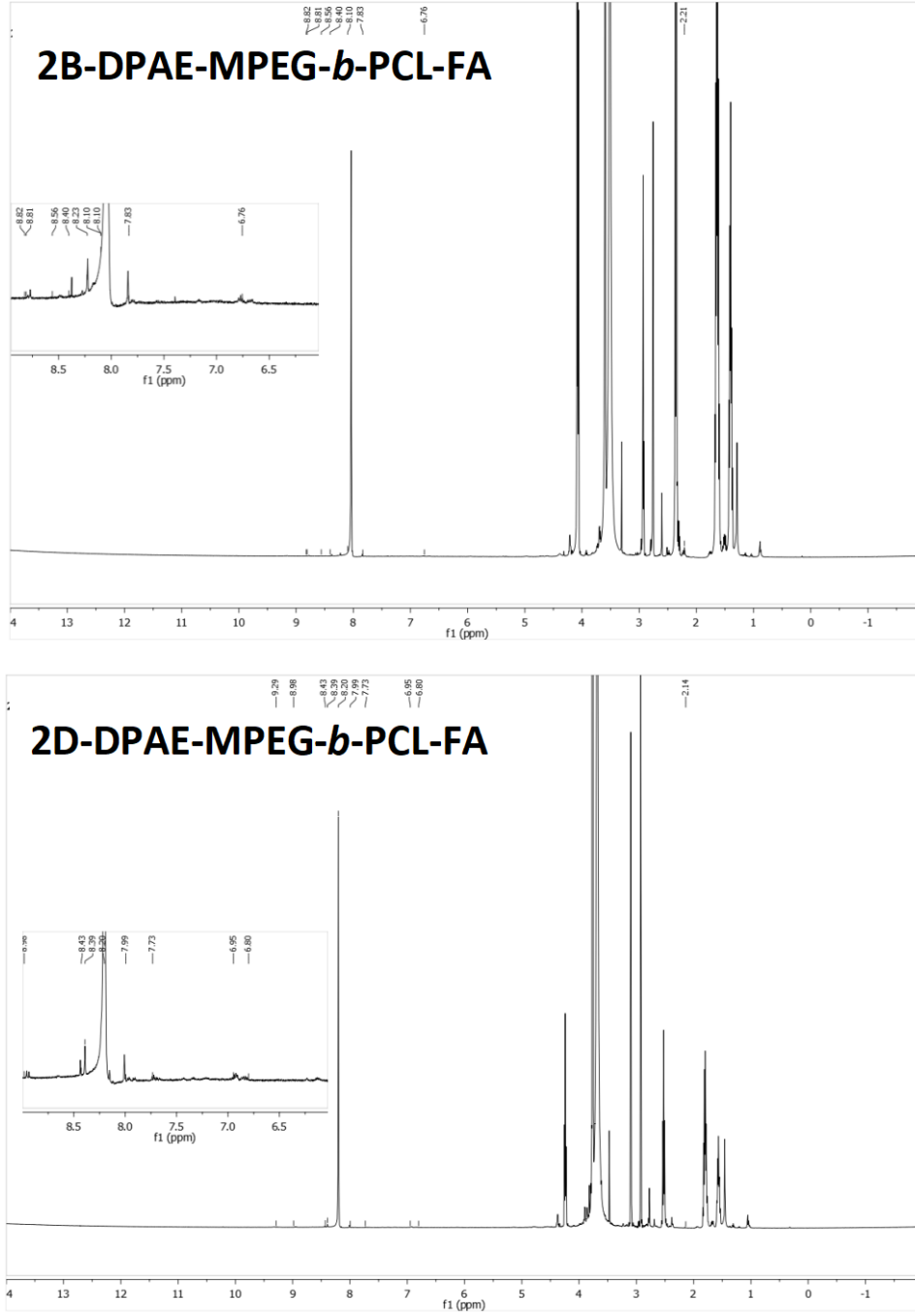
Bölüm 3.3.5’te ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi hazırlanan folatlanmış DPAE-PCL-b-MPEG ürünlerinin FTIR analizi Bölüm 3.2’de belirtilen FTIR spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Bu ürünlerinin FTIR spektrumları aşağıdaki Şekil 4.9’da görülmektedir. 1550 cm^{-1} dalga sayısında gözlemlenen pik artışı FA molekülünden gelen $-\text{COOH}$ gruplarından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.9: DPAE-PCL-b-MPEG ve DPAE-PCL-b-MPEG-FOL ürünlerine ait FTIR spektrumu.

4.1.8. Ligand Takılı DPAE-PCL-b-MPEG Ürünlerinin ^1H NMR Analizi

Bölüm 3.3.5'te ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi hazırlanan folat takılı DPAE-PCL-b-MPEG ürünlerine ait ^1H NMR spektrumları Şekil 4.10'da görülmektedir. Buna göre FA molekülünden kaynaklanan pikler 8-8,5 ppm'de görülmektedir. FTIR sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde molekülün başarılı bir şekilde yapıya konjuge olduğu kanaatine varılmıştır.



Şekil 4.10: 2B-DPAE-MPEG-*b*-PCL-FA ve 2D-DPAE-MPEG-*b*-PCL-FA polimerlerinin ¹H NMR spektrumları.

4.2. DALLANMIŞ POLİ (AMİNO ESTER) ESASLI AMFİFİLİK DİBLOK KOPOLİMER NANOPARTİKÜL ÜRÜNLERİNİN KARAKTERİZASYONU

4.2.1. Dallanmış Poli (amino ester) Esaslı Amfifilik diblok Kopolimer Nanopartillerinin Partikül Boyutu, Dağılımı ve Zeta Potansiyeli Değerleri

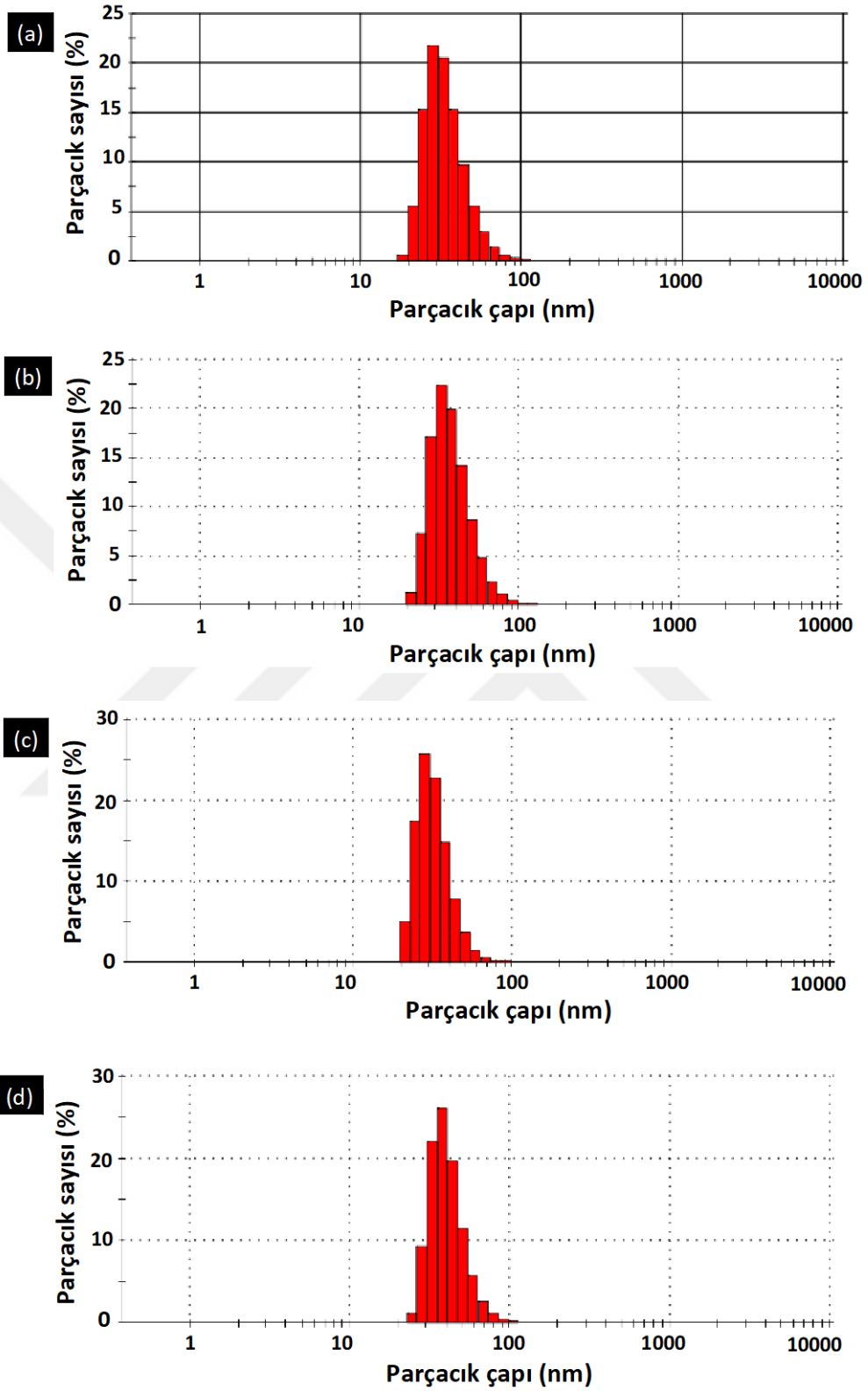
Bölüm 3.3.4 ve bölüm 3.3.5'te ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi sentezlenen DPAE-PCL-b-MPEG ve folik asit modifiye DPAE-PCL-b-MPEG ürünlerinin bölüm 3.3.6'da belirtildiği şekilde hazırlanan nanopartiküllerin partikül boyutu ve dağılımları aşağıdaki Tablo 4.1'de ve Şekil 4.11'de görülmektedir.

Tablo 4.1: Dallanmış poli(amino ester) esaslı amfifilik diblok kopolimer ürünlerinin partikül boyutları, dağılımları ve zeta potansiyeli değerleri.

Örnek Adı	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
DPAE-PCL-b-MPEG (MPEG-2000)	34,51	0,435	-10,2 mV
DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000)	38,67	0,520	-2,26 mV
DPAE-PCL-b-MPEG (MPEG-5000)	32,91	0,480	-1,45 mV
DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000)	41,58	0,614	-1,85 mV

Tablodaki değerler ve DLS analiz sonuçlarına ait grafik (Şekil 4.11) incelendiğinde sentezlenmiş ürünlerin partikül boyut dağılımının dar olduğu görülmektedir. DPAE-PCL-b-MPEG(MPEG-2000) ürününe ait partikül boyutunun değeri 34,51 nm olarak bulunmuştur. Partiküle yapılan folik asit modifikasyonu sonrası elde edilmiş olan DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000) ürününe ait partikül boyutu ise 38,67 nm olarak bulunmuştur. Beklendiği üzere folik asit modifikasyonu sonrası yapının partikül boyutu artmıştır.

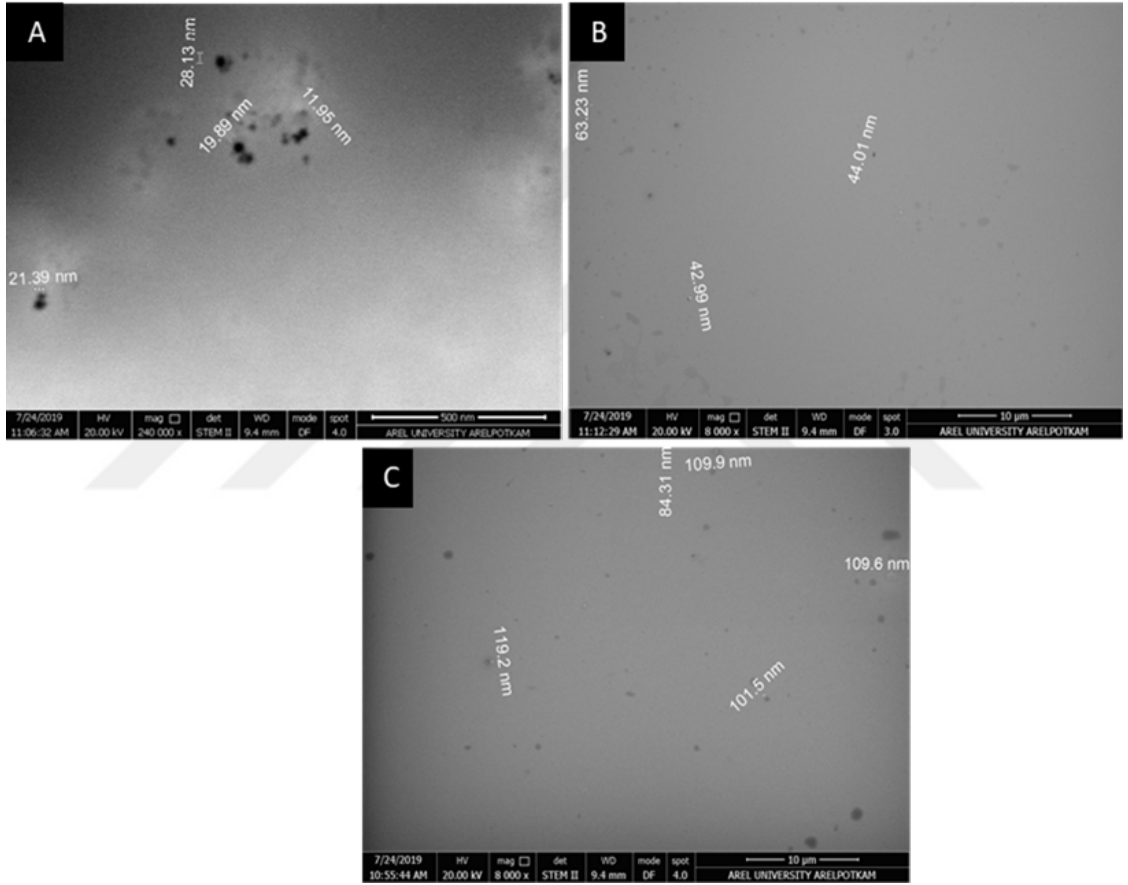
DPAE-PCL-b-MPEG(MPEG-5000) ürününe ait partikül boyutunun değeri ise 32,91 nm olarak bulunmuştur. Bu partikülde gerçekleştirilen folik asit modifikasyonu sonrası elde edilmiş olan DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000) ürününe ait partikül boyutu ise 41,58 nm'dir. Folik asit modifikasyonu sonrası yapının partikül boyutu artmıştır.



Şekil 4.11: Nanopartiküllerin partikül boyutu grafikleri: (a) DPAE-MPEG-b-PCL (MPEG-2000) (b) DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-2000) (c) DPAE-MPEG-b-PCL (MPEG-5000) (d) DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-5000).

4.2.2. SEM Görüntüleri

Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan boş nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri Şekil 4.12’te görülmektedir. DLS sonuçlarına göre ortalama partikül boyutu 38,67 nm olan DPAE-MPEG-*b*-PCL-FA numunesine ait SEM sonuçları, DLS sonuçları ile tutarlılık göstermektedir.



Şekil 4.12: DPAE-MPEG-*b*-PCL-FA nanopartikülüne ait SEM görüntüleri.

4.3. İLAÇ YÜKLÜ NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ KARAKTERİZASYONU

4.3.1. Partikül Büyüklüğü Dağılımı

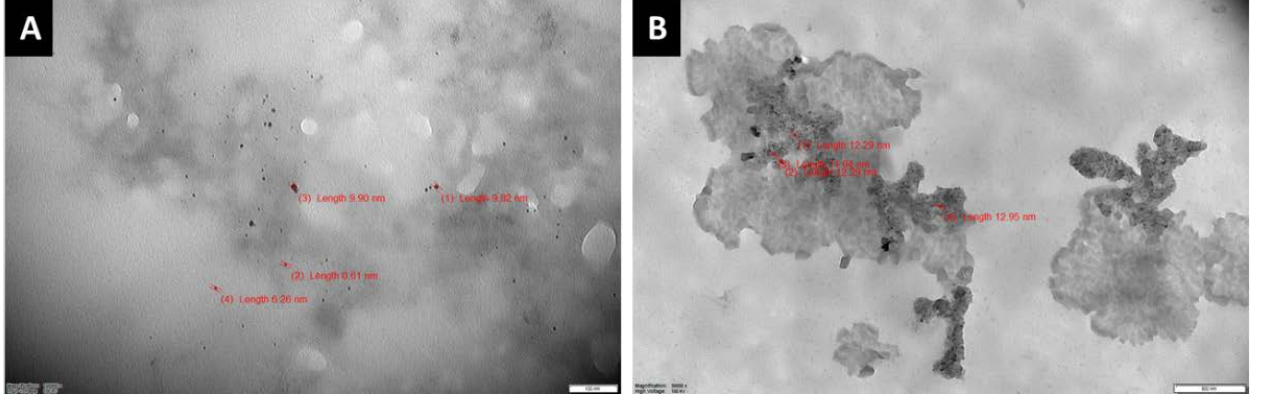
Bölüm 3.3.5'te ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi sentezlenen DPAE-PCL-b-MPEG-FOL ürünlerinin bölüm 3.3.6'da belirtildiği şekilde hazırlanan ilaç yüklü nanopartiküllere ait partikül büyüklüğü dağılımı, zeta potansiyel ve polidispersite indeksleri Tablo 4.2'de verilmiştir. Hazırlanmış ilaç yüklü nanopartiküllerin ortalama partikül boyutları ilaç yüklenmesi sonucu artmıştır.

Tablo 4.2: Antikanser etken madde içerikli nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklüğü dağılımı (nm), polidispersite indeksleri ve zeta potansiyeli değerleri.

Örnek Adı	Boyut (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
DPAE-PCL-b-MPEG-FOL-DOX (MPEG-2000)	88	0,407	-2,08 mV
DPAE-PCL-b-MPEG-FOL-DOX (MPEG-5000)	174	0,801	1,19 mV

4.3.2. Nanopartiküllerin Morfolojik Görüntüleri

Bölüm 3.3.5'te ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi sentezlenen DOX yüklü DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-2000) numunesine ait TEM görüntüleri Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13: DOX yüklü DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-2000) nanopartiküllerinin TEM görüntüleri; (A) x30000 büyütme ve (B) x100000 büyütme.

4.4. NANOPARTİKÜLLERİN İLAÇ YÜKLEME ETKİNLİĞİNİN VE İN VİTRO SALIM DAVRANIŞLARININ BELİRLENMESİ

4.4.1. Nanopartiküllerin İlaç Yükleme Etkinliği ve Kapasitesinin Belirlenmesi

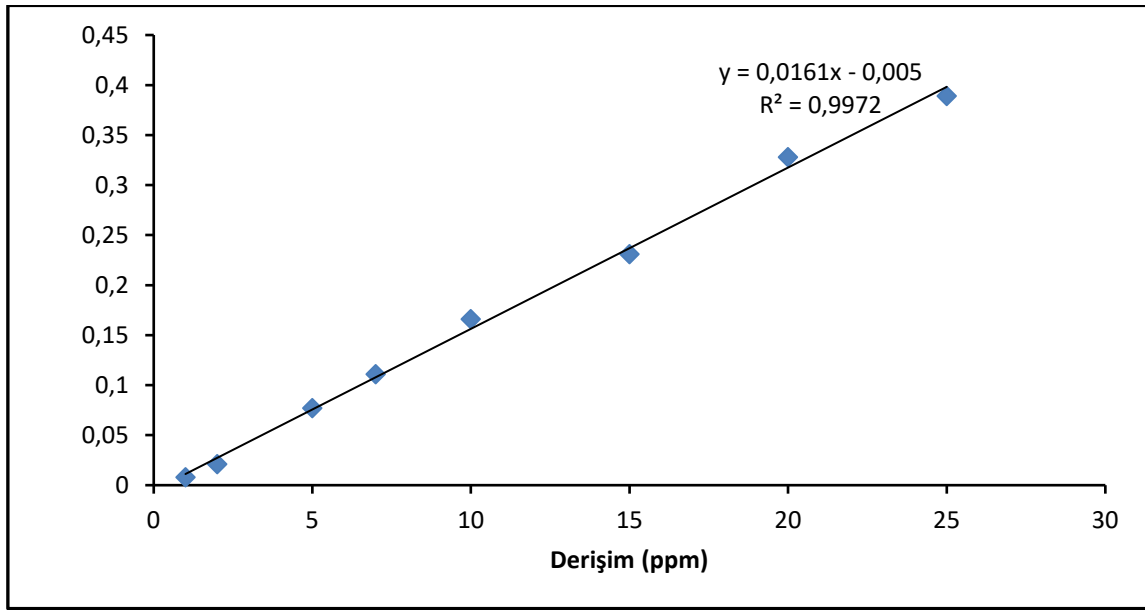
Bölüm 3.3.6.1’de gerçekleştirilen ilaç yükleme etkinlikleri ve yükleme kapasitelerinin incelenmesine ait bulgular Tablo 4.3 – Tablo 4.4’da görülmektedir.

Hazırlanan nanopartiküllerin ilaç yükleme etkinliği ve kapasitesini belirlemek için anti kanser ilacı olarak kullanılan Doksorubisinin (DOX) maksimum absorbans değerlerini verdiği dalga boyu tespit edilmiştir. DOX ilacının maksimum dalga boyu 480 nm olarak belirlenmiştir. Nanopartiküllere yüklenen ilaç miktarını nicel olarak belirlemek üzere DOX’un DMSO’da farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. DOX çözeltisi için maksimum dalga boyunda 480 nm’de absorbans değeri ölçülerek standart kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Hazırlanan standart kalibrasyon eğrileri Şekil 4.14’de görülmektedir.

Tablo 4.3: DOX – DMSO Standart Kalibrasyon Değerleri.

Derişim (ppm)	1	2	5	7	10	15	20	25
Absorbans	0,008	0,021	0,077	0,111	0,116	0,231	0,328	0,389

Kalibrasyon grafiğinin R2 değeri 0,9972 olarak bulunmuştur (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: DOX – DMSO Standart Kalibrasyon Eğrisi.

Tablo 4.4: Farklı oranlarda DOX yüklenen DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-5000) nanopartiküllerinin yükleme etkinlikleri ve yükleme kapasiteleri.

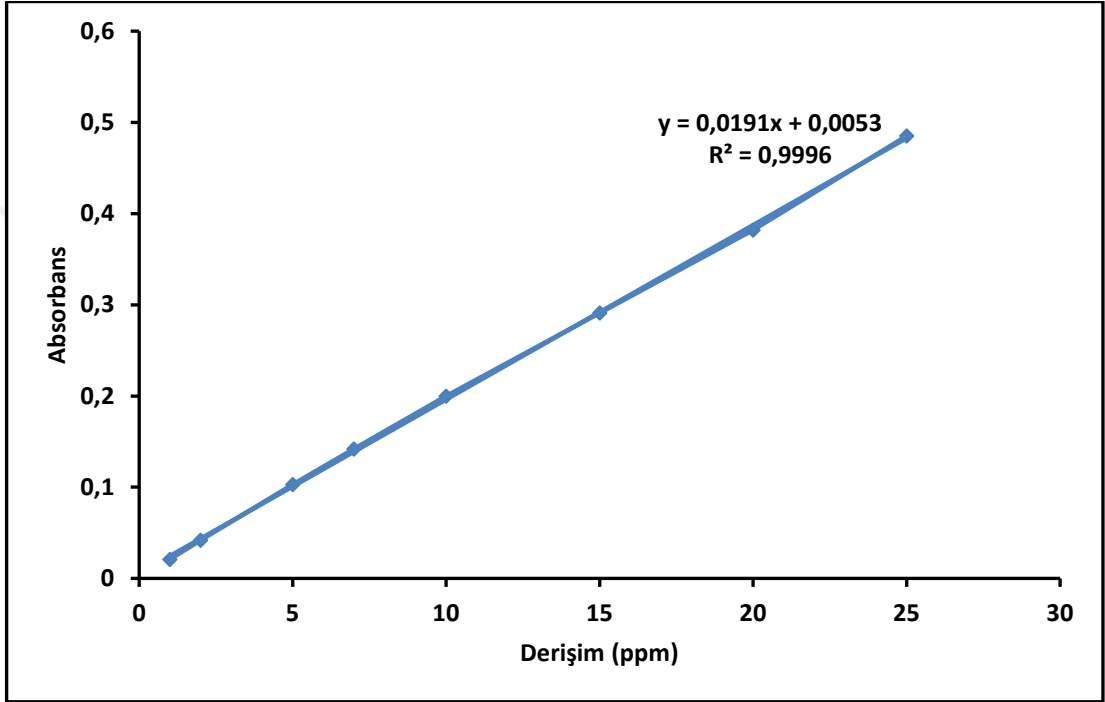
Polimer/ilâç (w/w)	Yükleme Etkinliği (%)	Yükleme Kapasitesi(%)
1/1	16,149	62,112
1/0,5	18,944	41,183
1/0,25	14,782	18,478
1/0,1	9,317	7,764
1/0,05	8,199	2,928

İlaç yükleme etkinlikleri ve yükleme kapasitelerinin değerlendirilmesinden elde edilen sonuçlar (Tablo 4.5 – 4.7) incelendiğinde optimum ve uygun polimer / ilâç oranı 1/0,5 olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Yapılan hesaplamalar sonucu yükleme etkinliği DOX yüklü DPAE-MPEG-b-PCL-FA (5000) için %18,94 olarak hesaplanmıştır. Bununla beraber ilâç yükleme kapasitesi % 41,18 bulunmuştur.

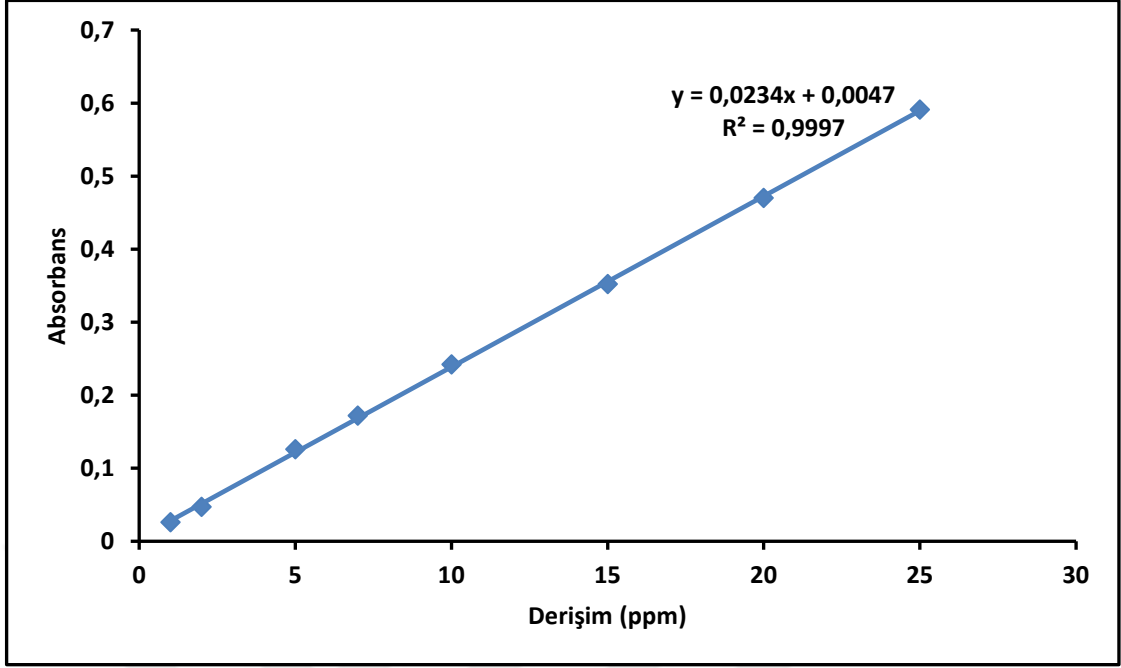
4.4.2. Nanopartiküllerin *In Vitro* Salım Davranışlarının Belirlenmesi

Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan ilâç yüklü nanopartiküllerden *in vitro* şartlarda salınan ilâç miktarını belirlemek amacıyla kullanılan anti kanser ilâçları Bölüm 3.3.7’de açıklandığı gibi hazırlanan pH 7,4 fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ve pH 5,5 (Asetat) tampon

  zeltelerde farklı konsantrasyonlardaki   zelteleri hazırlanmıştır. DOX   zelteleri i in maksimum dalga boylarında 480 nm’de absorbens değerleri     lerek standart kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Hazırlanan standart kalibrasyon eğrileri şekil 4.15 ve 4.16’da verilmiştir.



şekil 4.15: DOX – PBS Standart Kalibrasyon Eğrisi.



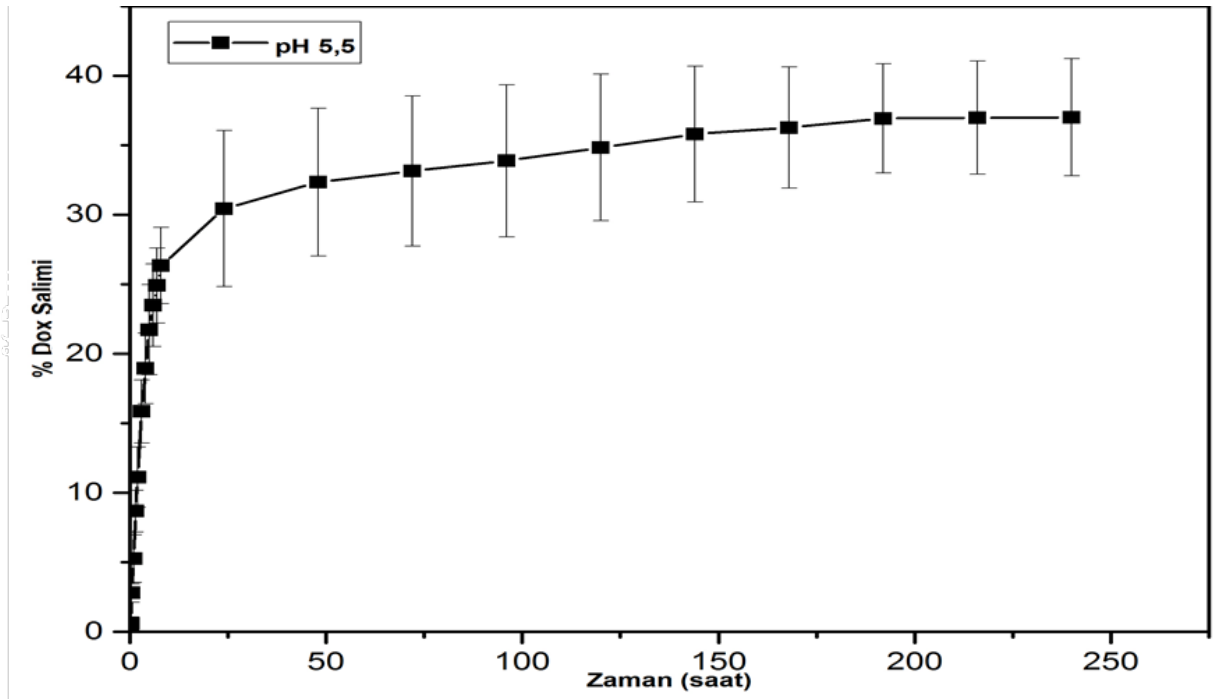
Şekil 4.16: DOX – Asetat Standart Kalibrasyon Eğrisi.

Bölüm 3.3.6’da belirtilen yöntemle göre farklı oranlarda DOX yüklenen DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000) ve DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000) nanopartikül formülasyonlarının Bölüm 4.4.2’de ayrıntılı bir biçimde anlatıldığı gibi farklı pH ortamlarında (5,5 ve 7,4) gerçekleştirilen *in vitro* ilaç salım çalışmaları sonuçları Şekil 4.17 – Şekil 4.20’de verilmiştir.

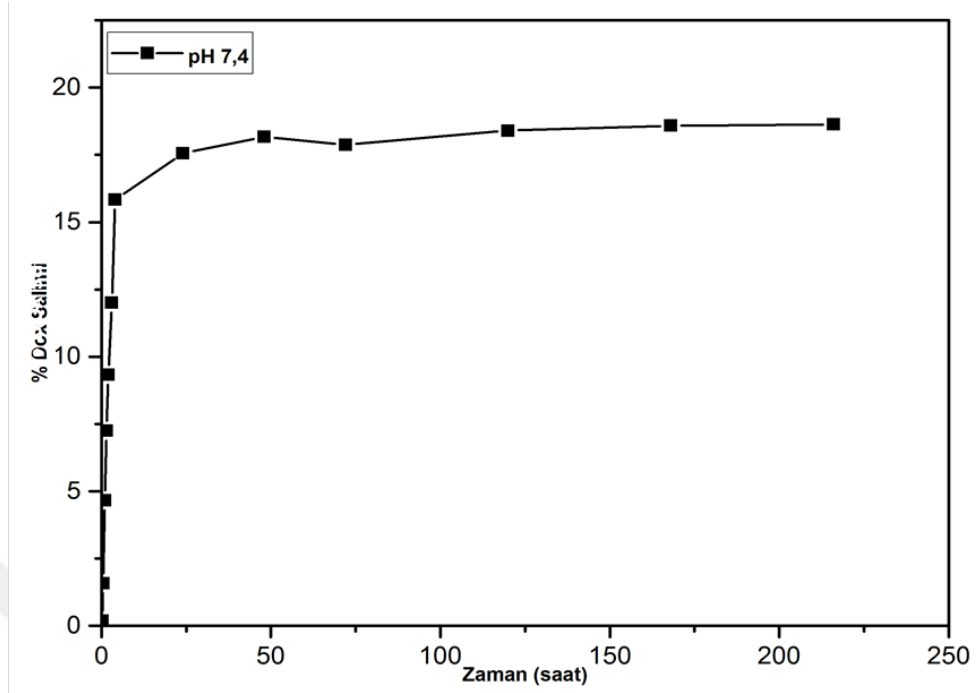
DOX antikanser ajanı için yapılan çalışmaların grafikleri incelendiğinde pH 5,5 değerinde yapılan salım çalışmalarında DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000) ve DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000) numunelerinin kümülatif salım değerleri için sırasıyla %36,2 (192 saat) ve %41 (528 saat) ile denge değerlerine ulaşmıştır. DOX antikanser ajanı için, DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000) ve DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000)’e ait pH 7,4 değerindeki kümülatif % salımın denge değerleri sırasıyla %18 (24 saat) ve %11,16 (288 saat) bulunmuştur. Bu sonuçlara göre asidik pH’larda salım değerleri nötr pH değerleri ile kıyaslandığında oldukça fazladır. Tüm numuneler için eşit süre göz önünde bulundurularak bir değerlendirme yapıldığında (96 saat) % salım değerleri Tablo 4.5’de bulunmaktadır.

Tablo 4.5: 96 saat % salım değerleri.

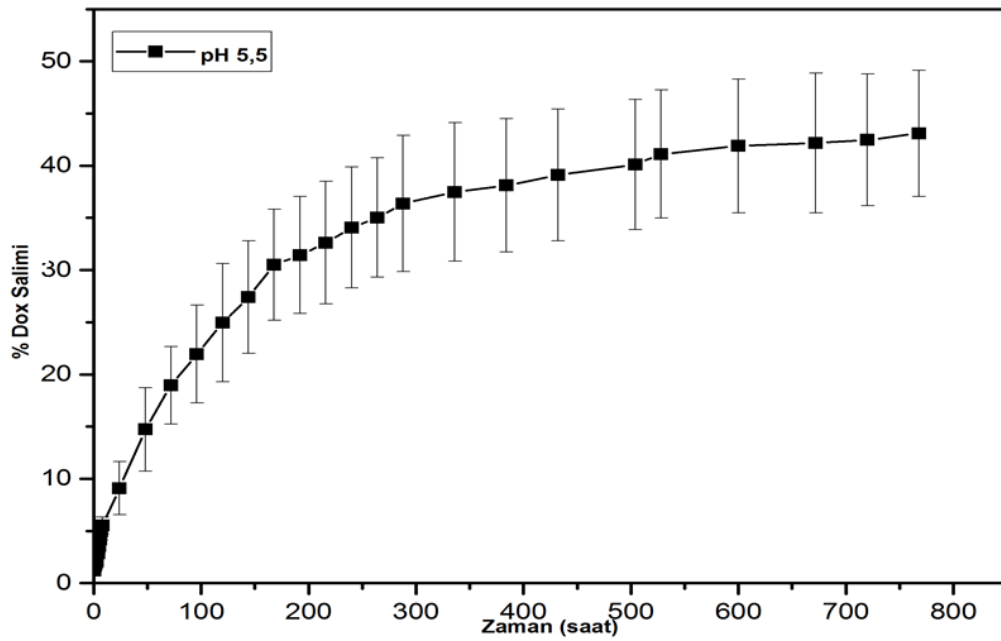
	%Salım (pH 5,5)	%Salım (pH 7,4)
DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000) (DOX)	33,86	18,2
DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000) (DOX)	21,93	7,22



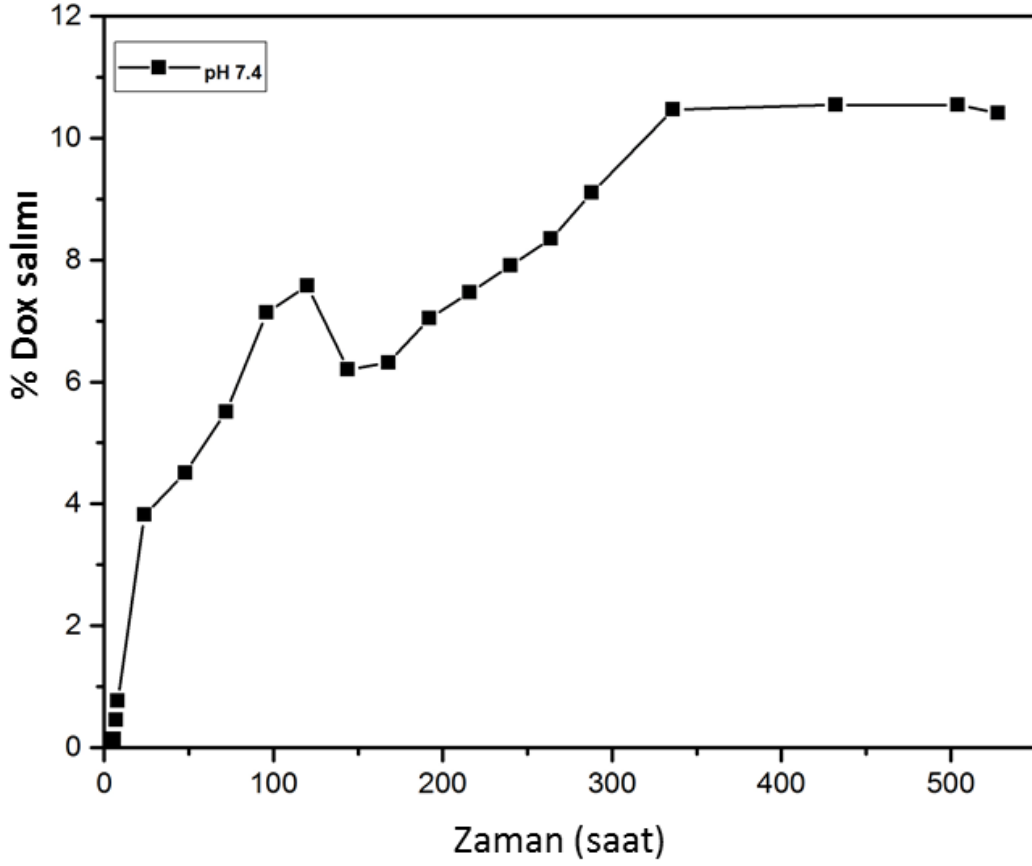
Şekil 4.17: DOX yüklü DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000) nanopartikül formülasyonuna ait salım grafiği.



Şekil 4.18: DOX yüklü DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000) nanopartikül formülasyonuna ait salım grafiği.



Şekil 4.19: DOX yüklü DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000) nanopartikül formülasyonuna ait salım grafiği.



Şekil 4.20: DOX yüklü DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000) nanopartikül formülasyonuna ait salım grafiği.

4.5. İLAÇ SALIM KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin sentezi, karakterizasyonu ve ilaç kinetiğinin incelenmesi konu başlıklı tez çalışmasında sentezlenmiş DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000) ve DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000) ürünlerinin her iki çözelti ortamındaki (pH 5,5 ve pH 7,4) salım kinetiklerin incelenmesi için çeşitli kinetik modeller kullanılmıştır. Buna göre DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000) ve DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000) ürünleri ile sentezlenmiş DOX yüklü nanopartiküllerin farklı ortamlardaki (pH 5,5 ve pH 7,4) salım kinetiklerini incelemek için ise Krosmeier-Peppas ve Higuchi modellerinin yanı sıra Zero Order salım kinetik modeli de incelenmiştir. Bu bulgulara ait değerler Tablo 4.6'da verilmiştir. İlgili salım kinetik modelleri Denklem 4.1-4.3 arasında verilmiştir.

$$M_t/M = K_m t^n \quad \text{Krosmeyer-Peppas Salım Kinetik modeli} \quad (4.1)$$

$$M_t/M_0 = kt^{1/2} \quad \text{Higuchi Salım Kinetik modeli} \quad (4.2)$$

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad \text{Zero Order Salım Kinetik modeli} \quad (4.3)$$

Km, Krosmeyer-Peppas kinetik sabiti; k, Higuchi kinetik sabiti; K₀, Zero Order kinetik sabiti.

Tablo 4.6: DOX yüklü nanopartiküllerin salım kinetiği tablosu.

	2B* (pH 7,4)		2B* (pH 5,5)		2D* (pH 7,4)		2D* (pH 5,5)	
KROSMAYER-PEPPAS (DOX)	K	7,431	K	12,474	K	1,013	K	0,0339
	n	0,195	n	0,215	n	0,397	n	0,3742
	R2	0,875	R2	0,929	R2	0,978	R2	0,9881
HIGUCHI (DOX)	K	0,016	K	0,0295	K	0,0047	K	0,0160
	R2	0,778	R2	0,8575	R2	0,9651	R2	0,9752
ZERO ORDER (DOX)	K	0,00124	K	0,0021	K	0,000253	K	0,0008
	R2	0,649	R2	0,7555	R2	0,899	R2	0,88241

2B*; DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-2000), **2D***; DPAE-PCL-b-MPEG-FOL (MPEG-5000)

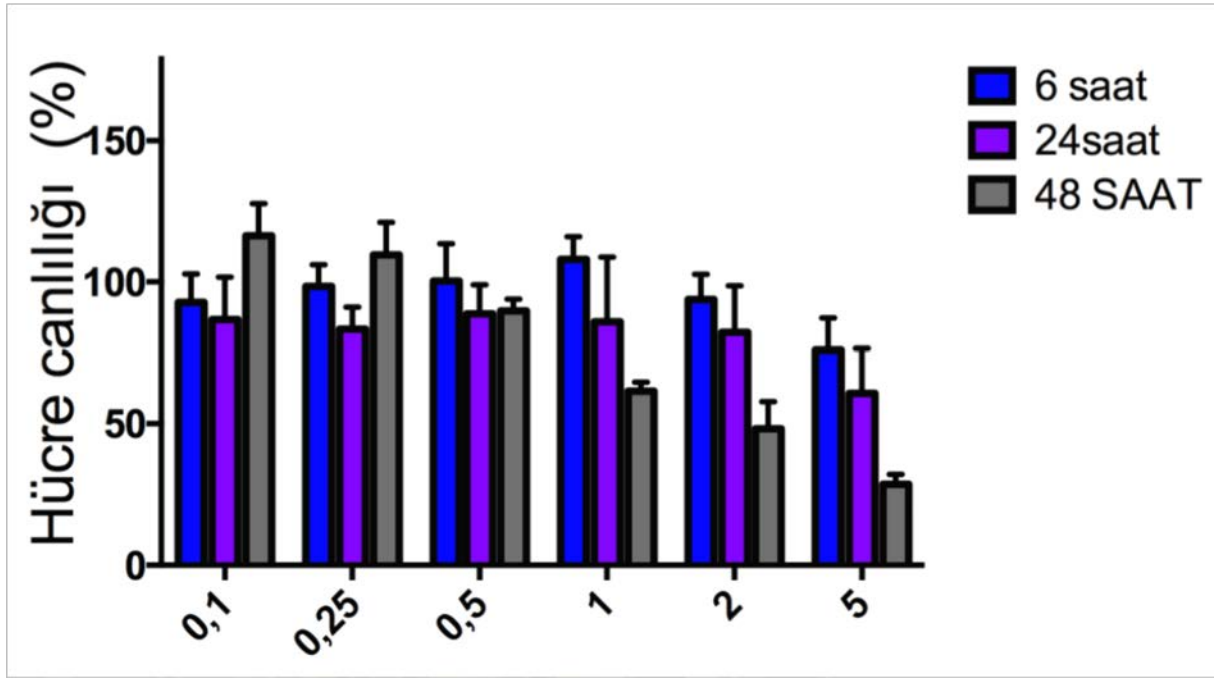
Tabloda verilen korelasyon katsayısı R2 değerleri incelendiğinde; her iki nanopartikül için, her iki pH değerinde DOX salım kinetiğinin en iyi Krosmeyer-Peppas salım kinetik modeli ile açıklanabildiği görülmektedir. Diğer iki modelden bir olan Higuchi modeli, 2D'nin pH 5,5 ve 7,4'teki davranışı için görece yüksek korelasyon katsayısına sahip olmakla birlikte, bu değer

Krosmeyer-Peppas modeli için hesaplanan R^2 değerinden düşüktür. Zero order kintetik modelin ise iki sistemin davranışını modellemek için uygun olmadığı belirlenmiştir.

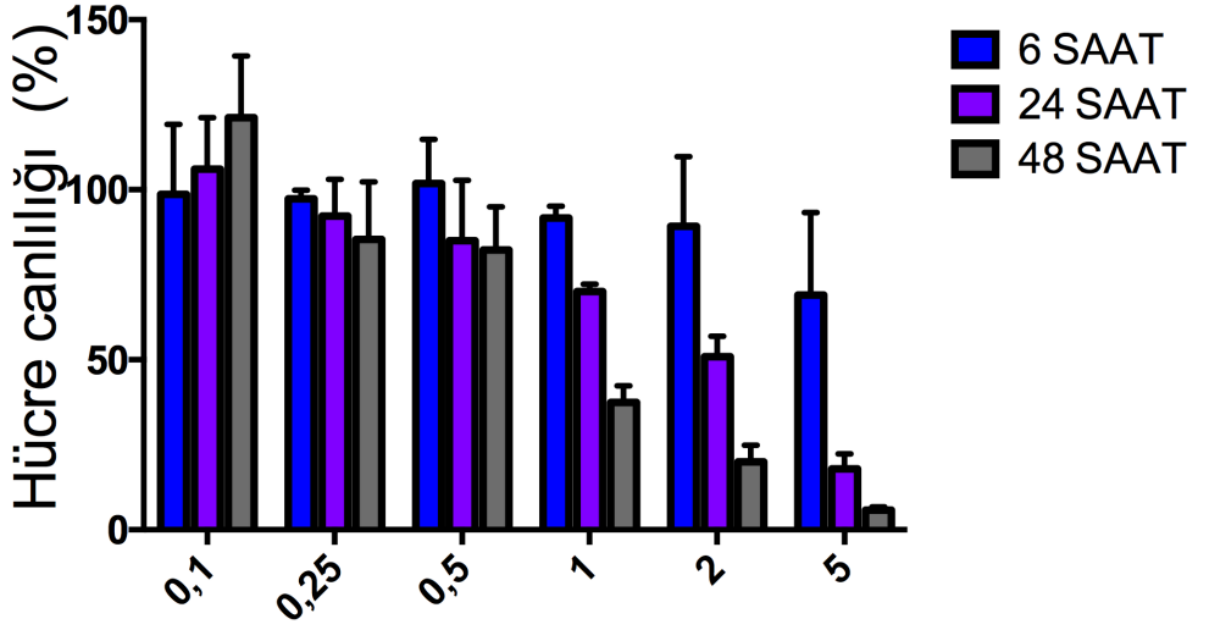
Krosmeyer-Peppas modeli için kinetik parameterler incelendiğinde, 2B nanopartikü için hesaplanan hız sabitinin her iki pH değerinde de 2D'ye göre çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun 2B partikülünün sentezinde kullanılan MPEG 2000 polimerinin, MPEG 5000'e göre düşük olmasından dolayı, partikül içerisinde DOX dizüzyonuna daha çok olanak sağlaması olduğu düşünülmektedir. Krosmeyer-Peppas kinetik modelinde bulunan n değerleri küresel yapılar için Non-Fickian difüzyonu işaret eden ($0,43 < n < 0,85$) aralığında olduğu belirlenmiştir.

4.6. NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HELA VE L929 HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNE AİT BULGULAR

Bu tez çalışması kapsamında nanopartikül formülasyonlarının sitotoksiteleri MTT testi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, bölüm 3.3.10.2'de belirtildiği üzere konsantrasyonlarda boş nanopartikül formülasyonlarının farklı sürelerde (6, 24 ve 48 saat) inkübasyona bırakılan HeLa hücrelerine ait MTT deney sonuçlarına ait bulgular Şekil 4.21'de görülmektedir.



Şekil 4.21: DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-2000) nanopartikülleri ile 6, 24 ve 48 saat inkübe edilmiş L929 hücrelerinin canlılığı (%).

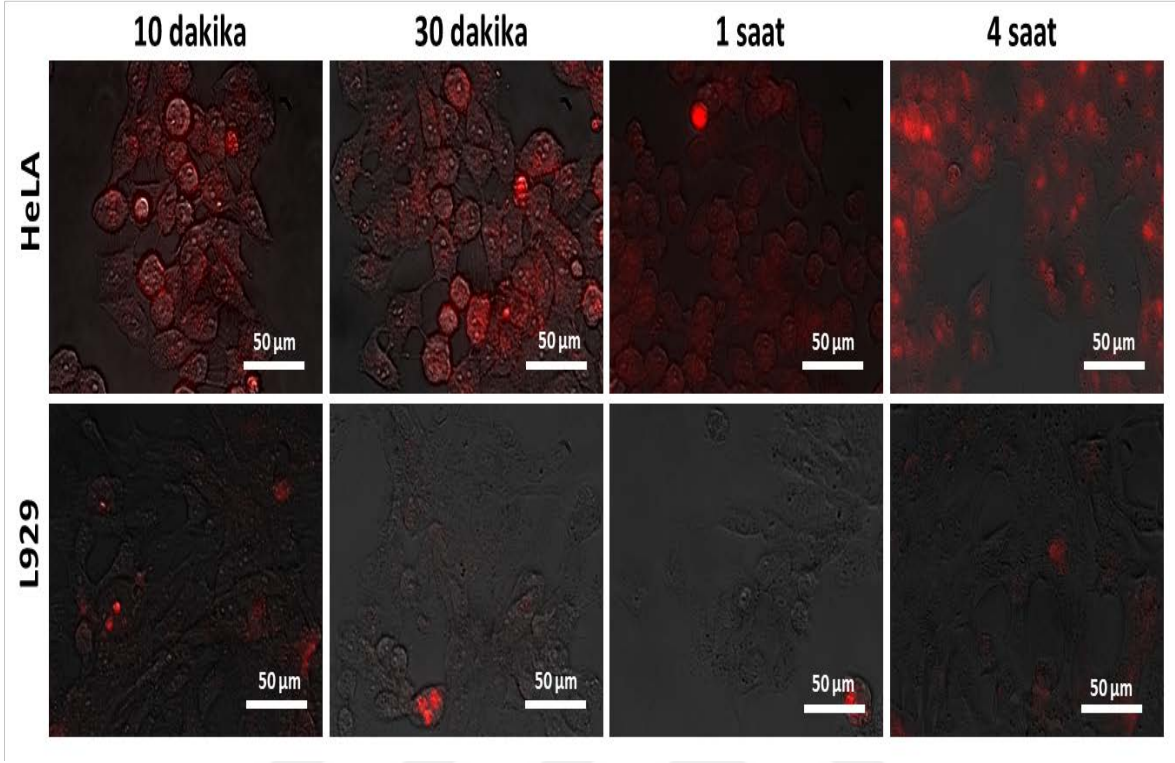


Şekil 4.22: DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-2000) nanopartikülleri ile 6, 24 ve 48 saat inkübe edilmiş HeLa hücrelerinin canlılığı (%).

DPAE-PCL-b-MPEG-FA nanopartiküllerinin toksisite çalışması L929 fare fibroblast hücre hattında MTT yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Sitotoksikite çalışmalarında DPAE-MPEG-b-PCL-FA polimerinin toksik olmadığı maksimum konsantrasyonu belirlemek için farklı konsantrasyonlarda nanopartiküller kullanılmıştır. L929 hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalarda, farklı inkübasyon sürelerinin (6, 24 ve 48 saat) ve konsantrasyonların (0,01, 0,25, 0,5, 1, 2 ve 5 mg/ml) sonunda hücre canlılığı değerleri Şekil 4.22 verilmektedir.

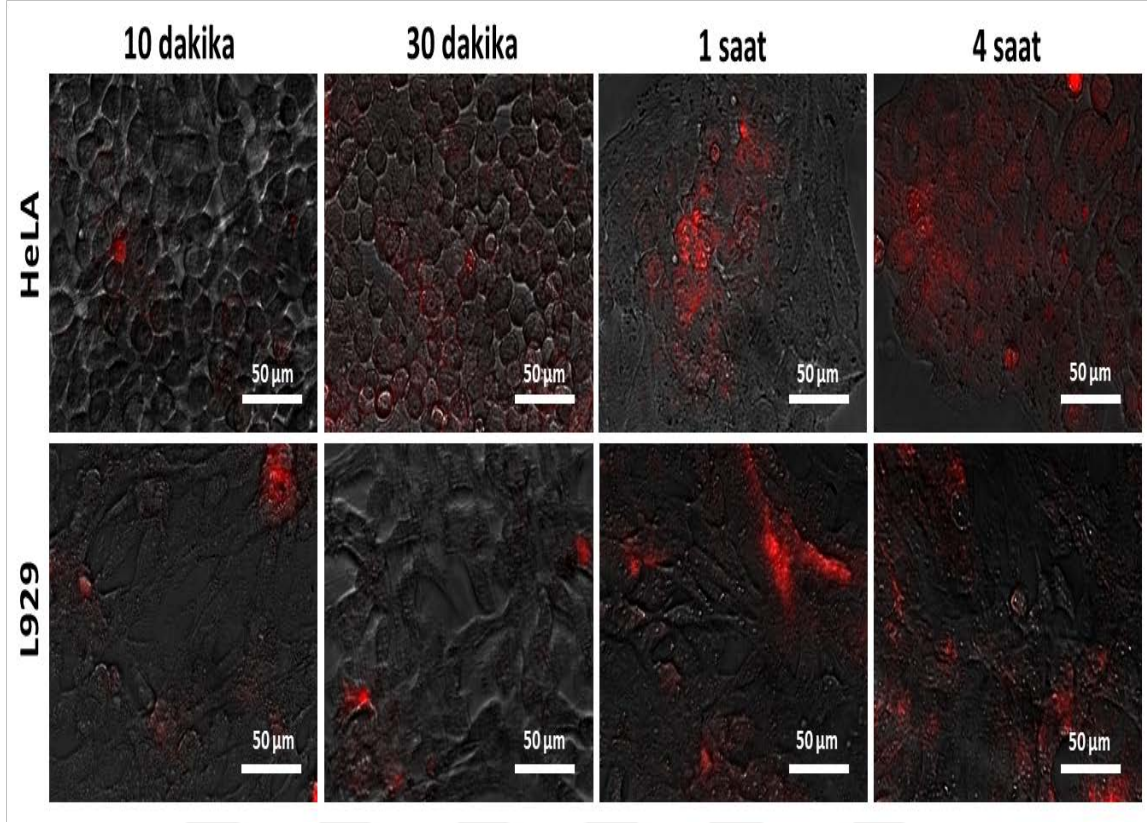
4.7. İLAÇ YÜKLÜ NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ HÜCRESEL ALIMLARINA AİT BULGULAR

Tez çalışmasında hücresel alım çalışmaları için folik asit modifiye ve folik asit modifiye olmayan nanopartikül formülasyonları kullanılmıştır. Bu amaçla, bölüm 3.3.10.3'te anlatıldığı üzere 0,5 mg/ml nanopartikül konsantrasyonu olacak şekilde hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının farklı inkübasyon sürelerindeki (10 dakika, 30 dakika, 1 saat ve 4 saat) floresans mikroskop görüntüleri Şekil 23 ve Şekil 24'de görülmektedir.



Şekil 4.23: DOX yüklü nanopartiküllerin hücresel alım ve hücre hedefleme özellikleri. DOX yüklü DPAE-MPEG-b-PCL-FA (MPEG-2000) nanopartikülleri ile 10 dakika, 30 dakika, 1 saat ve 4 saat inkübe edilen HeLa hücreleri ve L929 hücrelerinin floresans mikroskop görüntüsü.

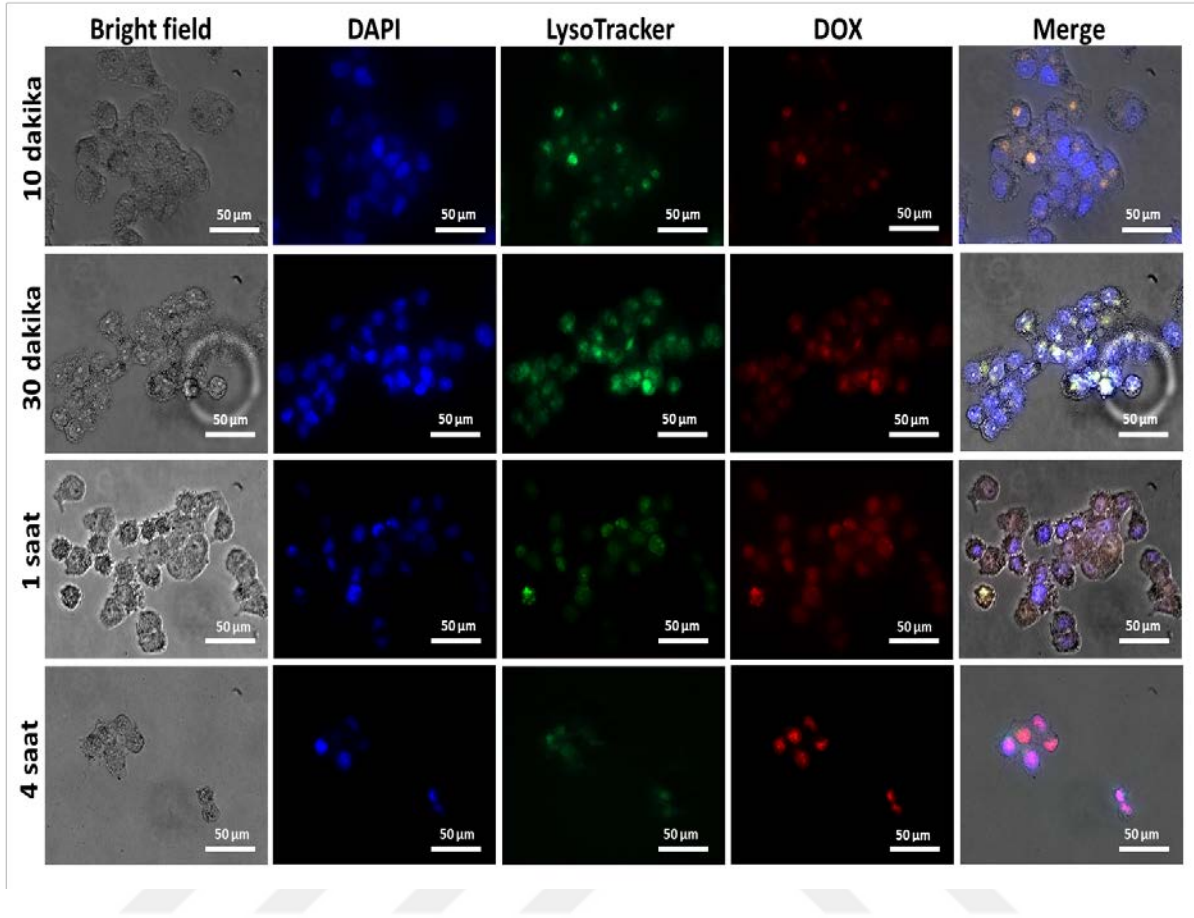
Bu tez çalışması kapsamında geliştirilen hedeflendirilmiş nanopartiküllerin kanser hücrelerine karşı hücresel alım yetenekleri ve hedefleme özelliklerini incelemek için, HeLa hücreleri (FR pozitif hücreler) ve L929 fare fibroblast hücreleri (FR negatif hücreleri), 0,5 mg/ml konsantrasyonda DOX yüklenmiş folik asit takılı (DPAE-MPEG-b-PCL-FA) ve folik asit takılı olmayan (DPAE-MPEG-b-PCL) nanopartikül formülasyonları ile 10 dakika, 30 dakika, 1 saat ve 4 saat inkübe edilmiştir. Şekil 4.23’de floresan mikroskop görüntülerinde gözlenen turuncu kümeler, DPAE-MPEG-b-PCL-FA nanopartiküllerin kanser hücrelerinin yüzeyinde bulunan folat reseptörlere nasıl ve ne etkiye bağlandığını göstermektedir. Şekil 4.24’de verilen floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde, folik asit takılı olmayan DPAE-MPEG-b-PCL (MPEG-2000) nanopartikül formülasyonlarında ise spesifik olmayan hücresel alım gerçekleşmiştir. DPAE-MPEG-b-PCL (MPEG-2000) her iki hücrede internalize olmuştur. Tüm sonuçlar HeLa hücrelerinin, hücre zarlarındaki endositozu geliştiren fazla miktarda folat reseptörleri eksprese etmesi nedeniyle daha yüksek hücresel alım verimliliğine sahip olduğunu gösterir.



Şekil 4.24: DOX yüklü DPAE-MPEG-b-PCL (MPEG-2000) nanopartiküllerin hücresel alım ve hücre hedefleme özellikleri.

Şekil 4.25’de verilen floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde, folik asit takılı olmayan nanopartiküllerinin HeLa hücreleri hücrelerine pasif hedefleme yoluyla bağlandığını göstermektedir.

Şekil 4.25’de yer alan nanopartiküllerin HeLa hücreleri ile farklı sürelerde inkübasyon sonrası elde edilen mikroskop görüntüleri incelendiğinde; HeLa hücrelerinde DPAE-MPEG-b-PCL nanopartiküllerin akümülyasyonunun DPAE-MPEG-b-PCL-FA nanopartiküllerinkine göre daha az olduğu görülmektedir. Bu da, bu tez çalışmasında geliştirilen DPAE-MPEG-b-PCL-FA nanopartiküllerinin, taşıdığı folik asit (FA) ligand sayesinde, HeLa hücrelerinin yüzeyinde bulunan folat reseptörlerine spesifik olarak bağlandığını ve hücre içine endositoz mekanizma ile alındıklarını göstermektedir.



Şekil 4.25: DOX yüklü 2B-DPAE-MPEG-b-PCL-FA nanopartiküllerinin LysoTracker ve DAPI boyama sonuçları. |

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Konvansiyonel ilaç salım sistemlerinden kaynaklanan sorunlar göz önünde bulundurulduğunda alternatif ve yenilikçi yaklaşımlar akademinin araştırma konuları arasında yer almaktadır. Buna göre hedeflenmiş bir sistem ile daha verimli ve etkili ilaç taşınımlarının yapılabilmesi mümkündür. Çekirdek-çoklu kabuk (CMS) polimerler, dallanmış polimerler çekirdek kısmı olarak, hidrofobik ve hidrofilik polimerler sırasıyla iç ve dış kabuklar olarak kullanılarak hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemleridir. Bu tip malzemelere hedeflendirilmiş kanser tedavisinde kullanılmak üzere, yüzeylerine folik asit gibi ligandlar bağlanarak etkili tedavi sonuçları alınabilmektedir. Sunulan tez çalışmasında özgün bir yaklaşımla hazırlanan CMS polimerlerin mevcut uygulama alanlarına bir yenisini daha eklemeyi amaçlamaktadır. Bu kapsamında hedeflendirilmiş kanser kemoterapisinde CMS polimerlerin ilaç taşıma sistemleri olarak kullanılabilirlikleri birçok yönden irdelenmiştir.

117Z732 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında, DOX salım kinetiği çalışmalarını içerecek şekilde farklandırılarak planlanan bu tez çalışmasında, öncelikle ilaç salım sistemlerinde kullanılabilecek yapıların sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, sentez reaksiyonlarında kullanılan PEG yapıların molekül ağırlıkları ve PEG/PCL oranları farklandırılarak MPEG-b-PCL (MPEG-2000, PEG/CL 1:20), MPEG-b-PCL (MPEG-2000, PEG/CL 1:40), MPEG-b-PCL (MPEG-5000, PEG/CL 1:20) ve MPEG-b-PCL (MPEG-5000, PEG/CL 1:40) olmak üzere dört farklı amfifilik blok kopolimer sentezlenmiştir. TÜBİTAK projesi çalışmalarında da kullanılmak üzere, elde edilen blok kopolimerlerin çeşitli özellikleri (partikül boyutu, çözünürlük özellikleri vb.) belirlenmiş ve karakterizasyon sonuçlarına göre, amfifilik blok kopolimerlerin yapısında bulunan hidrofobik segmentlerin zincir uzunluğu arttıkça, blok kopolimerin partikül büyüklüğünün da arttığı gözlenmiştir. Önemli ölçüde partikül büyüklüğü artışı malzemelerin hedeflendirilmiş kanser tedavisinde kullanılabilirliğini kısıtladığından, sentezlenen polimerlerin partikül büyüklüğü üzerinden değerlendirilmesi ilk aşamayı oluşturmuştur. Bu değerlendirmelere göre, MPEG-b-PCL (MPEG-2000, PEG/CL 1:20) ve MPEG-b-PCL (MPEG-5000, PEG/CL 1:20) blok kopolimerinin ilaç taşıma sisteminde kullanılmaya uygun polimer adayları olabilecekleri belirlenmiştir. Takiben, bir dizi reaksiyon basamağı sonucu iki farklı dallanmış poli(amino ester) esaslı amfifilik blok kopolimer (DPAE-PCL-b- MPEG2000 ve DPAE-PCL-b- MPEG5000) sentezlenmiştir. Sentez

basamakları ve sentezlenmiş ürünlere ait FTIR, C-NMR ve H-NMR sonuçları toplu olarak değerlendirildiğinde her iki ürünün de başarılı bir şekilde sentezlendiği kanaatine varılmıştır. Sentezlenen ürünlerin aktif hedefleme özelliği gösterebilmesi için hedefleme molekülü olarak folik asit modifikasyonu yapılmış ve bu modifikasyon reaksiyonu da H-NMR analizleri ile teyit edilmiştir.

Sentezlenmiş DPAE-PCL-*b*-MPEG2000 ve DPAE-PCL-*b*-MPEG5000 yapıları ile DPAE-MPEG-*b*-PCL-FOL (MPEG-2000) ve DPAE-MPEG-*b*-PCL-FOL (MPEG-5000) yapılarının DLS analizi ile partikül boyutları belirlenmiştir. Bu analiz sonuçlarına göre DPAE-PCL-*b*-MPEG2000 ve DPAE-MPEG-*b*-PCL-FOL (MPEG-2000) ürünlerine ait ortalama partikül boyutlarının sırasıyla 34,51 ve 38,67nm olduğu bulunmuştur. DPAE-PCL-*b*-MPEG5000 ile MPEG-*b*-PCL-FOL (MPEG-5000) ürünlerine ait ortalama partikül boyutları ise sırasıyla 32,91 nm ve 41,58 nm'dir. Ortalama partikül boyutu sonuçlarına göre yapıya yeni bir molekül (folik asit) konjugasyonu ile beklenildiği üzere ortalama partikül boyutu artmıştır. Ayrıca partikül boyutu dağılımı (polidispersite) değerleri ilaç taşıma sistemleri için oldukça uygundur. Ortalama partikül boyutları ve polidispersite değerlerine ait sonuçlar, yapılan SEM ve TEM analiz sonuçları ile de doğrulanmıştır. İlaç yüklü nanopartiküllerin ortalama partikül boyutları mikroskop ölçümleri ile 88 ve 174 nm olarak belirlenmiş ve bu değerlerin DLS sonuçları ile belirlenen değerler ile uyumlu olduğu gösterilmiştir.

Tez çalışmasının önemli bir aşaması olan nanopartiküllerin ilaç yükleme etkinliğinin belirlenmesi için yapılan çalışmalara göre, 1/1-1/0,05 arasında değişen beş farklı polimer/ilaç oranlarında optimum değer olarak 1/0,5 değeri bulunmuştur. DPAE-MPEG-*b*-PCL-FOL (MPEG-5000) ürünün DOX antikanser ajanına ait ilaç yükleme etkinliği %41,183 bulunmuştur. Nanopartiküllerin *in vitro* salım davranışlarının belirlenmesi için farklı pH ortamlarında kümülatif % salım değerleri incelenmiştir. Buna göre her iki nanopartikül örneği için salım davranışları pH 5,5 değerinde pH 7,4 değerine kıyasla oldukça yüksektir. Bu durumun nedeni yapıda bulunan fonsiyonel grupların asidik pH'lara duyarlı olması dolayısıyla yapıda bulunan ilacın yapıdan ayrılmasına olanak tanınmasıdır. Elde edilen sonuçlarda sistematik şekilde gözlemlenen bir diğer durum ise MPEG2000 yapısına kıyasla MPEG5000 yapısından gerçekleşen ilaç salım değerlerinin salım denge değerlerine ulaşması daha kısa sürede olmaktadır. Bu durumun nedeni olarak, partikülü oluşturan ana polimerik zincirlerin molekül ağırlığının artması ile, yapıdaki dolaşıklıkların fazla olması ayrıca

ortalama partikül boyutunun büyümesiyle ilaç salım denge değerlerine ulaşılmasının uzaması olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışmalarının temel alanlarından biri olan salım kinetiği çalışmalarında ise DOX için üç farklı salım kinetik modeli (Krosmeye-Peppas, Higuchi, Zero Order) uygulanmıştır. Buna göre salım kinetik tabloları incelendiğinde sentezlenmiş iki çeşit nanopartikül için de salım kinetikleri Krosmeyer-Peppas modeli ile yüksek oranda örtüşmektedir. Krosmeyer-Peppas kinetik modelinde bulunan n değerleri küresel yapılar için non-Fickian difüzyonu işaret eden $0,43 < n < 0,85$ aralığında olduğu görülmüştür.

Çalışmlarda son olarak DPAE-MPEG-b-PCL-FOL (MPEG-2000) nanopartikül formülasyonlarının HeLa ve L929 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre; $\leq 0,5$ mg/mL konsantrasyonlarındaki DPAE-MPEG-b-PCL-FOL (MPEG-2000) nanopartikül formülasyonunun L929 ve HeLa hücreleri üzerinde toksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır. Nanopartiküllerin hedefleme ajanı olarak yapıya konjuge edilen folik asit molekülünün hücre geçişlerine katkısını gözlemlemek için mikroskop altında yapılan görüntüleme çalışmalarında folik asidin nanopartiküllerin hücre geçişlerine katkısı görülmektedir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde nano boyutta, aktif hedefleme stratejisine uygun antikanser ilaç yükleme ve salım verimleri yüksek, dallanmış poli(amino ester) esaslı ilaç taşıma sistemleri için uygun bir aday başarılı şekilde sentezlenmiştir. Sentezlenmiş yapı *in vitro* çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre umut vaat etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Ramsden, J. (2008). *Essentials of nanotechnology*. BookBoon.
- [2]. Emeje, M. O., Obidike, I. C., Akpabio, E. I., & Ofoefule, S. I. (2012). Nanotechnology in drug delivery. *Recent advances in novel drug carrier systems*, 69-106.
- [3]. Roco, M. C. (2007). National nanotechnology initiative-past, present, future. *Handbook on nanoscience, engineering and technology*, 2.
- [4]. Kaur, G., Singh, T., & Kumar, A. (2012). Nanotechnology: A review. *IJEAR*, 2, 50-53.
- [5]. Stiriba, S. E., Kautz, H., & Frey, H. (2002). Hyperbranched molecular nanocapsules: comparison of the hyperbranched architecture with the perfect linear analogue. *Journal of the American Chemical Society*, 124(33), 9698-9699.
- [6]. Palmer, D. H., Young, L. S., & Mautner, V. (2006). Cancer gene-therapy: clinical trials. *Trends in biotechnology*, 24(2), 76-82.
- [7]. Saçak, M., 2018, Polimer kimyası, Gazi kitabevi, Ankara, ISBN: 978-605-344-740-5.
- [8]. Van Krevelen, D. W., & Te Nijenhuis, K. (2009). *Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions*. Elsevier.
- [9]. TÜYLEK, Z. (2017). İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER VE NANOTEKNOLOJİK ETKİLEŞİM Drug Delivery Systems and Nanotechnological Interaction. *Bozok Tıp Dergisi*, 7(3), 89-98.
- [10]. Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A. (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 1, 149-173.
- [11]. Zhang, X. Z., Lewis, P. J., & Chu, C. C. (2005). Fabrication and characterization of a smart drug delivery system: microsphere in hydrogel. *Biomaterials*, 26(16), 3299-3309.
- [12]. Gatenby, R. A., Gawlinski, E. T., Gmitro, A. F., Kaylor, B., & Gillies, R. J. (2006). Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer research*, 66(10), 5216-5223.
- [13]. Aluri, S., Janib, S. M., & Mackay, J. A. (2009). Environmentally responsive peptides as anticancer drug carriers. *Advanced drug delivery reviews*, 61(11), 940-952.
- [14]. . Chan, A., Orme, R. P., Fricker, R. A., & Roach, P. (2013). Remote and local control of stimuli responsive materials for therapeutic applications. *Advanced drug delivery reviews*, 65(4), 497-514
- [15]. Fattal, E., Couvreur, P., & Dubernet, C. (2004). “Smart” delivery of antisense oligonucleotides by anionic pH-sensitive liposomes. *Advanced drug delivery reviews*, 56(7), 931-946.

- [16]. Felber, A. E., Dufresne, M. H., & Leroux, J. C. (2012). pH-sensitive vesicles, polymeric micelles, and nanospheres prepared with polycarboxylates. *Advanced drug delivery reviews*, 64(11), 979-992.
- [17]. Jang, E., Lim, E. K., Choi, Y., Kim, E., Kim, H. O., Kim, D. J., ... & Haam, S. (2013). π -Hyaluronan nanocarriers for CD44-targeted and pH-boosted aromatic drug delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(41), 5686-5693.
- [18]. Traitel, T., Goldbart, R., & Kost, J. (2008). Smart polymers for responsive drug-delivery systems. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19(6), 755-767.
- [19]. James, H. P., John, R., Alex, A., & Anoop, K. (2014). Smart polymers for the controlled delivery of drugs—a concise overview. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(2), 120-127.
- [20]. Timko, B. P., Dvir, T., & Kohane, D. S. (2010). Remotely triggerable drug delivery systems. *Advanced materials*, 22(44), 4925-4943.
- [21]. Portney, N. G., & Ozkan, M. (2006). Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384(3), 620-630.
- [22]. Fleige, E., Quadir, M. A., & Haag, R. (2012). Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications. *Advanced drug delivery reviews*, 64(9), 866-884.
- [23]. Sezer, A. D. (Ed.). (2012). *Recent advances in novel drug carrier systems*. BoD—Books on Demand.
- [24]. Srivastava, A., Yadav, T., Sharma, S., Nayak, A., Kumari, A. A., & Mishra, N. (2015). Polymers in drug delivery. *Journal of Biosciences and Medicines*, 4(1), 69-84.
- [25]. Stefani, S. (2016). *Core-shell and core-amphiphilic branched shell nanocarriers based on biodegradable hyperbranched polymers, as potential drug delivery systems* (Doctoral dissertation).
- [26]. Sultana, F., Manirujjaman, M., Imran-Ul-Haque, M. A., & Sharmin, S. (2013). An overview of nanogel drug delivery system. *J Appl Pharm Sci*, 3(8), 95-105.
- [27]. Kim, S., Kim, J. H., Jeon, O., Kwon, I. C., & Park, K. (2009). Engineered polymers for advanced drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3), 420-430.
- [28]. Zheng, L., Wang, Y., Zhang, X., Ma, L., Wang, B., Ji, X., & Wei, H. (2018). Fabrication of hyperbranched block-statistical copolymer-based prodrug with dual sensitivities for controlled release. *Bioconjugate chemistry*, 29(1), 190-202.
- [29]. Caminade, A. M., Yan, D., & Smith, D. K. (2015). Dendrimers and hyperbranched polymers. *Chemical Society Reviews*, 44(12), 3870-3873

- [30]. Barman, S. R., Nain, A., Jain, S., Punjabi, N., Mukherji, S., & Satija, J. (2018). Dendrimer as a multifunctional capping agent for metal nanoparticles for use in bioimaging, drug delivery and sensor applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(16), 2368-2384.
- [31]. Yadav, H. K., Almokdad, A. A., Sumia, I. M., & Debe, M. S. (2019). Polymer-based nanomaterials for drug-delivery carriers. In *Nanocarriers for Drug Delivery* (pp. 531-556). Elsevier.
- [32]. Pal, D., & Nayak, A. K. (2010). Nanotechnology for targeted delivery in cancer therapeutics. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 1(1), 1-7.
- [33]. Duro-Castano, A., Movellan, J., & Vicent, M. J. (2015). Smart branched polymer drug conjugates as nano-sized drug delivery systems. *Biomaterials science*, 3(10), 1321-1334.
- [34]. Tomuta, A. M. (2013). *New and improved thermosets based on epoxy resins and dendritic polyesters* (Doctoral dissertation, Universitat Rovira i Virgili).
- [35]. Kricheldorf, H. R., & Stöber, O. (1994). New polymer syntheses, 76 Hyperbranched polyesters by polycondensation of silylated 5-acetoxyisophthalic acid. *Macromolecular rapid communications*, 15(1), 87-93.
- [36]. Wooley, K. L., Fréchet, J. M., & Hawker, C. J. (1994). Influence of shape on the reactivity and properties of dendritic, hyperbranched and linear aromatic polyesters. *Polymer*, 35(21), 4489-4495.
- [37]. Shanmugam, T., Raghavan, A., & Sultan Nasar, A. (2006). Distribution of dendritic, terminal and linear units and relationship between degree of Branching and molecular weight of AB₂-type hyperbranched polymer: a ¹³C-nmr study. *Journal of Macromolecular Science Part A: Pure and Applied Chemistry*, 43(9), 1387-1397.
- [38]. Kim, Y. H., & Webster, O. W. (1992). Hyperbranched polyphenylenes. *Macromolecules*, 25(21), 5561-5572.
- [39]. Hawker, C. J., & Chu, F. (1996). Hyperbranched poly (ether ketones): manipulation of structure and physical properties. *Macromolecules*, 29(12), 4370-4380.
- [40]. Seiler, M. (2006). Hyperbranched polymers: Phase behavior and new applications in the field of chemical engineering. *Fluid Phase Equilibria*, 241(1-2), 155-174.
- [41]. Hawker, C. J., Lee, R., & Fréchet, J. M. J. (1991). One-step synthesis of hyperbranched dendritic polyesters. *Journal of the American Chemical Society*, 113(12), 4583-4588.
- [42]. Frechet, J. M., Henmi, M., Gitsov, I., Aoshima, S., Leduc, M. R., & Grubbs, R. B. (1995). Self-condensing vinyl polymerization: an approach to dendritic materials. *Science*, 269(5227), 1080-1083.
- [43]. Matyjaszewski, K., Gaynor, S. G., & Müller, A. H. (1997). Preparation of hyperbranched polyacrylates by atom transfer radical polymerization. 2. Kinetics and mechanism of chain

- growth for the self-condensing vinyl polymerization of 2-((2-bromopropionyl) oxy) ethyl acrylate. *Macromolecules*, 30(23), 7034-7041.
- [44]. Matyjaszewski, K., & Gaynor, S. G. (1997). Preparation of hyperbranched polyacrylates by atom transfer radical polymerization. 3. Effect of reaction conditions on the self-condensing vinyl polymerization of 2-((2-bromopropionyl) oxy) ethyl acrylate. *Macromolecules*, 30(23), 7042-7049.
- [45]. Magnusson, H., Malmström, E., & Hult, A. (1999). Synthesis of hyperbranched aliphatic polyethers via cationic ring-opening polymerization of 3-ethyl-3-(hydroxymethyl) oxetane. *Macromolecular rapid communications*, 20(8), 453-457.
- [46]. Sunder, A., Hanselmann, R., Frey, H., & Mülhaupt, R. (1999). Controlled synthesis of hyperbranched polyglycerols by ring-opening multibranching polymerization. *Macromolecules*, 32(13), 4240-4246.
- [47]. Matyjaszewski, K., Gaynor, S. G., Kulfan, A., & Podwika, M. (1997). Preparation of hyperbranched polyacrylates by atom transfer radical polymerization. 1. Acrylic AB* monomers in "living" radical polymerizations. *Macromolecules*, 30(17), 5192-5194.
- [48]. Liu, M., Vladimirov, N., & Fréchet, J. M. (1999). A new approach to hyperbranched polymers by ring-opening polymerization of an AB monomer: 4-(2-hydroxyethyl)- ϵ -caprolactone. *Macromolecules*, 32(20), 6881-6884.
- [49]. Coessens, V., Pintauer, T., & Matyjaszewski, K. (2001). Functional polymers by atom transfer radical polymerization. *Progress in polymer science*, 26(3), 337-377.
- [50]. Chang, H. T., & Fréchet, J. M. (1999). Proton-transfer polymerization: a new approach to hyperbranched polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 121(10), 2313-2314.
- [51]. Gao, C., Yan, D., & Frey, H. (2011). Promising dendritic materials: an introduction to hyperbranched polymers. *Hyperbranched Polymers: Synthesis, Properties, and Applications; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA*, 1-26.
- [52]. Hobson, L. J., & Feast, W. J. (1999). Poly (amidoamine) hyperbranched systems: synthesis, structure and characterization. *Polymer*, 40(5), 1279-1297.
- [53]. Jeon, I. Y., Noh, H. J., & Baek, J. B. (2018). Hyperbranched macromolecules: From synthesis to applications. *Molecules*, 23(3), 657.
- [54]. Hult, A., Johansson, M., & Malmström, E. (1995, July). Dendritic resins for coating applications. In *Macromolecular Symposia* (Vol. 98, No. 1, pp. 1159-1161). Basel: Hüthig & Wepf Verlag.
- [55]. Zhao, M., Zhou, Y., Bruening, M. L., Bergbreiter, D. E., & Crooks, R. M. (1997). Inhibition of electrochemical reactions at gold surfaces by grafted, highly fluorinated, hyperbranched polymer films. *Langmuir*, 13(6), 1388-1391.

- [56]. Wang, M. J., Yuan, G. C., & Han, C. C. (2015). Influences of hyperbranched polyethylenimine on the reactive compatibilization of polycarbonate/polyamide blends. *Chinese Journal of Polymer Science*, 33(4), 652-660.
- [57]. Slagt, M. Q., Stiriba, S. E., Klein Gebbink, R. J., Kautz, H., Frey, H., & van Koten, G. (2002). Encapsulation of Hydrophilic Pincer– Platinum (II) Complexes in Amphiphilic Hyperbranched Polyglycerol Nanocapsules. *Macromolecules*, 35(15), 5734-5737.
- [58]. Kim, Y. H., & Webster, O. W. (1992). Hyperbranched polyphenylenes. *Macromolecules*, 25(21), 5561-5572.
- [59]. Massa, D. J., Shriner, K. A., Turner, S. R., & Voit, B. I. (1995). Novel blends of hyperbranched polyesters and linear polymers. *Macromolecules*, 28(9), 3214-3220.
- [60]. Öztürk Bal, A., (2015), Hedeflendirilmiş polimerik nanopartiküler taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi, Doktora Tezi, T.C. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [61]. Yang, H., Zhao, X., Zhang, X., Ma, L., Wang, B., & Wei, H. (2018). Optimization of bioreducible micelles self-assembled from amphiphilic hyperbranched block copolymers for drug delivery. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 56(13), 1383-1394.
- [62]. Zeng, X., Zhang, Y., Wu, Z., Lundberg, P., Malkoch, M., & Nyström, A. M. (2012). Hyperbranched copolymer micelles as delivery vehicles of doxorubicin in breast cancer cells. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 50(2), 280-288.
- [63]. Zhao, S., Yang, H., Zuo, C., Sun, L., Ma, L., & Wei, H. (2016). pH-sensitive drug release of star-shaped micelles with OEG brush corona. *RSC advances*, 6(112), 111217-111225.
- [64]. Cheng, J., Ding, J. X., Wang, Y. C., & Wang, J. (2008). Synthesis and characterization of star-shaped block copolymer of poly-(ϵ -caprolactone) and poly (ethyl ethylene phosphate) as drug carrier. *Polymer*, 49(22), 4784-4790.
- [65]. Dai, Y., & Zhang, X. (2018). Recent Advances in Amphiphilic Polymers as the Stabilizers of Colloidal Gold Nanoparticles. *Macromolecular Materials and Engineering*, 303(6), 1800105.
- [66]. Kataoka, K., Harada, A., & Nagasaki, Y. (2012). Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 37-48.
- [67]. Li, G., Liu, J., Pang, Y., Wang, R., Mao, L., Yan, D., ... & Sun, J. (2011). Polymeric micelles with water-insoluble drug as hydrophobic moiety for drug delivery. *Biomacromolecules*, 12(6), 2016-2026.
- [68]. Zhang, S., Hou, Y., Chen, H., Liao, Z., Chen, J., Xu, B. B., & Kong, J. (2018). Reduction-responsive amphiphilic star copolymers with long-chain hyperbranched poly (ϵ -

- caprolactone) core and disulfide bonds for trigger release of anticancer drugs. *European Polymer Journal*, 108, 364-372.
- [69]. Ranger, M., Jones, M. C., Yessine, M. A., & Leroux, J. C. (2001). From well-defined diblock copolymers prepared by a versatile atom transfer radical polymerization method to supramolecular assemblies. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 39(22), 3861-3874.
- [70]. Zhang, J., & Ma, P. X. (2009). Polymeric core-shell assemblies mediated by host-guest interactions: versatile nanocarriers for drug delivery. *Angewandte Chemie*, 121(5), 982-986.
- [71]. Moughton, A. O., & O'Reilly, R. K. (2008). Noncovalently connected micelles, nanoparticles, and metal-functionalized nanocages using supramolecular self-assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 130(27), 8714-8725.
- [72]. Bouchemal, K., Agnely, F., Koffi, A., & Ponchel, G. (2009). A concise analysis of the effect of temperature and propanediol-1, 2 on Pluronic F127 micellization using isothermal titration microcalorimetry. *Journal of colloid and interface science*, 338(1), 169-176.
- [73]. 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.
- [74]. Mai, Y., & Eisenberg, A. (2012). Self-assembly of block copolymers. *Chemical Society Reviews*, 41(18), 5969-5985.
- [75]. Riess, G. (2003). Micellization of block copolymers. *Progress in polymer science*, 28(7), 1107-1170.
- [76]. La, S. B., Okano, T., & Kataoka, K. (1996). Preparation and characterization of the micelle-forming polymeric drug indomethacin-incorporated poly (ethylene oxide)-poly (β -benzyl L-aspartate) block copolymer micelles. *Journal of pharmaceutical sciences*, 85(1), 85-90.
- [77]. Kim, S. Y., Cho, S. H., Lee, Y. M., & Chu, L. Y. (2007). Biotin-conjugated block copolymeric nanoparticles as tumor-targeted drug delivery systems. *Macromolecular research*, 15(7), 646-655.
- [78]. Allen, C., Yu, Y., Maysinger, D., & Eisenberg, A. (1998). Polycaprolactone-b-poly (ethylene oxide) block copolymer micelles as a novel drug delivery vehicle for neurotrophic agents FK506 and L-685,818. *Bioconjugate chemistry*, 9(5), 564-572.
- [79]. Kim, S. Y., Shin, I. G., Lee, Y. M., Cho, C. S., & Sung, Y. K. (1998). Methoxy poly (ethylene glycol) and ϵ -caprolactone amphiphilic block copolymeric micelle containing indomethacin.: II. Micelle formation and drug release behaviours. *Journal of controlled release*, 51(1), 13-22.

- [80]. Harada, A., & Kataoka, K. (1998). Novel polyion complex micelles entrapping enzyme molecules in the core: preparation of narrowly-distributed micelles from lysozyme and poly (ethylene glycol)– poly (aspartic acid) block copolymer in aqueous medium. *Macromolecules*, 31(2), 288-294.
- [81]. Jeong, Y. I., Cheon, J. B., Kim, S. H., Nah, J. W., Lee, Y. M., Sung, Y. K., ... & Cho, C. S. (1998). Clonazepam release from core-shell type nanoparticles in vitro. *Journal of Controlled Release*, 51(2-3), 169-178.
- [82]. Liu, L., Li, C., Liu, X., & He, B. (1999). Micellar formation in aqueous milieu from biodegradable triblock copolymer polylactide/poly (ethylene glycol)/polylactide. *Polymer journal*, 31(10), 845-850.
- [83]. Katayose, S., & Kataoka, K. (1998). Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with poly (ethylene glycol)–poly (l-lysine) block copolymer. *Journal of pharmaceutical sciences*, 87(2), 160-163.
- [84]. Kabanov, A. V., Chekhonin, V. P., Alakhov, V. Y., Batrakova, E. V., Lebedev, A. S., Melik-Nubarov, N. S., ... & Kabanov, V. A. (1989). The neuroleptic activity of haloperidol increases after its solubilization in surfactant micelles: micelles as microcontainers for drug targeting. *FEBS letters*, 258(2), 343-345.
- [85]. Inoue, T., Chen, G., Nakamae, K., & Hoffmana, 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.
- [86]. Wilhelm, M., Zhao, C. L., Wang, Y., Xu, R., Winnik, M. A., Mura, J. L., ... & Croucher, M. D. (1991). Poly (styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study. *Macromolecules*, 24(5), 1033-1040.
- [87]. Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release*, 70(1-2), 1-20.
- [88]. Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), 561-573.
- [89]. Shon, Y. S. (2010). Nanoparticle-Cored Dendrimers and Hyperbranched Polymers: Synthesis, Properties, and Applications. *Advanced Nanomaterials*.
- [90]. Wang, X., Summers, C. J., & Wang, Z. L. (2004). Large-scale hexagonal-patterned growth of aligned ZnO nanorods for nano-optoelectronics and nanosensor arrays. *Nano letters*, 4(3), 423-426.

- [91]. Jang, J., & Oh, J. H. (2002). Novel crystalline supramolecular assemblies of amorphous polypyrrole nanoparticles through surfactant templating. *Chemical Communications*, (19), 2200-2201.
- [92]. Fudouzi, H., & Xia, Y. (2003). Photonic papers and inks: color writing with colorless materials. *Advanced Materials*, 15(11), 892-896.
- [93]. Sekretaryova, A. N., Beni, V., Eriksson, M., Karyakin, A. A., Turner, A. P., & Vagin, M. Y. (2014). Cholesterol self-powered biosensor. *Analytical chemistry*, 86(19), 9540-9547.
- [94]. Zhang, Q., & Chuang, K. T. (2001). Adsorption of organic pollutants from effluents of a Kraft pulp mill on activated carbon and polymer resin. *Advances in Environmental Research*, 5(3), 251-258.
- [95]. Shokri, N., Javar, H. A., Fouladdel, S. H., Khalaj, A., Khoshayand, M. R., Dinarvand, R., ... & Azizi, E. (2011). Preparation and evaluation of poly (caprolactone fumarate) nanoparticles containing doxorubicin HCl. *Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 19(1), 12.
- [96]. Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*, 2(12), 751-760.
- [97]. Ghosh, P. K. (2000). Hydrophilic polymeric nanoparticles as drug carriers.
- [98]. FARRUGIA, C. A., & Groves, M. J. (1999). Gelatin behaviour in dilute aqueous solution: designing a nanoparticulate formulation. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 51(6), 643-649.
- [99]. Fernández-Urrusuno, R., Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1999). Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 16(10), 1576-1581.
- [100]. Luppi, B., Bigucci, F., Corace, G., Delucca, A., Cerchiara, T., Sorrenti, M., ... & Zecchi, V. (2011). Albumin nanoparticles carrying cyclodextrins for nasal delivery of the anti-Alzheimer drug tacrine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(4), 559-565.
- [101]. Sundar, S., Kundu, J., & Kundu, S. C. (2010). Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*.
- [102]. Kumar, M. R., Bakowsky, U., & Lehr, C. M. (2004). Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*, 25(10), 1771-1777.
- [103]. Li, Y. P., Pei, Y. Y., Zhou, Z. H., Zhang, X. Y., Gu, Z. H., Ding, J., ... & Gao, X. J. (2001). PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as tumor necrosis factor- α carriers. *Journal of controlled release*, 71(3), 287-296.

- [104]. Lai, P., Daear, W., Löbenberg, R., & Prenner, E. J. (2014). Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly (d, l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 118, 154-163.
- [105]. Gürsoy, A.Z., 2002, Kontrollü salım sistemleri, ISBN 975-97725-0-7.
- [106]. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1998). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug development and industrial pharmacy*, 24(12), 1113-1128.
- [107]. Vanderhoff, J. W., El-Aasser, M. S., & Ugelstad, J. (1979). *U.S. Patent No. 4,177,177*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [108]. Song, C. X., Labhasetwar, V., Murphy, H., Qu, X., Humphrey, W. R., Shebuski, R. J., & Levy, R. J. (1997). Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 43(2-3), 197-212.
- [109]. Vandervoort, J., & Ludwig, A. (2002). Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *International journal of pharmaceutics*, 238(1-2), 77-92.
- [110]. Ubrich, N., Bouillot, P., Pellerin, C., Hoffman, M., & Maincent, P. (2004). Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study. *Journal of controlled release*, 97(2), 291-300.
- [111]. Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8-21.
- [112]. Pal, S. L., Jana, U., Manna, P. K., Mohanta, G. P., & Manavalan, R. (2011). Nanoparticle: An overview of preparation and characterization. *Journal of applied pharmaceutical science*, 1(6), 228-234.
- [113]. Reis, C. P., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2010). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8-35.
- [114]. Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 26(5), 1025-1058.
- [115]. Kawashima, Y., Niwa, T., Handa, T., Takeuchi, H., Iwamoto, T., & Itoh, K. (1989). Preparation of controlled-release microspheres of ibuprofen with acrylic polymers by a novel quasi-emulsion solvent diffusion method. *Journal of pharmaceutical sciences*, 78(1), 68-72.

- [116]. Nagavarma, B. V. N., Yadav, H. K., Ayaz, A. V. L. S., Vasudha, L. S., & Shivakumar, H. G. (2012). Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 5(3), 16-23.
- [117]. Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E., & Doelker, E. (1996). Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D, L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 143(2), 133-141.
- [118]. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1999). Pseudolatex preparation using a novel emulsion–diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *International journal of pharmaceutics*, 188(2), 155-164.
- [119]. Quintanar-Guerrero, D., Tamayo-Esquivel, D., Ganem-Quintanar, A., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *European journal of pharmaceutical sciences*, 26(2), 211-218.
- [120]. Muthu, M. S. (2014). Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 3(4)
- [121]. Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(1), 67-75.
- [122]. Yadav, H. K., Almokdad, A. A., Sumia, I. M., & Debe, M. S. (2019). Polymer-based nanomaterials for drug-delivery carriers. In *Nanocarriers for Drug Delivery* (pp. 531-556). Elsevier.
- [123]. Dreis, S., Rothweiler, F., Michaelis, M., Cinatl Jr, J., Kreuter, J., & Langer, K. (2007). Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 341(1-2), 207-214.
- [124]. Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., & Vauthier, C. (2002). Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19(2).
- [125]. Lepeltier, E., Bourgaux, C., & Couvreur, P. (2014). Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Advanced drug delivery reviews*, 71, 86-97.
- [126]. Stella, B., Marengo, A., & Arpicco, S. (2017). Nanoparticles: an overview of the preparation methods from preformed polymers. *Istituto Lombardo-Accademia di Scienze e Lettere-Incontri di Studio*.

- [127]. Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), 561-573.
- [128]. Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Progress in polymer science*, 36(7), 887-913.
- [129]. Puglisi, G., Fresta, M., Giammona, G., & Ventura, C. A. (1995). Influence of the preparation conditions on poly (ethylcyanoacrylate) nanocapsule formation. *International Journal of Pharmaceutics*, 125(2), 283-287.
- [130]. Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 90, 21-27.
- [131]. Burgess, D. J., & Carless, J. E. (1985). Manufacture of gelatin/gelatin coacervate microcapsules. *International journal of pharmaceutics*, 27(1), 61-70.
- [132]. Sailaja, A. K., Amareshwar, P., & Chakravarty, P. (2011). Different techniques used for the preparation of nanoparticles using natural polymers and their application. *Int J Pharm Pharm Sci*, 3(2), 45-50.
- [133]. Calvo, P., Remuñan-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharmaceutical research*, 14(10), 1431-1436.
- [134]. Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125-132.
- [135]. Masood, F. (2016). Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. *Materials Science and Engineering: C*, 60, 569-578.
- [136]. Wang, L., Sun, Y., Li, Z., Wu, A., & Wei, G. (2016). Bottom-up synthesis and sensor applications of biomimetic nanostructures. *Materials*, 9(1), 53.
- [137]. Liu, D., Yang, F., Xiong, F., & Gu, N. (2016). The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics*, 6(9), 1306.
- [138]. Ilaria Parisi, O., Scrivano, L., Stefania Sinicropi, M., Picci, N., & Puoci, F. (2016). Engineered polymer-based nanomaterials for diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 16(9), 754-761.
- [139]. Cho, K., Wang, X. U., Nie, S., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical cancer research*, 14(5), 1310-1316.
- [140]. Markland, P., & Middleton, J. C. (2013). Biodegradable polymers as drug carriers. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology, Six Volume Set (Print)* (pp. 163-184). CRC Press.

- [141]. Amass, W., Amass, A., & Tighe, B. (1998). A review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. *Polymer international*, 47(2), 89-144.
- [142]. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., & Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of controlled release*, 65(1-2), 271-284.
- [143]. Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*, 2(12), 751-760.
- [144]. Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced drug delivery reviews*, 63(3), 131-135.
- [145]. Mahmud, A., Xiong, X. B., Aliabadi, H. M., & Lavasanifar, A. (2007). Polymeric micelles for drug targeting. *Journal of Drug Targeting*, 15(9), 553-584.
- [146]. Aliabadi, H. M., & Lavasanifar, A. (2006). Polymeric micelles for drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 3(1), 139-162.
- [147]. Prakash, S., Malhotra, M., Shao, W., Tomaro-Duchesneau, C., & Abbasi, S. (2011). Polymeric nanohybrids and functionalized carbon nanotubes as drug delivery carriers for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 63(14-15), 1340-1351.
- [148]. Yadav, H. K., Almokdad, A. A., Sumia, I. M., & Debe, M. S. (2019). Polymer-based nanomaterials for drug-delivery carriers. In *Nanocarriers for Drug Delivery* (pp. 531-556). Elsevier.
- [149]. Dubé, D., Francis, M., Leroux, J. C., & Winnik, F. M. (2002). Preparation and tumor cell uptake of poly (N-isopropylacrylamide) folate conjugates. *Bioconjugate chemistry*, 13(3), 685-692.
- [150]. Lee, E. S., Na, K., & Bae, Y. H. (2003). Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. *Journal of Controlled Release*, 91(1-2), 103-113.
- [151]. Shuai, X., Ai, H., Nasongkla, N., Kim, S., & Gao, J. (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.
- [152]. Yoo, H. S., & Park, T. G. (2004). Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *Journal of controlled release*, 96(2), 273-283.
- [153]. Park, E. K., Kim, S. Y., Lee, S. B., & Lee, Y. M. (2005). Folate-conjugated methoxy poly (ethylene glycol)/poly (ϵ -caprolactone) amphiphilic block copolymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 109(1-3), 158-168.

- [154]. Haxton, K. J., & Burt, H. M. (2008). Hyperbranched polymers for controlled release of cisplatin. *Dalton Transactions*, (43), 5872-5875.
- [155]. Chen, S., Zhang, X. Z., Cheng, S. X., Zhuo, R. X., & Gu, Z. W. (2008). Functionalized amphiphilic hyperbranched polymers for targeted drug delivery. *Biomacromolecules*, 9(10), 2578-2585.
- [156]. Zhao, H., & Yung, L. Y. L. (2008). Selectivity of folate conjugated polymer micelles against different tumor cells. *International journal of pharmaceutics*, 349(1-2), 256-268.
- [157]. Mohanty, A. K., Dilnawaz, F., Mohanty, C., & Sahoo, S. K. (2010). Etoposide-loaded biodegradable amphiphilic methoxy (poly ethylene glycol) and poly (epsilon caprolactone) copolymeric micelles as drug delivery vehicle for cancer therapy. *Drug delivery*, 17(5), 330-342.
- [158]. Wang, T., Li, M., Gao, H., & Wu, Y. (2011). Nanoparticle carriers based on copolymers of poly (ϵ -caprolactone) and hyperbranched polymers for drug delivery. *Journal of colloid and interface science*, 353(1), 107-115.
- [159]. Xu, Q., Liu, Y., Su, S., Li, W., Chen, C., & Wu, Y. (2012). Anti-tumor activity of paclitaxel through dual-targeting carrier of cyclic RGD and transferrin conjugated hyperbranched copolymer nanoparticles. *Biomaterials*, 33(5), 1627-1639.
- [160]. Selec, M., Selec, D. A., Ciftci, M., Odaci Demirkol, D., Stahl, F., Timur, S., ... & Yagci, Y. (2015). Nanostructured amphiphilic star-hyperbranched block copolymers for drug delivery. *Langmuir*, 31(15), 4542-4551.
- [161]. Walker, K. A., Stumbé, J. F., & Haag, R. (2016). Polyester-based, biodegradable core-multishell nanocarriers for the transport of hydrophobic drugs. *Polymers*, 8(5), 192.
- [162]. Du, F., Hönzke, S., Neumann, F., Keilitz, J., Chen, W., Ma, N., ... & Haag, R. (2016). Development of biodegradable hyperbranched core-multishell nanocarriers for efficient topical drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 242, 42-49.
- [163]. Cao, H., Chen, C., Xie, D., Chen, X., Wang, P., Wang, Y., ... & Wang, W. (2018). A hyperbranched amphiphilic acetal polymer for pH-sensitive drug delivery. *Polymer Chemistry*, 9(2), 169-177. |

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	[Sherif domingo TİETİLU]
Doğum Yeri	[KINSHASA]
Doğum Tarihi	28.08.1987
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer: [Demokratik Kongo]
Telefon	[05533644716]
E-Posta Adresi	[sherifdomingo@gmail.com]
Web Adresi	[]



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	[Ondokuz Mayıs Üniversitesi]
Fakülte	[Fen Edebiyat Fakültesi]
Bölümü	[Kimya Bölümü]
Mezuniyet Yılı	[2016]

Makale ve Bildiriler

A. Bal, Z.P. Akgüner, **S. Domingo**, T. Erol, H. Darıcı, S. Emik, “In vitro targeting of synthesized folic acid-conjugated poli(amino ester) based hyperbranched polymeric nanoparticles”, Brightlands Rolduc Polymer Conference, September, 9-11, 2019, Rolduc Abbey, Kerkrade, The Netherlands.

A. Bal, **S. Domingo**, T. Erol, S. Emik, E. Alarcin,”In vitro Release Behaviour of Folic Acid Functionalized Hyperbranched Nanoparticulate Systems”, 15TH Nanoscience and Nanotechnology Conference, November, 03-06, 2019, Antalya, Turkey.

R. Tutar, **S. Domingo**, K. Titi, Z.P. Akgüner, E. Alarcin, A. Bal,”Kemik Doku Mühendisliğinde Kullanılmak Üzere Nanokompozit Biyoink Formülasyonlarının Geliştirilmesi”, 6. Biyomalzeme Günleri, KUTTAM – Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, 9-10, Aralık 2019. |