



**MEİS PROTEİN İNHİBİTÖRÜ YÜKLÜ
ALBÜMİN NANOPARTİKÜLLERİNİ ve iRGD PEPTİDİNİ İÇEREN
IN SITU JELLEŞEN SİSTEMİN HAZIRLANMASI
ve KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Gizem DEĞER

Eskişehir 2021

**MEIS PROTEİN İNHİBİTÖRÜ YÜKLÜ ALBÜMİN NANOPARTİKÜLLERİNİ
ve iRGD PEPTİDİNİ İÇEREN *IN SITU* JELLEŞEN SİSTEMİN
HAZIRLANMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Gizem DEĞER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Temmuz 2021

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1909S104 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gizem DEĞER'in “MEIS Protein İnhibitörü Yüklü Albümin Nanopartiküllerini ve iRGD Peptidini Taşıyan *In Situ* Jelleşen Sistemin Hazırlanması ve Karakterizasyonu” başlıklı tezi/...../2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	:	
Üye	:	
Üye	:	

ÖZET

MEIS PROTEİN İNHİBİTÖRÜ YÜKLÜ ALBÜMİN NANOPARTİKÜLLERİNİ ve iRGD PEPTİDİNİ İÇEREN *IN SITU* JELLEŞEN SİSTEMİN HAZIRLANMASI ve KARAKTERİZASYONU

Gizem DEĞER

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temmuz 2021

Danışman: Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Pankreasın duktal adenokarsinomu (PDAC), fibrotik dokunun tümörü çevrelediği bir stromal bariyer ile karakterizedir. Bu bariyer, PDAC’li bireylere uygulanan kemoterapötik ajanların tümör hücrelerine erişimi kısıtlar. Stromal bariyeri aşmak tedavinin başarısı kritiktir. Albümin, PDAC tümör mikro ortamında aşırı miktarda eksprese edilen SPARC proteinlerine bağlanabilme özelliği ile bu bariyerin aşılmasında büyük bir potansiyele sahiptir. Stromal bariyerin aşılmasındaki diğer bir hedef nokta da integrin reseptörleridir. iRGD peptidi, stromal hücrelerdeki integrin reseptörüne bağlanarak, beraber uygulandığı terapötik ajanların hücre içine alınmasını sağlar. DNA’ya bağlanarak kanser oluşumuna katkıda bulunan MEIS proteinleri, onkojenik aktivitelerinin yanı sıra kemoterapiye direnç geliştirmesine yol açar. MEIS protein inhibitörü ise MEIS’e bağlanarak tümöral aktiviteyi baskılar. Bu tezde, pankreas kanalına uygulamak üzere tasarlanmış Poloxamer®407/kitosan temelli bir *in situ* jelleşen sistem geliştirilmiştir. MEİS inhibitörü-2 yüklü albümin nanopartikülleri ve iRGD peptidi *in situ* jelleşen sistem içerisinde dağıtılmıştır. Formülasyonun, fizikokimyasal özellikleri ve *in vitro* ortamda pankreas kanser hücreleri üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Albümin, iRGD, MEİS İnhibitörü-2, *In Situ* Jelleşen Sistemler.

ABSTRACT

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF *IN SITU* GELLING
SYSTEM CONTAINING MEIS PROTEIN INHIBITOR LOADED ALBUMIN
NANOPARTICLES and iRGD PEPTIDE**

Gizem DEĞER

Department of Pharmaceutical Technology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is characterized by a stromal barrier in which fibrotic tissue surrounds the tumor. This barrier restricts access to tumor cells of chemotherapeutic agents administered to individuals with PDAC. Crossing the stromal barrier is critical to the success of the treatment. Albumin has great potential to overcome this barrier, with its ability to bind to SPARC proteins overexpressed in the PDAC tumor microenvironment. Another target point to overcome the stromal barrier is integrin receptors. The iRGD peptide binds to the integrin receptor in stromal cells, allowing therapeutic agents to be administered into the cell. MEIS proteins, which contribute to cancer formation by binding to DNA, cause resistance to chemotherapy as well as oncogenic activities. MEIS protein inhibitor suppresses tumor activity by binding to MEIS. In this master thesis, an *in situ* gelling system based on Poloxamer® 407/Chitosan designed for application to the pancreatic duct. MEIS inhibitor-2 loaded albumin nanoparticles and iRGD peptide were dispersed in the *in situ* gelling system. The physicochemical properties of the formulation and its activity on pancreatic cancer cells were evaluated *in vitro*.

Keywords: Albumin, iRGD, MEIS Inhibitor-2, *In Situ* Gelling Systems.

TEŞEKKÜRLER

Henüz eczacılık fakültesi lisans öğrencisiyken Farmasötik Biyoteknoloji ile tanışmamı sağlayan, vizyonu ile bu alanda yüksek lisans eğitimi almaya karar vermemde büyük payı olan, bilgisi ve tecrübeleri ile desteğini her daim hissettiğim, ayrıca üç sene boyunca manevi olarak her an yanımda olan çok kıymetli tez danışmanım Doç. Dr. Gülay BÜYÜKKÖROĞLU'na,

Hücre biyolojisi, sitotoksiste ve hücre kültürü gibi alanlarda bana eşsiz bilgiler katan, bu tez çalışmasına teorik ve pratik olarak büyük katkılar sunan, mesleki ve manevi tüm sorunlarımda yanımda olan çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Behiye ŞENEL'e,

Bu tez çalışmasında MEIS inhibitörü-2 ile çalışmamıza ve maddeyi temin etmemize izin veren Doç. Dr. Fatih KOCABAŞ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca, merak ettiğim akademik konularda ve karşılaştığım zorluklarda her daim kapıları bana açık olan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarım, Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e, Doç Dr. Evrim YENİLMEZ'e, Dr. Öğr. Üyesi Murat Sami BERKMAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Alper ÖZTÜRK'e, Dr. Öğr. Üyesi Gülsel YURTDaş KIRIMLIOĞLU'na ve Doç. Dr. Mustafa Sinan KAYNAK'a,

Yakın zamanda benzer süreçlerden geçmiş olmanın empatisiyle, ilgi ve desteklerini asla esirgemeyen sevgili arkadaşlarım, Arş. Gör. Sinan ÖZER'e ve Arş. Gör. Kadir AYKAÇ'a,

Fakültede aynı odayı, laboratuvarı ve beraberinde çok şeyi paylaştığım sevgili yüksek lisans ve doktora eğitimi alan arkadaşlarım, Ecz. Berna KAVAl'a, Ecz. İrem NAMLI'ya ve Gencay SEVİM'e,

Mutlu olmamdan başka bir beklentileri olmaksızın, aldığım her kararda her zaman maddi manevi yanımda olan çok sevgili fedakâr aileme,

2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar kapsamında projeme burs desteği sağlayan TÜBİTAK'a, TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

..../..../2021

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan ‘bilimsel intihal tespit programı’ ile tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜRLER.	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.	vi
İÇİNDEKİLER.	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ.	4
2.1. Pankreasın Duktal Adenokarsinomu	4
2.2. Stromal Bariyer	5
2.2.1. Stromal Bariyerin Aşılmasındaki Yaklaşımlar	6
2.2.1.1. <i>Albümin</i>	6
2.2.1.1.1. <i>Albümin aracılı SPARC hedeflendirme</i>	8
2.2.1.2. <i>Yardımcı peptid kullanımı</i>	10
2.2.1.3. <i>Hedgehog sinyal inhibitörleri</i>	12
2.2.1.4. <i>Hyaluronidaz enzimi</i>	13
2.2.1.5. <i>CTGF antagonistleri</i>	14
2.2.1.6. <i>Pirfenidon</i>	15
2.2.1.7. <i>Anjiyotensin inhibitörleri</i>	15

	<u>Sayfa</u>
2.2.1.8. <i>miRNA</i>	16
2.3. MEIS ve PDAC.....	17
2.4. <i>In Situ</i> Jelleşen Sistemler	19
2.4.1. pH'a duyarlı <i>in situ</i> jelleşen sistemler	20
2.4.2 Sıcaklığa duyarlı <i>in situ</i> jelleşen sistemler	21
3. GEREÇLER.....	24
3.1 Kullanılan Maddeler	24
3.2 Kullanılan Cihazlar.....	25
4. YÖNTEM	26
4.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon	26
4.1.1. Analitik yöntem geliştirme.....	26
4.1.2. Validasyon çalışması.....	26
4.1.2.1. <i>Doğrusallık</i>	26
4.1.2.2. <i>Doğruluk</i>	27
4.1.2.3. <i>Kesinlik</i>	27
4.1.2.4. <i>Duyarlılık</i>	27
4.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları.	28
4.2.1. Albümin nanopartiküllerinin hazırlanması.	28
4.2.1.1. <i>Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları</i>	30
4.2.1.1.1. <i>Partikül boyutu ve dağılımı</i>	30
4.2.1.1.2. <i>Zeta potansiyeli</i>	31
4.2.2. <i>In situ</i> jelleşen sistemlerin hazırlanması.	31

4.2.2.1. <i>In situ jelleşen sistemlerin jelleşme sıcaklığının belirlenmesi</i>	32
4.2.2.2. <i>In situ jelleşen sistemlerin pH değerlerinin ölçümü</i>	32
4.2.2.3. <i>Uygun in situ jelleşen sistemin belirlenmesi</i>	32
4.2.2.4. <i>Reolojik davranış</i>	32
4.2.3. <i>HSAM4 içeren in situ jelleşen sistemin hazırlanması</i>	33
4.2.3.1. <i>HSAM içeren in situ jelleşen sistemin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi</i>	33
4.2.3.1.1. <i>Jelleşme sıcaklığı</i>	33
4.2.3.1.2. <i>pH değeri</i>	33
4.2.3.1.3. <i>Jelleşme kapasitesi</i>	33
4.2.3.1.4. <i>Şişme</i>	33
4.2.3.1.5. <i>Reolojik davranış</i>	34
4.3. <i>Nanopartiküle Yüklenmiş Etkin Madde Miktar Tayini</i>	34
4.4. <i>In Vitro Salım Çalışmaları</i>	34
4.5. <i>iRGD Peptidinin In Situ Jelleşen Sisteme Yüklenmesi ve Salım Çalışması</i>	36
4.5.1. <i>iRGD peptidi ve miktar tayini</i>	36
4.5.2. <i>iRGD peptidinin in situ jelleşen sistemden salım çalışması</i>	37
4.6. <i>Hücre Kültürü</i>	37
4.6.1. <i>Sitotoksite çalışması</i>	37
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	40
5.1. <i>Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışması</i>	40

5.1.1. Analitik yöntem geliştirme	40
5.1.1.1. <i>Doğrusallık</i>	40
5.1.1.2. <i>Kesinlik</i>	41
5.1.1.3. <i>Doğruluk</i>	42
5.1.1.4. <i>Duyarlılık</i>	42
5.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları.....	43
5.2.1. Albümin nanopartiküllerinin hazırlanması.....	43
5.2.1.1. <i>Partikül boyutu ve dağılımı</i>	43
5.2.1.2. <i>Zeta potansiyeli</i>	44
5.2.2. <i>In situ</i> jelleşen sistemlerin hazırlanması.....	45
5.2.2.1. <i>In situ jelleşen sistemlerin jelleşme sıcaklığının belirlenmesi</i>	45
5.2.2.2. <i>In situ jelleşen sistemlerin pH değerlerinin ölçümü</i>	45
5.2.2.3. <i>Uygun in situ jelleşen sistemin belirlenmesi</i>	46
5.2.2.4. <i>Reolojik davranış</i>	46
5.2.3. HSAM4 içeren <i>in situ</i> jelleşen sistemin hazırlanması.....	48
5.2.3.1. <i>HSAM içeren in situ jelleşen sistemin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi</i>	48
5.2.3.1.1. <i>Jelleşme sıcaklığı</i>	48
5.2.3.1.2. <i>pH değeri</i>	48
5.2.3.1.3. <i>Jelleşme kapasitesi</i>	49

	<u>Sayfa</u>
5.2.3.1.4. <i>Şişme</i>	49
5.2.3.1.5. <i>Reolojik davranış</i>	49
5.3. Nanopartiküle Yüklenmiş Etkin Madde Miktar Tayini.....	51
5.4. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları.....	51
5.5. iRGD Peptidinin HSAM4 İçeren <i>In Situ</i> Jelleşen Sistemlere Yüklenmesi.....	56
5.5.1. iRGD peptidine ait doğrusallık grafiğinin ve denkleminin belirlenme	56
5.5.2. iRGD peptidinin <i>in situ</i> jelleşen sistemden <i>in vitro</i> salım çalışması.....	56
5.6. Hücre Kültürü.....	57
5.6.1. Sitotoksosite çalışması.....	57
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	62
KAYNAKÇA.....	63

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. <i>In situ</i> jelleşen sistemlerin jelleşme sıcaklıkları.....	22
Tablo 4.1. UPLC analiz koşulları.....	26
Tablo 4.2. <i>In situ</i> jelleşen sistemlerde kullanılan madde miktarları.....	32
Tablo 4.3. Jelleşme kapasitesi belirteçleri.....	33
Tablo 5.1. Kesinlik çalışması sonuçları.....	41
Tablo 5.2. Doğruluk çalışması sonuçları.....	42
Tablo 5.3. Duyarlılık çalışması sonuçları.....	43
Tablo 5.4. Formülasyonlara ait partikül boyutu ve boyut dağılımı değerleri.....	43
Tablo 5.5. Formülasyonların zeta potansiyeli değerleri.	45
Tablo 5.6. <i>In situ</i> jelleşen sistemlerin jelleşme sıcaklıkları	45
Tablo 5.7. <i>In situ</i> jelleşen sistemlerin farklı sıcaklıklardaki pH değerleri	46
Tablo 5.8. H4P18 formülasyonunun jelleşme sıcaklığı.....	48
Tablo 5.9. H4P18 formülasyonunun farklı sıcaklıklardaki pH değerleri.....	49
Tablo 5.10. H4P18'in jelleşme kapasitesi.	49
Tablo 5.11. H4P18'in zaman göre şişme oranları.....	49
Tablo 5.12. <i>In vitro</i> salım profillerinin matematiksel modellere uyumu.	53
Tablo 5.13. <i>In vitro</i> salım profilinin matematiksel modellere uyumu.	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Yetişkin pankreas anatomisi.....	4
Şekil 2.2. PDAC gelişimi.....	6
Şekil 2.3. iRGD peptidi aracılı transitoz.....	11
Şekil 5.1. Meis2i'ye ait doğrusallık grafiği.....	40
Şekil 5.2. PC18'in 4°C'deki reogramı.....	47
Şekil 5.3. PC18'in 25°C'deki reogramı	47
Şekil 5.4. PC18'in 37°C'deki reogramı	47
Şekil 5.5. H4P18'in 4°C'deki reogramı.....	50
Şekil 5.6. H4P18'in 25°C'deki reogramı.....	50
Şekil 5.7. H4P18'in 37°C'deki reogramı.....	50
Şekil 5.8. Meis2i'nin PC18'den in vitro salım profili.	52
Şekil 5.9. Meis2'inin nanopartikülden in vitro salım profili.	54
Şekil 5.10. iRGD peptidine ait doğrusallık grafiği	56
Şekil 5.11. iRGD peptidine ait in vitro salım profili.....	57
Şekil 5.12. Huvec-24. saat % canlılık grafiği.....	59
Şekil 5.13. Huvec-48. saat % canlılık grafiği.....	59
Şekil 5.14. PANC1-24. saat % canlılık grafiği.....	60
Şekil 5.15. PANC1-48. saat % canlılık grafiği.....	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	: Bovine serum albumin (Sığır serum albümini)
BSAM	: MEİS inhibitör-2 yüklü sığır serum albümin nanopartikülleri
ECM	: Hücre Dışı Matris (Extracellular Matrix)
FDA	: Food and Drug Administration
HSA	: Human serum albumin (insan serum albümini)
HSAM	: MEİS inhibitör-2 yüklü insan serum albümin nanopartikülleri
Meis2i	: MEİS inhibitörü-2
SPARC	: Asidik ve Sistein Bakımından Zengin Salgı proteini
UPLC	: Ultra Performance Liquid Chromatography

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pankreas kanseri, pankreasın ekzokrin hücrelerinden kaynaklanır ve tüm ekzokrin tümörleri arasında pankreasın duktal adenokarsinomu (PDAC), pankreas tümörlerinin %90'ından fazlasını oluşturan en yaygın pankreas neoplazmı türüdür. Pankreasın duktal adenokarsinomu, 5 yıllık genel sağkalım oranı %3-5 olan en ölümcül malignitelerden biridir.

PDAC, yoğun fibrotik dokunun tümörü genişlettiği ve çevrelediği, pankreas kanseri ilerlemesinde kritik bir rol oynadığı bilinen belirgin bir fibrotik stromal reaksiyon (dermoplazi) ile karakterizedir. Hücrel bileşenler ve kollajen, hyaluran, fibronektin gibi aselüler bileşenler arasındaki etkileşim, pankreas kanserinin ilerlemesinden ve metastazından sorumludur. Ameliyat, kemoradyoterapi ve immünoterapideki gelişmelere rağmen, tümörlü hücreleri çevreleyen karakteristik stromal bariyerden dolayı PDAC'nin farmakolojik tedavisi oldukça sınırlıdır.

PDAC'de stromal bariyerin aşılmasında hedef noktalarından biri integrin reseptörleridir. RGD peptid ailesinin üyesi olan yardımcı peptidler integrin reseptörlerine hedeflendirilmede kullanılmaktadır. Yalnızca integrinleri hedef alan geleneksel lineer ve siklik RGD peptidleriyle karşılaştırıldığında, siklik iRGD peptidi, tümör hedefli antikanser ilaçların veya küçük moleküllerin, antikorlar ve nanoparçacıklar içeren yüklerin taşınmasında üstünlük göstermektedir. iRGD peptidi, anjiyogenez ve kanser ilerlemesini kolaylaştıran, tümör hücreleri tarafından eksprese edilen αv integrinleri için en belirgin tanıma motifidir. iRGD tümör ve stromal hücrelerde aşırı eksprese edilen NRP-1'e bağlanır ve böylece ona bağlı yüklerin hücreye alınmasını, ekstrasvazasyonunu ve doku penetrasyonunu sağlar. RGD peptid ailesi PDAC'ye ilaç hedeflendirmesinde günümüz araştırmacılarının ilgisini çekmiş durumdadır.

Stromal bariyerin üstesinden gelmek ve ilaç etkinliğini arttırmak için, kemoterapötik ajanlar, stromal hücrelerde bol miktarda eksprese edilen endojen reseptörlere yüksek bağlanma afinitesine sahip maddeler ile birleştirilerek modifiye edilmiştir. Örneğin, albümin, PDAC tümör mikro ortamında bol miktarda eksprese edilen SPARC proteinlerine verimli bir şekilde bağlanır. SPARC, PDAC tümörünün istilası/göçü ve anjiyogenezin inhibisyonunda da etkin bir rol oynamaktadır. SPARC'a

yüksek afiniteli bağlanma başarısından dolayı albümin, PDAC tümörlerine ilaç hedeflendirme çalışmalarında umut vericidir.

Serum albümini, kanda en fazla bulunan proteindir. Kandaki ekzojen ve endojen maddeler için bir taşıyıcı protein olarak çalışır. Serum albümini ayrıca plazma onkotik basıncına katkıda bulunarak hücre dışı sıvı hacminin stabilize edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. İnsan serum albümini (HSA) ve sığır serum albümini (BSA) en çok incelenen proteinler arasındadır.

Albümin ile kombine haldeki kanser ilaçlarının, reseptör aracılı albümin alım yolları aracılığıyla kanserli hücrelerde biriktiği bulunmuştur. Albümin nanopartiküllerine hapsolmuş etkin maddeler, kontrollü (sürekli) bir şekilde yavaşça salınacakları terapötik alana ulaşana kadar albümin tarafından korunur. Etkin maddenin bölgeye özgü teslimi, hedefleme ligandlarının nanopartikül yüzeyine bağlanmasıyla sağlanabilir.

Albümin, gelişmiş tümör spesifitesine, azaltılmış ilaç kaynaklı sitotoksositeye katkıda bulunmaktadır. İlaç, peptit, protein ve genetik materyal gibi terapötik etkinliği olan çeşitli ajanların konsantrasyonunu uzun bir süre boyunca muhafaza eder.

İlk olarak BXH-2 fare lösemi modelinde keşfedilen MEIS proteinleri, tümörlü hücrelerde yüksek miktarda eksprese edilerek, tümörigenezi desteklemektedir. Hücre DNA'sıyla kompleks oluşturan MEIS proteinleri aynı zamanda tümörlü hücrelerin uygulanan ilaç tedavisine direnç geliştirmesine yol açmaktadır. Tümörün elverişsiz koşullar altında hayatta kalmasını sağlayan bu etkiden de MEIS proteinlerinin sorumlu olduğu bulunmuştur. Fatih Kocabaş ve ekibi tarafından geliştirilmiş ve **EP3541410A2 numarası ile Avrupa patent enstitüsünden patenti alınmış** olan MEIS protein inhibitörü, MEIS proteinine bağlanarak tümöral aktiviteyi baskılamaktadır ve bu nedenle PDAC ilaç hedeflendirme çalışmaları için umut vericidir.

Akışkan bir sıvı halindeyken uygulandığı bölgede çeşitli uyaranların (sıcaklık, pH, elektromanyetik radyasyon) etkisiyle jelleşerek kontrollü salım sağlayan *in situ* jelleşen sistemler, tümörlü dokunun ilaca maruziyetini artırma özellikleriyle yeni bir tedavi yaklaşımı niteliğindedirler.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, MEIS protein inhibitörü-2 (Meis2i) yüklü albümin nanopartiküllerini ve iRGD peptidini içeren, parenteral uygulama yapılabilecek şekilde tasarlanmış poloksamer ve kitosandan oluşan *in situ* jel formülasyonunun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda;

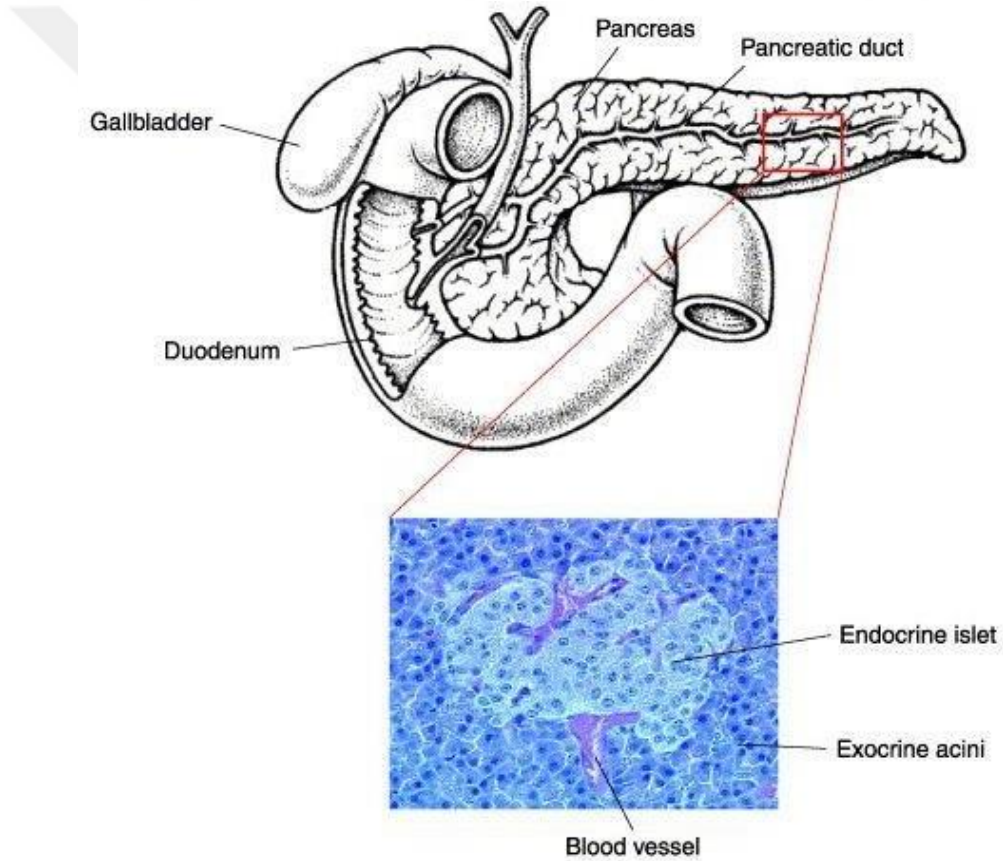
- MEIS inhibitörü-2'nin albümin nanopartiküllerine yüklenmesi ve karakterizasyonu,
- Poloksamer ve kitosan ile sıcaklığa duyarlı *in situ* jel formülasyonunun geliştirilmesi ve karakterizasyonu,
- iRGD peptidinin *in situ* jel içinde dağıtılması ve karakterizasyonu,
- iRGD peptidini içeren sıcaklığa duyarlı *in situ* jel içinde MEIS inhibitörü yüklü nanopartiküllerin dağıtılması ve karakterizasyonu çalışmaları yapılacaktır.

Etkin maddenin ilk kez bir formülasyon haline geleceği bu çalışmada, albümin ve iRGD peptidi ile kombine halde kullanılmasının sinerjik bir etkiye yol açarak metastatik PDAC hücresinin gelişiminin etkin şekilde durdurulması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Pankreasın Duktal Adenokarsinomu

Pankreas, hem Langerhans adacıkları olarak adlandırılan, hormonları doğrudan kan dolaşımına salgılayan ve karbonhidrat metabolizmasını düzenlemeye yardımcı olan endokrin bezlerinden; hem de sindirim enzimlerini bağırsak lümenine salgılayan ekzokrin bezlerinden oluşan karmaşık bir organdır. Akut/kronik pankreatit ve pankreas kanseri, ekzokrin bezleri etkileyen temel hastalıklardır. (McGuckin, Cade ve Hanison, 2020; Tao vd., 2021).



Şekil 2.1. Yetişkin pankreas anatomisi (Kumar ve Melton, 2003)

Diğer kanser türleriyle kıyaslandığında görece düşük insidansına rağmen pankreas kanseri, dünya çapındaki kansere bağlı ölümlerin dördüncü önde gelen nedenidir. En yaygın pankreas neoplazmı, hastalarda %8'lik bir oranla 5 yıllık sağkalım ortalamasına sahip olan pankreasın duktal adenokarsinomudur (PDAC) (Winer vd., 2019).

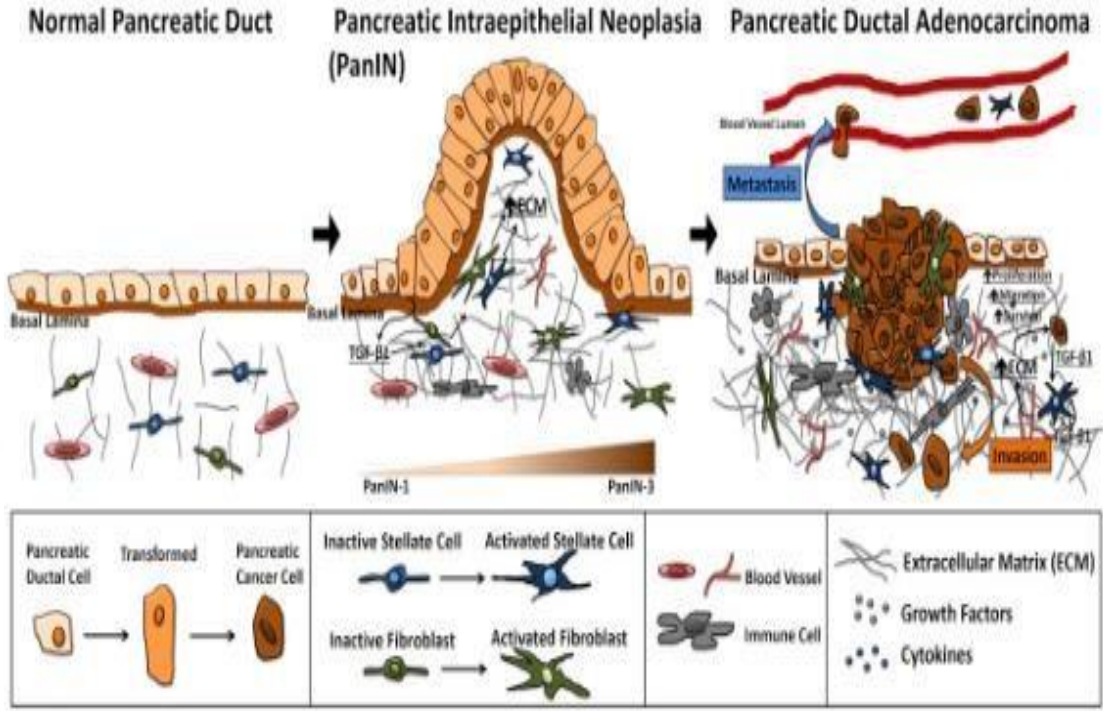
PDAC'nin tanısının geç konulabilmesi ve hızlı metastaz yapması nedeniyle, ilerlemiş hastalığı olan çoğu hasta için temel tedavi biçimi, yetersiz bir yaklaşım olsa da kemoterapidir. Tümörün evresine bağlı olarak kemoterapi, rezeksiyon cerrahisi ve radyoterapi ile desteklenebilmektedir. Kemoterapi tedavisi, bir nükleosid analogu olan gemsitabin (GEM) ve daha güçlü ancak oldukça toksik bileşenler içeren FOLFIRINOX (oksaliptatin, irinotekan, 5-florourasil ve lökovorin) ile gerçekleştirilmektedir. Kombinasyonlara rağmen kemoterapi, PDAC hastaları arasında toksisite profilinde artışa yol açan birçok yan etki sergiler. Ek olarak, bu standart kemoterapötik ajanlar, sınırlı etkinlikleri nedeniyle hastanın sağkalımı üzerinde yalnızca orta düzeyde bir etkiye sahiptir. Kemoterapinin yetersizliği, PDAC'de ilaç iletimi için fiziksel ve biyolojik bariyer işlevi gören yoğun bir desmoplastik stroma ve olumsuz bir farmakokinetik profil ile açıklanmaktadır (Meng ve Nel, 2018; Panchal vd., 2021).

2.2. Stromal Bariyer

PDAC'nin sahip olduğu tümör mikro ortamı (TME), pankreas kanser hücrelerini çevreleyen ve sıklıkla tümör kütesinin çoğunu kaplayan bol bir stroma ile karakterize edilir. Tümörün epitelyal hücrelerini çevreleyen stromal bariyer çeşitli modifikasyonlara tabidir. Pankreas kanser hücreleri, hücre dışı matrisin (ECM) bileşimini değiştiren, inflamatuvar hücrelerin bu mekanizmaya dahil olmasını sağlayan ve pankreas stellat hücresi (PSC) olarak adlandırılan özel bir fibroblast hücre tipi de dahil olmak üzere fibroblastların çoğalmasını teşvik eden stroma hücrelerine sinyal gönderir. PDAC tümörlerinde bulunan bu fibrotik doku hem tümör hem de stroma hücrelerinin katkıda bulunduğu bir ECM ile karakterize edilmektedir. Pankreas kanseri ECM'si, kollajen, kollajen olmayan glikoproteinler, glikozaminoglikanlar, büyüme faktörleri ve proteoglikanların yanı sıra periostin, tenasin C, SPARC (asidik ve sistein bakımından zengin salgı proteini) ve trombospin gibi modülatörlerinden meydana gelir (Lunardi, Buschel and Brunner, 2014).

Periasiner bölgelerde aşırı ECM birikmesi normal parankimi bozarak vasküleritenin sıkışmasına neden olurken, tümör hücrelerinin hipovaskülerliğine ve hipoksisine yol açar. Tümör hipoksisinin ayrıca PSC'leri aktive ettiği ve hipoksi-fibrozis döngüsünün korunmasına ve sürdürülmesine yardımcı olduğu bilinmektedir. Ek olarak, yoğun fibrotik stroma ve disfonksiyonel vaskülerite, kanser hücrelerine ilaç verilmesini engeller ve terapötik etkinliklerini azaltır. Bu nedenle PDAC'de stromal bariyerin

aşılması tedavinin başarısında belirleyici bir role sahiptir. Sağlıklı bireylerde PDAC gelişimi ve metastazı Şekil 1.'de aşamalarıyla gösterilmiştir (Kota vd., 2017).



Şekil 2.2. PDAC gelişimi (Kota vd., 2017)

Yukarıdaki şekilde PSC'lerin dönüşümü gösterilmiştir. Normal bir pankreasta, PSC'ler hareketsizdir ve sitoplazmasında A vitamini içeren lipid damlacıklarının varlığı ile tanımlanabilirler. Pankreas yaralanması veya inflamasyonuna yanıt olarak, hareketsiz fenotiplerinden miyofibroblast benzeri hücrelere dönüştürülürler. 'Aktivasyon' olarak tanımlanan bu durum, α -düz kas aktinini (α -SMA) eksprese eder, aktif olarak çoğalır ve tip I kolajen gibi hücre dışı matris bileşenleri üretir (Masamune ve Shimosegawa, 2013).

2.2.1. Stromal Bariyerin Aşılmasındaki Yaklaşımlar

2.2.1.1. Albümin

Serum albümini, kanda en fazla bulunan proteindir. Öncelikle, kandaki ekzojen ve endojen maddeler (steroidler, yağ asitleri, tiroid hormonları ve diğer moleküller) için bir taşıyıcı protein olarak çalışır. Serum albümini ayrıca plazma onkotik basıncına katkıda bulunarak hücre dışı sıvı hacminin stabilize edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. İnsan serum albümini (HSA) ve sığır serum albümini (BSA) en çok incelenen proteinler arasındadır. (Siddiqui vd., 2021).

BSA'nın yapısı, HSA'nın üç boyutlu yapısı ile homologtur. Aralarındaki temel fark ise triptofan sayılarıdır. BSA'da iki adet triptofan bulunurken, HSA'da ise sadece bir tane triptofan vardır. Bu fark, spektrofotometri ile yapılan çalışmalar bağlamında bir avantajdır. Çünkü triptofan amino asidi proteinlerin içsel floresansından sorumlu olan ana amino asittir (Bronze-Uhle vd., 2017).

HSA, moleküler ağırlığı 66,500 Da olan 585 amino asit içeren tek zincirli, glikozillenmemiş bir polipeptittir. HSA, kan plazmasının önemli bir protein bileşenidir ve koloidal ozmotik basıncın düzenlenmesinde; yağ asitleri, hormonlar, toksik metabolitler (bilirubin), safra asitleri, amino asitler ve metaller gibi çok sayıda endojen bileşiğin taşınmasında önemli bir rol oynar. HSA ayrıca çok çeşitli ilaç moleküllerini bağlar (Yamasaki vd., 2013).

Albümin ile kombine haldeki kanser ilaçlarının, reseptör aracılı albümin alım yolları aracılığıyla kanserli hücrelerde biriktiği bulunmuştur. İlaç-albümin formülasyonları; kovalent olmayan ilişki, kovalent bağlanma ve etkin maddenin albümin nanopartiküllerine (NP) yüklenmesi olmak üzere üç ana gruba ayrılmıştır. Etkin madde yüklü albümin NP'lerinin diğer formülasyon yöntemlerine göre çeşitli avantajları vardır. Örneğin, albümin NP'lerine hapsolmuş etkin maddeler, NP'ler kontrollü (sürekli) bir şekilde yavaşça salım yapabilecekleri terapötik alana ulaşana kadar korunur. Ek olarak, ilaçların bölgeye özgü teslimi, hedefleme ligandlarının NP yüzeyine bağlanmasıyla sağlanabilir. NP'lerin bu özellikleri, ilaç dozunu ve dozaj sıklığını artırmadan ilaçların etkinliğini artırır. İnsan serum albümini, kanser terapötiklerinin uygulanması için albümin bazlı nano taşıyıcıların (ANC'ler) üretiminde sıkça tercih edilen proteindir. Albümin, gelişmiş tümör spesifitesine, azaltılmış ilaç kaynaklı sitotoksositeye katkıda bulunabilir ve ilaç, peptit, protein ve gen gibi terapötik olarak aktif ajanların konsantrasyonunu uzun bir süre boyunca muhafaza edebilir (Sozer vd., 2020; Zeeshan vd., 2021).

Emülsifikasyon ve desolvasyon yöntemleri, albümin nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan iki temel yöntemdir. Emülsifikasyon yönteminde, albüminin sulu çözeltisi, yüzey etkin madde moleküllerinin varlığında, yüksek basınçlı bir homojenizatör, yüksek hızlı bir homojenizatör veya ultrasonikasyon kullanılarak diklorometan, sikloheksan veya iyonik sıvılar gibi karışmayan sıvılarda emülsifiye edilir. Desolvasyon yönteminde ise, etanol veya aseton gibi bir desolvasyon ajanı ilavesi,

albüminin hidrasyon seviyesini ve çözünürlüğünü azaltarak NP oluşumuna yol açar. Solvent türü, çözücü ekleme oranı, albümin konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve ortamın iyonik kuvveti ayarlanarak NP hazırlama işleminin optimizasyonu sağlanır (Sozer vd., 2020).

2.2.1.1.1. Albümin aracılı SPARC hedeflendirme

İnsanlarda kromozom 5q bölgesi tarafından ifade edilen, osteonektin veya temel membran proteini-40 olarak da bilinen SPARC, matriselüler protein ailesinin bir üyesidir. Matriselüler proteinler ECM ortamına salgılanır ve hücre fonksiyonlarını, hücre-hücre ve hücre-ECM etkileşimleri kontrol etmekten sorumludur (Neuzillet vd, 2013).

Neoplastik progresyon sırasında SPARC, stromal bölgede veya çeşitli tipteki malign hücrelerde, tümör gelişimini, istilasını, metastazını, anjiyogenezini ve inflamasyonunu etkileyecek şekilde eksprese edilir. Tümör mikro çevresindeki SPARC kaynaklı değişiklikler, doku ve hücre tipine bağlı olarak farklı kanser türlerinin ilerlemesini baskılayabilir veya ilerletebilir (Chlenski and Cohn, 2010). Yapılan son çalışmalarda aşırı SPARC ekspresyonunun, kolorektal kanser, mide kanseri ve pankreas kanseri ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. PDAC’de SPARC ekspresyonu stromal bariyer hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Yu vd., 2017).

FDA onaylı bir ilaç olan Abraxane’ın (albümine bağlı paklitaksel) başarısı ile, albümin bazlı nanopartiküller kanser tedavisi alanında potansiyel bir aday olarak ortaya çıkmıştır. Albümin, yaklaşık 0,7 mg/saat hızında karaciğerde sentezlenen; kandaki ozmotik basıncın korunmasından, hidrofobik özellikteki ilaç moleküllerinin, vücuttaki yağ asitlerinin ve hormonların taşınmasından sorumlu olan 66.5 kDa molekül ağırlığında bir plazma proteinidir. İnsanda bulunan plazma proteinlerinin yarısından fazlasını oluşturan (40 mg/ml ortalama plazma konsantrasyonu) albümin, geniş bir pH (4 ila 9) ve sıcaklık (60 °C’de 10 saate kadar) aralığında kararlılığını korumaktadır. Ayrıca albümin, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için umut verici bir yüzey modifiye edici maddedir. Bir disopsonin görevi gören albümin, dolaşımdaki nanopartiküllerin (NP), mononükleer fagositik sistem (MPS) tarafından tanınmasını ve temizlenmesini engelleyerek dolaşımdaki sirkülasyonlarını arttırmaktadır (Bhushan vd., 2017; Hyun vd., 2018).

Stromal bariyerin üstesinden gelmek ve ilaç etkinliğini arttırmak için, kemoterapötik ajanlar, stromal hücrelerde bol miktarda eksprese edilen endojen

reseptörlere yüksek bağlanma afinitesine sahip çeşitli yardımcı maddeler ile birleştirilerek modifiye edilmiştir. Örneğin, albümin, yukarıda bahsedilen üstünlüklerinin yanı sıra, PDAC tümör mikro ortamında bol miktarda eksprese edilen SPARC'a da verimli bir şekilde bağlanma özelliği göstermektedir. Ayrıca, SPARC, PDAC'de tümör istilası/göçü ve anjiyojenезin inhibisyonu ile ilişkilidir. Bu gözlemlere dayanarak, albümin ile konjuge edilmiş kemoterapötik bir ajan olan paklitakselin (nab-paklitaksel), albüminle tetiklenen absorpsiyonu yoluyla ve SPARC'a bağlanarak terapötik etkinliği arttırdığı ortaya konmuştur. Gemsitabin ile kombinasyonu hazırlanmış Nab-paklitaksel konjugatının, hastalığı ilerlemiş durumda olan PDAC'li bireylerin sağkalımlarında ılımlı bir iyileşme yarattığı gözlenmiş ve bu kombinasyon FDA onayı almıştır. Halen, birkaç nab-paklitaksel bazlı kombinasyon terapötik stratejisi, klinik değerlendirmenin çeşitli aşamalarında. Ayrıca, nab-paklitakselin, makropinositoz yoluyla pankreas kanseri hücreleri tarafından alındığı ve makropinositozun artırılmasının ilaç dağıtımını arttırmak için yeni bir mekanizmayı temsil ettiği öne sürülmüştür (Kota vd., 2017).

Noorani ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları çalışmada hidrofobik özellikteki kemoterapötik bir ajan olan ve oral yolla konvensiyonel olarak uygulandığında ilk geçiş etkisi nedeniyle düşük biyoyararlanım gösteren erlotinib etkin maddesini sığır serum albüminine (BSA) desolvasyon (çözücü uçurma) yöntemiyle yüklemeye çalışmıştır. Dimetil sülfoksit (DMSO), aseton ve iki çözücünün bir karışımını (aseton/DMSO 5:1 (h/h) oranı) hazırlayan araştırmacılar, bu çözücülerini %5 a/h oranında distile su ile hazırladıkları ve HCl yardımıyla pH 5'e ayarladıkları BSA çözeltisine manyetik karıştırıcılı ortamda damla damla ilave etmiştir. Kararlı albümin nanopartikülleri (ANP) oluşturmak için bu karışımlar 10 dakika boyunca karıştırılmıştır. Termal yolla çapraz bağlanma gerçekleştirmek amacıyla aseton ve aseton/DMSO karışımı bulunan ortam için 55° C'de, DMSO bulunan ortam için ise 100° C'de 30 dakika boyunca karıştırma işlemi devam ettirilmiştir. Karışımlar daha sonra 20.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantların uzaklaştırılmasından sonra, nanopartiküller iki kez organik çözücü ile yıkanarak santrifüjlenmiştir. Erlotinib yüklü albümin nanopartikülü (E-ANP) hazırlamak için yukarıdaki işlemler organik çözücüye 8 mg/ml erlotinib eklenerek tekrar edilmiş ve nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Başlangıçta ilave edilen erlotinib miktarından enkapsüle edilememiş erlotinib miktarının çıkarılmasıyla hesaplanan yükleme verimliliği (EE) %44 olarak bulunmuştur. Literatürde diğer polimer türleriyle hazırlanan erlotinib nanopartiküllerinin %20 civarındaki yükleme verimliliğiyle

kıyaslama yapan araştırmacılar pankreas tümörlerine ilaç hedeflendirmede albümin kullanımının gelecek vaad ettiği sonucuna ulaşmıştır. Ayrıca TEM görüntüleri alınan E-ANP nanopartiküllerinin boyutları 14nm civarında ölçülmüştür. Elde edilen bu küçük boyut, pankreas tümör hücrelerine pasif hedeflendirme yapabilmek adına da avantaj sağlamaktadır.

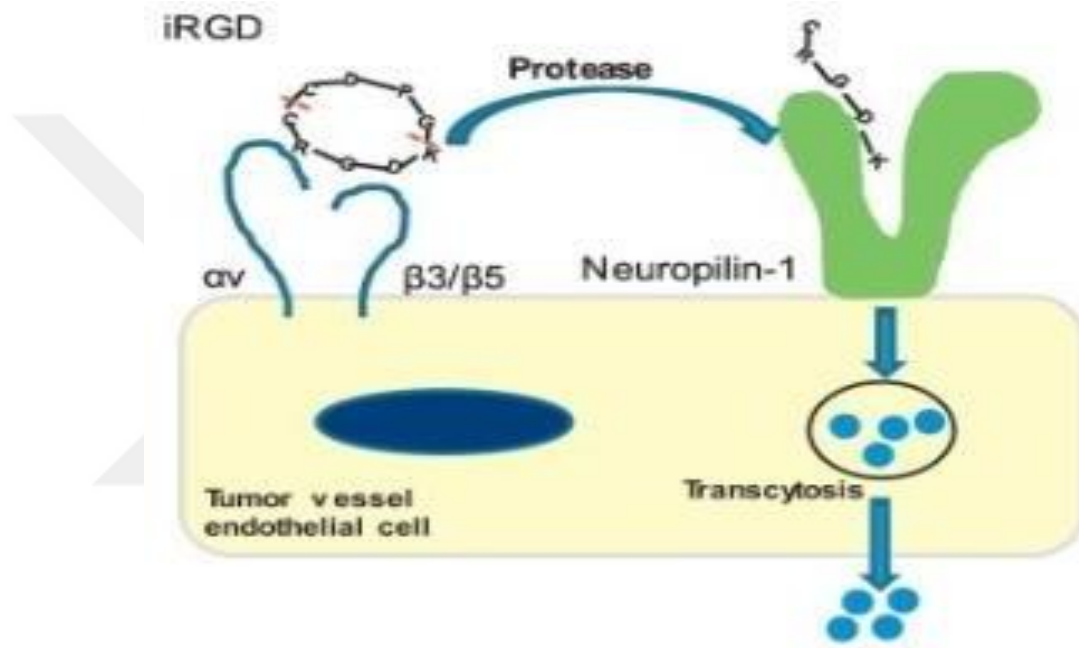
2.2.1.2. Yardımcı peptid kullanımı

Stromal bariyerin hedeflendirilmesinde kullanılan bir diğer yöntem ise yardımcı peptidlerden faydalanmaktır. Stromal bariyerin aşılmasında yeni bir keşif olan bu yöntem, siklik iRGD (Arg-Gly-Asp) peptidlerinin tümöral ortamın besin tedarik yolağını kullanarak PDAC vaskülerine ulaşımı arttırdığını ortaya koymuştur. iRGD peptidi, endotel hücrelerinde sitoplazmik veziküllerin ve vakuollerin yani vezikül-vasküler organel (VVO) oluşumunu içeren bir transitoz yolu başlatır. Fizyolojik koşullar altında, transitoz yolu, vasküler endotel büyüme faktörlerinin (VEGF) kontrolü altında, PDAC tümör büyümesine besin desteği yapmaktadır. Bu büyüme faktörleri (örneğin VEGF, TG β -ve semaforin), tümör kan damarlarındaki nöropilin-1 (NRP-1) reseptörüne bağlanan bir C-terminal peptid motifi gösterir. NRP-1 ayrıca proteinlerin ve diğer besin maddelerinin taşınmasını sağlayan, aynı zamanda ilaçların ve nano taşıyıcıların taşınmasını da içeren transitoz yanıtını tetiklemektedir (Sugahara vd., 2010; Meng ve Nel, 2018).

İlk olarak Pierschbacher ve Ruoslahti tarafından bulunan RGD adlı tripeptid dizisinin keşfini, bu peptidin tümör hedefleme özelliğine ek olarak, etkili hücre ve doku penetrasyonu gösteren iRGD (içselleştirilmiş RGD, CRGDK /RGPD/EC) adındaki yeni versiyonunun keşfi takip etmiştir. Yalnızca integrinleri hedef alan geleneksel lineer ve siklik RGD peptidleriyle karşılaştırıldığında, iRGD, tümör hedefli antikanser ilaçların veya küçük moleküllerin, antikorlar ve nanoparçacıklar içeren yüklerin taşınmasında üstünlük göstermektedir (Cho vd.,2019).

iRGD peptidi, anjiyogenez ve kanser ilerlemesini kolaylaştıran, tümör hücreleri tarafından eksprese edilen α_v integrinleri için en belirgin tanıma motifidir. iRGD'nin tümöre penetrasyonu birkaç basamaklıdır. N-terminal iRGD peptidi üzerindeki RGD sekansı (RGD motifi) önce anjiyogenik tümör vasküleritesinde aşırı eksprese edilen $\alpha_v\beta_3$ veya $\alpha_v\beta_5$ integrinleri ile etkileşime girer. Daha sonra kriptik C-uç Kuralı (CendR)

motifini (R/KXXR/K, R arginin, K lisin ve X herhangi bir amino asittir) C-terminalinde açığa çıkarmak için proteazlar yardımıyla ayrılır. Açığa çıkan CendR motifi, hücresel içselleşmeye, vasküler sızıntıya ve ekstravasküler tümör dokusuna derin penetrasyona neden olmak üzere in vitro olarak birçok tümör hücre hattında, in vivo olarak tümör ve stromal hücrelerde aşırı eksprese edilen NRP-1'e bağlanabilen iRGD'nin (CRGDK / R) N-terminal yarım parçasını oluşturur. NRP-1'e bağlanan iRGD peptidi böylece ona bağlı yüklerin hücreye alınmasını, ekstravazasyonunu ve doku penetrasyonunu sağlar (Simon-Gracia vd., 2016; Cho vd., 2016).



Şekil 2.3. iRGD peptidi aracılı transitoz (Meng and Nel, 2018)

RGD ile modifiye edilmiş polimer ve lipozom gibi nano taşıyıcı sistemler, α_v 3 integrinlerine spesifik bağlanma kabiliyeti sergilemektedir. Özellikle kanser tedavisinde geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemde elde edilen çarpıcı sonuçlar RGD peptidlerine olan ilgiyi arttırmış durumdadır. Özellikle PDAC'de stromal bariyerden kaynaklanan ilaç direncinin aşılmasında RGD ile kombine edilmiş taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi tedavide umut vaad edicidir (Cheng ve Ji, 2019).

Ji ve arkadaşları 2019 yılında yaptıkları çalışmada pankreas kanserinde gelişen fibrozisin kaynağı rolündeki stellat hücrelerine hedeflendirilmek üzere lipozom geliştirmeye çalışmışlardır. Hidrofobik bir kemoterapötik ajan olan gemsitabin maddesini lipozom çekirdeğine yükleyen çalışmacılar, stellat hücrelerine hedeflendirme sağlaması

amacıyla kanserli hücrelerde bol miktarda eksprese edilen metallerproteinaz-2 (MMP-2) tarafından tanınacak bir peptid olan Ac-CSSSGPLGIAGQSSS-COOH kodlu peptidi geliştirerek lipozomun dış katmanına eklemiş ve bu peptidin ucuna siklodekstrine tutturdukları bir antifibrotik ajan olan pirfenidon maddesini stromal bariyeri eritmesi amacıyla konjuge etmişlerdir. Ek olarak, hazırladıkları lipozomun dış katmanına tümör hücrelerine geçişini transitoz yoluyla da arttırması amacıyla RGD peptidi ilave edilmiştir. Pankreas kanseri hücre dizilerine uyguladıkları formülasyonlarda, RGD ile kombine edilmiş olanların hücre içine alınan gemitabin miktarını belirgin ölçüde arttırdığı gözlenmiştir.

2.2.1.3. Hedgehog sinyal inhibitörleri

Hedgehog (HH) sinyali hücre çoğalmasını, gelişimini ve doku onarımını regüle etmekten sorumlu bir sinyaldir. Memelilerde, HH sinyali üç ligand tarafından aktive edilmektedir. Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) ve Desert Hedgehog (DHH) olarak adlandırılan bu üç ligandın yetişkin dokularda en çok eksprese edileni SHH'dir (Cortes vd., 2019).

HH sinyalinin alımından, '12- transmembran domain proteini (Patch-1)' ve '7- transmembran domain proteini (Smoothed (Smo))' olmak üzere iki membran proteini sorumludur. HH ligandları için birincil reseptör Patched-1'dir (Ptch1). Ligand yokluğunda, Ptch1, Smo'yu inhibe eder. Ancak ligand bağlanması durumunda, Smo'yu aktive eden ve glioma ile ilişkili onkogen (Gli) transkripsiyon faktörleri olan Gli1, Gli2 ve Gli3'ün aktivasyonuna yol açan Ptch-1'in inhibisyonu gerçekleşir. Gli1, tümörjenezle ilgili hedef genleri (örn. Siklin-D1, Myc, Bcl-2) ve anjiyojenez faktör genlerini etkinleştirir (Pak and Segal, 2016; Cortes vd., 2019).

Murin pankreas kanseri modellerinde ve ayrıca insan pankreas kanseri örneklerinde, Hh yolağının aktivasyonu sadece Hh ligand eksprese eden tümör hücrelerini çevreleyen stromal hücrelerde gözlenmiştir. SHH'nin, premalign pankreatik intraepitelyal lezyonlarda (PanIN) ve Pankreatik Duktal Adenokarsinom (PDAC) hücrelerinde yanlış ifade edildiği bildirilmiştir. SHH'nin stromal büyümeyi teşvik etmede etkin rol oynadığı görülmektedir. İnsan tümör ksenograftlarında, tümör hücreleri tarafından gerçekleştirilen SHH ekspresyonu, stromal bariyerde artan GLI-1 ve PTCH1 ekspresyonu ile korelasyon göstermektedir. Yolak inhibisyonu stromal GLI-1 ve PTCH1

ekspresyonunu etkilemekte ve HH ligand eksprese eden tümörlerde azalmış tümör büyümesiyle sonuçlanmaktadır (Niyaz vd.,2018; Rosow vd., 2012).

Günümüzde, Hh sinyalinin hedeflendirilmesi kanser tedavisinde çekici bir hal almış ve bir dizi Hh inhibitörü tasarlanmıştır. Çoğu Hh inhibitörü, SMO reseptörünün işlevini antagonize etmektedir. Vismodegib (GDC-0449, Erivedge®), 2012 yılında FDA tarafından metastatik ve lokal olarak ilerlemiş bazal hücre karsinomlarının tedavisi için onaylanan ilk SMO antagonisti olmuştur. Bu gelişmeyi, 2015 yılında Sonidegib (LDE225, Odomzo®) takip etmiştir (Ghirga, Mori and Infante, 2018).

PDAC, kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'lar) tarafından üretilen bir fibrotik birikim olan geniş desmoplastik stromasıyla diğer kanserlerden ayrılır. Stroma üreten CAF'lar ayrıca tümör hücrelerinde ilaç direncini de indükler. SHH yolağı, CAF aktivasyonu ve stromal biriktirme için önemli bir düzenleyicidir. Zhao ve arkadaşları, 2018 yılında yaptıkları çalışmada, tümör hücre dışı matriksindeki (ECM) CAF'lari (yaklaşık %80 azalma) ve tip I kollajeni ortadan kaldırmak için farelere uzun bir süre boyunca yüksek dozda (100 mg/kg'a kadar ulaşan) SHH inhibitörleri uygulamıştır. Ancak şaşırtıcı bir şekilde, kolajenli ECM kaybı, tümör hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) indüklemiş ve daha metastatik tümör fenotiplerine ve ardından tedavi başarısızlığına yol açmıştır. Bu nedenle, yüksek dozlarda kullanılan SHH inhibitörlerinin önemli sistemik toksisiteye ve olası hedef dışı etkilere neden olabileceği gözlenmiştir.

2.2.1.4. Hyaluronidaz enzimi

PDAC, hücre dışı matris (ECM) içine gömülü çeşitli stromal hücrelerden (inflamatuvarlı hücreler, yıldız hücreleri ve aktive edilmiş fibroblastlar dahil) oluşan yoğun bir stroma ile karakterize edilir. ECM'nin ana bileşenlerinden biri, devasa (genellikle saf formunda 10^6 Dalton'u aşan) bir makromoleküler bileşik olan hyaluronan veya hyaluronik asittir (HA). PDAC'de HA ve reseptörlerinin ekspresyonunun arttığı ortaya konmuştur. HA, CD44 ve RHAMM gibi spesifik hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşime girerek hücre yapışmasını, göçünü ve proliferasyonunu düzenlemektedir (Kudo vd., 2020).

Hücre dışı stromal HA birikimi, PDAC'de interstisyel sıvı basıncının artmasına ve vasküler geçirgenliğin azalmasına katkıda bulunur ve bu birikim, PDAC'de ters prognoz

ile ilişkilendirilir. Polietilen glikolle konjuge edilmiş (PEGile) rekombinant insan hyaluronidaz PH20'nin (PEGPH20) uygulanmasının, hayvan modellerinde intratümoral HA'yı azalttığı, intratümoral kan damarı açıklığını ve geçirgenliğini artırdığı ve gemsitabin ile kombinasyon halinde verildiğinde sağ kalımı artırdığı gözlenmiştir (Larson vd., 2019).

HALO 202 çalışmasının son sonuçlarına göre, pegvorhyaluronidaz alfa (PEGPH20), tümör mikro ortamındaki hyaluronanı bozarak ilaç emilimine yardımcı olmakta ve metastatik PDAC'li hastalarda progresyonsuz sağ kalım süresini (Progression Free Survival (PFS)) artırma potansiyeli taşımaktadır. Bu randomize faz II denemesinde, Sunil Hingorani (Fred Hutchinson Kanser Araştırma Merkezi, Seattle, WA, ABD) ve meslektaşları, önceden tedavi edilmemiş metastatik PDAC'li 279 hastanın 166'sına 4 hafta boyunca nab-paklitaksel ve gemsitabin ile kombine edilmiş PEGPH20 ve kalan 113 hastaya ise nab-paklitaksel ve gemsitabin uygulamıştır. 231 hastada etkinlik açısından değerlendirilen medyan PFS, PEGPH20 grubunda 6 ay iken, kontrol grubunda ise 5,3 ay olmuştur. Hyaluronan bakımından zengin tümör tipine sahip 84 hastada ise, medyan PFS, PEGPH20 grubunda 9,2 ay iken kontrol grubunda 5,2 ay olmuştur (Gourd, 2018).

2.2.1.5. CTGF antagonistleri

Bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF), üyeleri ilk olarak 1990'ların ortalarında tanınan ve mitojenik sinyallere (serum, büyüme faktörleri, onkojenler) cevap olarak sentezlenen veya transforme olmuş hücrelerde anormal biçimde ifade edilmelerine dayalı olarak tanımlanmış "CCN" ailesinin prototip bir üyesidir (Charrier and Brigstock, 2013).

Sistein bakımından zengin bir protein olan CTGF, pankreas dokularında ve diğer sistemlerde profibrotik bir aracı olarak tanımlanmaktadır. Pankreasta, stellat hücreleri tarafından üretilen CTGF, ECM'de protein birikimini ve pankreatik fibrozisi destekleyerek PDAC için önemli bir risk faktörü konumuna gelmektedir. Pankreas kanserinde, CTGF ekspresyonu, özellikle α -düz kas aktin-pozitif ve E-kaderin-negatif-kanserle-ilişkili fibroblastlarda belirgin bir şekilde artmıştır. qPCR ile yapılan analizler, CTGF ekspresyon seviyesinin farklı insan pankreas kanseri hücre hatlarında değiştiğini ve PANC-1 hücrelerinin nispeten daha yüksek seviyelerde CTGF mRNA eksprese ettiğini göstermiştir. Son çalışmalar, CTGF'nin hem tümör hücrelerinde hem de stromal

hücrelerde işlev gördüğünü ve PDAC ilerlemesini tetiklediğini ortaya koymaktadır (Shen vd., 2020).

Bir CTGF antikoru olan Pamrevlumab (FG-3019) ile LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre (KPC) transgenik PDAC'li fare modellerinde yapılan çalışmalar, gemsitabin ile kombine edilerek uygulanan pamrevlumab'ın sağ kalım süresini uzattığını ve tümör hücrelerinde apoptozu tetiklediğini ortaya koymuştur (Carrier vd., 2017).

2.2.1.6. Pirfenidon

Kemoterapi ile stroma hücrelerini, özellikle de stellat hücrelerini hedeflemek, mevcut pankreas kanseri tedavisinin odak noktası haline gelmiştir. İki müdahale, aynı anda kullanıldıklarında güçlü antikanser aktivite ortaya çıkarma potansiyeline sahiptir (Ramakrishnan vd., 2020).

Pankreas kanserinde desmoplazide rol oynayan pankreas stellat hücreleri kanser hücrelerinin malignitesini artırır ve tedavilere direnç kazandırır. Kozono ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları çalışmada antifibrotik bir ajan olan pirfenidonun desmoplaziyi baskılayıp baskılayamayacağını ve pankreas kanserine karşı antitümör etkiler uygulayıp uygulamayacağını araştırmışlardır. Ameliyat sırasında alınmış olan pankreas kanseri dokusundan elde ettikleri stellat hücreleriyle çalışan araştırmacılar, *in vitro* ortamda pirfenidonun doza bağımlı olarak stellat hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü baskıladığını gözlemlemiştir. Muamele edilmemiş stellat hücrelerinin süpernatantları, pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonunu, invazivliğini ve göçünü arttırmasına rağmen, pirfenidon ile tedavi edilen stellat hücrelerinin süpernatantları bu etkileri azaltmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda gemsitabin ile kombine ettikleri pirfenidonun, tek başına pirfenidon veya gemsitabine kıyasla ortotopik tümör büyümesini daha etkili bir şekilde baskıladığını gözlemişlerdir. Sonuç olarak bulgular, pirfenidonun stellat hücrelerini düzenleyerek desmoplaziyi baskılaması nedeniyle pankreas kanseri için umut verici bir antitümör ajan olduğunu göstermektedir.

2.2.1.7. Anjiyotensin inhibitörleri

Renin-anjiyotensin sistemi (RAS), kardiyovasküler ve renal fonksiyonların düzenlenmesinde yer alan temel endokrin yolaktır. Kan basıncının ve elektrolit dengesinin ayarlanarak homeostazın sağlanmasından sorumlu olan ana sistem RAS'tır. Bu sistemin başlıca hormonu olan vazopressör özelliğe sahip Anjiyotensin II (AngII),

hücresel düzeydeki etkilerini reseptörü olan ‘Anjiyotensin II Reseptör Tip I (AT1R)’ ile bağlanarak gerçekleştirmektedir. Hipertansiyonla birlikte artan AT1R miktarı ve hücresel sinyalizasyon, artmış vasküler duvar kalınlığına, artmış inflamasyona bağlı gelişen vasküler hasara ve vazokonstrüksiyona yol açan süperoksit oluşumuna sebep olur. Bu etkiler, tümör hücrelerinin ikincil bölgelere metastazının gerçekleşmesinde kan sirkülasyonunun etkileri düşünüldüğünde oldukça kritiktir (Perini vd., 2020).

RAS’ın düzenlenmesinde, Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri (ACEI) ve Anjiyotensin Reseptör Blokörleri (ARB) olmak üzere iki temel ilaç grubu kullanılmaktadır. RAS’ın baskılanmasının metastaz üzerindeki etkilerinin yanı sıra, bu ilaç gruplarının kronik pankreatitli modellerde fibrozisi baskıladığı gösterilmiştir (Masamune vd., 2013).

Masamune ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları çalışmada bir ARB olan olmesartanın farelerde PSC’ler ve pankreas kanseri hücrelerinin (AsPC-1) birlikte enjeksiyonu ile oluşturulan subkütan tümörlerin büyümesi üzerindeki etkilerini açıklığa kavuşturmayı amaçlamıştır. Bu çalışmanın sonucunda, farelerde subkütan olarak oluşturulan tümörlerde olmesartanın belirgin bir küçülme yarattığı gözlenmiştir. Ayrıca PSC’lerle *in vitro* olarak yapılan çalışmada olmesartanın doza bağımlı olarak PSC büyümesini ve PSC’lerdeki tip I kollajen üretimini inhibe ettiği sonucuna varmışlardır. Bu sonuçlar doğrultusunda, ARB’ler veya ACEI’ler, gemsitabin gibi geleneksel kemoterapötik ajanlar ile kombine halde, pankreas kanserinde bir anti-fibroz tedavisi sunma potansiyeli taşımaktadır.

2.2.1.8. miRNA

miRNA’lar, bir hedef mRNA’nın çevrilmemiş bölgeleri ile etkileşime girerek bunların azaltılmış translasyonuna veya hızlı bir degradasyonuna neden olan, yaklaşık 22 nükleotidden oluşan kodlamayan, tek iplikli RNA’lardır. Şimdiye kadar 700’den fazla miRNA tanımlanmıştır. miRNA’lar insan genomunun yaklaşık %3’ünü temsil eder ve insanlarda protein kodlayan genlerin >%60’ının ekspresyonunu kontrol eder. Gen ekspresyonunun düzenleyicileri olarak hizmet eden miRNA’lar, büyüme, farklılaşma, proliferasyon ve apoptoz dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar. Ayrıca onkojenik veya tümör baskılayıcı işlevleri

de olan miRNA'lar; meme, akciğer, kolorektal, pankreas ve karaciğer kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde profillenmiştir (Tsfaye, Azmi and Philip, 2019).

Takikawa ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları çalışmada, PSC'ler ile pankreas kanser hücreleri arasındaki etkileşimde miRNA'nın rolünü aydınlatmaya odaklanmışlardır. Bu çalışmada, farklı hücre tiplerinde hipoksi altında güçlü şekilde up-regülasyona uğrayan, hipoksik yanıtın başlıca miRNA'sı olarak kabul edilen miRNA-210'u tercih etmişlerdir. Literatürdeki geçmiş çalışmalarda hipoksinin yoğun biçimde gözlemlendiği pankreas kanserinde anormal biçimde eksprese edilen miRNA-210 hastalığın zayıf prognozuyla ilişkilendirilmiştir. PSC'lerin, pankreas kanser hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) indükleyerek metastaz kapasitesini ve ECM'yi arttırmasını engellemede yeni bir yaklaşım olarak miRNA-210'u inhibe eden araştırmacılar, pankreas kanser hücrelerindeki EMT'ye bağlı değişimlerin de önüne geçerek stromal bariyerin aşılmasında yeni bir yaklaşım sunmuşlardır.

2.3. MEIS ve PDAC

Homeobox genleri, promoter DNA'larına doğrudan bağlanarak büyük, yukarı yönlü hedef gen setlerinin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerini kodlar. Bu etkileşim, 60 amino asit domain'i olan homeobox aracılığıyla gerçekleşir. Homeobox genleri tüm çok hücreli organizmalarda yaşam süreleri boyunca gelişim ve farklılaşma süreçlerinde aktif rol alır. Böylece hücre büyümesi ve hücre ölümü üzerinde bir kontrol sağlanır. Ayrıca, hücrelerde düzensiz olarak eksprese edildiklerinde onkojenezde önemli roller oynarlar. Kanserlerde ekspresyonları ve fonksiyonları dokuya özgü gerçekleşmektedir. TALE (Three Amino Acid Loop Extension) homeobox proteinleri olan MEIS ve PBX; HOX proteinleri için kofaktör olarak görev yapmaktadır (Crijns vd., 2007; Zhang vd., 2006).

TALE genleri, tümör oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar. MEIS1 geni ilk olarak, bir murin lösemi modelinde lösemojenik virüs için bir ana entegrasyon bölgesi olarak tanımlanmıştır. MEIS1 promoter sekansına viral entegrasyon, her zaman yüksek MEIS1 ekspresyonu ile sonuçlanmış ve bu tümörlerde onkojenik etkinliğe yol açmıştır. Bu lösemi modeli kullanılarak, murin MEIS2 ve MEIS3 genleri için de benzer onkojenik fonksiyonla ortaya atılmıştır. MEIS alt ailesi, MEIS genlerinin zebra balığı, Xenopus, fare ve insandan izolasyonu ile tanımlanmıştır. Şimdiye kadar tüm omurgalı model

organizmalarının üç fonksiyonel MEIS genine sahip olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda MEIS1, 2p15'te kodlanırken; insan MEIS2'si, AML (akut miyelositik lösemi) ve CML (kronik miyeloid lösemi) ile ilişkili bir kromozomal bölge olan 15q14'te bulunmaktadır (Geerts vd., 2005).

NF- κ B (Aktive B hücrelerinin nükleer faktör kappa-hafif zincir güçlendiricisi) ailesinin transkripsiyon faktörleri, birçok kanser türünde yukarı regüle edilir. NF- κ B, hücre ölümünden korunma, hücre proliferasyonunun artması, hücre hareketliliği ve metastazı, tümöral inflamasyon ve anjiyogenezler dahil olmak üzere karsinogenez veya kanser ilerlemesinin tüm ayırt edici özelliklerinde rol oynar. Ek olarak, tümör hücreleri genellikle NF- κ B sinyalini yukarı regüle ederek antikanser ilaçlara karşı direnç (kemorezistans) kazanır (Döppler, Liou ve Storz, 2013).

PDAC'de, NF- κ B seviyeleri kanser hücre hatlarında ve hasta örneklerinde artarak, hücre proliferasyonuna ve kemoterapiye direnç aracılık eder. PDAC'de artan NF- κ B aktivitesi hem kanonik hem de alternatif aktivasyon yollarından kaynaklanmaktadır (Döppler, Liou ve Storz, 2013). Alternatif NF- κ B yolağının en önemli aracısı ise 'NF- κ B İndükleyici Kinaz (NIK)'dır.' Yapılan çalışmalar, PDAC'de anormal seviyelere ulaşmış NIK miktarının düzenlenmesinin Meis2 hedef genlerini de baskıladığını göstermektedir (Maubach vd., 2019).

Büyük heterotrimerik $\alpha\beta\gamma$ proteinleri familyası olan lamininler, hücre membranlarında ve farklı dokuları bölümlere ayıran, kan damarlarını, sinirleri ve adipositleri çevreleyen özel hücre dışı matrisler bulunmaktadırlar. Beş laminin α zinciri ($\alpha1$ - $\alpha5$), dört laminin β zinciri ($\beta1$ – $\beta4$) ve üç laminin γ zinciri ($\gamma1$ – $\gamma3$), $\alpha\beta\gamma$ heterotrimerleri olarak, 15 farklı laminin izoformunu oluşturur. Lamininler, zincir kompozisyonlarına göre adlandırılır. Laminin izoformları, özellikle laminin α zinciri, hücre ve dokuya özgü bir şekilde eksprese edilir ve neredeyse 10 farklı integrin ve diğer hücre yüzeyi reseptörleri tarafından bağlanır. Lamininler, tümör hücrelerinin adhezyonunun ve vücudun diğer bölgelerine göçünün güçlü destekleyicileridir. Ayrıca hücre farklılaşmasını, çoğalmasını ve hayatta kalmasını düzenlemektedirler. Özellikle, $\alpha4$ -lamininleri, epitelyal-mezenkimal geçişi takiben karsinom hücreleri de dahil olmak üzere glioma, melanom ve diğer tümör hücreleri tarafından da eksprese edilir ve salgılanır. CD146, MUC18, MelCAM, A32 antijeni, METCAM ve giserin olarak da bilinen 'Melanom Hücre Adhezyon Molekülü' (MCAM), Ig süper ailesinin bir üyesi olan

transmembran molekülüdür. Endotelyal hücrelerinde, düz kas hücrelerinde, Schwann hücrelerinde, mezenkimal kök hücrelerde eksprese edilen MCAM aynı zamanda laminin bağlayıcı bir hücre yüzeyi molekülüdür. Lamininlere bağlanan MCAM molekülü tümör hücrelerinde çoğalmaya ve kanserin metastazına yol açmaktadır (Ishikawa vd., 2014).

Pankreasın duktal adenokarsinomunda da etkin rol oynayan MCAM molekülü, MEIS tarafından aktive edilerek metastaz süreci başlatılmaktadır. *In vitro* ortamda pankreas hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda MEIS proteini ve MCAM molekülü üzerine olan etkisi ortaya konmuştur (Von-Burstin vd., 2017). MCAM'a karşı geliştirilen antikorların, insan tümörü ksenogreftinde melanom, pankreas kanseri ve hepatoselüler karsinom dahil olmak üzere çeşitli modellerde büyümeyi inhibe ettiği görülmüştür. Daha yakın zamanlarda, MCAM eksprese eden murin melanom hücrelerine karşı aşılamanın, fareleri öldürücü melanom hücre seviyelerine karşı koruduğu gösterilmiştir (Asa, 2017).

Prosen ve arkadaşları 2014 yılında yaptıkları çalışmada üç farklı siRNA molekülü (siRNA 801, siRNA 802 ve siRNA 552) seçerek, MCAM mRNA ve protein seviyeleri ve biyolojik etkileri üzerindeki etkilerini belirlemek üzere lipofeksiyon ile B16F1, B16F10 ve 2H-11 hücrelerine transfekte ederek *in vitro* özelliklerini değerlendirmiştir. Test edilen tüm siRNA molekülleri arasında, siRNA 801'in, MCAM mRNA'sının ve protein seviyelerinin azaltılmasında, B16F1 ve B16F10 tümör hücrelerinin hayatta kalmasının önüne geçilmesinde, B16F10 hücrelerinin göçünün engellenmesinde ve 2H-11 hücrelerinin kılcal benzeri yapılar oluşturma yeteneğini azaltmada oldukça etkili olduğu görülmüştür.

2.4. *In Situ* Jelleşen Sistemler

Hidrojeller, kimyasal veya fiziksel çapraz bağlar varlığında büyük miktarda su tutma kapasitesine sahip olan üç boyutlu hidrofilik veya amfifilik özellikteki polimer ağlarıdır. Hidrojel oluşturuç polimerler yapılarında amin (NH₂), hidroksil [-OH], amid (-CONH-, -CONH₂) ve sülfat (-SO₃H) gibi hidrofilik fonksiyonel gruplara sahiptir. Hidrofilik gruplar, hidrojin, hidrojel genleşmesi ve şişmesi olarak da bilinen, daha büyük bir hacme sahip olmasını sağlayan su ve sulu sıvıları emmesini sağlar. Şişme sırasında, hidrojellerin çapraz bağlı yapısı, hidrojel çapraz bağlarının çözünmesini ve tahrip olmasını önler.

Son yıllarda, geleneksel enjekte edilebilir hidrojel­lerle karşılaştırıldığında, yapısal ağlarında çeşitli uyarılara bağı olarak değışimler oluş­an hidrojel­ler daha fazla dikkat çekmektedir. Elektrik alanı, sıcaklık, manyetik alan ve ışık gibi dış uyarılara yanıt verme konusunda farklı yeteneklere sahip bu hidrojel­lerin geliştirilmesinde önemli ilerleme sağlanmıştır. İlaç taşıyıcı sistemi istenen bölgeye hedeflemede büyük potansiyel uygulamalarından dolayı, çevresel faktörlere duyarlı ve biyouyumlu bu sistemlere “akıllı” hidrojel­ler de denmektedir (Qu vd., 2017; Wang vd.,2010; Ahmadi vd., 2015).

Bununla birlikte, önceden oluşturulmuş hidrojel­lerin cerrahi müdahale yoluyla tatbik edilmesi, hasta için oldukça maliyetli ve elverişsizdir. Bu nedenle, nano taşıyıcı sistemlerin, çeşitli proteinlerin, hücrelerin ve genetik materyallerin enjekte edilebilir *in situ* jelleşen sistemlere yüklenmesinde hidrojel kullanımına odaklanılmıştır. Normal şartlar altında sıvı ve berrak formda olan bu sistemler, hedeflendirmenin amaçlandığı bölgenin değışen koşullarına göre jel formunu alarak ortama kontrollü etkin madde salımı yapmaktadır. Çevresel uyarılara duyarlı enjekte edilebilir hidrojel­lerin ideal özellikleri temel olarak amaçlanan uygulamalarına bağı olsa da ilaç taşıyıcı sistemin uygulanmasında kullanılan hidrojel­lerin tasarımı aşağıdaki gibi sıralanan bazı önemli gereklilikleri yerine getirmelidir:

(a) Sulu polimer çözeltisinin viskozitesi, enjeksiyonu kolaylaştıracak kadar düşük (serbest akışlı) olmalıdır.

(b) Patlama etkisini (Burst Effect) en aza indirmek için jelleşme kısa sürede gerçekleşmelidir.

(c) Hidrojel biyolojik olarak uyumlu/çözünebilir olmalı ve bozunma ürünü sitotoksik olmamalıdır.

(d) İlaç yükleme verimliliğı yüksek olmalı ve belirli bir zaman dilimi boyunca kontrollü ilaç salımı sağlamalıdır (Singh and Lee, 2014).

2.4.1. pH’a duyarlı *in situ* jelleşen sistemler

İnflamasyondan kansere kadar uzanan geniş bir klinik tabloda mikro ortamın pH’ı farklı patofizyolojik bölümlerde değışim göstermektedir. Özellikle pankreasın duktal adenokarsinomu tüm kanser türleri içinde belirgin pH gradienti gözlenen yegane kanser türüdür. Vücudun sağlıklı departmanlarından patolojik mikro ortama doğru gidildikçe pH

(pH 6.0-6.5'a kadar) düşmektedir. Bu pH hücre içi ortama gelindiğinde yaklaşık pH 5 olarak gözlenmektedir. Bu nedenle PDAC tümöral hedeflendirmesinde kullanılan nano taşıyıcı sistemlerin bu gradient göz önüne alınarak hazırlanması gerekmektedir (Ray vd., 2019).

Son yıllarda, bahsedilen pH gradienti kemoterapötik ajanların lokal olarak tümöral hedeflendirmesine aracılık eden *in situ* jelleşen sistem hazırlanmasında araştırmacılar tarafından bir avantaj olarak değerlendirilmektedir. *In situ* jelleşen sistem hazırlamada kullanılan hidrojeller yumuşak ve esnek olmalarıyla tümör dokusunun etrafına veya içine başarılı bir şekilde yerleştirilerek tümörün uzun süre boyunca antikanser ilaçlara maruz kalmasını sağlamaktadır (Gao vd., 2019).

2.4.2 Sıcaklığa duyarlı *in situ* jelleşen sistemler

Sıcaklığa duyarlı *in situ* jelleşen sistemler, uygulama öncesinde ve sırasında sıvı halde olan ancak uygulandığı bölgenin sıcaklığına bağlı olarak faz geçisiyle yarı kat jel halini alan yeni ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Faz geçişi, suda çözünür, ısıya duyarlı polimerlerin, 'düşük kritik çözelti sıcaklığına (Lower Critical Solution Temperature-LCST)' ulaştığında polimerler ve su arasındaki hidrojen bağlarının tahrip olması nedeniyle çözünmez hale gelmesiyle meydana gelir (Zhang vd., 2021; Zeng vd., 2018).

Poli(oksietilen/oksipropilen/oksietilen) (PEO/PPO/PEO) triblok kopolimer (poloksamer) ailesin bir üyesi olan P407, ilaç taşıyıcı sistemlerde emülsifiye edici ajan, çözücü, disperse edici ve jel oluştucu özellikleriyle kullanımı FDA ve EMA tarafından onaylanmış farmasötik bir ekspiyandır. P407, biyoyumlu, birçok etkin maddeyle geçimli, non-toksik, cilt ve mukozal membranlar için non-iritan, zayıf immunojen yanıt oluşturma, çeşitli vücut kompartmanlarına verildiğinde iyi tolare edilebilmesi gibi çeşitli avantajlara sahip olması nedeniyle oldukça yaygın bir kullanıma sahiptir (Djekic, Calija ve Medarevic, 2020).

Tüm bu avantajlarının yanında, poloksamer jel temelli ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı jelin fizyolojik ortamlarda hızlı çözünmesi nedeniyle kısıtlıdır. Bu sorunun üstesinden gelmek amacıyla, jelin dayanıklılığını ve mukoadhezifliğini arttırmak, uygulandığı bölgedeki kalış süresini uzatmak üzere karbofil, sodyum aljinat, karragenin ve kitosan gibi mukoadhezif polimerlerle kombine halde kullanılması gündeme gelmiştir (Ur-Rehvan, Tavelin ve Gröbner, 2011).

Kitosan, selülozdan sonra doğada en bol bulunan ikinci polisakkarit olan kitinden elde edilen doğal bir doğrusal amino polisakkarittir. Kabuklu canlıların dış iskeletinin ana bileşenidir. Kimyasal yapısında, negatif yüklü mukoza tabakası ile etkileşime girebilen, kendisine muko-adhezif bir özellik kazandıran pozitif yüklü amin grupları bulunur. Kitosan, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, antimikrobiyal özellik ve toksik olmama gibi benzersiz özelliklerinden dolayı hidrojel üretiminde en çok kullanılan polimerlerden biridir. (Gratieri, vd., 2010; Pita-Lopez vd., 2021).

Gratieri vd., 2010 yılında yaptıkları çalışmada, oftalmik olarak uygulanacak, sıcaklığa duyarlı, poloksamer ve kitosan temelli bir *in situ* jelleşen sistem geliştirmişlerdir. Poloksamer ve kitosanın jel formülasyonda kombine halde kullanılmasının, polimerlerin tek başlarına kullanılmasıyla kıyaslandığında, hazırlanan *in situ* jelleşen sistemin mekanik olarak daha dayanıklı olmasını sağlayacağını savunmuşlardır. Bu çalışmada kullanılan tüm poloksamer çözeltileri, polimerin soğuk ultra saf suda çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. Kitosan çözeltileri ise kitosanın %0,5 (a/h) asetik asit çözeltisinde çözündürülmesiyle elde edilmiştir. Sonrasında, kitosan çözeltileri de soğutularak poloksamer çözeltisi ile karıştırılmıştır. %14-%20 (a/a) derişimine sahip poloksamer çözeltileri ve %0,5-%1,5 (a/a) derişimindeki kitosan çözeltini farklı oranlarda karıştırarak hazırladıkları formülasyonların jelleşme sıcaklıklarını ve reolojik özelliklerini test etmişlerdir. Hazırlanan *in situ* jelleşen sistemlerdeki polimer yüzdeleri ve bu oranlar doğrultusunda ölçülen jelleşme sıcaklıkları Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. *In situ* jelleşen sistemlerin jelleşme sıcaklıkları (Gratieri vd.,2010)

Poloxamer (% w/w)	Chitosan (% w/w)	$T_{sol/gel}$ (°C)
14	–	42 ± 2.3
16	–	32 ± 1.2
18	–	25 ± 0.9
20	–	23 ± 0.4
16	0.5	33 ± 0.8
16	1.0	32 ± 1.7
16	1.5	31 ± 1.3

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, kitosan varlığının jelleşme sıcaklığını belirgin ölçüde etkilemediği görülmektedir. Araştırmacılar, çalışmanın devamında bu formülasyonların diğer mekanik özelliklerini incelemişler ve kitosan varlığının jelin dayanıklılığını ve mukoadhezifliğini arttırdığını gözlemlemişlerdir.



3. GEREÇLER

3.1 Kullanılan Maddeler

<u>Madde Adı</u>	<u>Firma Adı</u>
Asetonitril	Merck, Almanya
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	BiologicalInd, İsrail
Etanol	Merck, Almanya
Fetal Sığır Serumı (FBS)	Sigma-Aldrich, Almanya
Fosfat Tampon Tuz Tableti	Biomatik, ABD
Glasiyel Asetik Asit	Sigma-Aldrich, Almanya
İnsan Serum Albümini (HSA)	Sigma-Aldrich, Almanya
iRGD Peptidi	MedChemExpress, ABD
Kitosan	Fluka, Japonya
MEİS İnhibitörü-2	Meinox Tech, Türkiye
Metanol	Merck, Almanya
MTT boyası	Applichem, Almanya
Orto Fosforik Asit	Merck, Almanya
Penisilin/streptomisin	GIBCO, Birleşik Krallık
Poloxamer® 407	Sigma-Aldrich, Almanya
Sığır Serum Albümini (BSA)	Merck, Almanya
Tripsin/EDTA	BiologicalInd, İsrail

3.2 Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı

Firma Adı

Büyük Kapasiteli Santrifüj

Eppendorf 5810, Almanya

CO₂'li Etüv

Hera Cell 240i, ABD

Cytation 5 Plaka Okuyucu

BioTek, ABD

Dondurucu (-20)

Arçelik, Türkiye

Dondurucu (-80)

New Brunswick Sci., ABD

Floresan Mikroskop

Leica DMIL, Almanya

Güç Kaynağı

Consort E861, Belçika

Hassas Terazı

Mettler Toledo, ABD

Manyetik Karıştırıcı

Heidolph, Almanya

Mikrosantrifüj

Eppendorf, Almanya

Orbital Karıştırıcı

Stuart Ssl, Birleşik Krallık

Otoklav

Hiyarama, Japonya

Otomatik Mikropipetler

Eppendorf, Almanya

pH-metre

O Haus, ABD

Reometre

Brookfield, ABD

Su Banyosu

GFL T-251425, Almanya

Termometre

Ebro, Almanya

Ultra Performans Sıvı Kromatografi Cihazı

Agilent Tech, ABD

Zeta Ölçüm Cihazı

Malvern, Birleşik Krallık

4. YÖNTEM

4.1 Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon

4.1.1 Analitik yöntem geliştirme

Meis2i etkin maddesinin miktar tayinini gerektiren tüm çalışmalarda Agilent marka Ultra Basınçlı/Performans Sıvı Kromatografisi (UPLC) cihazı kullanılmıştır. Analitik yöntem validasyonu ilk kez gerçekleştirilecek olan etkin maddenin analiz koşulları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. UPLC analiz koşulları

Cihaz	Agilent 1290 Infinity LC System
Kolon	GraceSmart RP18 150 mm x 4.6 mm
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Mobil Faz	Asetonitril (%1 O-fosforik asit) / Ultra Saf Su (%1 O-fosforik asit) (60/40)
Dedektör	Max-Light Cartridge Cell
Dalga Boyu	258 nm
Akış Hızı	0.670 ml.dk ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	5 µL

4.1.2 Validasyon çalışması

Analitik yöntem validasyonunun gerçekleştirilmesindeki amaç, kullanılan yöntemin doğruluk ve güvenilirliğinin elde edilen çalışma sonuçları aracılığı ile kanıtlanmasıdır. Analitik yöntem validasyonunda doğrusalılık, doğruluk ve kesinlik gibi analitik parametreler, Uluslararası Harmonizasyon Konferansında (ICH) kararlaştırılmış olan istatistiklere göre uygulanmış ve sonuçlar bu doğrultuda değerlendirilmiştir (ICH, 2005).

4.1.2.1 Doğrusallık

Doğrusallık çalışması, belirli bir konsantrasyonda hazırlanmış olan stok çözeltiden seri dilüsyon yöntemiyle elde edilen farklı derişimlerdeki örneklerde bulunan etkin madde miktarının artışıyla analiz sonuçlarının da doğru orantılı olarak arttığını ifade etmek amacıyla yapılmaktadır. Bu çalışmanın ICH tarafından belirlenmiş şartlara uyması için analizler en az 5 farklı derişim ile yapılmalıdır (ICH, 2005).

Bu çalışmada, UPLC yöntemi ile analizleri yapılacak olan Meis2i'ye ait olan standart regresyon eğrisinin elde edilmesi amacıyla 5-100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ derişim aralığındaki 9 farklı derişimden 6 seri örnek hazırlanmıştır. Bu örneklerin analiz edilmesi sonucunda her bir derişime karşılık gelen alan değeri bulunmuştur.

4.1.2.2 Doğruluk

Analitik yöntem validasyonu parametrelerinden biri olan doğruluk, analitik yöntemin gerçek değere ya da kabul edilen referans değere yakınlığını temsil etmektedir. Belirtilmiş olan aralık boyunca doğruluk sağlanmalıdır. Genellikle, belirlenen aralıkta bulunan üç farklı derişim en az üçer örnek olacak şekilde ölçülür. Elde edilen sonuçlar % verim ve her serinin bağıl standart sapması hesaplanarak değerlendirilir (ICH, 2005)

Bu çalışmada, doğruluğun tayin edilmesi amacıyla 3 farklı konsantrasyonda (5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) Meis2i içeren çözelti hazırlanmıştır. Her çözelti 3 kez analiz edilmiştir.

4.1.2.3 Kesinlik

Analitik validasyonda kesinlik, belirli koşullar altında aynı örneğin çoklu analizinden elde edilen bir dizi ölçüm arasındaki dağılımını ifade eder. Kesinliğin yorumlanmasında tekrarlanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik parametreleri rol oynamaktadır (ICH, 2005).

Tekrarlanabilirlik parametresi, kısa bir zaman aralığı içerisinde aynı koşullar altındaki kesinliği belirtir. Tekrarlanabilirliğin tayini için, aynı stok çözeltiden hareketle hazırlanan örneklerin alan ölçümü tekrarlanmalıdır.

Bu çalışmada yöntemin kesinliği, tekrarlanabilirliğin ortaya konması için kalibrasyon aralığında yer alan 3 farklı derişimle (5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) hazırlanmış Meis2i çözeltisinin 3 farklı günde 3 kez tekrar eden ölçümlerinin yapılmasıyla gösterilmiştir.

4.1.2.4 Duyarlılık

Analitik yöntemde duyarlılık, kullanılan yöntemin örnek içerisindeki maddeyi saptayabilme ve konsantrasyonunu tayin edebilme yeteneğidir. Tespit sınırı (LoD) ve tayin sınırı (LoQ) hesaplanarak yöntemin duyarlılığı yorumlanır.

LoD, standart maddeye ait sinyalin gürültüden ayrıldığı en düşük konsantrasyon olarak ifade edilir. Analizler için kullanılan cihaza bağlı olarak LoD değerinin belirlenmesinde farklı yöntemlerden faydalanılır. Görsel değerlendirme, sinyal-gürültü oranı ve elde edilen cevap ile eğimin standart sapması gibi yöntemler ile LoD değeri bulunur.

LoD hesaplamada ICH kılavuzunda bulunan Denklem 4.1 kullanılmaktadır.

$$LoD = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (4.1)$$

LoQ ise, örnekte bulunan standart maddenin uygun doğruluk ve kesinlikle kantitatif olarak tespit edebilen en düşük miktarıdır.

LoQ hesaplamada ICH kılavuzunda bulunan Denklem 4.2 kullanılmaktadır.

$$LoQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad (4.2)$$

Yukarıdaki denklemlerde yer alan σ , y eksen kesim noktasının standart sapmasını ve m, korelasyon denkleminin eğimini ifade etmektedir.

4.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

4.2.1. Albümin nanopartiküllerinin hazırlanması

Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler (lipozomlar, polimerik nanopartiküller, miseller vb.) arasında, albümin temelli sistemler, kolay hazırlanabilme, çeşitli etkin maddelere yüksek bağlanma kapasitesi, toksik ve immünojenik olmama, biyolojik olarak uyumlu, biyo-parçalanabilir ve dolaşımda uzun süre kalabilme gibi avantajlı özellikleriyle öne çıkmaktadır (He vd., 2021).

Literatürdeki albümin nanopartikülü hazırlama yöntemleri incelendiğinde, bir kimyasal bileşiğin (örn., etanol, pamuk tohumu yağı veya β -merkaptöetanol (β -ME)) veya fiziksel bir faktörün (örn., ısı veya basınç) kullanıldığı gözlemlenebilir. Bu yöntemlerden başlıcaları koaservasyon (desolvasyon), emülsifikasyon, kendi kendine oluşma, nanopartikül albümin-bağlı (NAB) teknolojisi, ısı denatürasyonu ve püskürterek kurutmadır. En çok tercih edilen yöntem ise koaservasyondur. Bununla birlikte, nano çöktürme yoluyla albümin nanopartikülü hazırlanması konusunda yeterli çalışma yoktur.

Sadece bir adımdan oluşan bu yöntem, hızlı ve oldukça kolaydır. Hidrofobik maddelerden nanopartikül hazırlanmasında halihazırda yaygın kullanımda olan bu yöntem, genellikle peptid gibi makromoleküllerin bozulmasına yol açabilecek herhangi bir faktörü barındırmaz. Buna ek olarak, literatür, protein moleküllerini protein nanoyapı içinde kapsülleme girişiminden yoksundur. Teorik olarak, böyle bir sistem, her ikisi de amino asitlerden oluştuğu için taşıyıcı ve etkin madde arasındaki benzerliği bir avantaja dönüştürme potansiyeli taşır. Ayrıca, proteinle dolu olan bu ortam, vücuttaki protein barındıran ortamı taklit edebilir. (Kouchakzadeh, Safavi ve Shojaosadati, 2015; Tarhini vd., 2020).

Bu çalışmada Meis2i'nin albümin nanopartiküllerine yüklenmesi amacıyla nano çöktürme yönteminden faydalanılmıştır.

Çalışmanın ilerleyen aşamalarında kullanılacak olan ideal partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerlerine sahip nanopartiküllerin elde edilmesi amacıyla insan serum albümini (HSA) ve sığır serum albümini (BSA) ile çeşitli ön çalışmalar yürütülmüştür. Çalışmalar boyunca pH'ı 7,4 olan distile su ve %99,8 saflıkta 'HPLC Grade' etanol kullanılmıştır. Nano çöktürme süreci boyunca gerçekleştirilen damlatma işlemleri 1 ml/dk olacak şekilde ayarlanmıştır.

HSAM2 formülasyonu: 20 mg HSA 10 ml hacme sahip bir behere konularak üzerine 2 ml distile su ilave edilmiştir. Bu beher 400 rpm'e ayarlanmış manyetik karıştırıcılı ve 28°C sıcaklıktaki ortamda 10 dakika boyunca bekletilerek berrak bir albümin çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra, bu çözeltiye albüminin denatüre olmasını sağlamak amacıyla damla damla 1 ml etanol eklenmiştir. Bu işlem sonucunda ortamın berraklığı kaybolarak rakı görünümü almıştır. Diğer yandan, bir kriyotüp içerisinde 2 mg Meis2i tartılarak 2 ml etanolde 30 saniye boyunca sonike edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Etkin maddenin bulunduğu bu organik faz, albüminin bulunduğu sulu faza damlatılmıştır. Son olarak damla damla 3 ml etanol ilave edilerek nanoçöktürme tamamlanmıştır. Ortamdaki etanolün tamamen uzaklaşması için beher aynı koşullar altında 24 saat boyunca bekletilmiştir.

HSAM4 formülasyonu: 20 mg HSA 10 ml hacme sahip bir behere konularak üzerine 2 ml distile su ilave edilmiştir. Bu beher 400 rpm'e ayarlanmış manyetik karıştırıcılı ve 28°C sıcaklıktaki ortamda 10 dakika boyunca bekletilerek berrak bir

albümin çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra, bu çözeltiye albüminin denatüre olmasını sağlamak amacıyla damla damla 1 ml etanol eklenmiştir. Bu işlem sonucunda ortamın berraklığı kaybolarak rakı görünümü almıştır. Diğer yandan, bir kriyotüp içerisinde 4 mg Meis2i tartılarak 3 ml etanolde 30 saniye boyunca sonike edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Etkin maddenin bulunduğu bu organik faz, albüminin bulunduğu sulu faza damlatılmıştır. Son olarak damla damla 2 ml etanol ilave edilerek nanoçöktürme tamamlanmıştır. Ortamdaki etanolün tamamen uzaklaşması için beher aynı koşullar altında 24 saat boyunca bekletilmiştir.

HSAM4L formülasyonu: HSAM4 formülasyonunun liyofilize toz haline getirilmesiyle elde edilmiştir.

HSAB formülasyonu: Boş formülasyonun hazırlanmasında HSAM2 formülasyonunun hazırlanış prosedürü ortamda Meis2i olmadan uygulanmıştır.

BSAM formülasyonu: 20 mg BSA 10 ml hacme sahip bir behere konularak üzerine 2 ml distile su ilave edilmiştir. Bu beher 400 rpm'e ayarlanmış manyetik karıştırıcılı ve 28°C sıcaklıktaki ortamda 10 dakika boyunca bekletilerek berrak bir albümin çözeltisi elde edilmiştir. Daha sonra, bu çözeltiye albüminin denatüre oluşunun görsel belirtici olan bulanma gözlenene dek damla damla 7 ml etanol ilave edilmiştir. Diğer yandan, bir kriyotüp içerisinde 2 mg Meis2i tartılarak 2 ml etanolde 30 saniye boyunca sonike edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Etkin maddenin bulunduğu bu organik faz, albüminin bulunduğu sulu faza damlatılmıştır. Son olarak damla damla 2 ml etanol ilave edilerek nanoçöktürme tamamlanmıştır. Ortamdaki etanolün tamamen uzaklaşması için beher aynı koşullar altında 24 saat boyunca bekletilmiştir.

BSAB formülasyonu: Boş formülasyonun hazırlanmasında BSAM formülasyonunun hazırlanış prosedürü ortamda Meis2i olmadan uygulanmıştır.

4.2.1.1. Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları

4.2.1.1.1. Partikül boyutu ve dağılımı

Nanopartiküllerin partikül boyutunun kontrolü ve dağılımı etkin maddenin hedeflendirilmesi ve biyoyararlanımı için oldukça önemlidir. Boyut dağılımı ise genelde nanopartiküllerin tek düzelikliğini ve stabilitesini belirleyen polidispersite indeksi (PDI) ile tanımlanır. İdeal PDI, 0.01-0.5 aralığında olmalıdır (Youshia, Ali ve Lamprecht, 2017).

Hazırlanan tüm formülasyonların parçacık boyutu ve PDI analizleri Malvern Zetasizer (İngiltere) ile gerçekleştirilmiştir. Formülasyonlardan 50 µL alınarak formülasyon çalışmalarında kullanılan distile su ile 1 ml'ye tamamlanmış ve zeta hücrelerine alınan bu dispers ortam cihaza verilmiştir.

4.2.1.1.2. Zeta potansiyeli

Zeta potansiyeli, nanopartiküllerin süspansiyon içinde kararlı bir şekilde dağılım göstermesinin ölçütüdür. Zeta potansiyeli değeri, parçacıkların yüzeyindeki elektrik yüküne bağlı olarak nanosüspansiyonların kararlılığının yorumlanmasını sağlar. Elektrostatik olarak stabilize haldeki bir nanosüspansiyon için zeta potansiyeli en az ± 30 mV olmalıdır (Bose vd., 2021; Zirak ve Pezeshki, 2015).

Formülasyonların tamamının zeta potansiyeli ölçümleri parçacık boyutu ve PDI analizi için hazırlanmış örneklerin analizi sonrasında aynı örnekler ile Malvern Zetasizer (İngiltere) ile gerçekleştirilmiştir.

4.2.2 In situ jelleşen sistemlerin hazırlanması

In-situ jelleşen sistem hazırlamak için öncelikle 10 gram Poloxamer® 407 tartılarak 50 ml hacmindeki behere konulmuştur. Beher manyetik karıştırıcı üzerine bırakıldıktan sonra buz kalıpları yardımıyla soğuması sağlanmıştır. Daha sonra buzdolabında bir süre bekletilerek sıcaklığı $\sim 4^{\circ}\text{C}$ 'ye getirilen pH 7.4 distile su ortama ilave edilmiştir. Beher içeriği bir manyetik balık yardımı ile 750 rpm hızda 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Sıcaklığı sabit tutmak amacıyla buz kalıpları 2 saatte bir yenilenmiştir. Bu işlem sonucunda %20'lik (a/a) Poloxamer® 407 (P20) çözeltisi elde edilmiştir.

In situ jelleşen sistemin uygulandığı bölgedeki kalış süresinin ve şişme derecesinin arttırılması amacıyla poloxamer çözeltisine belirli oranlarda eklemek üzere kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. %1 oranında (a/a) yüksek viskoziteye sahip kitosan çözeltisi hazırlamak için hesaplanan miktarda kitosan tartılarak üzerine %0,6 (a/h) asetik asit çözeltisi (a/h) ilave edilmiştir. pH değeri 3.8 olan kitosan çözeltisinin pH değeri 0,5 M NaOH çözeltisi ile 4,5'e ayarlanmıştır. Elde edilen bu çözelti belirli oranlarda P20 ile karıştırılarak farklı konsantrasyonlara sahip *in situ* jelleşen sistemler elde edilmiştir. Formülasyonların hazırlanmasında kullanılan madde miktarları Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

Tablo 4.2. *In situ jelleşen sistemlerde kullanılan madde miktarları*

Formülasyon	PC20 miktarı (g)	Kitosan %1 miktarı (g)
PC15	5 gram	1,667 gram
PC16	5 gram	1,25 gram
PC17	5 gram	0,88 gram
PC18	5 gram	0,55 gram

4.2.2.1. *In situ jelleşen sistemlerin jelleşme sıcaklığının belirlenmesi*

Parenteral yolla vücuda verilecek olan bir *in situ* jelleşen sistemden beklenen ilk özellik, vücut sıcaklığı olan 37°C’de jelleşmiş olmasıdır. Hazırlanan tüm formülasyonların jelleşme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla *Görsel Tüp Ters Çevirme Yöntemi (Visual Tube Inversion Method)* kullanılmıştır. 15 ml hacimdeki falcon tüplerinde bulunan 1 gram ağırlığındaki formülasyonlar sıcaklığı yavaşça arttırılan sirkülasyonlu su banyosuna yerleştirilmiştir. Formülasyonların sıcaklıklarının ölçülmesi için termometre probu tüplerin tam ortasına ve jel sıcaklığının ortam sıcaklığına en geç ulaştığı kısma daldırılmıştır. Her 0,5°C’lik sıcaklık artışında tüplerin eğilmesi üzerine jelin akmayı durdurduğu sıcaklık, jelleşme sıcaklığı olarak kaydedilmiştir (Ur-Rehman, Tavelin ve Gröbner, 2011).

4.2.2.2. *In situ jelleşen sistemlerin pH değerlerinin ölçümü*

Hazırlanan *in situ* jelleşen sistemlerin pH ölçümü 4°C, 25°C ve 37°C’de pH metre ile yapılmıştır.

4.2.2.3. *Uygun in situ jelleşen sistemin belirlenmesi*

Bu çalışmada 3 farklı jel formülasyonu hazırlanarak jelleşme sıcaklıkları ve farklı sıcaklıklardaki pH değerleri belirlenmiştir. HSAM4’ün ilave edilerek çalışmaların devamında kullanılacak jel formülasyonuna karar verilmesinde bu parametreler etkili olmuştur.

4.2.2.4. *Reolojik davranış*

İlerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiş olan uygun jel formülasyonunun 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarında gösterdiği reolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, kayma hızına karşı kayma gerilimi ve viskozitenin değişimi reometre yardımıyla ölçülerek sonuçlar yorumlanmıştır.

4.2.3. HSAM4 içeren *in situ* jelleşen sistemin hazırlanması

Bu tez çalışmasında kullanılan etkin madde ile ilk kez ilaç geliştirme çalışması yapıldığı ve dolayısıyla etkin maddenin bir piyasa preparatı olmadığı için optimum doz ilerleyen MTT çalışmalarında belirlenmiştir. MTT çalışması için 1 mg HSAM4L tartılarak 1 ml jel içinde dağıtılmıştır.

4.2.3.1. HSAM içeren *in situ* jelleşen sistemin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

4.2.3.1.1. Jelleşme sıcaklığı

Görsel Tüp Ters Çevirme Yöntemi HSAM4L içeren jel formülasyonu ile tekrarlanmıştır.

4.2.3.1.2. pH değeri

HSAM4L içeren jel formülasyonunun 4°C, 25°C ve 37°C'deki pH değeri pH metre ile ölçülmüştür.

4.2.3.1.3. Jelleşme kapasitesi

Jelleşme kapasitesinin tayin edilmesi amacıyla, 37°C sıcaklığa sahip 2 ml pH 7.4 fosfat tamponu içeren vialin içine formülasyondan bir damla damlatılmıştır. Görsel olarak jelasyon için geçen zaman ve jelin çözünme süresi dikkate alınarak jelleşme kapasitesi değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme Tablo 4.3'te gösterilen parametrelere göre yapılmıştır (Srividya, Cardoza and Amin, 2001).

Tablo 4.3. *Jelleşme kapasitesi belirteçleri*

Görsel Değerlendirme	Belirteç
Jelleşme yok	-
Jelleşme birkaç dakika içerisinde oluştu ve hızla çözündü	+
Jelleşme hemen oluştu ve birkaç saat kaldı	++
Jelleşme hemen oluştu ve uzun süre kaldı	+++

4.2.3.1.4. Şişme

Şişme çalışması yapmak üzere 1 ml formülasyon diyaliz membrana konulmuş ve membranın uçları kapatıcı ile kapatılmıştır. Jel ağırlığı, suni gözyaşı ortamına konulmadan önce ve 37°C sıcaklıkta fosfat tamponu içine bırakıldıktan sonra çeşitli

zamanlarda tartılmıştır. Şişme oranı aşağıdaki Denklem 4.3 kullanılarak hesaplanmıştır (Güven, 2016).

$$\% \text{ şişme oranı}_t = \frac{\text{jel ağırlığı}_t - \text{jel ağırlığı}_{t_0}}{\text{jel ağırlığı}_{t_0}} \times 100 \quad (4.3)$$

4.2.3.1.5. Reolojik davranış

İdeal formülasyonun reolojik davranışları 4°C, 25°C ve 37°C’de, reometrede kayma hızına karşı kayma gerilimi ve viskozitenin değişimi ölçülerek değerlendirilmiştir.

4.3. Nanopartiküle Yüklenmiş Etkin Madde Miktar Tayini

Liyofilize haldeki HSAM4 formülasyonunda albümine yüklenmiş ve yüklenmemiş halde bulunan etkin madde miktarı, formülasyonun çeşitli işlemlere tabi tutularak UPLC’de analiz edilmesiyle bulunmuştur.

2 ml’lik tüp içerisinde 300 µg HSAM4 tartılarak üzerine 300 µL etanol ilave edilmiştir. Hazırlanan bu tüp 16000 rpm hızda 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstte kalan berrak kısım (süpernatant) etanol ile 2 ml’ye tamamlanarak albümin nanopartiküllerine yüklenmemiş halde bulunan Meis2i miktarının analizi için ayrılmıştır.

Süpernatant alındıktan sonra tüpün çeperinde kalan pellet 2 ml etanol ile resüspande edilmiş ve sonrasında 2 dakika boyunca ultrasonikasyona maruz bırakılmıştır. Bu işlem sayesinde albümin nanopartikülleri içerisinde bulunan Meis2i’nin ekstraksiyonu sağlanmıştır. Ultrasonikasyonun ardından tüp, 16000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek süpernatant analiz için ayrılmıştır.

Yükleme veriminin hesaplanmasında aşağıda yer alan Denklem 4.4 kullanılmıştır.

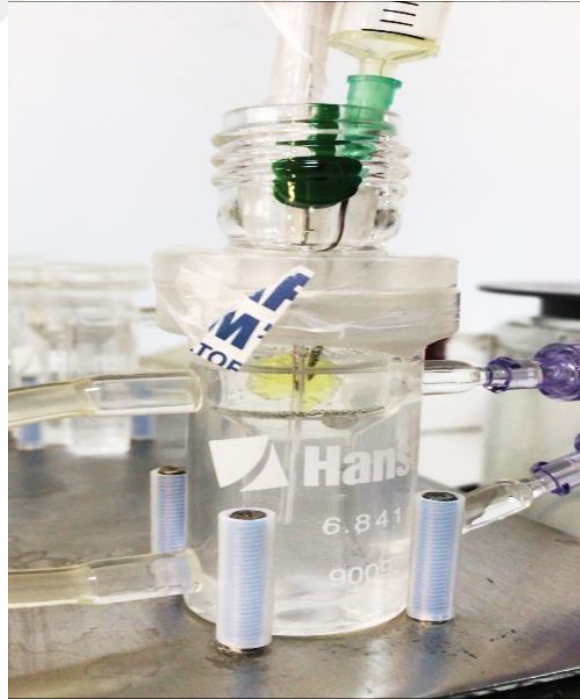
$$\%EE = \frac{\text{Formülasyondaki etkin madde miktarı} - \text{süpernatant içindeki etkin madde miktarı}}{\text{Formülasyondaki etkin madde miktarı}} \times 100 \quad (4.4)$$

4.4. In Vitro Salım Çalışmaları

In vitro salım çalışmalarında; *in situ* jelleşen sistemden Meis2i salımı, liyofilize HSAM4 nanopartikülü içeren *in situ* jelleşen sistemden partikül salımı, HSAM4

nanopartiküllerinden Meis2i salımı ve iRGD peptidinin *in situ* jelleşen sistemden salımı gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında geliştirilen formülasyonlar pankreas kanalına uygulanmak üzere tasarlanmıştır. *In situ* jelleşen sistemden etkin madde salım çalışmalarında pankreas kanalını simüle etmesi amacıyla Franz Difüzyon hücresi kullanılmış ve yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışma için pH değeri 7.4 olan bir fosfat tamponu hazırlanarak sıcaklığı 37°C'ye getirilmiştir. 5 ml hacimdeki fosfat tamponu Franz Difüzyon hücresine konarak içerisine bir manyetik balık atılmıştır. Sonrasında ise, *in situ* jelleşen sistemin salım ortamı içerisinde asılı kalarak ortama etkin madde geçişinin sağlanması amacıyla Franz Difüzyon hücresine 1 cm çapa sahip, eşit boyutta gözeneklerden oluşan metal bir plaka yerleştirilmiştir. 1 mg Meis2i'nin 1 ml jel içerisinde vorteks yardımıyla homojen biçimde dağıtılmasıyla bir stok elde edilmiş ve bu stoktan 300 µL alınarak, plaka üzerine enjekte edilmiştir. 100 rpm'e ayarlanan manyetik karıştırıcılı ortam karışmaya bırakılmıştır. 2., 4., 6., 8., 10., 12., 15., 18. ve 21. dakikalarda 500 µL örnek alınmış ve sonrasında ortama 500 µL fosfat tamponu ilave edilmiştir. Alınan örnekler etanol ile 1:1 oranında seyreltilerek UPLC analizleri yapılmıştır. N=3 çalışılmıştır.



Görsel 4.1. Franz Difüzyon hücresinde *in situ* jelleşen sistemden salım çalışması

In situ jelleşen sistemden HSAM4 nano partiküllerinin salım çalışması için 6 mg liyofilize HSAM4 tartılarak, vorteks yardımıyla 1 ml jel içerisinde homojen biçimde

dağıtılmıştır. Meis2i salımı için uygulanan prosedürler partikül salımı için de tekrar edilmiştir. Bu çalışmada örnekler, 2., 4., 6., 10., 14., 22., 30., 40., 50., 65., 80. ve 95. dakikalarda alınmıştır. Ortama geçen partiküllere yüklenmemiş halde bulunan etkin madde miktarının tayini için alınan örnekler 16000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve berrak kısımlar analiz edilmek üzere ayrılmıştır. Partiküllere yüklenmiş halde bulunan Meis2i miktarının tayini içinse santrifüj sonunda elde edilen pelletler 500 µL etanol ile resüspande edilmiş ve ardından sonikasyona maruz bırakılarak nanopartiküller parçalanmıştır. Sonikasyon sonrasında 16000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilen tüp içeriğinin berrak kısımları alınarak analiz edilmek üzere ayrılmıştır.

HSAM4 nanopartiküllerinden Meis2i’nin salım çalışmasını yapmak üzere 1200 µg liyofilize HSAM4 tartılarak, 2 ml pH 7.4 distile suda dağıtılmıştır. Daha sonra bu karışım, her birinde 500 µL olacak şekilde 4 ml’lik kriyo tüplere aktarılmıştır. Ardından, kriyo tüplerin hacmi, sıcaklığı 37°C’ye ayarlanmış pH 7.4 PBS çözeltisi ile 3 ml’ye tamamlanmıştır. Hazırlanan salım ortamları, bir çalkalayıcı üzerine sıcaklığı 37°C’de sabit tutmak amacıyla yerleştirilmiş ısıtıcı manyetik karıştırıcının üzerine yatay biçimde yerleştirilerek 130 rpm hızında çalkalanmaya bırakılmıştır. Belirlenen zamanlarda çalkalama işlemi durdurularak tüplerden 500 µL örnek alınmıştır. Partiküllerden salım ortamına geçen Meis2i’nin ortamdan izole edilmesi amacıyla örnekler 16000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısımlar analiz edilmek üzere ayrılmıştır. Dolaşım sisteminde 21 güne kadar bulunan insan serum albümini ile hazırlanmış nanopartiküllerle yapılan salım çalışması 21 gün boyunca devam ettirilmiştir. N=3 çalışılmıştır.

4.5. iRGD Peptidinin *In Situ* Jelleşen Sisteme Yüklenmesi ve Salım Çalışması

4.5.1. iRGD peptidi ve miktar tayini

iRGD peptidinin salım profilinin belirlenmesi amacıyla, salım ortamına geçen peptidin miktar tayini UV spektrofotometre kullanılarak hesaplanmıştır.

Analizler, Shimadzu UV-1800 ile gerçekleştirilmiş; iRGD peptidinin en yüksek absorbens değerini verdiği tespit edilen 220 nm dalga boyu ile çalışılmıştır.

Beyaz toz halinde bulunan peptidin pH 7.4 distile su ile seyreltilmesiyle hazırlanan 5-100 µg/ml konsantrasyon aralığındaki örneklerin 220 nm dalga boyunda absorbensleri okunmuş ve her bir derişime karşılık gelen absorbens değeri kullanılarak

bir doğrusallık grafiği ve denklemi elde edilmiştir. Bu denklem, peptidin salım çalışmasında miktar tayin edilmesinde kullanılmıştır.

4.5.2. iRGD peptidinin *in situ* jelleşen sistemden salım çalışması

In situ jelleşen sistemden iRGD peptidinin salım çalışmasında Franz Difüzyon Hücresi kullanılmıştır. Bu çalışma için pH değeri 7.4 olan bir fosfat tamponu hazırlanarak sıcaklığı 37°C'ye getirilmiştir. 5 ml hacimdeki fosfat tamponu Franz Difüzyon hücreğine eklenmiştir. Ardından, *in situ* jelleşen sistemin salım ortamı içerisinde asılı kalarak ortama etkin madde geçişinin sağlanması amacıyla Franz Difüzyon hücreğine 1 cm çapa sahip, eşit boyutta gözeneklerden oluşan metal bir plaka yerleştirilmiştir. Bu çalışma için daha önceden distile suda çözündürülerek 1 mg/ml porsiyonlara ayrılmış halde -80°C'de muhafaza edilmiş olan peptid çözeltisi belirli oranda poloksamer ve kitosan ile karıştırılarak 1mg/ml derişiminde iRGD bulunduran bir stok hazırlanmıştır. Bu stoktan 250 µL salım ortamına yerleştirilmiş olan plakanın üzerine enjekte edilmiş ve 100 rpm'e ayarlanan manyetik karıştırıcılı ortam karışmaya bırakılmıştır. 2., 4., 6., 8., 10., 12., 15., 18. ve 21. dakikalarda 500 µL örnek alınmış ve sonrasında ortama 500 µL fosfat tamponu ilave edilmiştir. Alınan örneklerin absorbens değerleri UV spektrofotometrede analiz edilmiştir. N=3 çalışılmıştır.

4.6. Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında, formülasyonların hücresel düzeydeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, insan pankreas kanalı kökenli pankreas kanser hücresi hattı olan PANC-1 ve insan endotelyal hücre hattı olan HUVEC kullanılmıştır. Hücrelerin çoğaltılması ve formülasyonların uygulanması gibi işlemler için hücre kültürü yapılmıştır. Tüm hücre hatları için besiyeri olarak %10 Fetal Bovine Serum, %1 penisilin-streptomisin, %1 glutamin içeren DMEM tercih edilmiştir. Hücrelerin çoğaltılması, MTT çalışmaları gibi süreçler boyunca hücreler 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer koşullarında bekletilmiştir.

4.6.1. Sitotoksosite çalışması

MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiyazolil)-2,5-difenil-2H tetrazolyum bromür) testi; güvenli, basit ve uygun maliyetli olmasıyla hücre yoğunluklarını ölçmek için kullanılan en popüler kolorimetrik yöntemlerden biridir. Bu yöntem, sarı ve çözünür olan MTT'nin canlı hücrelerin mitokondriyal, non-mitokondriyal ve plazma membran redüktazları

tarafından indirgenmesine dayanmaktadır. Bu indirgenme sonucunda ortaya çıkan çözünmez bir ürün olan formazon tuzunun çözülerek canlı hücrelerin absorbandsının okunabilmesi için ortama çözücü ilave edilmesi gerekir. Çözücü ilavesiyle berrak bir formazan çözeltisi elde edilir ve 550-600 nm dalga boyu aralığında absorbands değeri ölçülür (Nga vd., 2020).

Bu tez çalışmasında, hazırlanan formülasyonların ve formülasyonda kullanılan maddelerin sitotoksik açıdan değerlendirilmesi amacıyla MTT çalışması yapılmıştır. Formülasyonlarda yer alan herhangi bir maddeyi içermeyen, sadece besiyerinin uygulandığı kontrol grubundan elden edilen ortalama absorbands değeri %100 canlılık olarak kabul edilmiştir. Farklı derişimlerde hazırlanan örneklerin uygulandığı hücrelerden elde edilen absorbands değerleri kontrol grubunun absorbands değeri ile karşılaştırılarak göreceli % canlılık değeri hesaplanır. Bu değer %100'ün altında olduğunda, formülasyon hücreler üzerinde belirli bir oranda toksik etki göstermiş ve ölümlerine yol açmış olarak kabul edilir. Hücre miktarında %50 oranda azalmaya neden olan konsantrasyon IC50 değeri olarak tanımlanır.

Bu çalışmada PANC-1 ve HUVEC hücre hatlarına uygulanan MTT testinin aşamaları aşağıdaki gibidir.

- I. Hücreler 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ ve %95 hava içeren atmosfer ortamında, 75 cm²'lik flasklar içinde çoğaltıldıktan sonra tripsin yardımıyla kaldırılmış ve DMEM besiyeri içerisinde süspande edilmiştir.
- II. *Thoma* lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. Hücreler, 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta yaklaşık 2x10⁴ adet hücre olacak şekilde ekilmiştir.
- III. Hücreler 24 saat boyunca etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Kuyu zeminine tutunan hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra farklı derişimlere sahip formülasyonlar kuyucuklara uygulanmıştır. Plakalar 24. saat ve 48. saat analizleri yapılmak üzere inkübasyona bırakılmıştır.
- IV. Kontrol grubu olarak seçilen kuyucuklara yalnızca besiyeri ilave edilmiştir.
- V. 24 ve 48 saatin sonunda kuyucuk içeriği uzaklaştırılmış, her bir kuyucuğa 20 µL (5 mg/ml) MTT boyası konarak formazan tuzu oluşumu için plakalar 3 saat boyunca etüvde bekletilmiştir.

- VI. 3 saat sonra MTT boyası kuyucuklardan uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 200 µL DMSO eklenmiştir. Bu işlem sonrasında 20 dakika boyunca etüvde bekletilen plakalar ardından çoklu plaka okuyucuya (Cytation 5, BioTek Instruments, ABD) yerleştirilmiş ve her bir kuyucuğun 570 nm'deki absorbans değeri okunmuştur.
- VII. %100 canlılık olarak kabul edilen kontrol grubunun absorbans değeri ile formülasyon uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri oranlanarak % canlılık değerleri bulunmuştur.
- VIII. Her bir konsantrasyon için 3 kuyu kullanılmıştır.

Bu MTT testinde hücrelere 2, 4, 8, 10, 15, 20, 30 µg/ml konsantrasyondaki örnekler uygulanmıştır.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

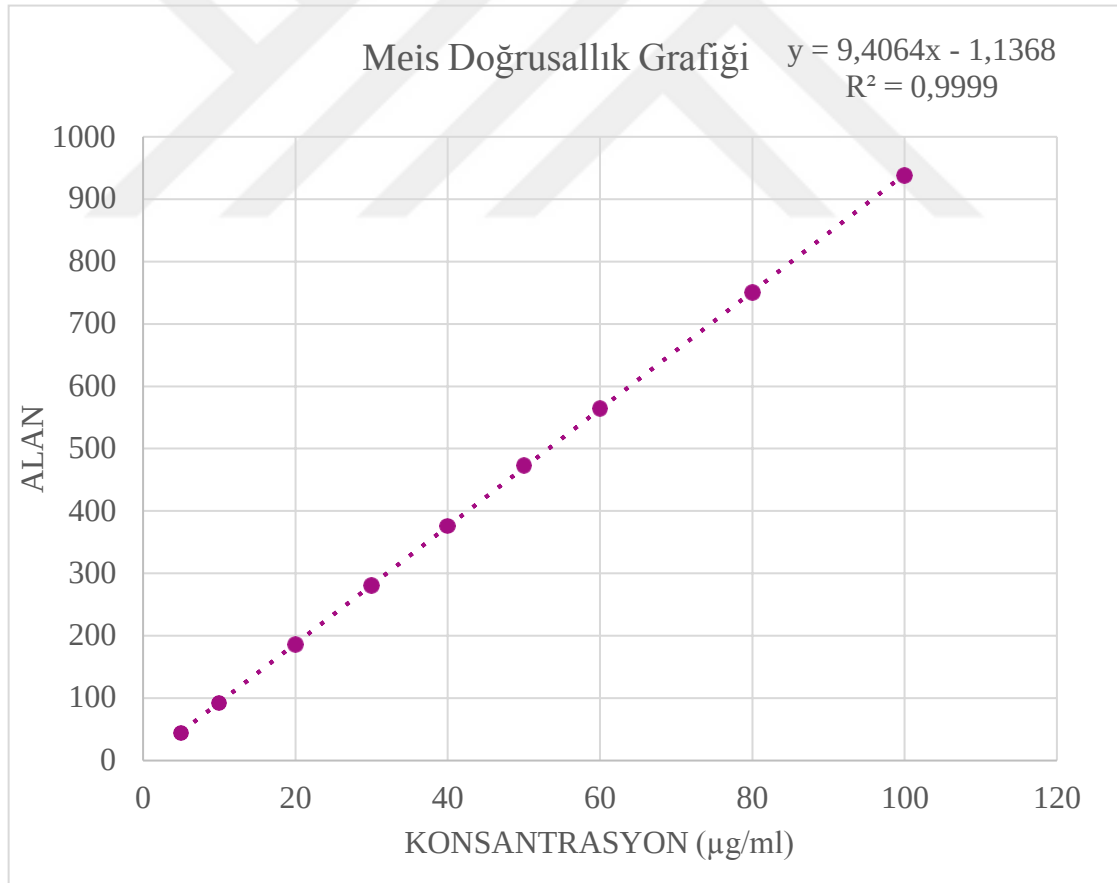
5.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışması

5.1.1. Analitik yöntem geliştirme

Meis2i'nin miktar tayininin yapılabilmesi için yeni bir UPLC methodu geliştirilmiştir. Farklı varyasyonlarda parametreler uygulanarak, en uygun pik morfolojisine ve seçiciliğe sahip yönteme ulaşılmıştır.

5.1.1.1. Doğrusallık

Meis2i'nin etanolde hazırlanan 5-100 µg/ml derişimlerdeki örneklerine karşılık gelen alan değerleri kullanılarak etkin maddeye ait kalibrasyon eğrisi bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisi ve eğriye ait doğru denklemi aşağıda yer alan Şekil 5.1'de gösterilmektedir.



Şekil 5.1. Meis2i'ye ait doğrusallık grafiği (n=6)

5.1.1.2. Kesinlik

Meis2i'nin 5, 40 ve 100 µg.ml⁻¹ derişimlerindeki çözeltileri etkin maddenin etanolde çözüldürölmesiyle hazırlanmıştır. Üç farklı günde üç farklı derişim 3 kez analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen alanlar doğrusallık çalışması ile bulunan denklemde yerine konarak derişim hesaplaması yapılmıştır. Bulunan derişimlere ait varyasyon katsayıları hesaplanarak yöntemin kesinliği değeriendirilmiştir. Kesinlik çalışmasına ait bulgular aşağıda yer alan Çizelge 5.1'de gösterilmektedir.

Tablo 5.1. Kesinlik çalışması sonuçları

	1. Gün	2. Gün	3.Gün
5 µg/ml	4,98279	4,87987	4,9418
	4,98519	4,94358	4,92811
	4,9939	4,97188	4,93824
Ortalama	4,987293	4,931776667	4,93605
Standart Sapma	0,005846	0,047126946	0,007103
Varyasyon Katsayısı	0,117218	0,955577455	0,143898
40 µg/ml	39,95542	40,06223	40,28888
	39,87845	40,252	40,6133
	40,58717	40,18305	40,49776
Ortalama	40,14035	40,16576	40,46665
Standart Sapma	0,388869	0,096059207	0,164433
Varyasyon Katsayısı	0,968774	0,239156952	0,406341
100 µg/ml	96,94006	96,92328	96,86819
	98,51829	98,74599	98,47477
	98,61646	98,70716	100,4577
Ortalama	98,02494	98,12547667	98,60022
Standart Sapma	0,940812	1,041313863	1,79804
Varyasyon Katsayısı	0,959768	1,061206425	1,823566

Analitik yöntemin kesinlik çalışmaları, hesaplanan varyasyon katsayısının %2'den küçük olması gerekmektedir (ICH, 2005). Yukarıda bulunan Çizelge 5.1'deki analiz sonuçları incelendiğinde, tüm derişimler için elde edilen değeri kabul edilen sınırlar içinde yer almakta ve yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır.

5.1.1.3. Doğruluk

Meis2i'nin 5, 40 ve 100 ug.ml⁻¹ derişimlerdeki çözeltileri hazırlanarak, her bir çözelti 3 kez analiz edilmiştir. Analiz sonrasında elde edilen alan değerleri etkin maddeye ait eşitlikte yerine konarak çözeltilerin derişimleri hesaplanmıştır. Bu derişimler teorik derişim ile karşılaştırılarak yöntemin doğruluğu elde edilen %geri kazanım oranı üzerinden değerlendirilmiştir. Doğruluk çalışması sonuçları aşağıda yer alan Çizelge 5.2'de sunulmaktadır.

Tablo 5.2. Doğruluk çalışması sonuçları

Derişim (µg/ml)	5	40	100
	4,92103	40,33298	98,70863
Elde Edilen Derişim	4,83449	40,28821	98,45481
	4,96152	40,28267	98,33638
% Geri Kazanım	98,4206	100,83245	98,70863
	96,6898	100,72053	98,45481
	99,2304	100,70668	98,33638
Ortalama	98,1136	100,75322	98,49994
Standart Sapma	1,2978247	0,0689666	0,1901843
Standart Hata	0,7492998	0,0400852	0,109803

Analik yöntemin doğru olarak kabul edilebilmesi için % geri kazanım değerinin kabul aralığı %±2'dir (ICH, 2005). Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, bu tez çalışmasındaki tüm %geri kazanım değerleri istenen aralıktadır. Böylece yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır.

5.1.1.4. Duyarlılık

LOD ve LOQ değerleri '4.1.2.4 Duyarlılık' başlığı altında yer alan Denklem 4.1 ve Denklem 4.2 yardımıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 5.3'te gösterilmektedir.

Tablo 5.3. Duyarluluk alışması sonuçları

Denklem	Kesim Noktası	Eğim (m)
1	-1,3217	9,0601
2	2,3128	9,0926
3	-3,0497	9,3315
4	-1,9291	9,9744
5	-3,5126	9,7343
6	0,6796	9,2457
Ortalama	-1,136783333	9,40643333
Standart Sapma	2,243416523	0,36877392
LOD	0,787043748	
LOQ	2,384981048	

Analitik yöntem validasyonu için kullanılan en düşük Meis2i derişimi 5 µg/ml’dir. LOD ve LOQ değerlerinin 5 µg/ml’den daha küçük olması, analitik yöntemin duyarlılığının kanıtıdır.

5.2. Formülasyon Geliştirme alışmaları

5.2.1. Albümin nanopartiküllerinin hazırlanması

‘4.2.1. Albümin nanopartiküllerinin hazırlanması’ başlığı altındaki prosedürler uygulanarak HSAM2, HSAM4, HSAM4L HSAB, BSAM ve BSAB formülasyonları elde edilmiştir. Nanopartiküller üzerinde çeşitli karakterizasyon çalışmaları yürütölmüştür.

5.2.1.1. Partiköl boyutu ve dağılımı

Formülasyonların partiköl boyutu ve dağılımı Malvern ZetaSizer (İngiltere) kullanılarak ölçölmüştür. Elde edilen sonuçlar aşağıda yer alan Tablo 5.4’te gösterilmektedir.

Tablo 5.4. Formülasyonlara ait partiköl boyutu ve boyut dağılımı değerleri

Formülasyon Kodu	Partiköl Boyutu (nm)	Boyut Dağılımı (PDI)
HSAB	77,607	0,172
HSAM2	160,333	0,317
HSAM4	215,567	0,277
HSAM4L	328,867	0,341
BSAB	79,01	0,303
BSAM	2260,667	0,905

Sonuçlar incelendiğinde, etkin madde içermeyen HSAB ve BSAB kodlu boş formülasyonların benzer partikül boyutlarına ve PDI değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Ancak etkin madde içeren formülasyonların analiz sonuçları değerlendirildiğinde, kullanılan albümin türünün partikül boyutu ve PDI değişiminde önemli bir rol oynadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, seçilen nanopartikül hazırlama yönteminin etkin maddenin sıgır serum albüminine yüklenmesi için uygun olmadığına karar verilmiştir.

İnsan serum albümini (HSA) ile 2 mg Meis2i kullanılarak hazırlanmış olan HSAM2 formülasyonu partikül boyutu ve boyut dağılımı bakımından olması istenen değerlere sahiptir. Bu doğrultuda aynı miktarda polimer kullanarak daha yüksek oranda etkin madde taşıyan bir formülasyon geliştirmek amacıyla 4 mg Meis2i ile HSAM4 kodlu formülasyon hazırlanmış ve boyut/dağılım bakımından değerlendirilmiştir. Nanopartikül eldesinde kullanılan etkin madde miktarının artırılması partikül boyutunda büyük bir değişime yol açmamakla birlikte, PDI değeri de kabul edilebilir sınırlar içerisinde kalarak partiküllerin tekdüze bir dağılım sergilediğini kanıtlamıştır.

HSAM4 formülasyonu liyofilize edildikten sonra ise nanopartiküllerin partikül boyutu kabul edilebilir ölçüde artmıştır. PDI değeri de artmış ancak bu artışa rağmen kabul edilen sınırlar içerisinde yer almıştır.

Literatürde tümöral hedeflendirmede pasif ve aktif hedeflendirme olmak üzere iki temel hedeflendirme biçimi ele alınmaktadır. Partikül boyutu ve morfolojisinin biyoyararlanım üzerindeki etkileri ise pasif hedeflendirme başlığı altında incelenmektedir. Bir nanotaşıyıcı sistem içerisinde vücuda uygulanan etkin maddeler, küçük partikül boyutları sayesinde (20-200 nm boyut aralığında) ekstrasvazasyon yapabilirler ve interstisyel boşluk içinde birikim gösterirler. Ayrıca, tümör hücrelerinde lenfatik damarlar yoktur veya işlevsizdir, bu da tümör dokusunun verimsiz drenajına katkıda bulunur. Küçük boyutları sayesinde tümöral ortama giren nanotaşıyıcılar bu sayede ortamda tutulum ve birikim gösterirler (Danhier, Feron ve Preat, 2010).

Bu tez çalışmasında insan serum albümini kullanılarak hazırlanan nanopartiküller sahip oldukları küçük partikül boyutları sayesinde pasif hedeflendirme bakımından tedavide büyük avantaj sağlama potansiyeline sahiptirler.

5.1.1.2. Zeta potansiyeli

Tüm formülasyonların zeta potansiyeli Tablo 5.5'te belirtilmiştir.

Tablo 5.5. Formülasyonların zeta potansiyeli değerleri

Formülasyon Kodu	Zeta Potansiyeli (mV)
HSAB	-27,067
HSAM2	-35,4
HSAM4	-32,133
HSAM4L	-26,6
BSAM	-34,6
BSAB	-35,233

Ölçülen partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri doğrultusunda, tezin ilerleyen çalışmalarında kullanılmak üzere HSAM4 ve HSAM4L formülasyonları seçilmiştir.

5.2.2 *In situ* jelleşen sistemlerin hazırlanması

PC16, PC17 ve PC18 kodlu *in situ* jelleşen sistemler hazırlanarak, jel formülasyonları üzerinde jelleşme sıcaklığı testi ve pH ölçümü yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda ilerleyen çalışmalarda kullanılacak en uygun jel formülasyonu seçilmiştir.

5.2.2.1. *In situ* jelleşen sistemlerin jelleşme sıcaklığının belirlenmesi

Hazırlanan jellerin akışkan, viskoz ve jel olduğu sıcaklıklar aşağıda yer alan Tablo 5.6’da gösterilmektedir.

Tablo 5.6. *In situ* jelleşen sistemlerin jelleşme sıcaklıkları

Formülasyon	Sıcaklık (°C)															
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
PC16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	½	½	1	1	1	1	1
PC17	-	-	-	-	-	-	½	½	½	1	1	1	1	1	1	1
PC18	-	-	½	½	½	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
-: Tamamen Akışkan								½: Viskoz				1: Jel				

5.2.2.2. *In situ* jelleşen sistemlerin pH değerlerinin ölçümü

Hazırlanan *in situ* jelleşen sistemlerin farklı sıcaklıklarda sahip olduğu pH değerleri aşağıdaki Tablo 5.7’de gösterilmiştir.

Tablo 5.7. *In situ jelleşen sistemlerin farklı sıcaklıklardaki pH değerleri*

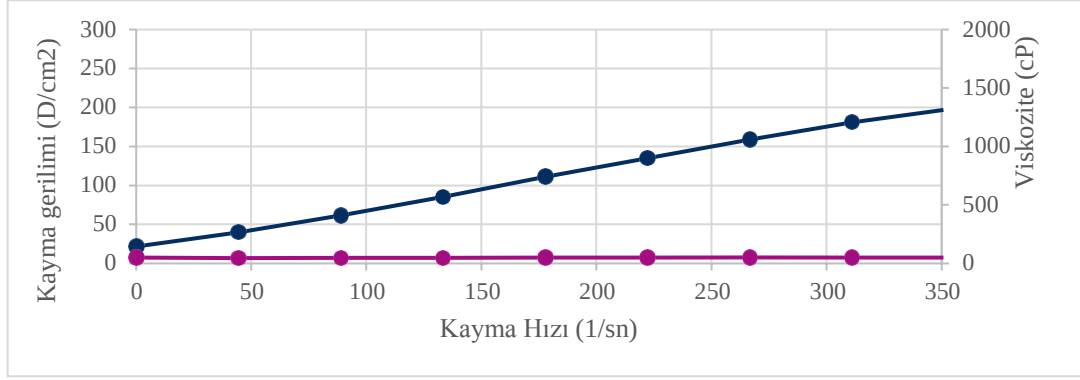
	Formülasyon		
	PC16	PC17	PC18
4°C	5.72	5.92	6.29
	5.72	5.92	6.29
	5.73	5.92	6.29
Ortalama	5.72	5.92	6.29
25°C	5.75	5.98	6.42
	5.75	5.98	6.42
	5.75	5.99	6.42
Ortalama	5.75	5.98	6.42
37°	5.81	6.05	6.50
	5.81	6.05	6.50
	5.80	6.06	6.49
Ortalama	5.81	6.05	6.50

5.2.2.3. Uygun *in situ jelleşen sistemin belirlenmesi*

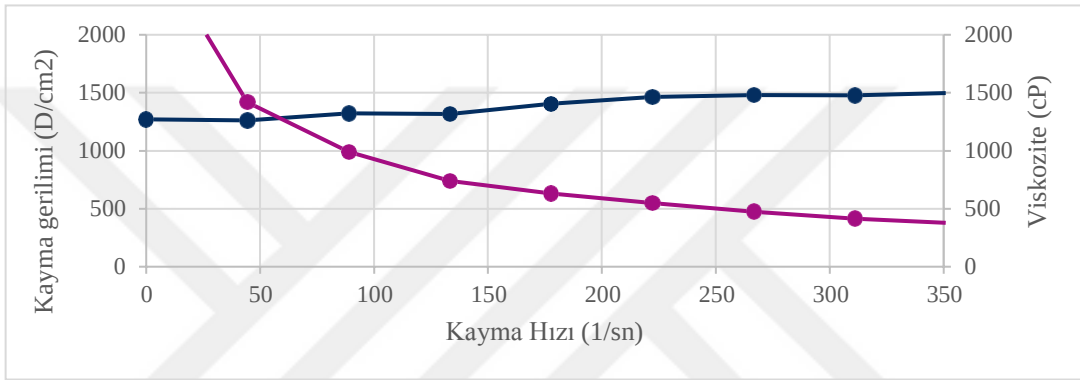
Pankreas kanalının içerisine parenteral yolla uygulanacak şekilde tasarlanan bir *in situ jelleşen sistemin* vücut sıcaklığı olan 37°C’de jel halini almış olması ve ortam pH’ına uyum sağlaması beklenmektedir. Tümöral bölgenin ekstra selüler kompartmanlarında pH değeri 6.5-7.2 aralığında olmaktadır (Schmaljohann, 2006). Hazırlanan formülasyonların tamamı 37°C’de jel halini almış olmakla beraber, yalnızca PC18 kodlu *in situ jelleşen sistemin* tümöral bölge pH’ına uyum sağlayacak pH değerine sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere PC18 tercih edilmiştir.

5.2.2.4. Reolojik davranış

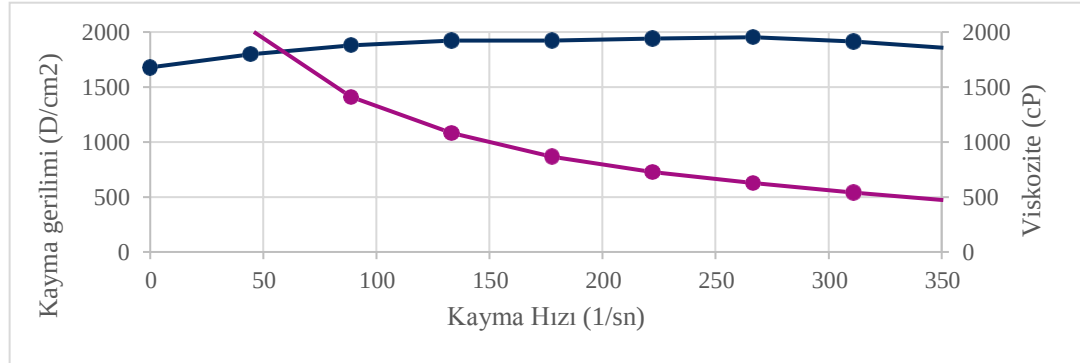
PC18 formülasyonunun 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarında kaydedilen reogramları aşağıda yer alan şekillerde gösterilmektedir.



Şekil 5.2. PC18'in 4°C'deki reogramı



Şekil 5.3. PC18'in 25°C'deki reogramı



Şekil 5.4. PC18'in 37°C'deki reogramı

HSAM4L ilavesinin jelin reolojik özellikleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla PC18 formülasyonunun reolojik davranışı, bu ilavenin öncesinde 3 farklı sıcaklıkta test edilmiştir.

5.2.3. HSAM4 içeren *in situ* jelleşen sistemin hazırlanması

1 mg/ml Meis2'i içeren jel formülasyonu hazırlamak üzere 6 mg HSAM4L tartılarak üzerine 1 ml PC18 ilave edilmiş ve vorteks yardımıyla nanopartiküllerin jel içerisinde homojen dağılması sağlanmıştır.

5.2.3.1. HSAM içeren *in situ* jelleşen sistemin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi

5.2.3.1.1. Jelleşme sıcaklığı

HSAM4L içeren PC18 formülasyonunun (H4P18) akışkan, viskoz ve jel halinde olduğu sıcaklıklar aşağıda bulunan Tablo 5.8'de gösterilmiştir.

Tablo 5.8. H4P18 formülasyonunun jelleşme sıcaklığı

Formülasyon	Sıcaklık (°C)															
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
H4P18	-	-	-	½	½	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
-: Tamamen Akışkan						½: Viskoz						1: Jel				

Test sonucuna bakıldığında, HSAM4L ilavesinin PC18'in jelleşme sıcaklığında belirgin bir değişime yol açmadığı görülmektedir.

5.2.3.1.2. pH değeri

H4P18 formülasyonunun farklı sıcaklıklarda sahip olduğu pH değerleri aşağıda yer alan Tablo 5.9'da belirtilmiştir.

Tablo 5.9. H4P18 formülasyonunun farklı sıcaklıklardaki pH değerleri

Formülasyon	
H4P18	
4°C	6.30
	6.30
	6.31
Ortalama	6.30
25°C	6.42
	6.42
	6.42
Ortalama	6.42
37°	6.52
	6.52
	6.52
Ortalama	6.52

Formülasyonun farklı sıcaklıklardaki pH değerleri incelendiğinde HSAM4L varlığının PC18'in pH'ını değiştirmedeği görülmektedir.

5.5.1.1.1. *Jelleşme kapasitesi*

H4P18'in jelleşme kapasitesi aşağıdaki Tablo 5.10'da belirtildiği gibidir.

Tablo 5.10. *H4P18'in jelleşme kapasitesi*

Formülasyon	Jelleşme Kapasitesi
H4P18	+++

In situ jelleşen sistemin uygulandığı bölgede uzun süre boyunca kalabilme yeteneği sergilemesi ilacın uygulandığı bölgenin etkin maddeye maruz kalma süresini uzatarak, tedavide avantaj sağlama potansiyeli taşımaktadır.

5.5.1.1.2. *Şişme*

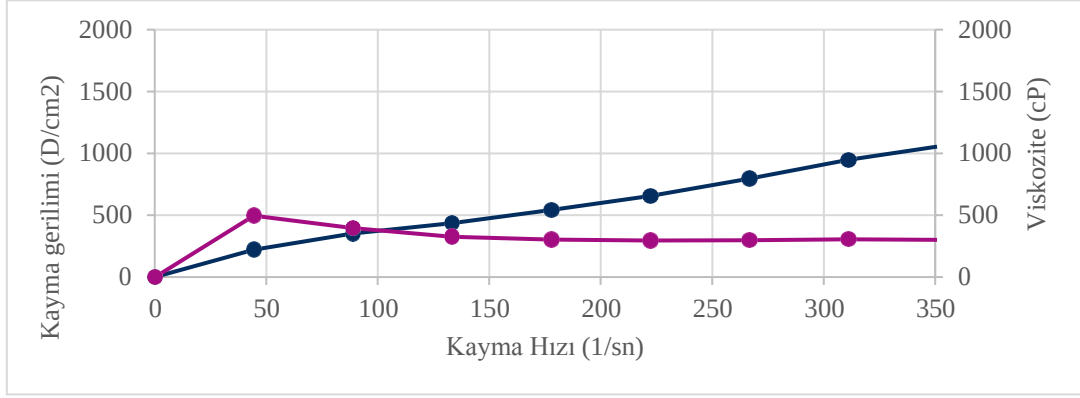
H4P18 formülasyonunun zamana göre şişme oranı aşağıda yer alan Tablo 5.11'de gösterilmektedir.

Tablo 5.11. *H4P18'in zaman göre şişme oranları*

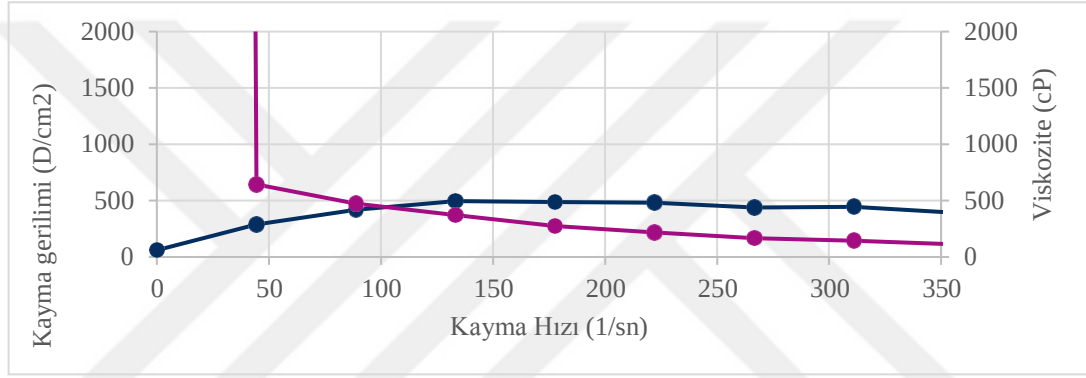
Zaman (saat)	Şişme (% (a/a), n=3)
0.5	85,3025
1	102,1463
2	134,1852
3	154,4267
4	178,8334
8	200,1064
12	226,0452
24	243,1560

5.5.1.1.3. *Reolojik davranış*

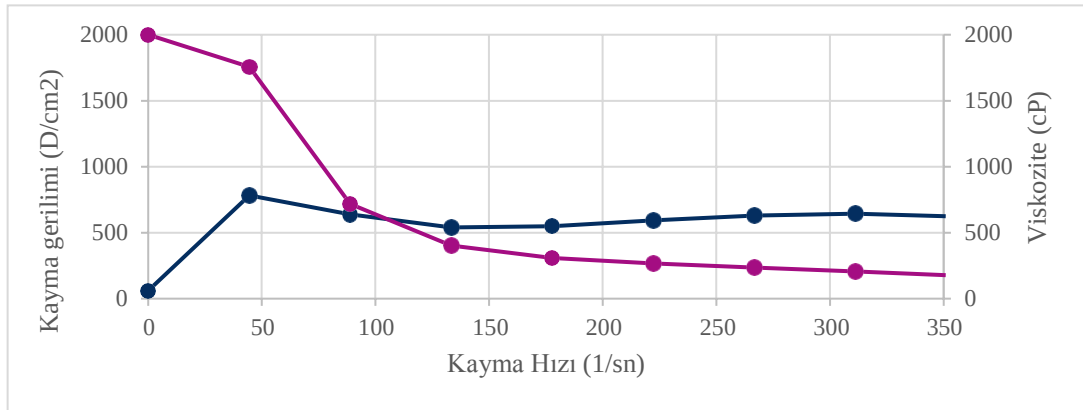
H4P18 formülasyonunun 4°C, 25°C ve 37°C sıcaklıklarındaki kayma hızına karşı değişen viskozite ve kayma gerilimi değerleri aşağıda yer alan şekillerde gösterilmektedir.



Şekil 5.5. H4P18'in 4°C'deki reogramı



Şekil 5.6. H4P18'in 25°C'deki reogramı



Şekil 5.7. H4P18'in 37°C'deki reogramı

PC18 ve H4P18 formülasyonlarının reolojik özellikleri üç farklı sıcaklıkta analiz edilmiştir. Etkin madde içermeyen PC18 formülasyonun HSAM4L ilave edildikten sonra reolojik özelliklerinde belirgin bir değişim gözlenmemiştir.

Akışkanların reolojik özellikleri, Newtonian ve Newtonian olmayan olmak üzere 2 temel akış modeli altında incelenmektedir. Artan kayma gerilimi ile kayma hızı arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu ve belirli bir sıcaklıkta viskozitesi sabit olan akışkanlar Newtonian olarak tanımlanırken; Newtonian olmayan akış modellerinde kayma gerilimi ve kayma hızı doğrusal olarak değişim göstermemektedir. Bu tip akış özelliği sergileyen akışkanların viskozitesi ise kayma gerilimine bağlı olarak değişim göstermektedir (http-1).

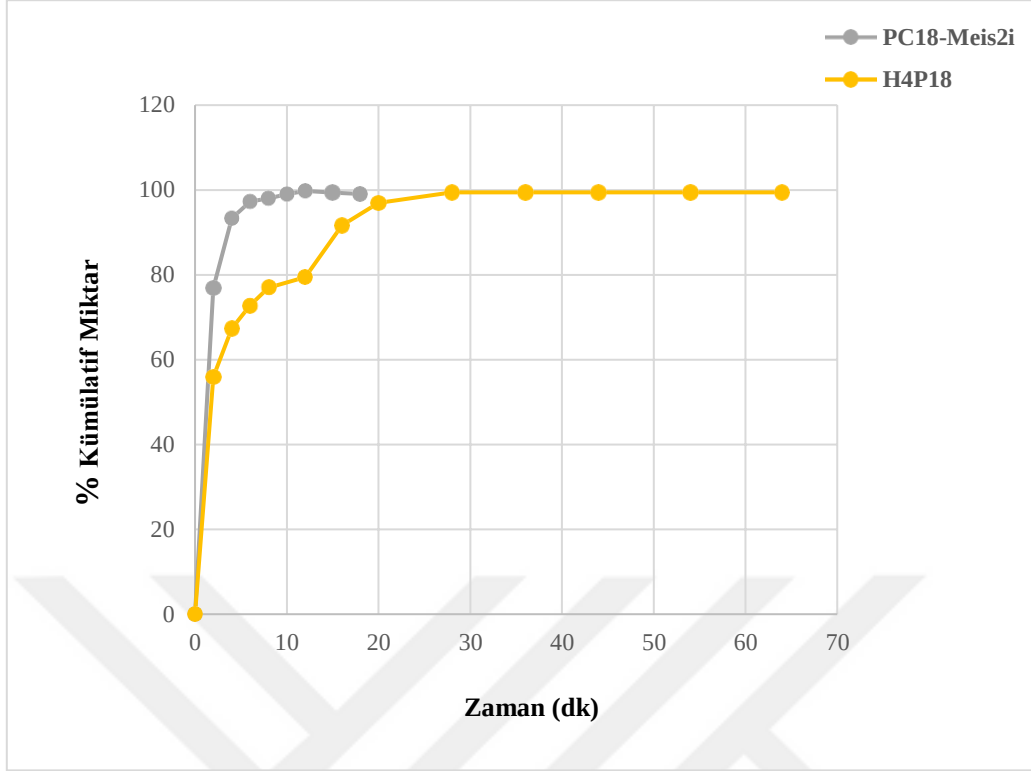
Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında hazırlanan formülasyonlar, jelleşme sıcaklığından oldukça düşük olan 4°C’de Newton akış modeline uygun bir davranış sergilerken; *in situ* jelleşen sistemlerin jelleşme sıcaklığı testinde viskoz olarak tayin edildiği 25°C’de ve sıvı-jel geçişinin gerçekleşmiş olduğu 37°C’de ise Newton-olmayan akış özelliği göstermiştir. 37°C’de jel halini almış olan formülasyonların reogramları incelendiğinde, artan kayma gerilimine karşı viskozitenin azaldığı ve kayma hızının arttığı görülmektedir. Bu durum, Newton-olmayan akış modeli altında sınıflandırılan psödoplastik akış modelinin bir göstergesidir (http-2).

5.3. Nanopartiküle Yüklenmiş Etkin Madde Miktar Tayini

Denklem 4.4 kullanılarak yükleme veriminin hesaplanması sonucunda, HSAM4 nanopartiküllerine %93 oranında Meis2i yüklendiği belirlenmiştir. Bu oran, seçilen polimer ve nanopartikül hazırlama yönteminin etkin madde için ideal olduğunu düşündürmüştür.

5.4. *In Vitro* Salım Çalışmaları

1 µg/ml Meis2i içeren PC18 ile hazırlanmış formülasyonların salım profilleri aşağıda yer alan Şekil 5.7’de ve salım profillerinin matematiksel modellere olan uyumu Tablo 5.12’de gösterilmiştir. Matematiksel modellere uyumun tespiti amacıyla DDSolver programından faydalanılmıştır.



Şekil 5.8. Meis2i'nin PC18'den *in vitro* salım profili

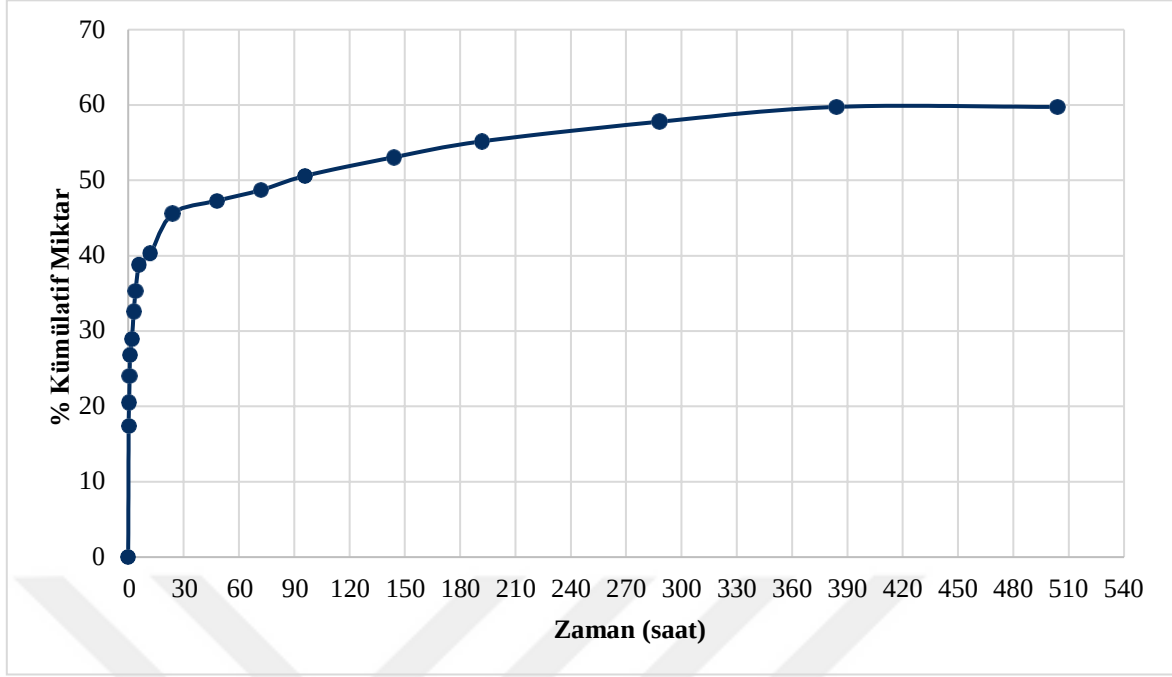
Albümin nanopartikülleri içerisinde enkapsüle halde bulunan etkin maddenin jelden salım ortamına geçen miktarının hesaplanmasında ‘**4.4. In Vitro Salım Çalışmaları**’ başlığı altında anlatılan yöntem kullanılmıştır. Meis2i'nin salım ortamına geçişi hem partiküler düzeyde hem de serbest halde gerçekleşmiştir. Partiküllerden ekstrakte edilen ve ortamda serbest halde bulunan etkin maddenin kümülatif miktarları kullanılarak H4P18'e ait salım profili elde edilmiştir. Yukarıda yer alan salım profilleri incelendiğinde, saf etkin maddenin tamamı *in situ* jelleşen sistemden 10 dakika içinde salınırken; albümin nanopartiküllerine yüklenmiş halde bulunan etkin maddenin tamamının *in situ* jelleşen sistemden salım ortamına geçişi 30 dakikada gerçekleşmiştir. Etkin maddenin nanopartikülünün hazırlanması, ilacın uygulandığı tümörlü bölgenin antikanser özellikteki Meis2i'ye maruziyetini artırma potansiyeline sahiptir.

Tablo 5.12. *In vitro* salım profillerinin matematiksel modellere uyumu

Formülasyon	Değerlendirme	Model		
		Sıfıncı Derece	Birinci Derece	Higuchi
PC18-Meis2i	r^2	-0.001	0.001	0.000
	k	0.007	0.001	0.028
	AIC	0.100	0.030	0.088
H4P18	r^2	-0.002	0.001	0.000
	k	0.002	0.000	0.017
	AIC	0.134	0.098	0.118
		Hixon-Crowell	Baker Lonsdale	Korsmeyer-Peppas
PC18-Meis2i	r^2	0.001	0.000	0.001
	k	0.000	0.000	0.078
	AIC	0.084	0.088	0.053
H4P18	r^2	0.000	0.000	0.001
	k	0.000	0.000	0.053
	AIC	0.116	0.116	0.077

Elde edilen *in vitro* salım profillerinin matematiksel modellere olan uyumunun ölçütü olarak Akaike bilgi kriteri (AIC), hız sabiti (k) ve regresyon analizinin determinasyon katsayısı (r^2) olmak üzere üç temel parametre kullanılmıştır. Bir salım profilinin en yüksek uyumu gösterdiği matematiksel model; en düşük AIC değerine, en yüksek k değerine ve 1'e en yakın olan determinasyon katsayısına sahiptir (Öztürk, 2017). DDSolver yardımıyla elde edilen bulgular incelendiğinde, her iki salım profilinin de Korsmeyer-Peppas matematiksel modeline uyumlu olduğu belirlenmiştir. Korsmeyer-Peppas modeli, etkin maddenin taşıyıcı sistemden kontrollü olarak salındığını gösteren bir matematiksel modeldir.

Meis2i'nin albümin nanopartiküllerinden salım profili, '**4.4. In Vitro Salım Çalışmaları**' başlığı altında yer alan işlemler uygulanarak elde edilmiştir. Nanopartiküller dolaşımında yaklaşık olarak 19 gün bulunan insan serum albümini kullanılarak hazırlanan formülasyonun salım çalışması 21 gün boyunca devam ettirilmiştir. HSAM4L'den salım ortamına geçen Meis2i'ye ait *in vitro* salım profili Şekil 5.8'de ve *in vitro* salım profilinin matematiksel modellere uyumu Tablo 5.13'te gösterilmektedir.



Şekil 5.9. Meis2'inin nanopartikülden in vitro salım profili

Yukarıda yer alan *in vitro* salım profili incelendiğinde, 510. saatin (21.gün) sonunda Meis2i'nin %60'ının salındığı gözlenmektedir. Etkin maddenin tamamının salım çalışması bittiğinde ortama geçmemiş olması, etkin madde ve albümin arasında hidrostatik, kovalent veya elektrostatik olmak üzere çeşitli bağların oluştuğunu düşündürmektedir.

Protein temelli terapötikler, çeşitli hastalıkların klinik tedavisine başarıyla uygulanmaktadır. Bununla birlikte, sistemik dolaşımdaki protein molekülleri, hızlı renal klirens ve karaciğer metabolizmasına karşı hassastır ve bu nedenle, kısa zaman aralıklarında tekrarlanan yüksek doz terapötik enjeksiyonları gerektiren kısa yarı ömürler sergileme eğilimindedir. Uzun süreli ilaç sirkülasyonu, hedeflenen bölgeye ulaşmak ve terapötik etkiyi uzatmak için bir ön koşuldur. Bu durum yarılanma ömrünü uzatan teknolojiler geliştirilmesine yol açmıştır. Protein temelli terapötiklerin yarı ömürlerini uzatmak amacıyla, PEGilasyon ve antikor Fc füzyonu dahil olmak üzere çeşitli stratejiler geliştirilmiştir (Cho vd., 2020; Larsen vd., 2018).

İlaç yarı ömrünü uzatmak için sıklıkla kullanılan mekanizmalardan biri, serum albüminin neonatal Fc reseptörü (FcRn) aracılı geri dönüşümüdür. FcRn, serum albümininin I ve III alanları ile etkileşerek serum albümininin dolaşım süresini uzatan bir hücre yüzeyi reseptörüdür. Serum albümini ve diğer serum proteinleri, endotel hücrelerinde endozoma endositoz edilir. Genel olarak, içselleştirilmiş serum proteinleri

endozomdan lizozoma taşınır ve hidrolize edilir. Bununla birlikte, endositozlu serum albümini, FcRn'ye bağlanır ve lizozomal bozulma olmadan hücre yüzeyine geri dönüştürülür, bu da serum albüminin insan dolaşım sisteminde tutulma süresini (yarı ömür, ~19 gün) uzatır. Ayrıca, serum albümini boyutu ve yükü nedeniyle renal filtrasyonu önler. Bu nedenle, serum albümini, granülosit koloni uyarıcı faktör, büyüme hormonu, insülin ve interferonlar dahil olmak üzere çeşitli ilaçların yarı ömürlerini genetik füzyon veya kimyasal bağlanma yoluyla uzatmak için kullanılmıştır (Cho vd., 2020).

Bu tez çalışmasında antikanser bir ajan olarak seçilen Meis2i, albümin nanopartikülleri içerisinde enkapsüle edilerek, etkin maddenin hedeflenen bölgede uzun süre boyunca terapötik aralıkta kalacak şekilde kontrollü salımının gerçekleşmesi hedeflenmiştir. 21 gün boyunca devam ettirilen salım çalışmasının sonucu incelendiğinde, etkin maddenin albümin varlığına bağlı olarak hedeflenen bölgede uzun süreli terapötik etkinlik gösterme yeteneği kazandığı gözlenmektedir. Bu sonuçların, ilerleyen dönemde gerçekleşmesi planlanan hayvan deneyleriyle desteklenmesi planlanmaktadır.

Tablo 5.13. *In vitro* salım profilinin matematiksel modellere uyumu

Formülasyon	Değerlendirme	Model		
		Sıfıncı Derece	Birinci Derece	Higuchi
HSAM4	r^2	-0.002	0.000	-0.001
	k	0.000	-0.001	0.004
	AIC	0.186	0.180	0.172
HSAM4		Hixon-Crowell	Baker Lonsdale	Korsmeyer-Peppas
	r^2	-0.002	0.000	0.001
	k	0.000	0.000	0.026
	AIC	0.182	0.172	0.099

DDSolver programı kullanılarak HSAM4'e ait salım profilinin çeşitli matematiksel modellere olan uyumu değerlendirilmiştir. Yukarıda bulunan Tablo 5.13 incelendiğinde, en yüksek k değeri, 1'e en yakın korelasyon katsayısı ve en düşük AIC değeri ile, *in vitro* salım profilinin Korsmeyer-Peppas modeline uyduğu görülmektedir. Bu durum, etkin maddenin albümin nanopartiküllerinden kontrollü bir şekilde salındığının kanıtı niteliğindedir.

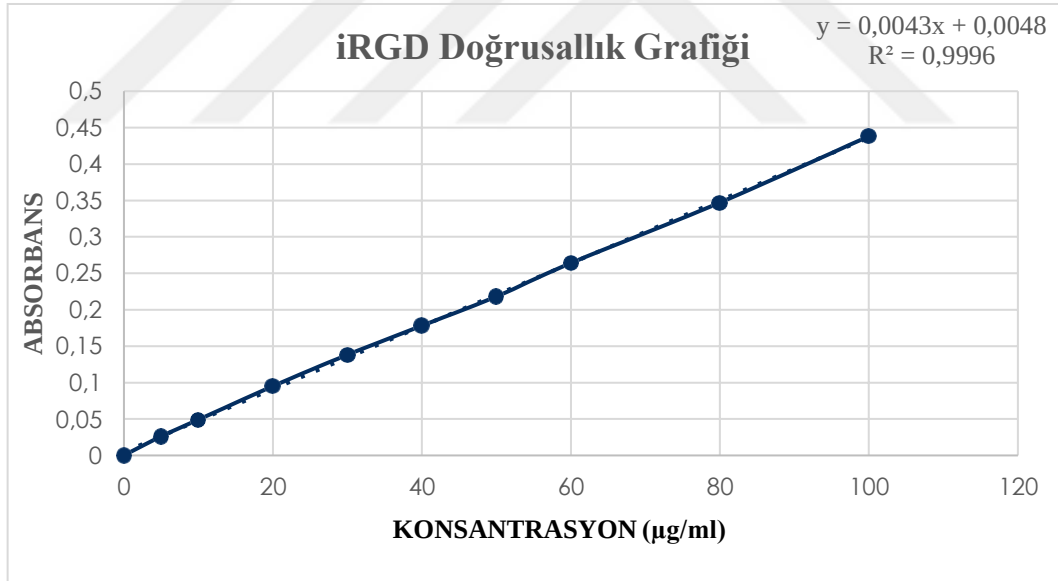
5.5. iRGD Peptidinin *In Situ* Jelleşen Sisteme Yüklenmesi ve Salım Çalışması

Kuru beyaz toz halde bulunan iRGD peptidi distile suda çözündürülerek 1 mg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde porsiyonlanarak çalışmalarda kullanılmak üzere buzdolabında -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Peptidin *in situ* jelleşen sisteme yüklenmesi amacıyla 1 mg/ml derişimine sahip peptid çözeltisi ile soğukta hazırlama yöntemi kullanılarak %18 (a/h) poloksamer-kitosan jeli hazırlanmıştır. Bu işlem sonucunda 0,1mg/ml konsantrasyonda peptid içeren *in situ* jelleşen sistem elde edilmiştir.

5.5.1. iRGD peptidine ait doğrusallık grafiğinin ve denkleminin belirlenmesi

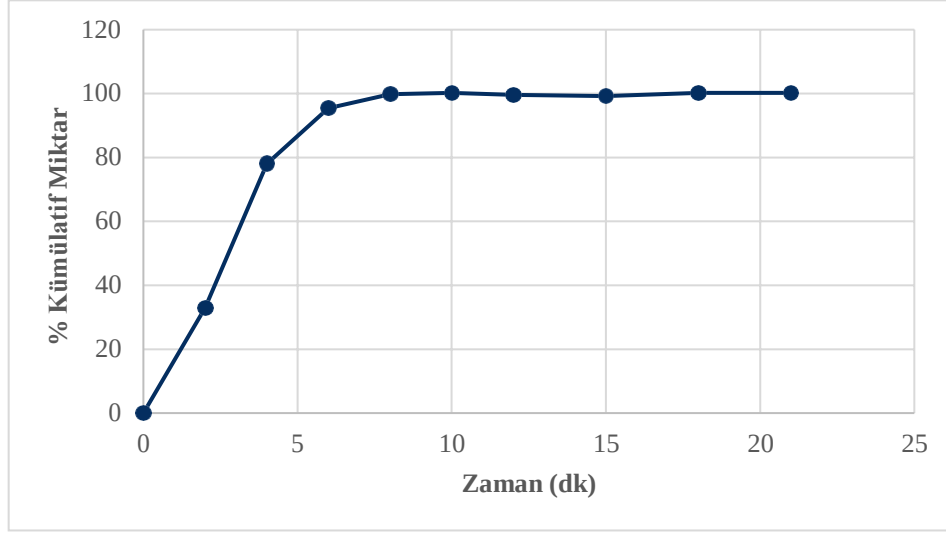
iRGD peptidinin distile su ile hazırlanan 5-100 µg/ml derişimlerindeki örneklerine karşılık gelen absorbans değerleri kullanılarak etkin maddeye ait kalibrasyon eğrisi bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisi ve eğriye ait doğru denklemi Şekil 5.10’da gösterilmektedir.



Şekil 5.10. iRGD peptidine ait doğrusallık grafiği

5.5.2. iRGD peptidinin *in situ* jelleşen sistemden *in vitro* salım çalışması

iRGD peptidine ait *in vitro* salım profili aşağıdaki Şekil 5.11’de gösterilmektedir.



Şekil 5.11. iRGD peptidine ait *in vitro* salım profili

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında, anti kanser ajan olarak seçilen Meis2i'nin pankreas kanser hücrelerine penetrasyonunun ve dolayısı ile etkinliğinin artırılması amacıyla kullanılan iRGD peptidinin *in vitro* salım ortamına 10 dakika içinde tamamının geçtiği görülmektedir. Peptidin sudaki yüksek çözünürlüğü ile ilişkilendirilen bu durum, klinik uygulamada peptidin uygulandığı pankreas kanalında kısa sürede yüksek konsantrasyonlara ulaşarak beraberinde verilen etkin maddenin kanserli hücrelere daha hızlı biçimde taşınmasını sağlayacak potansiyeldedir.

5.6. Hücre Kültürü

5.6.1. Sitotoksikite çalışması

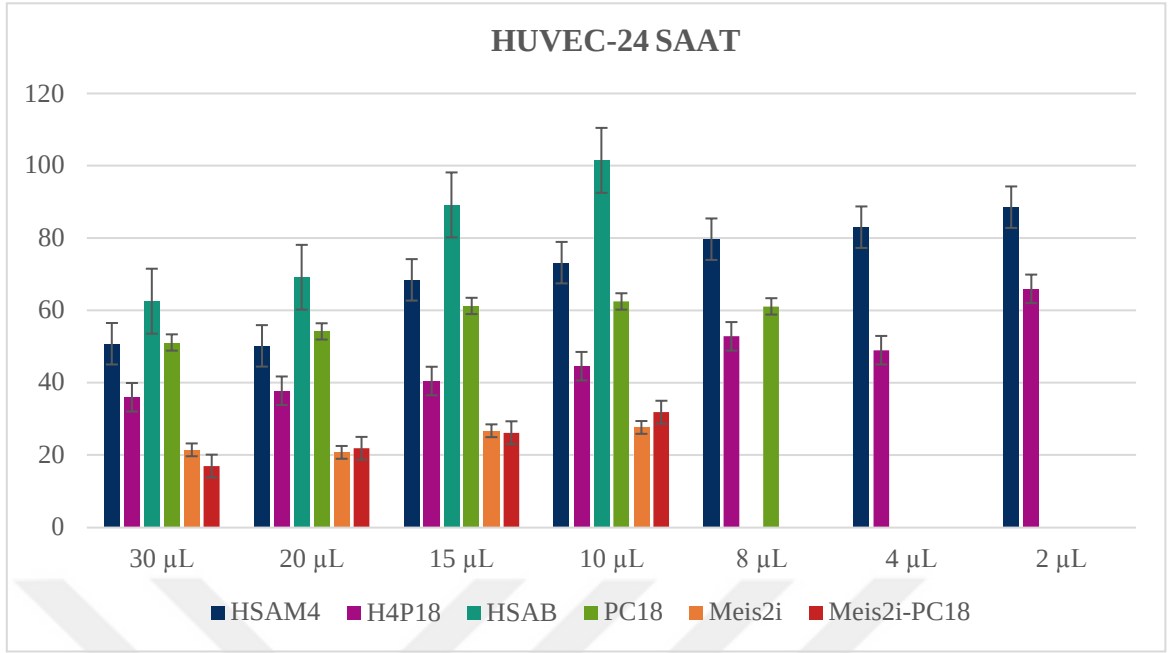
Hazırlanan formülasyonlar farklı konsantrasyonlarda sağlıklı hücrelere (HUVEC) ve kanser hücrelerine (PANC1) uygulanarak 24 ve 48 saatlik MTT çalışmaları yürütülmüştür.

HSAB, HSAM4, H4P18, PC18, Meis2i ve Meis2i-PC18'in farklı konsantrasyonlarda HUVEC hücrelerine uygulanmasıyla elde edilen MTT sonuçları aşağıda yer alan Şekil 5.12 ve Şekil 5.13'te gösterilmiştir.

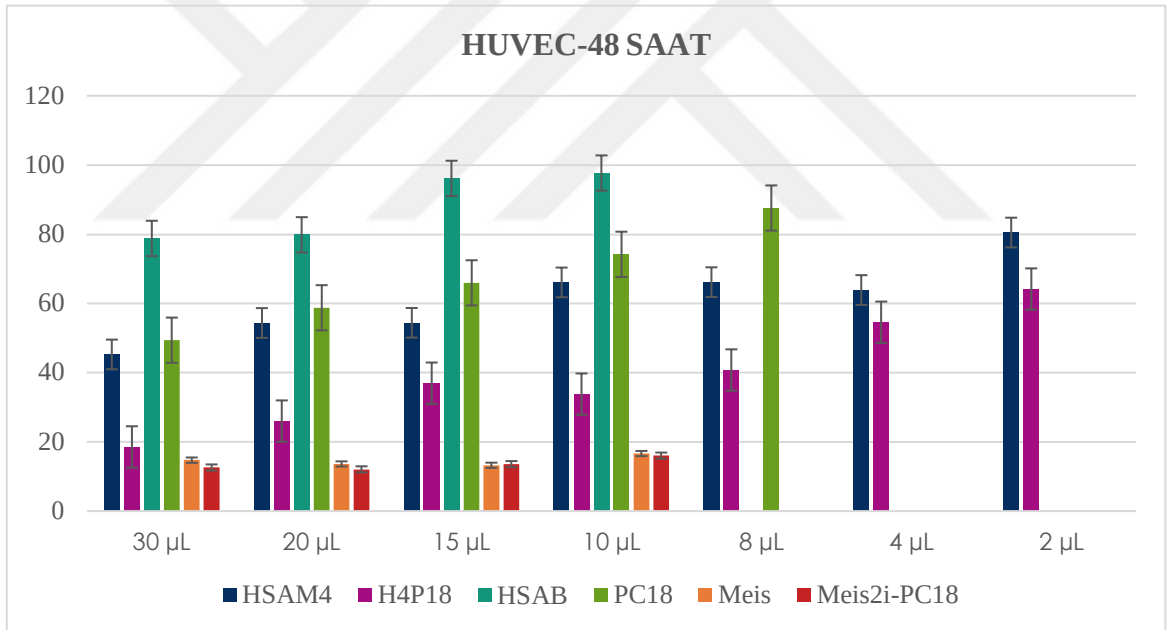
Saf etkin maddenin farklı konsantrasyonlarda sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkinliğinin değerlendirildiği MTT çalışmasının 24. saat sonuçlarına bakıldığında, antikanser özelliğe sahip Meis2i'nin en düşük konsantrasyonunda dahi hücrelerin ancak %27'sinin canlı kaldığı görülmüştür.

24. saate ait MTT sonuçları incelendiğinde tüm formülasyonlar arasında sağlıklı hücreler üzerinde en düşük sitotoksik etkinliğe sahip olan formülasyonun sadece albümin içeren HSAB olduğu görülmektedir. 10 µL HSAB uygulanan sağlıklı HUVEC hücrelerinin canlılığında bir değişim olmaması, bu konsantrasyonda albüminin sitotoksik etkinlik sergilemediğini göstermiştir. Albümin nanopartiküllerine Meis2i yüklenmesiyle elde edilen HSAM4 formülasyonunun 24. saat % canlılık değerleri incelendiğinde, etkin maddenin varlığına bağlı olarak albümin nanopartikülleri, en yüksek konsantrasyonda sağlıklı hücrelerin yaklaşık olarak %50'sini öldürmüştür. Azalan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığının arttığı ve en düşük konsantrasyonda hücrelerin %80'inin yaşadığı belirlenmiştir. Saf halde 10 µL hacimde hücrelere uygulandığında hücre canlılığının %27 olduğu Meis2i'nin albümin nanopartikülleri içerisinde enkapsüle edildiği HSAM4 formülasyonun ise aynı konsantrasyonda etkin maddenin sitotoksik özelliklerini maskeleyerek hücre canlılığını %73'e kadar arttırdığı görülmektedir. HSAM4'ün hücrelere 2 µL olarak uygulandığı minimum derişiminde ise hücre canlılığı %88 seviyesine kadar yükselmiştir. Yüksek sitotoksik etkinlik sergileyen Meis2i'nin albümin nanopartiküllerine yüklenmesi, sağlıklı hücrelerin canlılığının artmasında büyük bir başarı elde edilmesini sağlamıştır.

Bu tez çalışmasında, pankreas kanalına uygulanmak üzere tasarlanmış ve sitotoksikite derecesi en fazla önem arz eden ana formülasyon HSAM4'ün PC18 içerisinde dağıtıldığı H4P18 kodlu formülasyondur. Ana formülasyonun hücre canlılığı üzerinde etkileri incelendiğinde, 2 µL HSAM4 ile %88 olan hücre canlılığının aynı konsantrasyonda HSAM4'ün PC18 içerisinde dağıtılmasıyla %65'e düştüğü tespit edilmiştir. Hücre canlılığındaki bu belirgin azalış, PC18'in varlığıyla açıklanmıştır. Poloksamer ve kitosan temelli bir *in situ* jelleşen sistem olan PC18 5 farklı derişimde HUVEC sağlıklı hücrelerine uygulanmıştır. PC18'in uygulandığı en yüksek konsantrasyonda hücrelerin yarısını öldürdüğü gözlenmiştir. Bu jel formülasyonunun en düşük derişiminde ise hücre canlılığı ancak %61 seviyesine çıkabilmiştir. Bu durum *in situ* jelleşen sistemin düşük pH değeri ilişkilendirilmiş ve kullanılan polimerlerin sitotoksik etkinlik gösterdiğini düşündürmüştür.



Şekil 5.12. Huvec-24. saat % canlılık grafiği

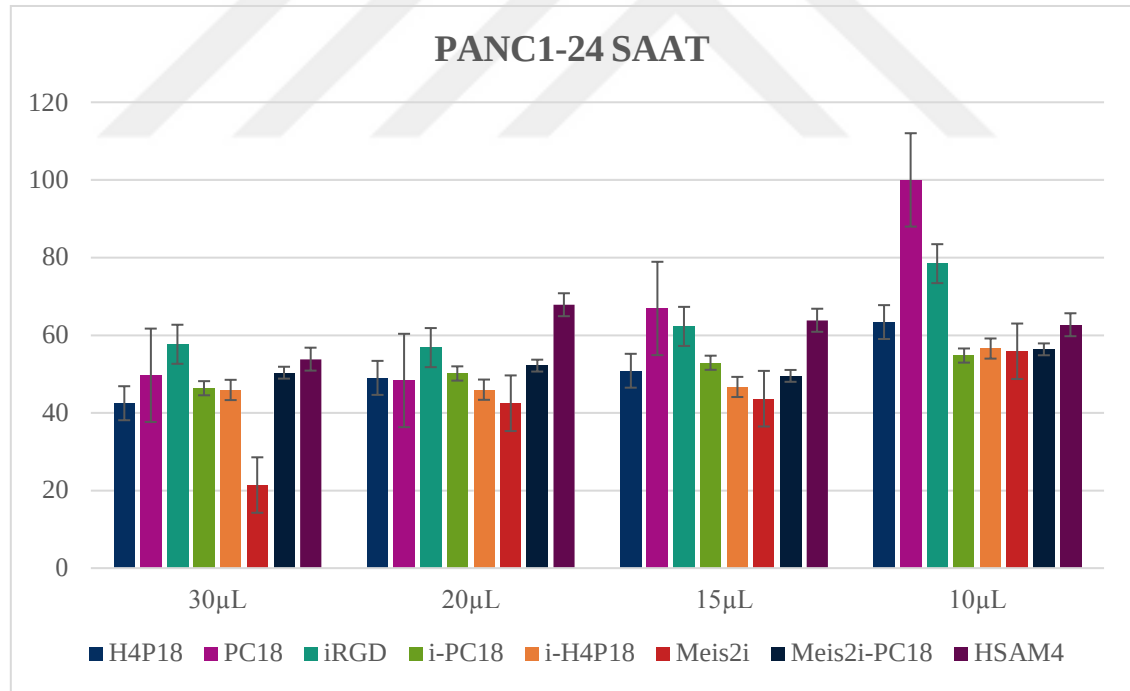


Şekil 5.13. Huvec-48. saat % canlılık grafiği

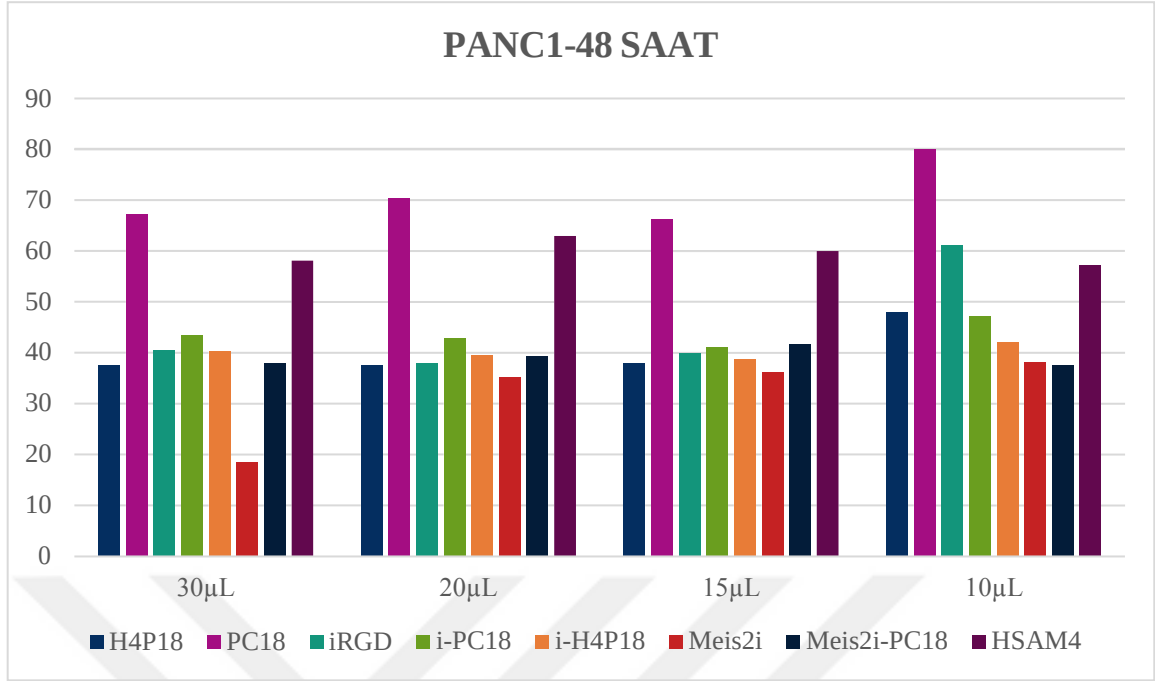
HSAB formülasyonuna ait 48. saat MTT çalışması sonuçlarına bakıldığında, albümin nanopartiküllerinin 24. saat sitotoksosite sonuçlarında belirgin bir düşüş yaşanmamış olup, HUVEC hücreleri büyük oranda canlılığını korumuştur. Hücrelere 10 µL miktarda uygulanmış olan HSAB formülasyonu ile hücrelerin 2. günün sonunda da yaklaşık olarak tamamının (%97) canlı olduğu gözlenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında PDAC hastalarında kullanılmak üzere tasarlanmış olan H4P18'in 48. saat sitotoksosite çalışma sonuçları incelendiğinde, hücrelerin 24. saatteki konsanrasyon-% canlılık ilişkisini 48.saatte de koruduğu görülmektedir. Bu durum, etkin maddenin albümin nanopartiküllerinden yavaş ve kontrollü salımı ile ilişkilendirilmiştir. Diğer bir yandan, uzun süre boyunca doğrudan saf Meis2i'ye maruz bırakılan sağlıklı hücrelerin canlılığı ise en düşük Meis2i konsantrasyonunda dahi %16 seviyesinde olmuştur.

iRGD peptidinin kanserli hücreleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi amacıyla sağlıklı hücrelere uygulanan formülasyonlara ek olarak; iRGD peptidinin sudaki çözeltisi (iRGD), PC18 içinde dağıtıldığı formülasyonlar (i-PC18) ve H4P18'e farklı oranlarda ilave edildiği formülasyonlar (i-H4P18), PANC1 hücrelerine uygulanmış ve elde edilen 24. ve 48. saat MTT sonuçları aşağıda yer alan Şekil 5.14 ve Şekil 5.15'te gösterilmiştir.



Şekil 5.14. PANC1-24. saat % canlılık grafiği



Şekil 5.15. PANC1-48. saat % canlılık grafiği

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında stromal bariyer ile karakterize olan pankreas kanser hücrelerine ilaç hedeflendirme çalışması yürütülmüştür. Bu doğrultuda hazırlanan çeşitli formülasyonlar arasında, kanserli hücreler üzerindeki başarısı ilerleyen dönemler için planlanan çalışmalar için belirleyici olan son formülasyon i-H4P18'dir.

Meis2i yüklü albümin nanopartiküllerini taşıyan *in situ* jelleşen sistem içerisinde iRGD peptidinin farklı oranlarda dağıtılmasıyla elde edilen i-H4P18 formülasyonunun 24. saat MTT sonuçları incelendiğinde, PANC1 hücrelerine 15 µL uygulanan i-H4P18'ün kanserli hücrelerin %50'sini öldürdüğü görülmektedir. Aynı konsantrasyonda H4P18 uygulanması ile PANC1 hücrelerinin daha yüksek bir canlılık oranı sergilemiş olması, peptidin anti kanser aktiviteyi arttırmış olabileceğini düşündürmektedir. iRGD peptidinin formülasyon içinde kullanıldığı konsantrasyonlarda tek başına kanserli hücrelere uygulandığı 24. ve 48 saat sonuçları incelendiğinde sitotoksik etkinlik göstermiş olması da bu durumu kanıtlar niteliktedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar sonucunda, MEİS inhibitörü olan yeni bir molekülün UPLC ile oldukça hassas bir şekilde tayin edilmesini sağlayacak yeni bir yöntemin geliştirildiği, antikanser özelliğe sahip bu etkin maddenin albümin nanopartiküllerine yüksek oranda yüklenebildiği, yüklü partiküllerin partikül boyutu ve dağılımlarının hücresel alım için uygun olduğu, yüzey yüklerinin süspansiyonun kararlılığı için uygun değerlerde olduğu, uzun süreli salım yapılabildiği ve sağlıklı hücrelere kıyasla kanser hücrelerine daha toksik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bu süspansiyonların *in situ* jelleşen sistem içerisinde de stabil kalabildiği ve jelleşmenin vücut sıcaklığında gerçekleşebildiği, salım profili açısından değerlendirildiğinde ise partiküllerin etkin maddeyi ortama uzun bir süre boyunca kontrollü olarak salabileceği sonucuna varılmıştır. *In situ* jelleşen sistemin reolojik özelliği ise formülasyonun enjekte edilebilecek akış özelliği sergilediğini ortaya koymaktadır.

Yapılan bu tez çalışması, yeni bir molekülün ilaç taşıyıcı sistem içerisinde formüle edilebileceğini göstermiştir. Bundan sonraki dönemde bu sistemlerin kanserleştirilmiş hayvan modelleri üzerinde etkinliklerini belirlemek amacıyla *in vivo* testler yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- Ahmadi, F., Oveisi, Z., Samani, S. M., and Amoozgar, Z. (2015). Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 1-11.
- Asa, S. A. (2017). Immunohistochemical Expression of MCAM/CD146 in Canine Melanoma. *Journal of Comparative Pathology*, 157(1), 27-33.
- Bhushan, B., Khanadeev, V., Khlebtsov, B., Khlebtsov, N., Gopinath, P. (2017). Impact of albumin based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery. *Advances in Colloid and Interface Science*, 246, 13-39.
- Bose, S., Sharma, P., Mishra, V., Patial, S., Saraogi, G. K., Tambuwala, M. M., Dua, K. (2021). Comparative in vitro evaluation of glimepiride containing nanosuspension drug delivery system developed by different techniques. *Journal of Molecular Structure*, 1231, 129927.
- Bronze-Uhle, E. S., Costa, B. C., Ximenes, V. F., & Lisboa-Filho, P. N. (2017). Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid. *Nanotechnology, Science and Applications*, 10, 11.
- Carrier, E., Picozzi, V., Pishvaian, M. J., Mody, K., Winter, J., Glaspy, J., Larson, T., Conway, W.C., Lipson, K., Porter, S., Kouchakji, E. (2017). 1734PD Anti-CTGF human recombinant monoclonal antibody pamrevlumab increases resectability and resection rate when combined with gemcitabine/Nab-paclitaxel in the treatment of locally advanced pancreatic cancer patients. *Annals of Oncology*, 28.
- Charrier, A. and Brigstock, D. R. (2013). Regulation of pancreatic function by connective tissue growth factor (CTGF, CCN2). *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 24(1), 59-68.
- Cheng, Y., & Ji, Y. (2018). RGD-modified polymer and liposome nanovehicles: Recent research progress for drug delivery in cancer therapeutics. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 128, 8-17.

- Chlenski, A. and Cohn, S. L. (2010). Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. *In Seminars In Cell & Developmental Biology*, 21(1), 55-65.
- Cho, S. Y., Han, J., Cha, S. H., & Yoon, S. I. (2020). Structural basis of serum albumin recognition by SL335, an antibody Fab extending the serum half-life of protein therapeutics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526(4), 941-946.
- Cho, H. J., Park, S. J., Lee, Y. S., & Kim, S. (2019). Theranostic iRGD peptide containing cisplatin prodrug: Dual-cargo tumor penetration for improved imaging and therapy. *Journal of Controlled Release*, 300, 73-80.
- Cortes, J. E., Gutzmer, R., Kieran, M. W., Solomon, J. A. (2019). Hedgehog signaling inhibitors in solid and hematological cancers. *Cancer Treatment Reviews*, 76, 41-50.
- Crijns, A. P. G., de Graeff, P., Geerts, D., Ten Hoor, K. A., Hollema, H., Van der Sluis, T., Hofstra, R.M.W., de Bock, G.H., de Jong, S.H., van der Zee, A.G.J., de Vries, E. G. E. (2007). MEIS and PBX homeobox proteins in ovarian cancer. *European Journal of Cancer*, 43(17), 2495-2505.
- Danhier, F., Feron, O., & Préat, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 148(2), 135-146.
- da Silva Neto, G. F., de Andrade Rodrigues, M. L., Fonseca, A. (2021). A new quantitative gel electrophoresis method with image-based detection for the determination of food dyes and metallic ions. *Talanta*, 221, 121602.
- Djekic, L., Čalijs, B., Medarević, Đ. (2020). Gelation behavior, drug solubilization capacity and release kinetics of poloxamer 407 aqueous solutions: The combined effect of copolymer, cosolvent and hydrophobic drug. *Journal of Molecular Liquids*, 303, 112639.
- Döppler, H., Liou, G. Y., & Storz, P. (2013). Downregulation of TRAF2 mediates NIK-induced pancreatic cancer cell proliferation and tumorigenicity. *PLOS One*, 8(1), e53676.

- Gao, J., Xu, Y., Zheng, Y., Wang, X., Li, S., Yan, G., Wang, J., Tang, R. (2019). pH-sensitive carboxymethyl chitosan hydrogels via acid-labile ortho ester linkage as an implantable drug delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 225, 115237.
- Geerts, D., Schilderink, N., Jorritsma, G., & Versteeg, R. (2003). The role of the MEIS homeobox genes in neuroblastoma. *Cancer Letters*, 197(1-2), 87-92.
- Ghirga, F., Mori, M., and Infante, P. (2018). Current trends in Hedgehog signaling pathway inhibition by small molecules. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(19), 3131-3140.
- Gourd, E. (2018). PEGPH20 for metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *The Lancet Oncology*, 19(2), e81.
- Gratieri, T., Gelfuso, G. M., Rocha, E. M., Sarmiento, V. H., de Freitas, O., Lopez, R. F. V. (2010). A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(2), 186-193.
- Güven, U.M. (2016). Antihistaminik Etkili Oftalmik Kontrollü Salım Gösteren Farklı Sistemler Üzerinde Çalışmalar. Yayımlanmamış Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- He, C., Zhang, L., Liu, W., Huang, Y., Hu, P., Dai, T., Xu, J., Chen, Z. (2021). Albumin-based nanoparticles combined with photodynamic therapy enhance the antitumor activity of curcumin derivative C086. *Dyes and Pigments*, 189, 109258.
- He, Q., Chen, J., Yan, J., Cai, S., Xiong, H., Liu, Y., Peng, D., Liu, Z., Mo, M. (2019). Tumor microenvironment responsive drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, In press.
- Hossieni-Aghdam, S. J., Foroughi-Nia, B., Zare-Akbari, Z., Mojarad-Jabali, S., & Farhadnejad, H. (2018). Facile fabrication and characterization of a novel oral pH-sensitive drug delivery system based on CMC hydrogel and HNT-AT nanohybrid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2436-2449.

- Hyun, H., Park, J., Willis, K., Park, J. E., Lyle, L. T., Lee, W., & Yeo, Y. (2018). Surface modification of polymer nanoparticles with native albumin for enhancing drug delivery to solid tumors. *Biomaterials*, 180, 206-224.
- Ishikawa, T., Wondimu, Z., Oikawa, Y., Gentilcore, G., Kiessling, R., Brage, S. E., Hansson, J., Patarroyo, M. (2014). Laminins 411 and 421 differentially promote tumor cell migration via $\alpha 6\beta 1$ integrin and MCAM (CD146). *Matrix Biology*, 38, 69-83.
- Ji, T., Li, S., Zhang, Y., Lang, J., Ding, Y., Zhao, X., Rhao, Z., Li Y., Shi, J., Hao, J., Zhao, Y. Nie, G. (2016). An MMP-2 responsive liposome integrating antifibrosis and chemotherapeutic drugs for enhanced drug perfusion and efficacy in pancreatic cancer. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(5), 3438-3445.
- Koltai, T. (2016). Cancer: fundamentals behind pH targeting and the double-edged approach. *OncoTargets and Therapy*, 9, 6343.
- Kota, J., Hancock, J., Kwon, J., Korc, M. (2017). Pancreatic cancer: Stroma and its current and emerging targeted therapies. *Cancer Letters*, 391, 38-49.
- Kouchakzadeh, H., Safavi, M. S., & Shojaosadati, S. A. (2015). Efficient delivery of therapeutic agents by using targeted albumin nanoparticles. *Advances In Protein Chemistry and Structural Biology*, 98, 121-143.
- Kozlovskaya, V., Alexander, J. F., Wang, Y., Kunczewicz, T., Liu, X., Godin, B., & Kharlampieva, E. (2014). Internalization of red blood cell-mimicking hydrogel capsules with pH-triggered shape responses. *ACS Nano*, 8(6), 5725-5737.
- Kozono, S., Ohuchida, K., Eguchi, D., Ikenaga, N., Fujiwara, K., Cui, L., Mizumoto, K., Tanaka, M. (2013). Pirfenidone inhibits pancreatic cancer desmoplasia by regulating stellate cells. *Cancer Research*, 73(7), 2345-2356.
- Kudo, Y., Sato, N., Adachi, Y., Amaike, T., Koga, A., Kohi, S., Noguchi, H., Nakayama, T., Hirata, K. (2020). Overexpression of transmembrane protein 2 (TMEM2), a novel hyaluronidase, predicts poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology*, 20(7), 1479-1485.

- Kumar, M., & Melton, D. (2003). Pancreas specification: a budding question. *Current Opinion In Genetics & Development*, 13(4), 401-407.
- Larsen, M. T., Rawsthorne, H., Schelde, K. K., Dagnæs-Hansen, F., Cameron, J., Howard, K. A. (2018). Cellular recycling-driven in vivo half-life extension using recombinant albumin fusions tuned for neonatal Fc receptor (FcRn) engagement. *Journal of Controlled Release*, 287, 132-141.
- Larson, B. K., Guan, M., Placencio, V., Tuli, R., Hendifar, A. E. (2019). Stromal hyaluronan accumulation is associated with low tumor grade and nodal metastases in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Human Pathology*, 90, 37-44.
- Liu, L., Gao, Q., Lu, X., Zhou, H. (2016). In situ forming hydrogels based on chitosan for drug delivery and tissue regeneration. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(6), 673-683.
- Liu, L., Tang, X., Wang, Y., Guo, S. (2011). Smart gelation of chitosan solution in the presence of NaHCO₃ for injectable drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 414(1-2), 6-15.
- Lunardi, S., Muschel, R. J. and Brunner, T. B. (2014). The stromal compartments in pancreatic cancer: are there any therapeutic targets? *Cancer Letters*, 343(2), 147-155.
- Masamune, A. and Shimosegawa, T. (2013). Pancreatic stellate cells—multi-functional cells in the pancreas. *Pancreatology*, 13(2), 102-105.
- Masamune, A., Hamada, S., Kikuta, K., Takikawa, T., Miura, S., Nakano, E., Shimosegawa, T. (2013). The angiotensin II type I receptor blocker olmesartan inhibits the growth of pancreatic cancer by targeting stellate cell activities in mice. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 48(5), 602-609.
- Masoodi, K. Z., Lone, S. M., & Rasool, R. S. (2020). *Advanced Methods in Molecular Biology and Biotechnology: A Practical Lab Manual*. Academic Press.
- Maubach, G., Feige, M. H., Lim, M. C., & Naumann, M. (2019). NF-kappaB-inducing kinase in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1871(1), 40-49.

- McGuckin, E., Cade, J. E., & Hanison, J. (2020). The pancreas. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*.
- Meng, H. and Nel, A. E. (2018). Use of nano engineered approaches to overcome the stromal barrier in pancreatic cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 130, 50-57.
- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cros, J., Faivre, S., Hammel, P., Raymond, E. (2013). Stromal expression of SPARC in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer and Metastasis Reviews*, 32(3-4), 585-602.
- Nga, N. T. H., Ngoc, T. T. B., Trinh, N. T. M., Thuoc, T. L., Thao, D. T. P. (2020). Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. *Analytical Biochemistry*, 610, 113937.
- Niyaz, M., Khan, M. S., Hussain, M. U., Wani, R. A., Shah, O. J., & Mudassar, S. (2018). Expression Undercurrents of Sonic Hedgehog in Colorectal and Pancreatic Cancers. *Gene Reports*, 12, 310-316.
- Noorani, M., Azarpira, N., Karimian, K., Heli, H. (2017). Erlotinib-loaded albumin nanoparticles: a novel injectable form of erlotinib and its in vivo efficacy against pancreatic adenocarcinoma ASPC-1 and PANC-1 cell lines. *International Journal of Pharmaceutics*, 531(1), 299-305.
- Öztürk, A.A. (2017). Deksketoprofen Yüklü Kontrollü Salım Gösteren Nanonoboyutta İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve *İn Vitro/İn Vivo* Değerlendirilmesi. Yayınlanmamış Doktora Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Pak, E. and Segal, R. A. (2016). Hedgehog signal transduction: key players, oncogenic drivers, and cancer therapy. *Developmental cell*, 38(4), 333-344.
- Panchal, K., Sahoo, R. K., Gupta, U., & Chaurasiya, A. (2021). Role of targeted immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) treatment: An overview. *International Immunopharmacology*, 95, 107508.
- Perini, M. V., Dmello, R. S., Nero, T. L., Chand, A. L. (2020). Evaluating the benefits of renin-angiotensin system inhibitors as cancer treatments. *Pharmacology & Therapeutics*, 107527.

- Pita-López, M. L., Fletes-Vargas, G., Espinosa-Andrews, H., Rodríguez-Rodríguez, R. (2021). Physically cross-linked chitosan-based hydrogels for tissue engineering applications: A state-of-the-art review. *European Polymer Journal*, 145, 110176.
- Prosen, L., Markelc, B., Dolinsek, T., Music, B., Cemazar, M., Sersa, G. (2014). Mcam silencing with RNA interference using magnetofection has antitumor effect in murine melanoma. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 3, 205.
- Qu, J., Zhao, X., Ma, P. X., & Guo, B. (2017). pH-responsive self-healing injectable hydrogel based on N-carboxyethyl chitosan for hepatocellular carcinoma therapy. *Acta Biomaterialia*, 58, 168-180.
- Ramakrishnan, P., Loh, W. M., Gopinath, S. C., Bonam, S. R., Fareez, I. M., Mac Guad, R., Sim, M.S., Wu, Y. S. (2020). Selective phytochemicals targeting pancreatic stellate cells as new anti-fibrotic agents for chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(3), 399-413.
- Ray, P., Confeld, M., Borowicz, P., Wang, T., Mallik, S., Quadir, M. (2019). PEG-b-poly (carbonate)-derived nanocarrier platform with pH-responsive properties for pancreatic cancer combination therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 126-135.
- Rosow, D. E., Liss, A. S., Strobel, O., Fritz, S., Bausch, D., Valsangkar, N. P., Alsina, J., Kulemann, B., Park, J. K., Yamaguchi, J., LaFemina, J. (2012). Sonic Hedgehog in pancreatic cancer: from bench to bedside, then back to the bench. *Surgery*, 152(3), 19-32.
- Schmaljohann, D. (2006). Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(15), 1655-1670.
- Shen, Y. W., Zhou, Y. D., Luan, X., & Zhang, W. D. (2020). Blocking CTGF-Mediated Tumor–Stroma Interplay in Pancreatic Cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 26(12), 1064-1067.
- Siddiqui, S., Ameen, F., ur Rehman, S., Sarwar, T., & Tabish, M. (2021). Studying the interaction of drug/ligand with serum albumin. *Journal of Molecular Liquids*, 116200.

- Simón-Gracia, L., Hunt, H., Scodeller, P., Gaitzsch, J., Kotamraju, V. R., Sugahara, K. N., Tammik, O., Ruoslahti, E., Battaglia G., Teesalu, T. (2016). iRGD peptide conjugation potentiates intraperitoneal tumor delivery of paclitaxel with polymersomes. *Biomaterials*, 104, 247-257.
- Singh, N. K. and Lee, D. S. (2014). In situ gelling pH-and temperature-sensitive biodegradable block copolymer hydrogels for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 193, 214-227.
- Sozer, S. C., Egesoy, T. O., Basol, M., Cakan-Akdogan, G., Akdogan, Y. (2020). A simple desolvation method for production of cationic albumin nanoparticles with improved drug loading and cell uptake. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 101931.
- Srividya, B., Cardoza, R.M. and Amin, P.D. (2001). Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system. *Journal of Controlled Release*, 73 (2-3), 205-211.
- Sugahara, K. N., Teesalu, T., Karmali, P. P., Kotamraju, V. R., Agemy, L., Greenwald, D. R., Ruoslahti, E. (2010). Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science*, 328(5981), 1031-1035.
- Takikawa, T., Masamune, A., Hamada, S., Nakano, E., Yoshida, N., Shimosegawa, T. (2013). miR-210 regulates the interaction between pancreatic cancer cells and stellate cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(3), 433-439.
- Tao, X., Xiang, H., Pan, Y., Shang, D., Guo, J., Gao, G., & Xiao, G. G. (2021). Pancreatitis initiated pancreatic ductal adenocarcinoma: pathophysiology explaining clinical evidence. *Pharmacological Research*, 105595.
- Tarhini, M., Pizzoccaro, A., Benlyamani, I., Rebaud, C., Greige-Gerges, H., Fessi, H., ... & Bentaher, A. (2020). Human serum albumin nanoparticles as nanovector carriers for proteins: Application to the antibacterial proteins “neutrophil elastase” and “secretory leukocyte protease inhibitor”. *International Journal of Pharmaceutics*, 579, 119150.

- Tesfaye, A. A., Azmi, A. S. and Philip, P. A. (2019). miRNA and gene expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*, 189(1), 58-70.
- Ur-Rehman, T., Tavelin, S. and Gröbner, G. (2011). Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics*, 409(1-2), 19-29.
- Von Burstin, J., Bachhuber, F., Paul, M., Schmid, R. M., Rustgi, A. K. (2017). The TALE homeodomain transcription factor MEIS1 activates the pro- metastatic melanoma cell adhesion molecule Mcam to promote migration of pancreatic cancer cells. *Molecular Carcinogenesis*, 56(3), 936-944.
- Wang, K., Xu, X., Liu, T., Fu, S., Guo, G., Gu, Y., Luo, F., Zhao, X., Wei, Y., Qian, Z. (2010). Synthesis and characterization of biodegradable pH-sensitive hydrogel based on poly (ϵ -caprolactone), methacrylic acid, and Pluronic (L35). *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 755-761.
- Winer, L. K., Dhar, V. K., Wima, K., Morris, M. C., Lee, T. C., Shah, S. A., Ahmad, S.A., Patel, S. H. (2019). The Impact of Tumor Location on Resection and Survival for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Journal of Surgical Research*, 239, 60-66.
- Yamasaki, K., Chuang, V. T. G., Maruyama, T., & Otagiri, M. (2013). Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(12), 5435-5443.
- Youshia, J., Ali, M.E. ve Lamprecht, A. (2017). Artificial neural network based particle size prediction of polymeric nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 119, 333-342.
- Yu, X. Z., Guo, Z. Y., Di, Y., Yang, F., Ouyang, Q., Fu, D. L., Jin, C. (2017). The relationship between SPARC expression in primary tumor and metastatic lymph node of resected pancreatic cancer patients and patients' survival. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 16(1), 104-109.
- 1.1.1. Zeeshan, F., Madheswaran, T., Panneerselvam, J., Taliyan, R., Kesharwani, P. (2021). Human serum albumin as multifunctional nanocarrier for cancer therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, In press.

- Zeng, Y., Chen, J., Li, Y., Huang, J., Huang, Z., Huang, Y., Pan, X., Wu, C. (2018). Thermo-sensitive gel in glaucoma therapy for enhanced bioavailability: in vitro characterization, in vivo pharmacokinetics and pharmacodynamics study. *Life sciences*, 212, 80-86.
- Zhang, T., Chen, S., Dou, H., Liu, Q., Shu, G., Lin, J., Zhang, W., Peng, G., Zhong, Z., Fu, H. (2021). Novel glucosamine-loaded thermosensitive hydrogels based on poloxamers for osteoarthritis therapy by intra-articular injection. *Materials Science and Engineering: C*, 118, 111352.
- Zhang, X., Rowan, S., Yue, Y., Heaney, S., Pan, Y., Brendolan, A., Selleri, L., Maas, R. L. (2006). Pax6 is regulated by Meis and Pbx homeoproteins during pancreatic development. *Developmental Biology*, 300(2), 748-757.
- Zhao, J., Wang, H., Hsiao, C. H., Chow, D. S. L., Koay, E. J., Kang, Y., Wen, X., Huang, Q., Ma, Y., Bankson, J. A., Ullrich, S. E., Overwijk, W., Maitra, A., Piwnicka-Worms, D., Fleming, J. B., Li, C. (2018). Simultaneous inhibition of hedgehog signaling and tumor proliferation remodels stroma and enhances pancreatic cancer therapy. *Biomaterials*, 159, 215-228.
- Zirak, M. B., & Pezeshki, A. (2015). Effect of surfactant concentration on the particle size, stability and potential zeta of beta carotene nano lipid carrier. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 4(9), 924-32.
- <http1:https://depo.btu.edu.tr/dosyalar/kimyamuh/Dosyalar/5.NEWTONIAN%20VE%20NEWTONIAN%20OLMAYAN%20AKI%C5%9EKANLARIN%20V%C4%B0SKOZ%C4%B0TES%C4%B0N%C4%B0N%20BEL%C4%B0RLENMES%C4%B0.pdf> (Erişim tarihi: 19.04.2021)