

**BIYOKİMYASAL OLARAK MODİFİYE EDİLMİŞ BAKTERİYEL POLİESTER
ESASLI MİKRO VE NANO BOYUTLU İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN
HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Ebru KILIÇAY

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Doktora Tezi

Olarak Hazırlanmıştır

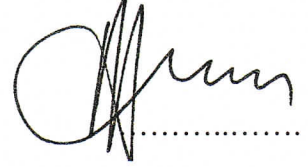
ZONGULDAK

Mayıs 2010

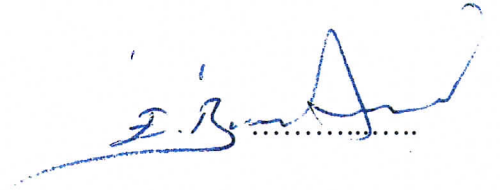
KABUL:

Ebru KILIÇAY tarafından hazırlanan ‘‘BİYOKİMYASAL OLARAK MODİFİYE EDİLMİŞ BAKTERİYEL POLİESTER ESASLI MİKRO VE NANO BOYUTLU İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU’’başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oybirliğiyle kabul edilmiştir. 28.05.2010.

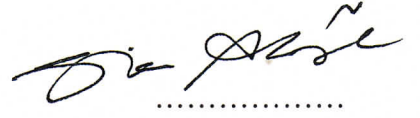
Başkan : Prof. Dr. Baki HAZER (ZKÜ)



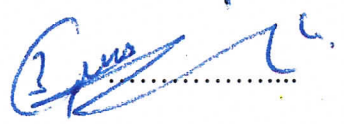
Üye : Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ (HÜ)
(Yardımcı Danışman)



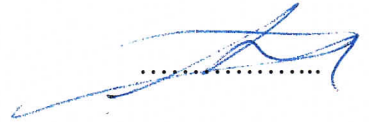
Üye : Doç. Dr. Sinan AKGÖL (EÜ)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Birten ÇAKMAKLI (MAKÜ)

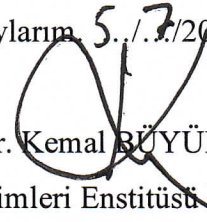


Üye : Yrd.Doç.Dr. Burak ÇOBAN (ZKÜ)

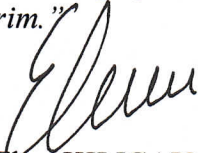
**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım. 5.7/2010

Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



"Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim."


Ebru KILIÇAY

ÖZET

Doktora Tezi

BIYOKİMYASAL OLARAK MODİFİYE EDİLMİŞ BAKTERİYEL POLİESTER ESASLI MİKRO VE NANO BOYUTLU İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Ebru Kılıçay

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Baki HAZER

Mayıs 2010, 154 sayfa

Kontrollü salım teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen ilaç salımı 1970’lerde başlamıştır ve hızla yaygınlaşmıştır. Polimerler kontrollü salım sistemlerinin gelişiminde önemli rol oynamaktadırlar. Özellikle de biyobozunur ve biyoyumlu polimerlerden hazırlanan taşıyıcı sistemler oldukça ilgi çekmektedir. Bu taşıyıcı sistemlerden en önemlileri, mikro ve nano boyutta hazırlanan partiküler yapılardır. Mikro ve nanopartikül ilaç salım sistemleri son 20 yıldır yaygın bir şekilde çalışılmaktadır. Mikro ve nanotaşıyıcı sistemler, kullanılan ilaçların etkinliğini artırarak terapötik indeksini iyileştirmekte, ilacın toksisitesini düşürmekte, uzun zaman periyodunda ilacın terapötik kararlı hal düzeyine ulaşmasını sağlamakta ve aynı zamanda ilacın çözünürlüğünü ve kararlılığını arttırmaktadır.

ÖZET (devam ediyor)

Sunulan tez kapsamında biyomedikal uygulamalar için poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat) mikro ve nanopartikülleri çözücü buharlaştırma tekniği ile hazırlanmıştır. Mikropartiküller için morfolojik değerlendirmeler SEM ve optik mikroskopla, nanopartiküller için ise SEM, AFM ve FTIR ile gerçekleştirilmiştir. Mikropartiküller içerisinde, göz iltihabının tedavisinde yaygın olarak kullanılan göz ilacı triamsinolon asetonid yüklenmiştir ve ilaç yükleme ve salım profilleri değerlendirilmiştir. Kanser hücrelerine hedefleme çalışmaları için antikanser ilaç olarak etoposid ve ligand olarak folik asit PHBHHX nanopartiküllere yüklenmiştir. Etoposidin salım çalışmaları değerlendirilmiştir ve sistem ileride yapılacak olan *in vivo* uygulamalar için optimize edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Mikropartikül, nanopartikül, poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat), mikrot taşıyıcılar, nanotaşıyıcılar, triamsinolon asetonid, etoposid, folik asit.

Bilim Kodu: 405.05.01

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF BIOCHEMICALLY MODIFIED BACTERIAL POLYESTER BASED MICRO AND NANO SIZED DRUG CARRIER SYSTEMS

Ebru KILIÇAY

Zonguldak Karaelmas University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Thesis Advisors: Prof. Baki HAZER

May 2010, 125 pages

Delivery of drugs by means of controlled release technology began in the 1970s and has continued to expand so rapidly. Polymers have played a major role in the development of controlled release systems. Especially carrier systems which are prepared from biodegradable and biocompatible polymers, are very attractive. The most important of these carrier systems are particular structures which are prepared for micro and nano sized. Microparticle and nanoparticle drug delivery systems have been widely studied over the past 20 years. Micro and nanocarriers have the potential to improve the therapeutic index of drugs by increasing drug efficiency, lowering drug toxicity, achieving steady state therapeutic levels of drugs over an extended period of time and also improve drug solubility and drug stability.

ABSTRACT (continued)

In the presented study, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) micro-and nanoparticles were prepared by solvent evaporation technique for biomedical applications. Morphological evaluations were investigated using SEM and optical microscope for microparticles and SEM, AFM and FTIR for nanoparticles. Triamcinolone acetonide which has been widely used for the treatment of eye inflammation in ophthalmology, was loaded into microparticles and evaluated drug loading and release profiles. Etoposide as a anticancer drug and folic acid as ligand were loaded in PHBHHX nanoparticles for targeting the cancer cells. Release studies of etoposide were evaluated and the system was optimized for the further *in vivo* applications.

Key Words: Microparticle, nanoparticle, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), microcarriers, nanocarriers, triamcinolone acetonide, etoposide, folic acid.

Science Code: 405.05.01

TEŞEKKÜR

Öncelikle beni her zaman ve her koşulda özveriyle, güvenle destekleyen, sarıp sarmalayan, bu günlere gelmemi sağlayan sevgili canım annem Nurten KILIÇAY’a,

Çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden her fırsatta yararlanmama olanak sağlayan, beni hiçbir zaman yüzüstü bırakmayan ve üzerimde çok emeği geçen Sayın ZKÜ Kimya Bölümü Başkanı Prof. Dr. Baki HAZER (ZKÜ) ve eşi Kadriye HAZER; Hacettepe Üniversitesi Biyokimya-Nanoteknoloji-Nanotıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ (HÜ) ve eşi Ayşe DENKBAŞ’a, tezimin yürütülmesindeki desteklerinden ve dostane yaklaşımlarından ötürü derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın çeşitli aşamalarında değerli katkılarından ve desteğinden dolayı ZKÜ Tıp Fakültesi öğretim üyesi Sayın Doç.Dr. İshak Özel TEKİN’e (ZKÜ)

Çalışmalarımın her aşamasında bana çok destek veren, bilimsel açıdan beni destekleyen, ilgi ve şevkatleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiren ve beni hep tölere eden ZKÜ Meslek Yüksekokulu Müdürü Sayın Prof. Dr. Ali İhsan EROL (ZKÜ) ve Müdür Yardımcısı Sayın Yrd. Doç.Dr. Bülent HANER (ZKÜ) ve tüm meslek yüksekokulu çalışanlarına,

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini paylaşan ve sonuna kadar beni destekleyen, yalnız bırakmayan, en zor anlarımda yanımda olan, her zaman moral ve güç veren canım arkadaşım Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Öğretim Üyesi Öğr. Gör.Dr. Eylem ÖZTÜRK GÜVEN (HÜ) ve eşi Yrd.Doç. Dr. Oğuz GÜVEN’e,

Ortaklaşa çalışma yaptığım, bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım, desteğini ve yanımda olduğunu her an hissettiğim Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç.Dr. Birten ÇAKMAKLI’ya, (MAKÜ).

Tez çalışmamda emeği geçen ve bana yardımcı olan Kırıkkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyeleri Sayın Yrd. Doç.Dr. Mustafa TÜRK ve Yrd.Doç.Dr. Serpil OĞUZ TÜZÜN'e (KÜ).

Çalışmalarım esnasında beni tölere eden, desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan zevk aldığım Hacettepe Üniversitesi Biyokimya-Nanoteknoloji-Nanotıp Anabilim Dalı Biyopolimerik Sistemler Araştırma Grubu Üyeleri, Yrd. Doç.Dr. Mesut ŞAM, Yrd. Doç.Dr. Melike Erol DEMİRBİLEK, Murat DEMİRBİLEK, Tayfun VURAL, Tamer ÇIRAK, Cem BAYRAM, Doğa KAVAZ, Esmâ ALP, Öznur AKBAL, Nazlı ÇALIŞKAN, Ebru ERDAL, Eda YALÇIN, Zeynep KARAHALİLOĞLU, Betül Bozdoğan PALA, İrem OKMAN ve Osman KAZAK'a,

Birlikte çalışmaktan büyük zevk aldığım ZKÜ Kimya Bölümü Polimer Araştırma Grubu üyelerinden çok sevdiğim canım arkadaşlarım Elif KELEŞ, Sema ALLI, Abdülkadir ALLI ve eşi Selma ALLI, Timur ŞANAL, Murat BALCI, Soner ATAMAN'a ve kimya bölümünün tüm çalışanlarına,

Maddi desteklerinden dolayı araştırmacı olarak yer aldığım 2004-13-02-01 no'lu Kapsamlı Araştırma Projesi için ZKÜ Araştırma Fonuna, 2007/2-13-02-08 no'lu Lisansüstü Öğrenim ve Araştırma Projesine, 2008-70-0101 no'lu Rektörlük Analiz Projesine, 108T423 ve 104M128 kodlu araştırma projeleri için TUBİTAK'a teşekkür ederim.

En zor anlarımda yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana sürekli moral veren ve yalnız bırakmayan canım arkadaşlarım Uzm. Dr. Tuğba TÜĞSÜZ ARİFİOĞLU, Dr. Ster IRMAK ve Öğr. Gör. Oya KORKMAZ'a,

İhtiyacım olduğu zamanlarda laboratuvarlarını bana açan biyokimya araştırma grubu üyeleri ve kimya mühendisliğindeki arkadaşlarıma,

En içten minnet ve şükran duygularıyla sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ.....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
 BÖLÜM 1 GİRİŞ	 1
 BÖLÜM 2 GENEL BİLGİLER	 3
 2.1 İLAÇ SALIM TEKNOLOJİSİ	 3
2.1.1 İlaç verilme yolları	4
2.1.1.1 Oral	4
2.1.1.2 Pulmonar	4
2.1.1.3 Enjeksiyon	5
2.1.1.4 Transdermal	5
2.1.1.5 İmplant.....	6
2.1.2 İlaç Salımı için Mekanizma.....	6
2.1.2.1 Difüzyon Kontrollü Sistem.....	8
2.1.2.1.1 Rezervuar sistemler	8
2.1.2.1.2 Matriks cihazları	8
2.1.2.2 Erozyon Kontrollü Sistem	10
2.1.2.3 Polimer Degradasyonu ve Erozyonu	12
2.2 KANSER TEDAVİSİNDE YAYGIN OLARAK KULLANILAN ETKEN	
MADDELER.....	13

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

2.3 KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER	13
2.3.1 Mikrokapsüller.....	15
2.3.2 Mikroküreler	15
2.3.3 Nanopartiküller	16
2.3.4 Lipozomlar.....	18
2.4 İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİNİN HEDEFLENDİRİLMESİ.....	18
2.4.1 Hedeflendirme Mekanizmaları	18
2.4.1.1 Pasif Hedeflendirme	18
2.4.1.2 Aktif Hedeflendirme.....	19
2.4.1.2.1 Manyetik Hedeflendirme	19
2.4.1.2.2 Ultrasonik Hedeflendirme.....	20
2.4.1.2.3 Ligand-Reseptör Aracılı Hedeflendirme.....	20
2.4.2 İlaç Taşıyıcı Sistemin Hücre İçine Alımı	23
2.5 KANSER VE KANSER TEDAVİSİ.....	24
2.5.1 Kemoterapi	26
2.5.1.1 Kemoterapide Karşılaşılan Sorunlar	26
2.5.1.1.1 Dozaj Formu.....	27
2.5.1.1.2 Farmakokinetikler.....	27
2.5.1.1.3 Toksisite	27
2.5.1.1.4 İlaç Direnci.....	27
2.5.2 Radyoterapi.....	28
2.5.2.1 Radyoterapide Karşılaşılan Sorunlar.....	28
2.5.3 İmmunoterapi.....	28
2.6 KANSER NANOTEKNOLOJİSİ	29
2.7 BİYOBOZUNUR POLİMERLER	29
2.7.1 Doğal Biyobozunur Polimerler.....	31
2.7.1.1 Polisakkaritler	31
2.7.1.2 Doğal Orijinli Polipeptidler	32
2.7.1.3 Bakteriyel Poliesterler	32
2.7.1.3.1 Polihidroksialkanoatların Genel Özellikleri.....	33

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

2.7.1.3.2 PHA'nın Fermantasyon Yoluyla Üretimi	40
2.7.1.3.3 PHA'nın Uygulama Alanları.....	41
2.8 HÜCRE KÜLTÜRÜ	43
2.8.1 Hücre kültürünün kullanım alanları	44
2.8.2 Hücre kültürü koşulları.....	44
2.8.3 Hücre kültür sistemleri	45
2.9 MTT TESTİ.....	45
BÖLÜM 3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	47
3.1 PHBHHX MİKROKÜRELER.....	47
3.1.1 Kimyasallar.....	47
3.1.2 Mikrokürelerin hazırlanması	47
3.1.3 Morfolojik Değerlendirmeler.....	48
3.1.3.1 Boy ve Boy Dağılımları.....	48
3.1.4 Boy ve Boy Dağılımı Üzerine Etkin Parametreler	49
3.1.4.1 Karıştırma Hızı.....	49
3.1.4.2 Emülsifier Konsantrasyonu.....	49
3.1.4.3 Polimer/Çözücü Oranı	49
3.1.5 İlaç Yükleme Çalışmaları	49
3.1.5.1 İlaç Hapsetme Etkinliği	50
3.1.5.2 İn vitro Salım Çalışmaları.....	50
3.2 PHBHHX NANOKÜRELER.....	50
3.2.1 Kimyasallar.....	51
3.2.2 PHBHHX Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	51
3.2.3 PHBHHX Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	52
3.2.3.1 Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi.....	52
3.2.3.2 Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi.....	55
3.2.4 Hücresel Etkileşimler için PHBHHX Nanopartiküllerin Hazırlanması.....	55
3.2.4.1 PHBHX Nanopartiküllerinin FITC (fluorescein isothiocyanate) ile işaretlenmesi	55
3.2.5 PHBHX Nanopartiküllere <i>in vitro</i> İlaç Yükleme ve Salım Çalışmaları	56

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

Sayfa

3.2.6 PHBHHX Nanotaşıyıcıların Folik Asit ile Modifikasyonu	57
3.2.7 PHBHHX Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri	59
3.2.7.1 Hücrelerin Hazırlanması	59
3.2.7.2 PHBHHX nanopartiküllerin in-vitro sitotoksosite çalışması	59
3.2.8 Hücre Kültür Testleri	61
3.2.8.1 Kanser ilacı yüklenmiş, hedefleyici folik asit takılmış PHBHHX nanopartiküllerin, hücre kültüründe HeLa (kanser) hücreleri üzerine etkisinin araştırılması.....	61
3.2.8.2 Hücre kültürü ve kompleksin hücrelerle etkileşimi	61
3.2.8.3 Hücre içersine floresin ile işaretli nanopartiküllerin aktarılması	62
3.2.8.4 Kaspaz-3-immunositokimyasal metod ile apoptosiz belirlenmesi.....	62
3.2.8.5 İkili boyama	63
BÖLÜM 4 DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA.....	65
4.1 PHBHHX MİKROKÜRELER.....	65
4.1.1 Morfolojik Değerlendirmeler.....	65
4.1.2 Partikül Boy ve Boy Dağılımlarını Etkileyen Parametreler	66
4.1.2.1 Karıştırma Hızı.....	67
4.1.2.2 Emülsifier Konsantrasyonu.....	67
4.1.2.3 Polimer/Çözücü Oranı	68
4.1.3 İlaç Yükleme ve İn vitro Salım Deneyleri.....	69
4.1.4 Sonuç	70
4.2 PHBHHX NANOKÜRELER.....	70
4.2.1 PHBHHX Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri	70
4.2.2 PHBHHX Nanopartiküllerin Boy-Boy Dağılımına Etki Eden Parametreler	72
4.2.2.1 Karıştırma Hızı.....	72
4.2.2.2 Emülsifier Konsantrasyonu.....	72
4.2.2.3 Polimer/Çözücü Oranı	73
4.2.3 FITC ile işaretli nanopartiküllerin fagositoz tayininde kullanımı	74
4.2.4 PHBHHX Nanotaşıyıcılarının Folik Asit ile Modifikasyonu	77
4.2.4.1 Folik Asit Bağlı PHBHHX Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	79

İÇİNDEKİLER (devam ediyor)

	<u>Sayfa</u>
4.2.4.1.1 FTIR Spektrumları.....	79
4.2.5 PHBHHX Nanotaşıyıcılara İlaç Yükleme Etkinliği	81
4.2.5.1 Etoposid Yüklü PHBHHX Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	82
4.2.5.1.1 FTIR Spektrumları.....	82
4.2.6 Etoposid Yüklü Nanotaşıyıcıların in vitro İlaç Salımı.....	83
4.2.7 PHBHHX Nanopartiküllerin in-vitro Sitotoksosite Çalışması.....	84
4.2.8 PHBHX Nanotaşıyıcı-Hücre Etkileşimi.....	87
4.2.8.1 PHBHX Nanotaşıyıcıların Hücre İçerisine Aktarılmasından Sonra Elde Edilen Sonuçlar	87
4.2.8.2 Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Boyama ile Elde Edilen Apoptotik İndeks Sonuçları	88
4.2.8.3 İkili Boyama ile Elde Edilen Apoptoz ve Nekroz Sonuçları.....	91
BÖLÜM 5 SONUÇLAR	97
KAYNAKLAR	103
BİBLİYOGRAFYA	119
EK AÇIKLAMALAR A ETOPOSİDİN KALİBRASYON EĞRİSİ	121
ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

No	Sayfa
2.1 Tablet, sürekli salım cihazı veya kontrollü salım cihazı yoluyla ilacın salımı için konsantrasyon profil.	7
2.2 Rezervuar system.....	8
2.3 Matriks cihazı.	9
2.4 Matriks sistem tarafından difüzyon.	9
2.5 Rezervuar sistem tarafından difüzyon: (a) implante veya oral rezervuar; (b) transdermal ilaç salım sistemi.....	10
2.6 İlaç salımı (a) rezervuar ve (b) matriks şişme kontrollü salım sistemleri.	11
2.7 Çevreye duyarlı salım sistemlerinden ilaç salımı.	11
2.8 İlaç salımı (a) yığın-aşınan ve (b) yüzey-aşınan biyobozunur sistemler.	12
2.9 Etoposidin kimyasal yapısı.....	13
2.10 (A) Hedeflenmiş polimerik nanopartiküllerin şematik gösterimi. (B) Serbest ilacın sistemik salımıyla polimerik kontrollü ilaç salım sisteminin plazmadaki ilaç konsantrasyonlarının karşılaştırılması.	17
2.11 Nanopartiküllerin hedeflendirildiği şematik gösterim.	19
2.12 Tümör hücreleri üstündeki çeşitli reseptörler.....	21
2.13 Folik asitin kimyasal yapısı.	22
2.14 Hücre içerisine yüzeyi modifiye edilmiş nanopartiküllerin alımı.	22
2.15 Polihidroksialkanoatların genel kimyasal yapısı. R çeşitli zincir uzunluğunda n-alkil grubunu temsil etmektedir.....	33
2.16 PHBHHx'in kimyasal yapısı.	35
2.17 P(3HB-co-5 mol%3HHx)'nin geniş miktarını (kuru hücre ağırlığının %90'ı) içeren 4 hücre PHB rekombinant <i>R. eutropha</i> rekombinantın ince kesitinin transmisyon elektron mikroskop görüntüsü. Skala 0.5 µm'yi göstermektedir.....	38
2.18 Triamsinolon asetonidin kimyasal yapısı.....	43
2.19 MTT 3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromürün kimyasal yapısı.....	46
3.1 PHBHHX mikroküre hazırlama düzeneği.	48
3.2 PHBHHX nanopartikül hazırlama düzeneği ve işlem basamakları.....	52
3.3 AFM sistemi ve çalışma prensibi.	53
3.4 Zeta Sizer cihazı.	54
3.5 FITC'nin formülü.	56

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

No	Sayfa
3.6 PHBHHX nanotaşıyıcılardan in vitro etoposid salım düzeneği.....	57
3.7 Folik asitin kimyasal yapısı.....	58
3.8 Folik asitin PHBHHX nanopartiküllere kovalent bağlanma mekanizması.....	58
4.1 PHBHX mikrokürelerin optik mikroskop görüntüleri.....	65
4.2 PHBHHX mikrokürelerin SEM görüntüsü.	66
4.3 PHBHHX mikroküre boyutu üzerine karıştırma hızının etkisi.	67
4.4 PHBHHX mikroküre boyutu üzerine emülsifier konsantrasyonunun etkisi.....	68
4.5 PHBHHX mikroküre boyutu üzerine polimer/çözücü oranının etkisi.....	68
4.6 Triamsinolon asetonid yüklü PHBHHX mikrokürelerin in vitro salım profili.	69
4.7 A) PHBHHX nanopartiküllerin SEM görüntüsü. B) PHBHHX nanopartiküllerin AFM görüntüsü.....	71
4.8 Karıştırma hızının boy-boy dağılıma etkisi.....	72
4.9 Emülsifier miktarının boy-boy dağılıma etkisi.	73
4.10 Polimer miktarının boy-boy dağılıma etkisi.....	73
4.11 RAW 264,7 hücrelerin faz-kontrast mikroskopik görünümü (400X).....	74
4.12 (4.saat) Kontrol: Nanopartikül bulunmayan RAW 264,7 makrofaj; 10-FITC: 10µl işaretli nanopartikül eklenen hücreler. İşaretli nanopartikül miktarı arttıkça hücre içi floresan miktarı artmaktadır.	75
4.13 (24 saat) Kontrol: Nanopartikül bulunmayan RAW 264,7 makrofaj 10-FITC: 10µl işaretli nanopartikül eklenen hücreler. İşaretli nanopartikül miktarı arttıkça hücre içi floresan miktarı artmakta.	76
4.14 Nanopartikül fagosite eden hücrelerde sitoplazmik floresan ışıması (200X), Nikon.....	76
4.15 Folik asit miktarına karşı bağlanma yüzdesine ait grafik.	78
4.16 1/0.5, 1/0.25, 1/0.125 oranında ilaç yüklü ve floresan yüklü nanopartiküllere folik asit bağlanma yüzdesi.....	79
4.17 PHBHHX nanopartikül FTIR spektrumu.....	80
4.18 Folik asit FTIR spektrumu.	80
4.19 Folik asit bağlı PHBHHX nanopartikül FTIR spektrumu.	81
4.20 Etoposid FTIR spektrumu.	82
4.21 Etoposid yüklü PHBHHX nanopartikül FTIR spektrumu.	83
4.22 PHBHHX nanopartiküllerden etoposid salım grafiği.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam ediyor)

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
4.23 Floresein ile işaretlenmiş folik asit takılı nanopartiküllerin HeLa kanser hücre kültüründe inverted mikroskop ile, FITC filtrede elde edilmiş fotoğrafları	88
4.24 Kaspaz-3 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama fotoğrafları.	90
4.25 Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan İkili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları.	92
4.26 Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan İkili boyamadan elde edilen apoptotik hücre DNA'sının durumunu gösteren fotoğraflar.	93
4.27 Propidium Iyodid (PI) floresan boya kullanılarak yapılan İkili boyamadan elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları.....	95
A.1 Etoposid kalibrasyon eğrisi.	123

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Polimerik matris içine hidrofobik küçük molekül ve makromoleküler ilacın enkapsüle edildiği polimerik nanopartiküller.....	14
2.2 Vücutta parçalanabilen polimerler.....	30
2.3 PHA üretimi için uygun substratlar.	40
2.4 PHA'nın biyoteknolojik üretimi için uygun bakteriyel sistem örnekleri.....	41
2.5 PHA'nın tıptaki potansiyel uygulamaları.	42
3.1 HeLa hücrelerinin hücre kültür ortamında çoğaltılması.	59
4.1 Mikrokürenin boy ve boy dağılımı üzerine etki eden parametreler.	66
4.2 İlaç enkapsülasyon verimi.....	69
4.3 Farklı konsantrasyonlardaki ilacın PHBHHX nanopartiküle hapsedilme oranları.	81
4.4 1/0.5, 1/0.25, 1/0.125 (polimer/etoposid) oranlarında etoposid yüklenmiş PHBHHX nanopartiküllerin 5, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.	85
4.5 1/0.5, 1/0.25, 1/0.125 (polimer/etoposid) oranlarında etoposid yüklenmiş folik asit bağlı PHBHHX nanopartiküllerin 5, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.	86
4.6 5, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonda etoposidin HeLa hücrelerine sitotoksik etkisi.....	87
4.7 Değişik konsantrasyonlarda ilaç miktarına (µg/ml) karşı gelen ilaçlı partiküllerin µg cinsinden toplam ağırlıkları.....	89
4.8 Kanser ilacı etoposid, farklı oranlarda etoposid yüklü nanopartiküller ve farklı oranlarda etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş nanopartiküllerin HeLa hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % apoptotik indeksleri.....	89
4.9 Kanser ilacı etoposidin, farklı oranlarda etoposid yüklü nanopartiküllerin ve farklı oranlarda etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş nanopartiküllerin HeLa hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % nekrotik indeksleri.	94

EK AÇIKLAMALAR DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
A ETOPOSİDİN KALİBRASYON EĞRİSİ.....	121

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PHBHHX	: Poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksihekzanoat)
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	: Fourier Transform İnfrared Spektrometresi
EDAC	: 1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimid
MES	: 2-(N-Morpholino)ethane Sülfonik Asit
FA	: Folik Asit
FITC	: Florosein İzotiyosiyanat
PI	: Propodiyum iyodid
NP	: Nanopartikül
HeLa	: İnsan serviks kanseri hücreleri
L929	: Fare fibroblast hücreleri
MTT	: (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolium bromür; Tiazolil blue)

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Kanser tedavisindeki en büyük ve aşılması zor olan sorunlardan biri ilaçların kanser hücrelerine etki ederken diğer sağlıklı hücrelere de zarar vermesidir. Son yıllarda sadece kanser hücrelerine etki edecek olan sistemler üzerine yapılan çalışmalara ağırlık verilmiştir. Bu amaçla geliştirilen biyobozunur polimerlerden elde edilen mikro ve nano boyutlu partiküler sistemler oldukça ilgi çekmektedir. Mikroküreler, çapları birkaç μm 'den birkaç yüz μm 'ye kadar değişebilen monolitik yapıdaki mikro taşıyıcılardır. Nanoküreler ise çapları 10-1000 nm arasında değişen katı koloidal partiküllerdir. Bu taşıyıcı sistemlerin, etken maddeyi kontrollü şekilde salmaları, etkin maddeyi hedef doku, organ ve hücrelere taşımaları, düşük dozda ilaç kullanımına olanak sağlaması ve dolayısıyla ilaçtan gelecek olan toksisitenin azalması ve *in-vitro* ve *in-vivo* koşullara karşı dayanıklı olması gibi birtakım üstünlükleri vardır. Özellikle de son yıllarda, doku veya hücrelere lokalize olmuş veya hedeflenmiş salım yoluyla küçük molekül ağırlıklı ilaçlar kadar protein, peptit veya gen gibi makromoleküllerin de uygun bir şekilde salımını gerçekleştirmek amacıyla kullanılan nanoteknolojik sistemler için önemli girişimlerde bulunmaktadır (Moghimi et al. 2001).

Nanoteknolojik sistemlerin kullanılmasıyla geliştirilen özel taşıyıcı sistemler sayesinde sağlıklı hücrelere etki etmeyen ancak kanserli hücreleri öldüren tedaviler uygulamak artık mümkün olabilmektedir. Kanser tedavisinde kanda kolaylıkla dolaşan ve vücudun her tarafına ulaşan oldukça küçük nanoboyutta parçacıklar içine istenilen antikanser ilaçlar yerleştirilebilmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan nanoparçacıklar sağlıklı damarlardaki küçük deliklerden dışarı çıkamaz, ancak geniş gözenekli damar yapısındaki kanserli dokuya geldiklerinde damar dışına çıkar ve kanserli dokunun içine girerler. Kanserli dokuyla temas eden partiküller endositoz yoluyla hücre içerisine alınırlar. Klasik ilaç tedavisinde hücre içine giren ilacın bir kısmı özel hücre içi proteinleri tarafından dışarı atılmaktadır. Nanopartiküller içinde hücreye alınan ilaç, bu proteinlerden korunmuş olur. Hücre içerisine alınan nanopartikül içerisindeki ilaç, partikülden difüze olarak dışarı çıktığında kanser hücreleriyle etkileşerek onları yok eder. İlacın, istenilen hedef doku ve organa ulaştırılabilmesi için bu

nanotaşıyıcılara, kanser hücresindeki reseptörlere karşı spesifik olan birtakım ligandlar bağlanarak çok daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Bu çalışmanın ilk aşamasında, mikrobiyal olarak üretilen PHA sınıfından olan biyobozunur ve biyouyumlu poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat) PHBHHX kopolimerlerinden mikroküreler hazırlanarak içerisine, göz tedavisinde yaygın olarak kullanılan göz ilacı, triamsinolon asetonid yüklendi, ilaç yükleme ve salım profilleri incelendi. İkinci aşamasında ise yine PHBHHX kopolimerleri kullanılarak nanopartiküller hazırlandı. Öncelikle bu partiküllerin hücreyle etkileşimini gözlemek amacıyla, partiküllere FITC (florosein izotiyosiyanat) yüklendi ve bu partiküllerin RAW 264.7 fare makrofaj hücrelerinin içerisine girdiği saptandı. Elde edilen verilerden yola çıkarak PHBHHX nanopartiküllerine anti kanser ilaç olan etoposid yüklendi ve ligand olarak folik asit bağlandı. HeLa ve L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak ilaçlı ve ligandlı nanopartiküllerin kanser hücrelerindeki sitotoksik etkileri incelendi ve hücrelere hedefleme çalışmaları gerçekleştirildi.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 İLAÇ SALIM TEKNOLOJİSİ

Son 10 yıldır modern farmasötik teknolojinin gelişmesi ve biyoteknoloji endüstrisinin şaşırtıcı derecede büyümesi ilaç salım sisteminde bir devrim yaratmıştır (Park 1997). Endüstride yer alan farmasötikler, kimyasal bileşiklerin ağız yoluyla (katı hap ve sıvı şeklinde) veya enjeksiyon şeklinde verilmesini içermektedir. İlaç salım periyodunu ve hızını kontrol eden kompleks oluşumlar ve tedavi için vücudun spesifik bölgesine hedefleme yaygın olarak kullanılmaktadır (Park and Marshy 2000).

Kontrollü ilaç salım sistemlerinin yararları: (i) minimum dalgalanma ile kandaki optimum terapötik ilaç konsantrasyonunu sürdürmek; (ii) uzatılan zaman periyodunda tekrarlanabilir salım hızı; (iii) yarı ömrü kısa ilaçlar için aktivitenin sürdürülmesi; (iv) ilacın sarfiyatının, dozajının ve yan etkilerinin elimine edilmesi; (v) hasta uyumunun iyileştirilmesi ve terapinin optimizasyonu (Klausner et al. 2003, National Science and Technology Council Committee on Technology 2005, Valle et al. 2009'dan, Brayden 2003, Hughes 2005, Drummond et al. 1999, Au et al. 2001, Fetterly and Straubinger 2003).

Kontrollü salım sistemlerinde, ilacın kimyasal ve fiziksel özellikleri (Arnedo et al. 2004), yönetimde izlenecek yol, (Lin and Metters 2006, Papadopoulou et al. 2006, Bose and Bogner 2007) doğal salım cihazı, ilaç salım mekanizması, potansiyel hedefleme çalışması (Stru"bing et al. 2007) ve biyoyumluluk gibi pek çok faktörün aynı zamanda düşünülmesi gerekmektedir (Hoarau et al. 2004, Moghimi et al. 2003, Koo et al. 2005, Kristl et al. 2003).

İlaç salım teknolojisi, sağlık ürünleri açısından ticari ve terapötik öneme sahiptir (Acharya and Park 2006). Büyük farmasötik şirketler, diğer ilaç salım teknoloji şirketleriyle stratejik anlaşma yoluna giderek var olan eski ilaçları, yeni özellikteki formlarıyla kullanarak hastaların ömrünü uzatmayı hedeflemektedirler. Bununla birlikte, ilaç salım sistemlerinin

tasarımı ve gelişimi, disiplinlerarası araştırmaların temelini oluşturmaktadır. Açıkça görülmektedir ki biyoloji, kimya, fizik ve mühendislik bilimlerindeki en son yaklaşımlar kullanılarak multi disiplinlerarası takım çalışması yoluyla önemli ilerlemeler kaydedilebilmiştir.

2.1.1 İlaç verilme yolları

İlaç salım teknolojisi, vücut içerisine yerleştirilen ilacın verilme şekline göre sınıflandırılmaktadır. İlacın, gastrointestinal sistemlerde absorpsiyonu için ağız yoluyla alımı dışında diğer verilme yolları; implantasyon (vücut boşluğu içerisine), transdermal, vajinal, rektal, dil altı, bukkal (yanağın iç duvarı yoluyla), oküler, pulmoner, deri altı enjeksiyonu, kas içi enjeksiyonu, damar içi enjeksiyonunu içermektedir. İlaç salım sistemleri ilacın vücuda nasıl salınacağı ve ilacın vücuttaki etkisi üzerine odaklanmıştır (Chan et al. 2005). Genellikle partiküllerden oluşan nanometre boyutundaki bu malzemeler, biyolojik bölgeye spesifik hedefleme ve kontrollü salım gibi eşsiz özelliklere sahiptir. İlacın vücuda verilme yolları;

2.1.1.1 Oral

Oral yol, en güvenli metoddur ve ilaç salım sistemlerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Fakat peptid, protein ve nükleik asit gibi biyoteknolojik ilaçlar bu yol için uygun değildir çünkü bunların intestinal epitel yoluyla geçirgenliği düşüktür ve gastrointestinal sistemlerde çok fazla degradasyona maruz kalmaktadırlar. Sonuç olarak bu ilaçların gastrointestinal sistemlerdeki degradasyonunu önlemek ve ilaç absorpsiyonunu arttırmak için girişimlerde bulunmaktadır. Oral ilaç salım sistemleri; liposomlar (Chan et al. 2005), mukoadesif yamalar (Eaimtrakarn et al. 2003, Whitehead et al. 2004), nanopartiküller (Carino et al. 2000), absorpsiyonu arttıran ajanlar (Kidron et al. 2004) ve mikro boyutta imal edilen cihazları (Martin and Grove 2001, Foraker et al. 2003, Cohen 2003) içermektedir. Ayrıca oral aşılama da oldukça önemlidir (Tao et al. 2003).

2.1.1.2 Pulmonar

Pulmonar ilaç salımı, astım, kronik obstrüktif pulmonar hastalık ve kistik fibrozu içeren hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Soluma, ilacın hedefe doğrudan ulaşmasıdır. Obstrüktif solunum hastalıklarının tedavisinde pulmonar salım, sistemik yan etkileri minimize

edebilmekte ve hızlı cevap sağlayabilmektedir ve ilaç, akciğerin iletken bölgesine direkt olarak salındığı için ilaca olan gereksinim minimumdur (Chan 2006). Soluma, sistemik terapi için cazip bir opsiyondur çünkü akciğerin solunum bölgesi (en çok alveol) büyük bir yüzey alanı (80-100 m²/yetişkin) sağlamaktadır ve kandaki ilacın absorpsiyonu için oldukça yüksek geçirgenlikte bir membrandır. İğneyle serbest salım sistemi çeşitli terapötik maddeleri yönetebilmektedir (Chow et al. 2007). Gastrointestinal bölgeyi yıpratıcı şekilde degrade olan ve karaciğerde birinci-geçiş metabolizma yoluyla elimine edilen büyük protein molekülleri, eğer akciğerin solunum bölgesinde tortu olursa pulmonar yol vasıtasıyla salınabilmektedir.

Soluma yoluyla kullanılan ilaç partikülleri, küçük çaplı hava yolu ve alveollerde etkin birikme için 1-5 µm çapında olmalıdır (Coates et al. 2007). Bu tozlar çok yapışkandır, zayıf akış göstermektedir ve van der waals etkileşiminden meydana gelen yapışmadan dolayı havada asılı kalan küçük taneciklerin dağılması zordur. Pulmonar ilaç salımı ile ilgili olan bu problemler akışkanlaştırma araştırmalarından dolayı bilinmektedir.

2.1.1.3 Enjeksiyon

Enjeksiyon, sistemik ilaç salımı için bir standarttır ve oral salımda kullanılması uygun olmayan ilaçlar için önemli salım metodudur. Ancak bu metotta, ağrı, ilaç salımı esnasında patlama, iğne korkusu, enfeksiyon riski gibi birtakım problemler söz konusudur. Kronik hastalıklarda (insüline bağlı şeker hastalığı) tekrarlanan şekilde ilaç verilmesi gerekmektedir ki bu çok ciddi bir problemdir (Langer and Peppas, 2003). Bu problemlere karşılık iki strateji geliştirilmiştir. Birincisi enjeksiyon teknolojisini iyileştirmek, diğeri alternatif salım metodu geliştirmektir. Enjeksiyon teknolojisini iyileştirmede kullanılan en önemli örneklerden biri sabit ilaç salımını sağlayan ve enjeksiyon sıklığını en aza indiren biyobozunur mikroküreler üzerine kurulu enjekte edilebilir depo sistemleridir (Breimer 1999).

2.1.1.4 Transdermal

Birçok sebepten dolayı deri üzerine ilacın salınması tercih edilir. Çünkü, erişim kolaylığı, uygulama ve istenildiğinde salımı durdurması, devamlı ve kararlı ilaç salımı, sistemik yan etkileri azaltma, hepatik metabolizma ve gastrointestinal organlardaki ilacın degradasyonundan kaçınma ve ağrısız olması gibi avantajlara sahiptir (Guy et al. 1987, Prausnitz et al. 2004). Bununla birlikte deri yabancı maddelere karşı bariyer olarak doğal bir

fonksiyon göstermekte, ilacın çoğunun girişini önlemektedir. Bu sebeple araştırmacılar deriye karşı ilaç geçirgenliğini arttırmak için çeşitli metodlar geliştirmişlerdir. Elektroforez, iyonoforez, sonoforez, hareketli enjeksiyon, lazer ışıması ve mikro iğneleri içeren yeni teknolojiler bu amaç altında bulunmaktadır (Prausnitz et al. 2004, Bellhouse and Kendall 2003, Valle et al. 2009'dan, Mehier-Humbert and Guy 2005).

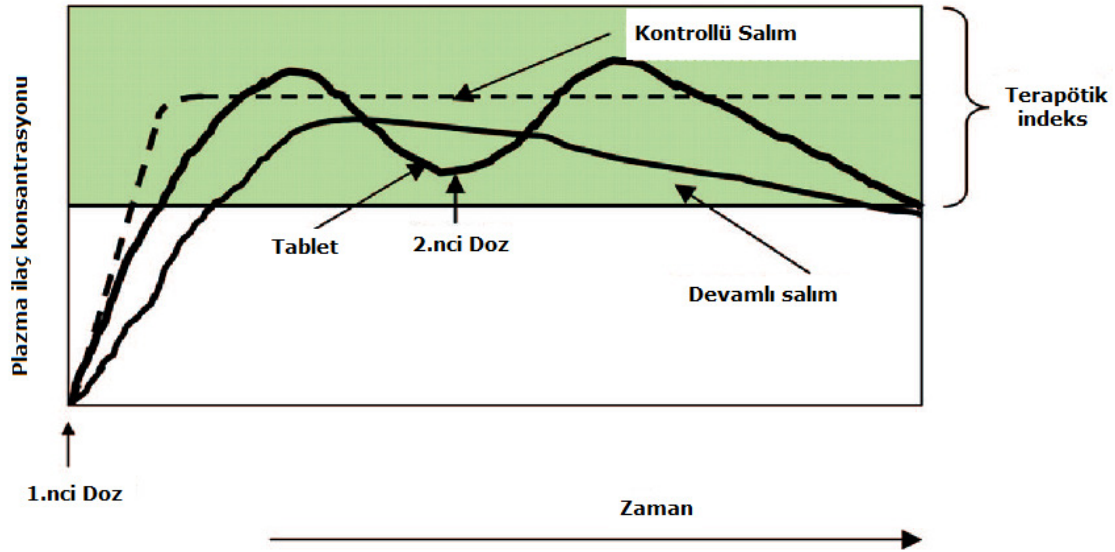
2.1.1.5 İmplant

İmplant edilebilir ilaç salım sistemleri, daha emniyetli ve güvenli olması, spesifik bölgeye ilacın sürekli salımını sağlaması açısından avantaja sahiptir. İmplant edilebilir ilaç salım sistemleri üç önemli kategoride sınıflandırılabilir: biyobozunur ve biyobozunur olmayan implantlar, implant edilebilir pompa sistemleri ve yeni, değişik implant çeşitleridir (Ramakrishna et al. 2001, Mestiri et al. 1995, Hughes et al. 2004, Szymura-Oleksiak et al. 2001, Lee et al. 2000, Guney and Akgerman 2002). Biyobozunur ve biyobozunur olmayan implantlar monolitik veya depo sistemlerde kullanılmaktadırlar. Bu gibi sistemlerden ilacın salım kinetiği, hem biyobozunur sistemlerde polimerin *in vivo* degradasyonuna hem de ilaç yükleme, polimerdeki ilacın difüzyon katsayısı ve çözünürlüğü gibi parametrelere bağlıdır (Dash and Cudworth 1998). İmplant edilebilir pompadan ilacın kontrollü salımı, sabit basınç farklılıklarının sürdürülmesi yoluyla uzaktan kumandalı akış hız manüplasyonu ve elektronik sistemlerdeki mikro teknoloji kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Üçüncü implant edilebilir ilaç salım sistemi, cinsel iktidarsızlığın tedavisinde kullanılan trans üretral implantlar, glaukoma tedavisi için göz içi implantlar, kemik enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan seramik hidroksiapatit antibiyotik sistemler gibi sistemleri içermektedir. Bu sistemlerin en büyük avantajı, tedavinin etkinliğini arttırmak, olası yan etkileri minimize etmek, hastalığın tedavisi için daha az ilaca gereksinim duymak ve sabit hızda ilacın hedefe lokal salımını içermektedir. Ayrıca salım sistemlerinin bu formları, sıklıkla ihtiyaç duyulan doz aralığını normal hale getirebilmekte ve *in vivo* ortamda kararsız olan ilacı koruyabilmektedir (Soykan and Donovan 2004).

2.1.2 İlaç Salımı için Mekanizma

Geleneksel metodlar ve ilacın verilme yolları, ilacın özellikleri (çözünürlük, yük, moleküler boyut v.s.), ilaç alım hızı ve ilacın verildiği bölgenin özelliklerini (pH, yüzey alanı, enzimin varlığı, aktif geçiş mekanizması) içermektedir (Dash and Cudworth 1998). Geleneksel tablet

veya enjeksiyon sisteminde kandaki ilaç düzeyi ile ilgili diyagram Şekil 2.1’de (Kiil and Dam-Johansen 2003). görülmektedir. İlacın ilk verilişinden sonra ilaç düzeyi yükselmekte ve bir sonraki alıma kadar düşmektedir. Geleneksel ilaç kullanımındaki önemli nokta, toksik düzeyi gösteren maksimum değer ve uzun süreli ilacın etkinlik göstermediği minimum değer arasında arta kalan ajanın kan düzeyidir. Kandaki ilaç düzeyinin uzun sürede verilmesi için tasarlanan kontrollü ilaç salım sistemlerinin, uzatılmış zaman periyodu içinde istenen minimum ve maksimum değer arasında sabit kaldığı Şekil 2.1’de görülmektedir (Kiil and Dam-Johansen 2003).



Şekil 2.1 Tablet, sürekli salım cihazı veya kontrollü salım cihazı yoluyla ilacın salımı için konsantrasyon profil.

Polimer matriksin fiziksel ve kimyasal özelliklerine dayanan ilaç salım mekanizması üç önemli prosese göre sınıflandırılabilir: (Leong and Langer 1987).

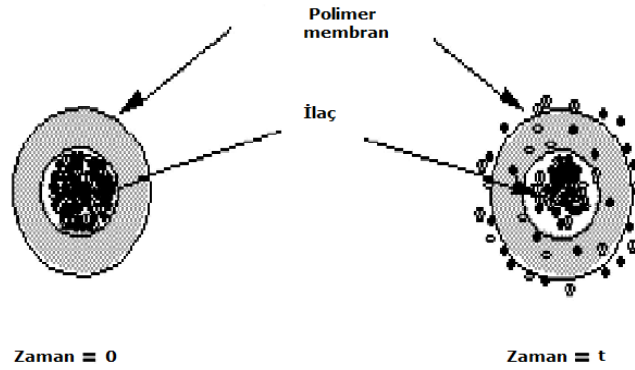
- 1- Degrad olmayan polimerden (difüzyon kontrollü sistem) ilaç difüzyonu.
- 2- Polimer şişmesinden dolayı (şişme-kontrollü sistem) ilaç difüzyonunun artması
- 3- Polimer degradasyonu ve erozyondan (erozyon kontrollü sistem) dolayı ilaç salınması.

2.1.2.1 Difüzyon Kontrollü Sistem

Aktif ajan veya ilaç, kontrollü salım cihazını oluşturan polimer içerisinden geçtiğinde difüzyon meydana gelmektedir. Belli başlı cihazlar, matriks ve rezervuar sistem olarak sınıflandırılmaktadır (Langer and Peppas 2003, Mourgues et al. 2004, Sobol 1998).

2.1.2.1.1 Rezervuar sistemler

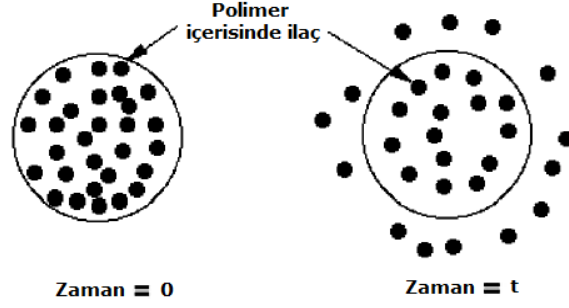
Polimerik sistemlerde büyük ölçüde kullanılmaktadır. Bu sistemlerde ilaç, merkez bölümde alıkonmuştur ve içinden difüze olduğu polimerik membran tarafından sarılmıştır. Böylelikle salım hızı kontrol edilebilmektedir. Şekil 2.2’de (Valle et al. 2009) bu tip sistemlerin şematik diyagramı görülmektedir. Rezervuar sistemler aynı zamanda içi boş fiber veya mikrokapsül formunda da olabilmektedir (Chow and Tong 2007).



Şekil 2.2 Rezervuar system.

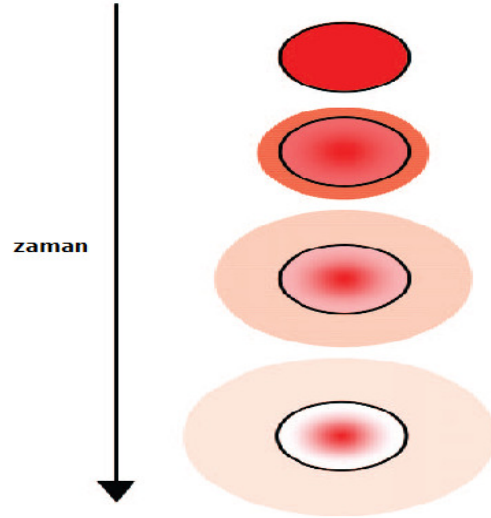
2.1.2.1.2 Matriks cihazları

Matriks cihazları, ilacın polimer içerisine dağıtıldığı cihazlardır (Şekil 2.3) (Valle et al. 2009). Matriks cihazları ilaç salımının kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır çünkü bunların üretimi rezervuar cihazlarıyla karşılaştırıldığında kolaydır ve rezervuar cihazlarındaki membranın yırtılmasıyla sonuçlanan yüksek dozda kaza tehlikesi yoktur. Matriks cihazı içerisinde aktif ajan, polimer matriks içerisinde dağılmış olarak bulunmaktadır ve tipik olarak erime veya çözünme yoluyla veya polimer/ilaç karışımının sıkıştırılması yoluyla oluşturulmaktadır (Langer and Peppas 2003).

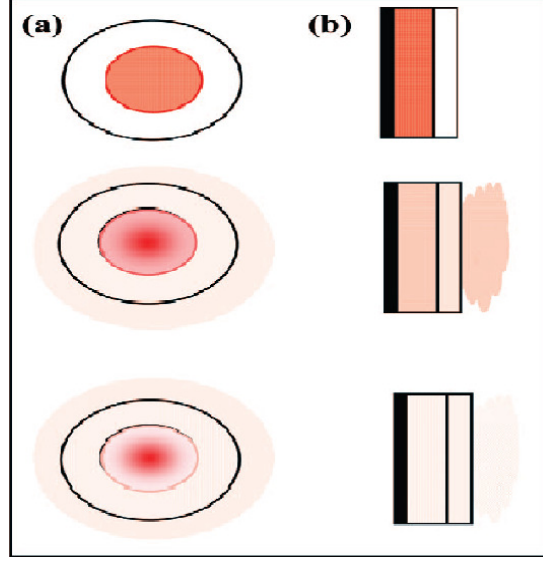


Şekil 2.3 Matriks cihazı.

Difüzyon, polimer zincirleri arasında geçiş yoluyla moleküler düzeyde veya polimer matriks içindeki gözenekler vasıtasıyla makroskopik ölçek üzerinde meydana gelebilmektedir. Difüzyon-salın sistemlerinin örnekleri Şekil 2.4 ve 2.5’de görülmektedir (Valle et al. 2009).



Şekil 2.4 Matriks sistem tarafından difüzyon.



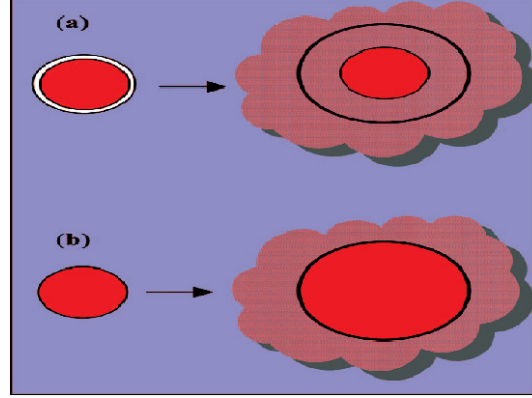
Şekil 2.5 Rezervuar sistem tarafından difüzyon: (a) implante veya oral rezervuar; (b) transdermal ilaç salım sistemi.

Şekil 2.4’de polimer ve aktif ajan homojen formda karışmaktadır. İlaç polimer matriksten dış çevreye geçtiğinde difüzyon olmaktadır. Salım devam ettikçe, aktif ajan difüze olmak için daha uzağa ilerlediğinden ve daha düşük konsantrasyon gradiyentine sahip olduğundan dolayı hız normal olarak azalmaktadır. Rezervuar sistemler için Şekil 2.5’te görüldüğü gibi ilaç salım hızı tamamen sabit kalabilmektedir. Bu tasarımda, polimer matriks içerisindeki katı ilaç, seyreltik veya yüksek konsantrasyonlu ilaç çözeltisi, hız kontrollü membran veya film tarafından salınmaktadır. İlaç salımını sınırlandıran yapısal etkinlik, rezervuarı çevreleyen polimer tabakasıdır. Bu polimer kaplamasının muntazam olması ve kalınlığının değişmemesinden dolayı aktif ajanın difüzyon hızı, salım sistemi boyunca tamamen sabit kalabilmektedir. Şekil 2.5 a’da görülen sistem implante veya oral rezervuar salım sistemidir, oysaki Şekil 2.5 b’de görülen sistem, gerçekte cihazın sadece bir bölgesinden ilacın salındığı transdermal ilaç salım sistemidir (Leong and Langer 1987, L 1997, Valle et al. 2009’dan).

2.1.2.2 Erozyon Kontrollü Sistem

Uygun biyolojik çevreye yerleşim esnasında, ajan veya ajanların salınmaması için tasarlanan ilaç salım sistemleri söz konusudur. Şişme kontrollü salım sistemleri başlangıçta kurudur ve vücuda yerleştirildiğinde suyu veya diğer vücut sıvılarını absorplar ve şişer (Leong and Langer 1987, Nam et al. 2004). Şişmenin hem polimer serbest hacmi hem de formülasyon

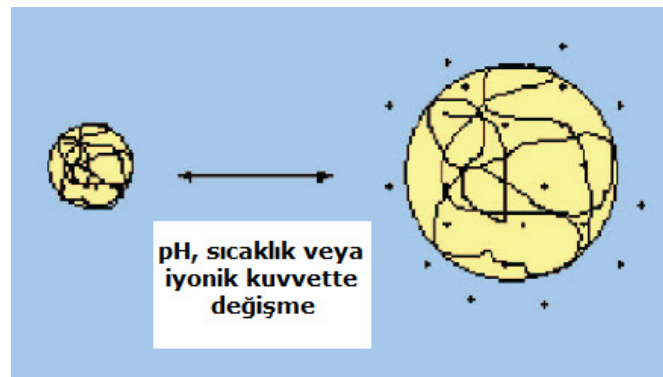
içindeki sulu çözücü içeriğini arttırması, dış çevreye, şişen sistem içindeki ilacın difüze olmasını sağlamaktadır. Bu tür cihazlar için örnekler; sırasıyla rezervuar ve matriks sistemler Şekil 2.6 a ve b’de gösterilmektedir (Valle et al. 2009).



Şekil 2.6 İlaç salımı (a) rezervuar ve (b) matriks şişme kontrollü salım sistemleri.

Şişme kontrollü salım sistemlerinde kullanılan çoğu materyaller, su veya diğer biyolojik sıvıya yerleştirildiğinde çözünmeksizin şişen polimerik hidrojeller üzerine kurulmuştur. Polimer yapısı, şişmiş jel fazını oluşturarak çözücüyü koruyabilmektedir. Bunlar çapraz bağlı sistemler olduğundan dolayı çözücünün özellikleri ne olursa olsun çözünmezler (Nam et al. 2004).

Polimere bağlı olarak çevresel değişimler sırasıyla pH, sıcaklık veya iyonik kuvvettir ve sistem, çevresel faktörlerden herhangi birindeki değişmeye bağlı olarak büzülebilmekte veya şişebilmektedir (Aminabhavi et al. 2004). Şekil 2.7’de (Valle et al. 2009) duyarlı sistemlerin yapısal değişimleri gösterilmektedir (Leong and Langer 1987, Kim 1996, Puttipatkhachorn et al. 2001, Powell 1996).

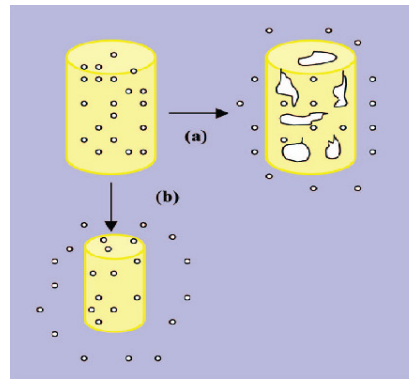


Şekil 2.7 Çevreye duyarlı salım sistemlerinden ilaç salımı.

Bu tip sistemlerde ilaç salımı, polimer şiştiği zaman gerçekleşmektedir. Çoğu pH duyarlı polimerlerin yüksek pH değerlerinde şişmesi ve düşük pH değerlerinde büzüşmesi ilaç salımına neden olmaktadır (Haystead 2003, Valle et al. 2009'dan). Bu gibi materyaller, midede düşük pH değerinde fakat barsak üzerinde oldukça yüksek pH değerinde ilacın salınmadığı durumlarda oral salım sistemleri için idealdir (Kiil and Dam-Johansen 2003).

2.1.2.3 Polimer Degradasyonu ve Erozyonu

Bu materyaller, aktif ajanın salımı gerçekleştirildikten sonra ilaç salım sisteminin uzaklaştırılması gerekliliğini ortadan kaldırmakta, doğal biyolojik prosesin sonucu olarak vücut içerisinde degrade olabilmektedir (Jain 2000). Biyobozunur polimerlere göre degradasyonun kimyasal bir proses olduğunu tanımlamak gerekir, oysaki erozyon, çözünme ve difüzyon prosesine dayanan fiziksel bir olaydır (Tom and Debendetti 1991). Polimer çatısının kimyasal yapısına bağlı olarak erozyon, yüzey veya yığın erozyonu yoluyla oluşabilmektedir. Yüzey erozyonu, erozyon hızı polimer yığın içerisindeki su geçirgenlik hızını aştığında meydana gelmektedir ve erozyon kinetiği ve ilaç salım hızı tekrarlanabilir olmasından dolayı gerekmektedir. Su molekülleri erozyona göre daha hızlı bir oranda matriks yığını içerisine nüfuz ettiği zaman yığın erozyonu meydana gelmektedir, bu sebeple kompleks, degradasyon/erozyon kinetiği göstermektedir. Çoğu biyobozunur polimerler, polimer zincirlerinin hidrolizi şeklinde daha küçük bileşiklere degrade olabilecek biçimde tasarlanmıştır. Degradasyon, şematik olarak Şekil 2.8'de gösterildiği gibi matriks boyunca polimerin degrade olduğu yığın hidrolizi yoluyla meydana gelebilmektedir. Bazı degrade olabilen polimerler için özellikle polianhidritler ve poliortoesterlerde degradasyon sadece polimerin yüzeyinde olmakta ve ilaç salım sistemlerinin yüzey alanıyla orantılı salım hızıyla sonuçlanmaktadır (Şekil 2.8 b) (Valle et al. 2009).

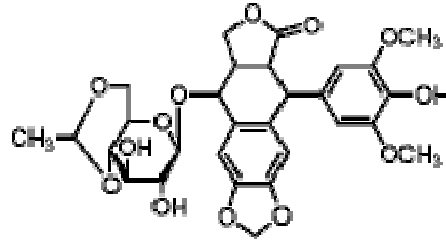


Şekil 2.8 İlaç salımı (a) yığın-aşınan ve (b) yüzey-aşınan biyobozunur sistemler.

2.2 KANSER TEDAVİSİNDE YAYGIN OLARAK KULLANILAN ETKEN MADDELER

İlaç hedefleme ve katı tümöre taşıma, ilaç salım sistemlerinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir alandır. Katı tümöre yüksek konsantrasyonda ilacın taşınması için araştırmalar halen devam etmektedir. Son yıllarda antikanser ajanların tümöre ulaştırılmasında çeşitli ilaç modifikasyonları (Nomura et al. 1998), taşıyıcı sistemler (Seong et al. 2003, Maeda et al. 2001, Nakanishi et al. 2001, Junping et al. 2003) ve ultrason (Marin et al. 2002) gibi birtakım teknikler geliştirilmiştir.

Bu amaçla etoposid, paklitaksel, doksorobusin, 5-florourasil, sisplatin, triptorelin, deksametazon gibi çeşitli antikanser ilaçlar kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilaçlardan etoposid podofilotoksinin türevidir ve lipofilik bir antineoplastik, antimitotik, yarı sentetik ve sitotoksik ajan olarak etkilidir. Antineoplastik ajan olarak, topoizomera II'yi önlemektedir ve limfoma beyin kök gliomaz, SCLC (küçük hücre akciğer karsinoma), mide, beyin, testis ve ovaryum kanseri gibi çeşitli tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Direkt olarak etoposidin sebep olduğu indirgenme-yükseltgenme aktivasyon reaksiyonları ve topoizomera II inhibisyonu sonucu üretilen türevler DNA'ya bağlanmakta ve DNA'ya zarar vermektedir (Chamberlain 1993, Ashley et al 1996). Etoposidin kimyasal yapısı Şekil 2.9'da gösterilmiştir (URL-1 2010).



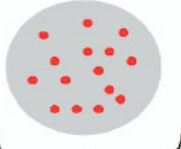
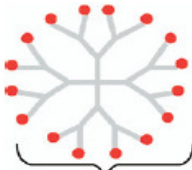
Şekil 2.9 Etoposidin kimyasal yapısı.

2.3 KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER

Kontrollü salım cihazlarının (nanotaşıyıcılar olarak da geçmektedir) yaygın olarak kullanılan örnekleri polimerik nanopartiküller, dendrimerler, nanotabakalar, lipozomlar, nanopartikül temelli nükleik asitler ve manyetik nanopartiküllerdir (Ferrari 2005). Nanotaşıyıcılar, ilaç etkinliğini arttıran, ilaç toksisitesini düşüren ve uzatılmış zaman periyodunda ilacın terapötik

kararlı hal seviyesine ulaşmasını sağlayan potansiyele sahiptirler. Sonuç olarak nanotaşıyıcılar, hedeflenmiş ilaç salımı (Bae et al. 2005, Nasongkla et al. 2006) için multifonksiyonel sistemlerin gelişimini kolaylaştırmakta, eş zamanlı terapötik ve diagnostik uygulamalar için sistemleri veya gerekli tedavileri birleştirmektedir (Larina et al. 2005). Kanseri nanoteknolojisindeki en büyük atılım, terapötik (Abraxane, Doxil, DaunoXome) ve diagnostik (Feridex) uygulamalar için FDA tarafından onaylanan nanotaşıyıcıların çeşitli örneklerinin tanımlanması olmuştur (Çizelge 2.1) (Green et al. 2006, Ellerhorst et al. 1999, Fassas and Anagnostopoulos 2005, Wang et al. 2001).

Çizelge 2.1 Polimerik matriks içerisine hidrofilik ve hidrofobik küçük molekül ve makromoleküler ilacın enkapsüle edildiği polimerik nanopartiküller.

İlaç salımı için nanopartikül platformu		
Nanopartikül	Materyal	Yapı
Polimerik	Poli(laktik-ko-glikolid) Poli(laktik) Poli(kaprolakton) Poli(ortoester) Poli(anhidrid) Poli(beta-aminoester)	 60-250 nm
Lipozom	Doxil/Caelyx: PEG-DSPE:HSPC/Kolesterol (5:56:39) DaunoXome: DSPC/Kolesterol (2:1)	 20-250 nm
Dendrimer Dallanmış	Poli(amidoamin) Poli(etilenimin) Poli(peptid)	 5-200 nm

Sırasıyla içi boş lipozom ve bunların hidrofobik membranlarının içerisine hidrofilik ve hidrofobik ilaçların enkapsüle edildiği lipozomlar. Dendrimerlerin, salım için terapötik ve diagnostik konjugatların kullanıldığı yüzey fonksiyonel gruplar ile dallandırıldığı birimler (Alexis et al. 2008).

2.3.1 Mikrokapsüller

Mikrokapsüller bir çekirdeğin çeperle kaplanması sonucu oluşan dozaj şeklidir. Mikrokapsülleme ise katı, sıvı ve gazın inert, polimerik bir madde ile bir film halinde kaplanması işlemidir. Genel olarak etkin madde çekirdek, kaplama maddesi de çeper adını alır. Mikrokapsüllemenin amacı sıvıların kolay taşınmasını sağlamak için katı hale getirmek, uçucu maddelerin buharlaşma kaybını azaltmak, istenmeyen tat ve kokuyu gizlemek, geçimsizliği gidermek, atmosfer koşullarından korumak, stabiliteyi arttırmak, etki süresini uzatmak ve kontrollü salın sistemleri üretmektir (Gürsoy 2002).

2.3.2 Mikroküreler

Çapları birkaç μm 'den birkaç yüz μm 'ye kadar değişebilen, monolitik yapıdaki mikro taşıyıcılardır. Mikrokürelerin özellikleri, etkin maddeyi kontrollü şekilde salması, etkin maddeyi hedef organ, doku ve hücreye taşıması, etkin maddenin yapı ve aktivitesini değiştirmemesi, hedefe ulaşınca kadar etkin madde sızıntısı olmaması, düşük dozda ilaç kullanılması, düşük dozdan dolayı toksisitenin azalması, in-vitro ve in-vivo koşullarda dayanıklı olması, biyolojik olarak parçalanabilmesi ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması ve biyolojik sistemle uyumlu olmasıdır.

Mikrokürelerin hazırlanmasında doğal ve sentetik birtakım polimerler kullanılır. Doğal polimerler arasında aminopolisakkaritler, proteinler, lipitler, karbonhidratlar; sentetik polimerler arasında da biyolojik olarak parçalanabilen ve parçalanamayan polimerler sayılabilir (Tunçay and Çalış 1999, Watts et al. 2001). Bunlardan yağ asitleri, vücudun doğal bileşiminde bulunduğu için biyobozunur polimerlerin hazırlanması için uygun adaydır, hidrofobiktir ve güvenilir oldukları düşünülmektedir. Bu sebeple ilaç taşıyıcısı olarak kullanıldıklarında uzun zaman periyodunda enkapsüle edilmiş ilacı tutabilmektedir (Slivniak and Domb et al. 2005, Slivniak et al. 2006). Bu amaçla PMMA homopolimer, PLO-g-PMMA, PSB-g-PMMA, Plina-g-PMMA ve PHA-g-PLina-g-PMMA hidrofobik birimler üretilmiştir ve farklı bileşimlerde bir seri mikro ve nanopartiküller hazırlanmıştır (Kilicay et al. 2010).

Mikroküreler farmasötik uygulamalarda, rutin teşhis işlemlerinde pulmoner perfüzyon maddesi olarak, damar çaplarının ölçülmesinde, dolaşım sistemi fonksiyonlarının

incelenmesinde, anjiyografide mikroemboli oluşturarak, biyoafinite kromatografisinde taşıyıcı şeklinde, kromatografi kolonlarında kolon dolgu maddesi olarak kullanılırlar. Genel olarak oral ve parenteral yolla uygulanırlar (Gürsoy 2002).

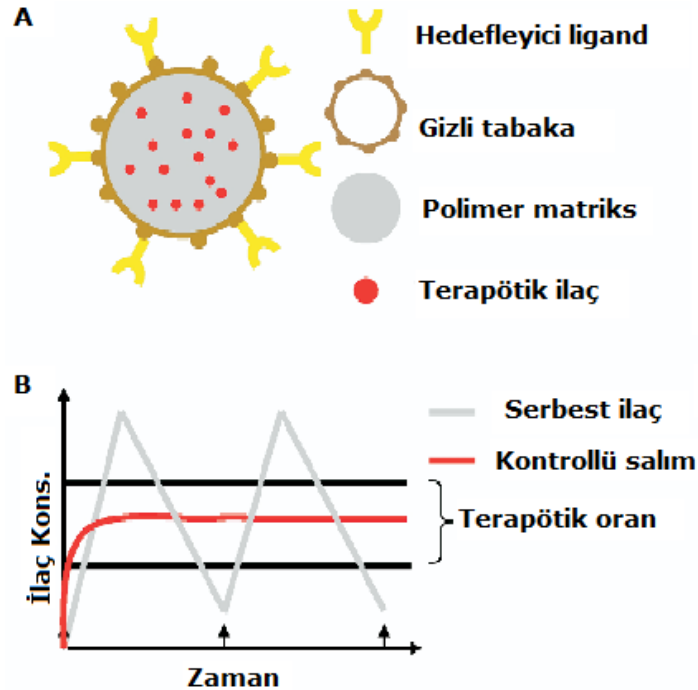
2.3.3 Nanopartiküller

Nanopartiküller, büyüklükleri 10-1000 nm arasında değişen, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe olan etkin maddeyi kontrollü olarak salan katı koloidal partiküllerdir. Nanopartiküller, nanoküre ve nanokapsül olarak da isimlendirilebilirler. Nanokürede etkin madde matriks sistem içinde homojen olarak dağıtılmıştır, nanokapsülde ise etkin madde bir polimerik membranla çevrilmiştir. Nanopartiküllerden istenen özellikler, ilacı kontrollü olarak salması, etki etmesi istenen bölgede toplanması, sterilize edilebilmesi, stabilite sorunları olmaması, taşıyıcının fizyolojik ortamda parçalanması ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması gibi özelliklerdir.

Nanopartiküller hücreye fagositoz yoluyla girer ve hücre içindeki lizozomal enzimler tarafından parçalanırlar. Nanopartiküller pasif hedeflendirme ile en fazla karaciğer ve böbreklerde toplanırlar ve karaciğerin kanser ve paraziter hastalıklarında kullanılırlar. Nanopartiküller aktif olarak da hedeflendirilirler. İntravenöz olarak verilen nanopartiküllerin, retiküloendotelial hücrelerin fazla olduğu karaciğer, dalak, kemik iliğinde; deri altı ve adale içine verildiklerinde ise böbrek ve barsaklarda yoğunlaştıkları, idrar ve feçes yoluyla atıldıkları gösterilmiştir.

Nanopartiküller antikanserojen, antiinflamatuvar, antiparaziter ilaçlarda, insülin ve pilokarpin gibi ilaçların taşınmasında ve aşı adjuvanı olarak kullanılırlar (Gürsoy 2002). Diğer ilaç salım metodları ile karşılaştırıldığında kontrollü salım polimer sistemleri uzun periyot zamanlarında optimum oranda ilaç düzeyi sağlayabilmektedir. Bu sebeple, yüksek toksik özellikte, zayıf çözünen veya kararsız ilaçların kullanımı çoğalırken, bu sistemler ilacın etkinliğini ve maksimum düzeyde hasta uyumunu artırmaktadırlar. Kontrollü salım sistemlerinin kullanımındaki diğer bir avantaj, istenen oranda ilaç düzeyinin devam ettirilmesi, daha az yönetime ihtiyaç duyulması, optimal düzeyde ilacın kullanımı ve hasta uyumunun artırılmasını kapsamaktadır.

Polimerik nanopartiküller kanser kemoterapisinde etkin olan nanotaşıyıcıları temsil etmektedir (Gref et al. 1994, Moghimi et al. 2001). Bu nanopartiküllerin yüzeyi spesifik olarak kanser hücrelerini hedeflemek için fonksiyonelize edilebilmektedir. Terapötik etkinliklerini arttırmak için uzatılmış sistemik dolaşım yarı ömrüne sahiptirler. Nanopartikülün yüzeyi genellikle, graftlama, konjugatlama veya yüzeyine polietilenglikol (PEG) gibi hidrofilik bir polimerin adsorblanması şeklinde sterik olarak kararlı hale getirilebilmektedir (Gref et al. 2000, Owens and Peppas 2006). Polimerik nanopartiküller hidrofilik veya hidrofobik küçük ilaç moleküllerinin salımı için kolaylıkla formüle edilebilmektedir. Polimer sistemleri, protein (Tobio et al. 1998) ve nükleik asit (Perez et al. 2001) gibi makromoleküllerin salımı için geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Biyobozunur polimerler, normal metabolik yolla vücuttan uzaklaştırılabilmekte ve metabolize olarak monomerlerine ayrı ayrı parçalanabilmektedir. Polimer degradasyon hızı ve sonrasında ilaç salımı, kopolimerlerin sentezi veya yeni polimerlerin keşfi, polimer yan zincirlerinin modifikasyonu yoluyla kontrol edilebilmektedir. Göğüs, pankreas ve ovaryum kanserlerinin sistemik tedavisinde kullanılabilecek hedeflenmiş nanopartiküller geliştirilmiştir (Şekil 2.10) (Alexis et al. 2008).



Şekil 2.10 (A) Hedeflenmiş polimerik nanopartiküllerin şematik gösterimi. (B) Serbest ilacın sistemik salımıyla polimerik kontrollü ilaç salım sisteminin plazmadaki ilaç konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

2.3.4 Lipozomlar

Lipozomlar, tek katmanlı/çok katmanlı amfifilik doğal veya sentetik lipidli nanopartiküller oluşturmaktadırlar (Torchilin 2005). Lipidler, hidrofilik baş grup ve hidrofobik uzantıyla karakterize edilmektedirler. Hidrofobik etkileşim yoluyla lipozomlar çift tabakalı lipid oluşturmaktadır ve eş zamanlı olarak hidrofilik ve hidrofobik molekülleri taşıyabilmektedir. Hidrofobik ve hidrofilik moleküller, sırasıyla lipid çift tabaka ve içi boş çekirdek içerisine enkapsüle edilebilmektedir. Dolaşımı uzatan ve tümör toplanmasını arttıran lipozomlar, bir seri modifikasyon yoluyla geliştirilmişlerdir (Torchilin 2005).

2.4 İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİNİN HEDEFLENDİRİLMESİ

2.4.1 Hedeflendirme Mekanizmaları

İlaçların hedeflendirilmesinde iki yol izlenir;

- pasif (doğal) hedeflendirme
- aktif hedeflendirme

Aktif hedeflendirme de kendi arasında üçe ayrılır;

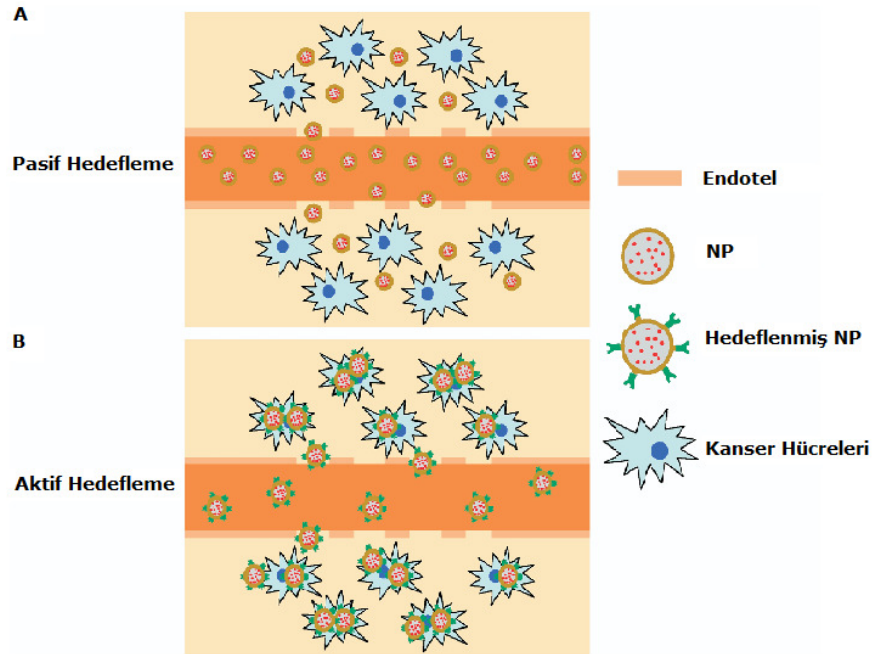
- manyetik hedeflendirme
- ultrasonik hedeflendirme
- ligant-reseptör aracılı hedeflendirme

2.4.1.1 Pasif Hedeflendirme

İntravenöz enjeksiyondan sonra taşıyıcının pasif hedeflenmesi, organ, doku ve hücreye yerleşmesidir. Hidrofobik özelliğe sahip küçük partiküler sistemler kan dolaşımına girer girmez plazma bileşenleri tarafından hızla kaplanarak genellikle retikuloendotelial sistemde (RES) toplanırlar. Pasif hedeflendirmede ilaç taşıyıcı sistemlerin, yüzey yükleri, partikül boyutları, veriliş yolları ve yüzey hidrofobisitesi değiştirilerek farklı hedeflere yönlendirilebilirler. Retikuloendotelial sistemlerin yabancı partikülleri kandan uzaklaştırma yeteneğinden faydalanarak etkin madde yüklü taşıyıcıların makrofajlarla pasif olarak hedeflendirilmesi olasıdır (Gürsoy 2002).

2.4.1.2 Aktif Hedeflendirme

Aktif hedeflendirme mikropartiküler sistemlerin retikuloendotelial sistemde toplanmaması, doğal dağılım modelinin değiştirilmesi sonucunda spesifik hücelere, dokulara veya organlara yönlendirilmesi temeline dayanmaktadır. Sistemde doğrudan etkin maddeye veya etkin maddeyi taşıyan taşıyıcıya bağlı hedefleyici bir madde bulunmaktadır. Manyetik, ultrasonik ve ligant-reseptör aracılı hedeflendirme olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Gürsoy 2002) (Şekil 2.11).



(A) Nanopartiküller, endotel tabakasına şekle görüldüğü gibi mikrovasküler sızıntı şeklinde pasif ekstravazasyon yoluyla dokudaki tümör parçası içerisine konsantre edilmişlerdir (açık portakal renkli olan). Bu prosesin adı, alıkonmuş etki ve pasif kanser hedeflemedir. Bu durumda nanopartikülün etkinliği, kanser hücrelerine ilacın lokal salımı yoluyla aracılık etmektedir. (B) Hedeflenmiş nanopartiküller benzer şekilde alıkonmuş etki ve pasif hedefleme yoluyla dokudaki tümör parçası içerisine konsantre edilmiştir fakat öncelikle nanopartiküller, kanser hücrelerinin yüzeyi üzerindeki hedef antijenlerine bağlandıktan sonra kanser hücreleri tarafından aktif olarak başlatılmaktadır. Bu durumda ilaç, kanser hücreleri içerisine salınmaktadır (Alexis et al. 2008).

Şekil 2.11 Nanopartiküllerin hedeflendirildiği şematik gösterim.

2.4.1.2.1 Manyetik Hedeflendirme

Pahalı, dayanıksız, toksik ve tedavi amacıyla belirli bölgeye yönlendirilmesi amaçlanan ilaçların istenilen bölgede yoğunlaşmasını sağlamak ve salımını kontrol etmek amacıyla manyetik partiküller ve manyetik alan kullanılarak yapılan hedeflemedir (Widdler and Senyei

1984). Mikrovasküler engelleri geçebilmesi, enjekte edilen dozun en az %60'ını hedef dokuya taşıması, serbest ilacın dolaşımdaki konsantrasyonunun 100 kat azalması, normal doku hücrelerinin hasarının azalması, dokuda kontrollü bir şekilde ilaç bulunmasının sağlanması gibi avantajları nedeniyle bölgesel rahatsızlıkların tedavisinde daha etkin olduğu görülmüştür. Bu avantajlarının yanında pahalı olması, özel mikropartikül ve mıknatıs gerektirmesi, manyetik hedefleme, izleme yöntemlerinin gerekliliği ve uzun dönemde magnetit depozisyonuna neden olması gibi dezavantajları vardır (Gürsoy 2002).

2.4.1.2.2 Ultrasonik Hedeflendirme

Ultrasonik dalga kontrollü sistemlerde biyolojik olarak aşınan ve aşınmayan polimerler ilaç taşıyıcısı olarak kullanılırlar. Bu sistemler etkin maddelerin vücudun istenilen bölgesinde yoğunlaşmasını sağlayan ve istenilen miktarda salımını kontrol edebilen sistemlerdir (Gürsoy 2002). Salım, ultrasonik dalgaların şiddet, frekans ve uygulama döngüsüne bağlıdır (Sheppard and Langer 1992, Kost 1993, Kost et al. 1994).

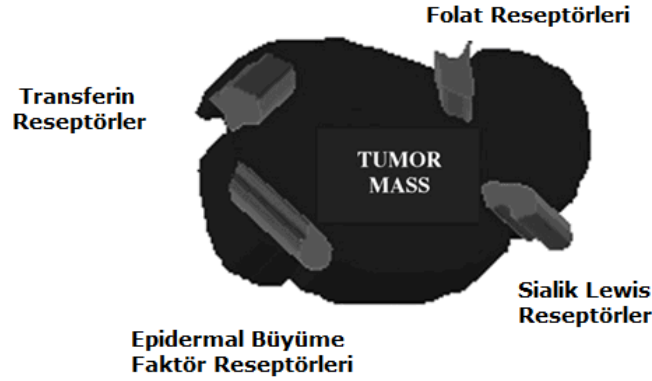
2.4.1.2.3 Ligand-Reseptör Aracılı Hedeflendirme

Taşıyıcı sistemler hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere yönlendirilerek, hücre içine alınma ligantın ve reseptörün yapısına bağlı olarak reseptör aracılı endositoz veya transitoz ile gerçekleşmektedir. Ligand, hedeflenen hücrede bulunan reseptörün özelliklerine göre seçilmelidir. Bu seçimde ligandın özellikleri (özgünlüğü, tipi, hücre içine internalizasyon kapasitesi ve hızı, reseptöre olan ilgisi ve bağlanması, taşıyıcı sistemin ligandın fizikokimyasal özelliklerine etkisi) ve reseptörün özellikleri (antijen/reseptör yoğunluğu, epitopun lokalizasyonu, reseptöre bağlanmanın doygunluğa erişmesi, hücre yüzeyinde ekspresyonun artması/azalması, hücre içine internalizasyon hızı) gözönünde bulundurulmaktadır.

Ligant-reseptör aracılı hedeflendirmede kullanılan belli başlı ligandlar; lektinler, monoklonal antikorlar, monoklonal antikor-enzim konjugatları, monoklonal antikor fragmanları, vitaminler, sitokinler, peptid yapıdaki büyüme faktörleri, glikoproteinler, viral proteinler, hücre adezyon molekülleri, toksinler, apolipoproteinler ve glikoaminoglikanlar bulunmaktadır (Gürsoy 2002). Ligantlar doğrudan ilaca, polimer-ilac konjugatına kovalent bağlanabildiği

gibi, lipozomal taşıyıcılarda lipozom membranına veya yüzeyde kaplı bulunan polimerin dış ucuna da bağlanmaktadır (Eldem and Speiser 1989b, Vyas et al. 2001).

Tümör hücreleri için çeşitli reseptörler kullanılmaktadır (Şekil 2.12) (Agarwal et al. 2008). Bu reseptörler, neovaskülarizasyon için ihtiyaç duyulan biyoaktifliğin sağlanması yoluyla tümör kütlelerini desteklemektedirler.



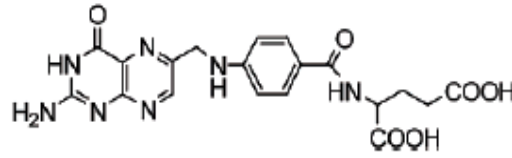
Şekil 2.12 Tümör hücreleri üstündeki çeşitli reseptörler.

Tümör tedavisinde en etkili ligandlardan biri, tümör-spesifik ilaç salım sistemlerine folat hedeflemesidir (Dube et al. 2002, Wang et al. 1997, Stella et al. 2000, Lee et al. 2003, Christopher and Philip 2001). Folat, tümöral hücrelerin yüzeyinde var olan folat reseptörle spesifik olarak bağlanan düşük molekül ağırlıklı ($M_w = 441$ Da) vitamindir (Sudimack and Lee 2000, Turek and Leamon 1993). Folat reseptörü (FR), ovaryum, kolorektal ve göğüs kanserleri gibi epitelyal habis durumunda kanser hücrelerinin yüzeyinde gözlenmiştir. Oysaki normal dokudaki düzeyi çok düşüktür (Campobell et al. 1991, Ross et al. 1994, Weitman et al. 1992).

Folik asit kararlı, pahalı olmayan ve immunojenik olmayan bir kimyasaldır ve hücre yüzey reseptörü olarak yüksek affiniteye sahiptir (Şekil 2.13) (A. Henne et al. 2006). Vitamin folik asit (FA), tümör hücrelerine hedeflemede kullanılan ligandlardan biridir. Folik asit, DNA sentezinde, hücre bölmesinde hücresel düzeyde ve insan büyümesi ve gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Salazar and Rantam 2007). Folik asit, folat reseptörü (FR) vasıtasıyla hücre içerisine alınmaktadır. Folik asitin folata bağlanması, reseptör yoluyla endositozu başlatmaktadır (Rijnboutt et al. 1996, Birn et al. 1993). Folik asit iki adet karboksilik asit

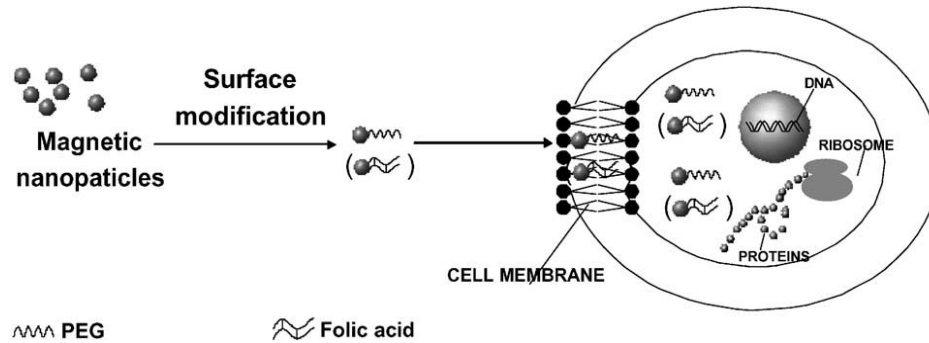
grubuna sahiptir. Bunlardan biri sterik olarak bloklanmıştır, diğer karboksil grubu ise amid grubu yoluyla nanopartiküllere ve diğer çeşitli organik moleküllere bağlanabilmektedir (Zhang 2008).

Çeşitli çalışmalar rapor edilmesine rağmen (Kataoka 1997, Jain 1990) folat konjugatların tedavideki uygulamaları boyutlarından dolayı sınırlandırılmıştır. Geniş moleküllerin, yüksek geçirgenlik ve alıkonma etkisinden dolayı katı tümör içerisinde pasif toplanmaya maruz kalmasına rağmen, tümör içi yüksek basınç neoplastik kütle içerisine geçirgenliği önlemektedir. Bu sebeple tümör bölgesine kolaylıkla ulaşabilecek ve ilacın salınabilmesi için tümör hücreleri tarafından aktif bir şekilde alınabilecek nano boyutlu konjugatların üretilmesi gereklidir.



Şekil 2.13 Folik asitin kimyasal yapısı.

Şekil 2.14 Folik asitle modifiye edilmiş PEG nanopartikülün hücre içerisine alımını göstermektedir (Zhang 2002). Protein adsorpsiyonuna karşı dayanıklı olan, makrofajlar tarafından tanınmayı azaltan ve nanopartiküllerin spesifik olmayan hücre içi alımını iyileştirmek için biyoyumlu PEG nanopartikülleri kullanılmıştır. Folik asit, yüzeylerinde folat reseptörleri barındıran kanser hücrelerine hedeflemede ligand olarak kullanılmıştır ve nanopartiküllerin hücre membranına geçişini kolaylaştırmaktadır (Zhang 2002).



Şekil 2.14 Hücre içerisine yüzeyi modifiye edilmiş nanopartiküllerin alımı.

Kontrollü salım sistemlerinde polimerik taşıyıcıları kullanarak hedefle yüksek oranda etkileşime sahip doğal ve sentetik hedeflendirici moleküllerin doğrudan ilaca ya da taşıyıcıya kovalent bağlanması ile hazırlanan sistemlerle ilaçların hedeflendirilmesine olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Bunun nedeni hedeflendirilmesi istenen ilacın, doku, organ, hücre gibi vücudun spesifik bölgesine seçici olarak taşınmasıdır. Belirli bölgeye seçici hedeflendirme ile yan etkiler azalmakta, optimum düzeyde terapötik yanıt elde edilmekte ve yüksek dozda toksik etkiye sahip kimyasal olarak aktif maddeler güvenli olarak kullanılabilir. (Gürsoy 2002).

Hedeflendirmedeki amaç, geleneksel tedavide gözlenen olumsuzlukları azaltmak, düşük veya yüksek dozlarda güvenli ve etkin tedavi sağlamak, ilaçların kararlılığını arttırmak, ilaçların dolaşımdaki konsantrasyonunu ve salım kinetiğini optimize etmek, toksik ve immunojenik özellikleri en aza indirmek, hücresel düzeylere taşınmayı arttırmak ve vücudun diğer bölgelerinde etkileşime neden olmadan hedef bölgede istenen farmakolojik yanıt elde etmektir (Gürsoy 2002).

İlaçların hedeflendirilmesinde ya bileşiğin hedef bölgeye taşınmasını, hedefte veya taşınma esnasında istenilen bölgede aktif hale gelmesini sağlayan kimyasal modifikasyon ya da mikropartiküler sistemle ilacın etki bölgesine gönderilmesi şeklindeki yaklaşımlardan biri kullanılmaktadır.

Kimyasal modifikasyon sonucunda ilaç, taşıyıcı bileşiğe kovalent olarak bağlanmakta ve elde edilen konjugat hedef bölgede kimyasal veya enzimatik degradasyon ile taşıyıcıdan ayrılmakta ve aktif haline dönüşmektedir. İlacın yapısını kimyasal olarak değiştirmede kullanılan molekül, ilacın taşınmasını ve spesifik olarak tanınmasını sağlayan kısmı oluşturarak, ilacın fizikokimyasal, biyofiziksel ve farmakokinetik özelliklerini değiştirmektedir. Kimyasal modifikasyondaki bir diğer yaklaşım ilacın kendisinin veya ligand ile birlikte taşıyıcıya kovalent bağlanması ve elde edilen polimer ilaç konjugatı ile kontrollü ve/veya hedeflendirilmiş sistemlerin oluşturulmasıdır (Gürsoy 2002).

2.4.2 İlaç Taşıyıcı Sistemin Hücre İçine Alımı

Endositoz hücre dışında bulunan materyalin hücre içine geçişini sağlayan primer hücresel fonksiyondur. Endositozda hücre dışında bulunan makromoleküller hücre membranı ile etkileşmekte ve membranda oluşan veziküler yapı içinde hücre içine alınmaktadır.

Endositozla hücre içine alınma üç şekilde olmaktadır;

- fagositoz
- pinositoz
- reseptör-aracılı endositoz

Fagositoz vücutta partiküler maddelerin, bakterilerin, yaşlanmış hücrelerin ve yabancı cisimlerin dolaşımdan uzaklaştırılmasında kullanılan hücresel fonksiyondur. Fagositozun gerçekleşmesinde etkili olan faktörler; partiküler materyalin hidrofobik yapısı, hidrojen bağı oluşturmaması, sertliği, moleküler büyüklüğü, yükü ve kimyasal bileşimidir. Bunlara bağlı olarak partiküler materyallerle hücre arasındaki etkileşim artmakta veya azalmaktadır. Pinositoz ekstrasellüler sıvıların hücre içine alımını sağlayan yapısal bir işlemdir.

Ligant-reseptör kompleksi hücre içine endozom veya reseptozom olarak adlandırılan veziküller ile taşınmaktadır. Ligant ve reseptörün hücre içine transportunda hem içinde parçalayıcı enzimler bulunmayan endozom, hem de reseptör ve ligandın yapısal özellikleri etkilidir (Gürsoy 2002).

2.5 KANSER VE KANSER TEDAVİSİ

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz ve anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesine ve yayılmasına neden olmakta, insan sağlığını tehdit etmekte ve ölüme sebep olmaktadır. 1990 ile 2001 yılları arasında kanser araştırmalarına ayrılan toplam maliyetin yaklaşık 156.7 milyar dolar olduğu tahmin edilen Birleşmiş Millet'lerde yaklaşık 16 milyon yeni kanser vakası teşhis edilmiştir. 2002'de yaklaşık 1.3 milyon kanser vakası ortaya çıkmıştır ve 500 milyon kişi kanserden ölmüştür (American Cancer Society 2002a, Feng and Chien 2003'ten). Kanser tedavisindeki araştırmalar halen devam etmektedir. Asırlar öncesinde kanserli kişilerin hayatta kalma şansı yoktu, bugün ise teşhis konulan her üç insandan ikisi beş yıl sonra bile hala hayatta kalabilmektedir. Kanser tedavisi oldukça zor olmasına rağmen tedavinin sürekliliği hayatta kalma şansını arttırması açısından önemlidir. Son on yılda kanserden ölenlerin sayısında %10 azalma görülmüştür (Eschenbach 2004).

Kanser tedavisinin gelişimi, hastalığın farkına varılması, önlenmesi, elimine edilmesi ve kontrolü için hücresel, genetik ve moleküler mekanizmanın anlaşılması gerekmektedir (Eschenbach 2004). Tümörün radyasyon yoluyla sterilizasyonu ve/veya cerrahi olarak uzaklaştırılmasından sonra arta kalan tümörlü yapının tedavisi, çeşitli sistemik terapilerin kullanılması yoluyla gerçekleştirilmektedir (Jain 1998, Minchinton and Tannock 2006). Bununla birlikte bu terapilerin başarılı olabilmesi için iki şey gereklidir. Birincisi, kullanılan spesifik ajanın, muamele edildiği tümörün in vivo ortopedik mikroçevresinde etkin olması şarttır. İkincisi, ajanın optimal miktarı, hedeflenen tümörün tüm hücrelerine ulaşmalıdır (Jain 1998).

Kanserin oluşum mekanizması ve yayılması hala tam olarak anlaşılmamasına rağmen, dış faktörlere (sigara içilmesi, kimyasallar, radyasyon ve enfeksiyon gibi) ve iç faktörlere (kalıtsal metabolizma mutasyonu, hormonlar ve immun sistem) bağlı olduğuna inanılmaktadır. Bu faktörlerin hepsi kanserin gelişimine neden olmaktadır. Hücre mutasyonunun başlangıcından itibaren saptanabilir kanser oluşumu 10 seneyi aşan bir sürede gerçekleşebilmektedir. Kanser için esaslı bir tedavi yoktur. Amaç oluşumu azaltan ve/veya hafifleten tedaviyi geliştirmektir. Kanserle ilgili tüm kliniksel göstergeler kaybolduğunda kanserin etkinliği azalmaktadır. Ancak kanser hücreleri azalsa da hala varolmaktadır. Etkin tedaviler cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon terapisi ve immunoterapiyi içermektedir. Bu tedavilerin her biri avantaj ve dezavantajlara sahiptir ve bunların birleşimi genellikle etkin sonuçlar göstermektedir. Erken teşhis, cerrahi işlem ve etkin radyoterapi, kemoterapi ve diğer tedaviler, hastanın hastalığının seyrini belirlemede kritik faktörlerdir. Bunlar arasında erken teşhis en önemli faktördür ve düzenli tarama muayenesi kanserin tedavisi ve önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Kanserine gelişimine neden olan faktörlerin tahmini zor olmasına rağmen, kanserin oluşumu, sigara ve alkol kullanımının, şişmanlığın ve güneşe maruz kalmanın kontrol edilmesiyle, kanser taramasından geçilerek, uygun beslenme ve fiziksel aktivite ve rutin davranışların gözlenmesiyle azaltılabilmektedir (American Cancer Society 2002b, Feng and Chien 2003'ten).

Zarar görmüş dokunun ve kanserli tümörün cerrahi olarak uzaklaştırılması oldukça etkindir ve tümör için birincil prosedür olarak düşünülmektedir. Fakat cerrahi açıdan mükemmel sonuca ulaşmak zordur ve genellikle zarar görmüş hücrelerin arta kalması kaçınılmazdır. Cerrahi müdahale, oldukça hızlı bir şekilde metastatik prosesi tetiklemesiyle arta kalan kanserli hücrelerin büyüme hızını değiştirmesi gibi istenmeyen yan etkilere sebep olabilmektedir. Pek

çok durumda hastalar esas tümörün başarılı bir şekilde uzaklaştırılmasından sonra metastatik kanserden ölmektedirler. Kliniksel izlenimlere göre büyük olan tümörü kesip çıkarırken ameliyat esnasında gözlenemediğinden olasılıkla hasta metastatik kanserden ölebilmektedir (Schabel 1977, Weiss and DeVita 1979). Cerrahi girişimi izleyen radyoterapi, kemoterapi, immunoterapi ve diğer tedavi çeşitleri, metastatik kanser hücrelerini öldürmesi veya azaltması açısından önemlidir.

2.5.1 Kemoterapi

Literatürde kemoterapi, herhangi bir hastalığın tedavisi için herhangi bir ilacın kullanımı olarak tanımlanmaktadır. Kanser için kemoterapi direkt öldüren veya kanser hücrelerini kontrol eden kemoterapötik ajanların dar bir manada kullanımı şeklinde anlaşılmaktadır. Kanser kemoterapötik ajanlar toksiktir veya yaşamı tehdit etmektedir. Kanser kemoterapisi ilk 1950'lerde başarılı bir şekilde uygulanmıştır ve tümör büyümesini etkin bir şekilde inhibe ettiği görülmüştür. Aşırı toksisitesinden dolayı antikanser ilaçlı etkin kemoterapi 1960'lı yıllara kadar fazla uygulanmamıştır. 1970'lerin başlangıcında kanser kemoterapisi diğer tedavilerle birleşerek hızla büyümüştür. Burada amaç bazı kanser çeşitlerini tedavi etmek veya en azından hastanın yaşamını umulandan daha da uzatmaktır. Şimdiye kadar yüz antikanser ajanı klinik kullanımlar için uygulanmıştır; bazıları sentetik kimyasallar ve bazıları da doğal ekstraktlardır. Diğer tedavilerle kemoterapinin birleşimi, yabancı hücre ve virüslerin vücuda yayılması ve kontrolsüz hücre büyümesi nedeniyle meydana gelen çeşitli hastalıklarla birlikte kanser için de tedaviler, standart ve temel olmuştur (Feng and Chien 2003).

2.5.1.1 Kemoterapide Karşılaşılan Sorunlar

İlaç, toksisitesinden dolayı oldukça yüksek risk taşımaktadır ve etkin olan ilaçlar daha çok toksik olma eğilimi göstermektedir. Başarılı kemoterapide bile birtakım problemler söz konusudur ve hasta pek çok yan etkiyi tolere etmek ve yaşam kalitesinden ödün vermek zorundadır. Kemoterapinin etkinliği, hastanın durumuna, dozaja ve formuna, kullanılan ilaç gibi pek çok faktöre bağlıdır (Feng and Chien 2003).

2.5.1.1.1 Dozaj Formu

Çoğu antikanser ilaçlar oldukça hidrofobiktir ve bu sebeple suda ve çoğunlukla farmasötik çözücülerde çözünmezler. Birçok antikanser ilacın kliniksel yönetimi için yardımcıları kullanılmalıdır ve bunlar önemli yan etkilere sebep olabilmektedir ve bunlardan bazıları yaşamı tehdit etmektedir. Kullanılabilirlik de ayrı bir problemidir. Antikanser ilaçların dozaj formlarında da problemler vardır (Feng and Chien 2003).

2.5.1.1.2 Farmakokinetikler

Kemoterapötik ajanların dozajı etkinlikleri açısından önemlidir. Kansere hücrelerinin uzun süre yüksek konsantrasyondaki ilaca maruz bırakılması gerekmektedir. İlaç konsantrasyonu, tedavi periyodu esnasında etkinliği ve tölere edilebilirliği arasında daima optimize edilmelidir. Kan konsantrasyonundaki kaçınılmaz dalgalanmalar terapötik etkinlikte dayanıksızlığa neden olmaktadır. İlmli konsantrasyonda ilaca uzun süre maruz kalınması etkin sonuç vermektedir. Kan dolaşımındaki ilacın konsantrasyonu, konsantrasyon-zaman eğrisinin altındaki bölgede kemoterapideki etkinliğin tayininde esastır (Wermuth 2002). Kemoterapideki amaç, yeterli uzun periyotta, uygun konsantrasyondaki ilacın istenen bölgeye doğru zamanda, yüksek etkinlikte salınmasıdır. Buradaki problemler alet ve proses tasarımıdır (Feng and Chien 2003).

2.5.1.1.3 Toksisite

Antikanser ilaçlar sağlıklı hücreleri etkileyebilmektedir. Genelde kanser kemoterapisindeki toksik ilaçlar kanser hücreleri için çok etkindir, normal hücrelere göre hücre döngüleri yoluyla geçişleri çok daha hızlıdır. Kemik iliği ve intestinal epitelyum hücreleri gibi hızlı-döngülü hücreler ciddi şekilde etkilenebilmektedir. Destekleyici tedavi, kemoterapinin devamlılığı için önemlidir. Karaciğer ve böbrek, ilaç metabolizmasında ve salgılamada önemli role sahiptir ve kemoterapiden dolayı zarar görebilmektedir (Feng S and Chien 2003).

2.5.1.1.4 İlaç Direnci

Kemoterapinin etkinliğine rağmen, kanser hücreleri tarafından ilaca karşı direnç geliştiğinden dolayı uzun dönemde başarısız olunmaktadır. İlaç direnci üç kategoriye ayrılmaktadır: tümördeki ilacın düşük konsantrasyonundan dolayı farmakokinetik direnç, küçük hücre

fraksiyonlarının varlığından dolayı kinetik direnç ve ilacın tümör hücrelerindeki biyokimyasal dayanıklılığından dolayı genetik direnç (Feng and Chien 2003).

2.5.2 Radyoterapi

Radyoterapi kanser yönetiminde önemli tedavi seçeneklerinden biridir (Delaney et al. 2005). Araştırmalara göre, kanser tedavisi esnasında en azından bir sefer hastaların %52'si radyoterapi almıştır (Delaney et al. 2005). Kanser tedavisi gören hastaların %40'nın tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi oldukça önemli rol oynamaktadır (The Swedish council on technology assessment in health care 2003, Shafiq et al. 2009'dan). Radyoterapi aynı zamanda, ilerlemiş veya nükseden hastalığın hafifletilmesi ve semptomların kontrolü için hayli etkin tedavi seçeneğidir.

2.5.2.1 Radyoterapide Karşılaşılan Sorunlar

Radyoterapi esnasında kazaya maruz kalma; operasyon hatası veya cihazla ilgili sorunlardan veya radyasyon kaynaklı kazalardan dolayı olabilmektedir (Holmberg 2007). Oluşan hataları ve kazaları azaltmak ve kaza olması durumunda bunun giderilmesi ve hataların organize edilebilmesi için kalite güvence protokolleri yayınlanmıştır (World Health Organization 1988, Shafiq et al. 2009'dan, European Commission 2000, Shafiq et al. 2009'dan, Comprehensive audits of radiotherapy practices 2007, Shafiq et al. 2009'dan, Setting up a radiotherapy programme 2008, Shafiq et al. 2009'dan, International Commission on Radiological Protection 1996, Shafiq et al. 2009'dan, Kutcher et al. 1994, Leer et al. 1998, Novotny et al. 1998, Prevention of accidental exposures to patients undergoing radiation therapy 2000, Shafiq et al. 2009'dan). Vücudun farklı bölgeleri için farklı radyasyon dozlarının hesaplanması ve birtakım tekniksel ölçümleri içerdiğinden dolayı radyoterapideki hatalar halen oldukça yüksektir.

2.5.3 İmmunoterapi

Hastanın kendi immun sistemi ile kanser tedavisinin gerçekleştirilmesi kavramı, akut bakteriyel enfeksiyondan acı çeken hastalarda spontane tumorün etkisinin azalmasının gözlenmesinden sonra ilk kez 1890'larda William B. Coley tarafından tanıtılmıştır (Coley 1991). Kanser immunoterapisinin gelişimi, hastadaki kanser hücrelerini yok etmek için

immun sistemi harekete geçiren çeşitli stratejilerin geliştirilmesiyle ortaya çıkmıştır (Mitchell 2002a, Mitchell 2002b, White et al. 2001, Foss 2002). Bu araştırmalardan ortaya çıkan en önemli keşiflerden biri, tümörle ilgili antijenin tanımlanması ve kansere spesifik immunolojik cevabı sağlamak için terapötik ajan olarak bunların potansiyel kullanımınıdır (White et al. 2001, Slingluff 1999, Wang and Rosenberg 1999, Coulie et al. 2001).

2.6 KANSER NANOTEKNOLOJİSİ

Atomik ve moleküler bileşenler kullanılarak materyallerin üretimi ve tasarımı şeklinde ortaya çıkan nanoteknolojinin, onkoloji ile birlikte tıbbın tüm branşlarında etkin olduğu düşünülmektedir (Ferrari 2005, Farokhzad and Langer 2006). Ulusal Nanoteknoloji Girişimi'nden (NNI; <http://www.nano.gov>) yapılan tanımlamaya göre nanopartikül, boyutları yaklaşık 1 ile 100 nm arasında olan partiküller olarak tanımlanmıştır. Perspektif olarak bu boyutsal oran ele alındığında küçük molekül, virüs, bakteri ve insan saç kesiti yaklaşık olarak sırasıyla 1 nm, 100 nm, 1,000 nm ve 100,000 nm'dir. Nanoteknolojik sistemler, birkaç yüz nanometre boyutuna kadar olan yapılara karşılık gelmektedir ve bileşenlerin oransal tasarlanması yoluyla geliştirilmiştir (Ferrari 2005, Whitesides 2003, LaVan et al. 2003, Farokhzad et al. 2006). Nanomateryaller, çeşitli moleküller ile etkileşim şeklinde ortaya çıkan fizikokimyasal özelliklere ve hacimsel oranda geniş yüzey alanına sahiptir ve diğer eşdeğer materyallerden farklıdır. Tıpta çok yaygın olarak kullanılan nanoteknoloji, yeni terapötik ve görüntüleme tedavilerini içeren geniş bir alana sahiptir. Ulusal Kanser Enstitüsü, kanser ölüm oranını azaltmak için nanoteknolojinin gelişimi açısından 2004'te 144 milyon dolarlık taahhütname yapmıştır ve altı alanı kapsayan olanaklar tanımlanmıştır: (1) hastalığın gelişiminden sorumlu moleküler değişimin bulunması; (2) hastalığın teşhisi ve tanımlanması; (3) ilaç salımı ve terapi; (4) terapötik ve teşhis uygulamalarını birleştiren çok fonksiyonlu sistemler; (5) terapötik ajanların in vivo etkinliğini kaydeden cihazlar; ve (6) temel araştırmaları ve bilimsel gelişmeleri hızlandıracak, teknolojiyi sağlayacak nanoölçekler (Alexis 2008).

2.7 BİYOBOZUNUR POLİMERLER

Günümüzde çok sayıda biyobozunur polimerler sentezlenmiş ve bunları degrade edebilen bazı mikroorganizmalar ve enzimler tanımlanmıştır. Gelişmekte olan ülkelerde, sentetik polimerlerden dolayı oluşan kirlilik tehlikeli boyutlara ulaşmıştır. Bu tür problemlerin çözümü

için, yapılarının modifiye edilmesi yoluyla kullanılan polimerlerle ilgili girişimlerde bulunmaktadır.

Biyobozunma, karbon, azot ve sülfür çevrimi gibi elementel dönüşüm yoluyla yeniden dağıtılan ve çevredeki organik kimyasalların mineralize edilmiş basit bileşiklere dönüştürüldüğü doğal bir prosestir.

Biyoparçalananan polimerler suda çözünmezler fakat biyolojik sıvılarla temas edince kimyasal ve fiziksel değişime uğrarlar. Biyolojik parçalanmada özellikle yığın parçalanmada iki aşama vardır. Birinci aşama, moleküler bağların rastgele kopmasıdır ve bunu sonucunda değişen molekül ağırlığı, polimerin mekanik özelliklerinde ve morfolojisinde değişimlere neden olur ama ağırlık kaybı olmaz (Brannon-Peppas 1997). İkinci aşama, zincir kopması yanısıra ölçülebilir ağırlık kaybıdır. Bu aşamada polimerin molekül ağırlığı iyice azalır ve yapıdan koparak çözünen en küçük birim oligomerler oluşur. Bu oligomerler en yakın dokuya difüze olacaklarından biyolojik olarak uyumlu olmaları istenir. Vücutta parçalanabilen polimerlere örnek Çizelge 2.2’de verilmiştir (Gürsoy 2002).

Çizelge 2.2 Vücutta parçalanabilen polimerler.

Poli(laktik asit)
Poli(glikolik asit)
Poli(kaprolakton)
Poli(alkil siyanoakrilat)
Polianhidrit
Poli(ortoester)
Poli(aminoasitler)

Parçalanabilen bağlar başlıca üç grupta toplanabilir ve bu gruplandırma parçalanabilen bağın bulunduğu yere göre yapılır. Parçalananan bağ, (i) polimer ana zincirinde (ii) çapraz bağlarda (iii) yan zincirlerde olabilir (Mathiowitz et al. 1999). Polimerlerin parçalanması, hidrolitik veya enzimatik mekanizmalarla veya her ikisiyle birden olur. Polimerin parçalanmasında hangi mekanizmanın daha fazla olduğu birçok faktöre bağlıdır, özellikle parçalanma ortamı önemlidir. Ayrıca parçalanma bu mekanizmalardan biri ile başlayıp diğerine dönüşebilir. Bu parçalanma sonucu oluşan ürünler vücut tarafından tekrar absorbe edilir veya normal

biyolojik yoldan elimine edilir. Hidrolizle parçalanan polimerler; poli(laktik asit), poli(glikolik asit), poli(kaprolakton), polianhidritler, poli(orto ester) ve poli(alkil-siyanoakrilat)'dır. Enzimatik olarak parçalanabilenler birçok poli(amino asitler) örneğin poli(L-lisin), poli(L-arjinin), poli(L-aspartik asit), poli(L-glutamik asit) ve poli[N-(2-hidroksietil)-L-glutamin]dir (Brannon-Peppas 1995).

Polimerin parçalanma ürünü vucuttan atılmalı veya absorbe olmalıdır. Oral alınan formülasyonlarda eliminasyon doğal yol izler, oysa parenteral veya diğer yollarla kullanılan formülasyonlarda polimerlerin tamamen parçalandığından emin olmak için analizler yapılması gerekir (Brannon-Peppas and Vert 2000).

Biyobozunurluk bakteri, fungi, maya vasıtasıyla olan bir prosestir ve bunların enzimleri, bu maddeleri yiyecek kaynağı olarak harcamaktadır. Yeterli miktarda oksijen, uygun nem ve sıcaklık koşulları altında biyobozunurluk oldukça hızlı bir prosestir. Sınırlı periyotlarda biyobozunurluk sindirim için uygun bir hedeftir ve toksik ve çevreye zararlı olmayan artıkların yok olmasıdır. Biyobozunur polimerler, tıp, tarım, ilaç salımı ve paketleme gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

2.7.1 Doğal Biyobozunur Polimerler

Biyopolimerler, organizmaların büyüme döngüsü esnasında doğada oluşan polimerlerdir. Bundan dolayı doğal polimerler olarak söz edilmektedir. Bunların sentezleri genellikle kompleks metabolik prosesi tarafından hücre içerisinde oluşan aktive edilmiş monomerlerin zincir büyüme polimerizasyonu ve enzim-katalizli reaksiyonlarını içermektedir (Chandra and Rustgi 1998).

2.7.1.1 Polisakkaritler

Materyal uygulamalarda etkin olan polisakkaritler, sellüloz ve nişastadır fakat daha çok bakteri, fungi ve özellikle ksantan, kurdlan, pullulan ve hyaluronik asit gibi polisakkaritler tarafından üretilen kompleks karbonhidrat polimerlere olan ilgi daha fazladır. Polimerler genellikle bir çeşit karbonhidrat biriminden daha fazlasını içermektedir ve çoğu durumda bu polimerler düzenli bir şekilde sıralanmış dallanmış yapı içerirler. Örneğin nişasta, dallanmış ve lineer polimerlerin (sırasıyla amilopektin ve amiloz) fiziksel bileşimidir fakat sadece bir

çeşit karbonhidrat içermektedir ki o da glikozdur. Bunların dışında belli başlı diğer polisakkaritler; kitin, kitosan, sellüloz ve aljinik asit sayılabilir (Chandra and Rustgi 1998).

2.7.1.2 Doğal Orijinli Polipeptidler

Materyal olarak uygulama alanına sahip proteinlerin çoğu degradasyon olmaksızın çözünemez veya eriyemezler, bundan dolayı doğada bulundukları formda kullanılırlar. Bu tanımlama özellikle fibröz proteinler odun, ipek ve kollajen için geçerlidir. Tüm proteinler, çeşitli α -amino asitlerin düzenli sıralanmasıyla oluşan spesifik kopolimerlerdir, bundan dolayı proteinlerin biyosentezi, farklı enzimleri içeren kompleks bir prosestir (Chandra and Rustgi 1998). Belli başlı doğal orijinli polipeptidlerin başında, peptid bileşikleri veya yapı taşı amino asit olan ürün veren çeşitli proteolitik enzimler yoluyla hidroliz olabilen ve peptid bağları tarafından bağlanmış 19 amino asitten oluşan hayvansal protein olan jelatin gelmektedir (Eastoe and Leach 1977).

2.7.1.3 Bakteriyel Poliesterler

Son 50 yıldır petrokimyasal plastikler en çok uygulanan materyallerden biri olmuştur. Çok yönlü oluşu, üstün teknik özellikleri ve ekonomik oluşu bunları oldukça cazip hale getirmektedir. Günümüzdeki uygulamalar hemen hemen evrenseldir: otomobillerdeki bileşenler, ev aletleri, bilgisayar teçhizatı, inşaat, spor aletleri, paketleme ve plastikler sayılabilir. Fakat bu plastiklerin biyolojik olarak bozunamayan ve çevreye karşı dost olmayan maddeler olduğu bilinmektedir (Zinn et al. 2001).

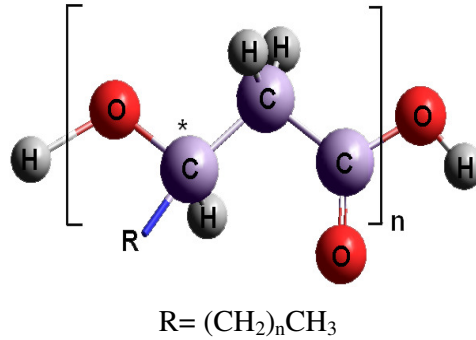
1970'li yıllarda Amerika'da plastik materyallerle ilgili çalışmalar yapılmıştır ve başka ülkelerde de paketleme endüstrisi için fotobozunur ve biyobozunur plastikler üretilmiştir. Bunlara gereksinim duyulmasındaki neden; toksik olmayan materyal ve bozunma ürünlerinin arazi bölgelerindeki boşaltım suları etkilememesi, spesifik kullanımlar için uygun mekanik özellikli polimerler olması, ekonomik açıdan uygunluğu, polimer modifikasyonu yoluyla plastiklerin bozunurluk kontrolü ve işlenebilirliğidir. Bu materyallerin kaynakları biyobozunur olduğu bilinen doğal materyaller ve sentetik biyobozunur polimerlerdir.

Yağ üreten ülkelerde kıtlığın oluşması ve yağ rezervlerinin sonuna gelinmesinden dolayı 1970'lerin ortalarında ham petrolün fiyatları yükselmiştir. Bundan dolayı petrole alternatif

plastik bazlı materyaller araştırılmıştır (Zinn et al. 2001). Petrol bazlı sentetik plastiklerin kullanımı, üretim ve yok etme işlemi esnasında atmosferdeki karbon dioksit düzeyinin artmasına neden olduğundan dolayı katı atık yönetim problemlerine ve küresel ısınma gibi ikincil problemlere neden olmaktadır. Bu problemlere cevap olacak şekilde, sentetik plastiklere alternatif olarak biyobazlı ve biyobozunur polimerlerin uygulanması önerilmiştir. Bu sebeple polihidroksialkanoat gibi biyobozunur polimerlerin araştırılması ve gelişimi Amerika, Japonya ve Almanya’da oldukça önem kazanmıştır (Sudesh and Doi 2005).

2.7.1.3.1 Polihidroksialkanoatların Genel Özellikleri

PHA’lar ilk defa Lemoigne tarafından *Bacillus megaterium*’da gözlenmiş ve karakterize edilmiştir (Lemoigne 1926). PHA’nın tekrarlayan biriminin genel yapısı, bakteri çeşidine ve substrata bağlı olarak (Hazer et al 1998, Casini et al 1997, Tan et al 1998, Curley et al 1996, Hazer et al 1996,. Fritzsche et al 1990b, İbaoğlu et al 2000) Şekil 2.15’de gösterilmektedir. β -karbonu üzerindeki yan zincir uzunluğu arttıkça PHA’nın fiziksel ve mekanik özellikleri kristalin ve sert yapıdan yumuşak ve yapışkan yapıya doğru değişmektedir.



Şekil 2.15 Polihidroksialkanoatların genel kimyasal yapısı. R çeşitli zincir uzunluğunda n-alkil grubunu temsil etmektedir.

- R= metil ise 3-hidroksibutirat, HB
- R= etil ise 3-hidroksivalerat, HV
- R= n-propil ise 3-hidroksikaproat, HC
- R= n-bütil ise 3-hidroksiheptanoat, HH
- R= n-pentil ise 3-hidroksioktanoat, HO
- R= n-hekzil ise 3-hidroksinonanoat, HN
- R= n-heptil ise 3-hidroksidekanoat, HD
- R= n-oktil ise 3-hidroksiundekanoat, HUD
- R= n-nonil ise 3-hidroksidodekanoat, HDD

PHA'lar biyobozunur ve biyouyumlu olduklarından dolayı oldukça caziptirler. Karakteristik özellikleri bakteri içerisinde üretilmesi yoluyla başarılmıştır, bu sebeple biyobozunurluk ve biyouyumluluk için gerekli olan tüm sterospesifiklik [R(-) konfigürasyon içerisinde çatıdaki tüm kiral karbon atomları] temin edilmiştir. Bakteri çeşidi ve büyüme koşulları PHA'nın kimyasal bileşimini belirlemektedir ve tipik olarak molekül ağırlığı 2×10^5 ile 3×10^6 Da arasındadır.

Kısa zincir uzunluğundaki PHA, düşük çözünürlük ve işleme problemi olan yüksek kristaliniteye sahip poli(3-hidroksibütirat)'tır (PHB). PHB, (R)-3-hidroksibütirik asitin oluşturduğu lineer homopolimerdir (Doi 1995). Tekrarlayan biriminde (R)-3HB içeren P(3HB), büyüme koşulları ve mikroorganizmaya bağlı olarak 200,000 ile 3,000,000 Da aralığında yüksek molekül ağırlıklı polimerler içerisinde polimerize olmaktadır (Byrom 1994) Bu homopolimer yüksek erime noktasına (177°C) sahiptir ve 3-hidroksivalerat ile olan kopolimerleri, P(HB-HV), düşük kristalizasyon hızına rağmen benzer yarı kristalin özelliklere sahiptir.

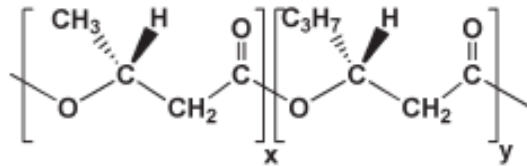
Kısa zincir uzunluğuna sahip olan PHA'lar oldukça sert ve kırılgandır ve biyomedikal ve paketleme film uygulamaları için gerekli olan üstün mekanik özelliklerden yoksundurlar. Orta zincir uzunluğundaki PHA'lar ise elastomeriktir fakat çok düşük mekanik kuvvete sahiptirler. Bu sebeple paketleme materyalleri, biyomedikal, doku mühendisliği ve diğer spesifik uygulamalar için mikrobiyal poliestерlerin mekanik özelliklerinin değiştirilmesi ve iyileştirilmesi gerekmektedir (Grassie et al. 1984, Hrabak 1992, Hazer 2002, 2003).

PHA'lar, monomer birimindeki karbon atomlarının sayısına göre 3 grupta sınıflandırılabilirler: (Steinbüchel and Valentine 1995) 3-5 karbon atomundan oluşan kısa zincir uzunluğundaki PHA; 6-14 karbon atomundan oluşan orta zincir uzunluğundaki PHA; ve 14 karbon atomundan daha fazlasını içeren uzun zincir uzunluğundaki PHA'dır. Orta zincir uzunluğundaki PHA'lar, 39 ile 61°C arasında erime sıcaklığına (T_m) ve -44 ile -30°C arasında camsı geçiş sıcaklığına (T_g) sahip olan doğal poliestерlerdir (Gross et al 1989, Preusting et al 1990, Witholt and Kessler 1999).

PHB biyouyumluluğundan dolayı implant materyal olarak kullanılabilir fakat kristalinitesi ve sertliğinden dolayı kullanımı sınırlıdır. PHB'deki en önemli problem, erime sıcaklığına yakın sıcaklıkta polimerin termal degradasyonunun hızlı olmasıdır (Grassie et al.

1984). PHB'nin fiziksel ve termal özellikleri, *in vitro* ve *in vivo* ortamda diğer hidroksialkanoik asitlerle kopolimerizasyonu yoluyla düzenlenebilmektedir (Hrabak 1992). PHA ailesinin en yeni üyesi poli(3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat) (PHBHHx)'tir. PHBHHx, PHB'ye göre çok miktarda çekilebilir ve işlenebilir özelliktedir çünkü düşük erime sıcaklığı ve kristaliniteye neden olan propil yan zincirine sahiptir. PHBHHx, kuvvetli mekanik özelliklere sahip, mükemmel biyobozunur ve biyoyumluluğu ile mikrobiyal olarak sentezlenen poliesterlerdir. Düşük 3 HHx fraksiyonlu PHBHx kopolimeri, PHA'lar arasında en kullanışlı polimerlerden biri olarak bilinmektedir çünkü PHB ve polilaktik asit (PLA) ile karşılaştırıldığında daha esnek bir materyaldir ve film olarak kullanılabilir uygun mekanik özelliklere sahiptir (Doi et al. 1995).

PhaC-J_{Ac} ve ccr_{Sc} ile donatılan rekombinant türünden olan *R. eutropha*, % 1.2-1.6 mol 3HHx farksiyonu ile % 33-49 kopolierlerden oluşan fruktozdan PHBHx kopolimerini sentezleyebilmektedir (Fukui et al. 2002). Benzer bir şekilde, rekombinant türünden olan *R. eutropha*, % 5.1 mole kadar 3HHx birimli kopolimer üretmektedir (Tsuge et al. 2004). *Aeromonas hydrophila*, büyüme koşullarına bakılmaksızın dodekanoat gibi uzun zincirli yağ asitlerinin varlığında büyütüldüğü zaman yaklaşık % 15 mol 3HHx içeren PHBHx kopolierlerini sentezleyebilmektedir (Lee et al. 2000a). Glukonat, dodekanoat ile birlikte kosubstrat olarak kullanıldığında, rekombinant türü, ortamdaki glukonat konsantrasyonuna bağlı olarak % 3-12 mol 3HHx içeren PHBHx üretmektedir (Qiu et al. 2004). Aynı zamanda, *A. hydrophila* ve *P. putida* rekombinant türü kullanılarak glukonat veya glukoz gibi bağımsız karbon kaynaklarından PHBHx'in biyosentezi gerçekleştirilmektedir (Qui et al. 2005). (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 PHBHHx'in kimyasal yapısı.

Poli(3-hidroksibütirikasit)'in özellikleri:(Steinbüchel and Fuchtenbusch 1998).

- Termoplastik
- Biyobozunur
- Yenilenebilir kaynaklardan elde edilebilir
- Toksik olmayan

- Biyouyumlu
- Yüksek polimerizasyon derecesi
- Suda çözünmezlik
- Doğal çevresinden ekstrakte edildiği zaman yüksek kristalinite
- Optikçe aktiflik
- İzotaktik (tekrarlanan biriminde sterokimyasal olarak düzenlilik)
- Piezoelektrik

PHA'lar normal olarak, karbon kaynağının fazlasında hücreler kültüre edildiği zaman ve sınırlı besinle büyütüldüğü zaman sentezlenmektedir (Witholt and Kessler 1999). Kısa zincirli olanlar *Ralstonia eutropha* ve diğer birçok bakteri tarafından, (Lenz and Marchessault 2005) orta zincir uzunluğunda olanlar *Pseudomonas oleovorans* ve diğer *pseudomonads sensu strictu* tarafından üretilmektedir (Timm and Steinbüchel 1990). Fonksiyonel grup içeren organik bileşikler üzerinde büyütülen hücreler, fonksiyonalize olmuş PHA oluşturmaktadır (Fritzsche et al 1990b, Lenz et al 1990, Lenz et al, 1993, Fritzsche et al. 1990a). Olefin (Preusting et al. 1990.), fenil (Fritzsche et al. 1990b, Hazer et al. 1996), klorür (Doi and Abe 1990), bromür (Kim et al.1992), florür (Abe et al. 1990, Ballistreri 2001'den, Kim et al. 1996), fenoksi (Kim et al. 1996) ve siyanofenoksi (Kim and Gross. 1995) gibi fonksiyonel gruplar içeren PHA'lar, fonksiyonel substrat üzerinde büyütülen *Pseudomonas putida* veya *P. oleovorans* tarafından elde edilmektedir. Fonksiyonel PHA'ların uygun türlerinden biri yan zincirinde doymamış grup içerenlerdir (Kilicay et al. 2010). Doymamış PHA'lar, doymamış doğal yağlardan elde edilen yağ asiti içeren substratlardan elde edilebilmektedir (Hazer et al. 1998, Hazer et al. 2009, Ashby and Foglia 1998, Eggink et al. 1993). *P. oleovorans*, 10-undekenoik asit üzerinde büyütüldüğünde, doymamış yan zincir içeren PHU elde edilmektedir (Gagnon et al. 1994, Dufresne et al. 2001, Hany et al. 2004). Doymamış kopoliester, poli(3-hidroksioktanoat-ko-3-hidroksi-10-undekenoat) PHOU, sodyum oktanoat ve 10-undekenoik asitin eşit miktardaki karışımından elde edilebilmektedir (Park et al. 1998). Doymamış birim içeren PHOU, hidrojel, yapıştırıcı ve biyobozunur elastomerleri içeren geniş uygulama alanına sahiptir (Kilicay et al. 2010). Spesifik olan birtakım fiziksel özellikleri kazanabilmek için doymamış birimler, epoksi, karboksilik asit ve hidroksil grupları gibi fonksiyonel gruplara dönüştürülebilmektedir (Eroğlu et al. 2005, Lee et al. 2000, König et al. 1994, Kurth et al. 2002, Stigers and Tew 2003).

Poliesterler birkaç farklı proses yoluyla elde edilebilmektedir (Steinbüchel and Fächtenbusch 1998).

Poliesterlerin üretimi için prosesler

Kimyasal üretim

- Laktonların halka açılma polimerizasyonunu içeren çeşitli metodlar

Kimyasal ve biyoteknolojik üretimin bileşimi

- Fermantasyon yoluyla üretilen laktik asidin kimyasal polimerizasyonu

Biyoteknolojik Üretim

- Yabani tipi bakteri ve *Archaea*'dan fermantasyon yoluyla üretim
- Mutasyona uğramış bakteriyel türlerden fermantasyon yoluyla üretim
- Rekombinant bakteri ve mayadan fermantasyon yoluyla üretim
- Transgenik bitkilerden üretim
- İzole edilmiş enzimle in vitro sentezi

Doğal kaynaklardan izolasyon

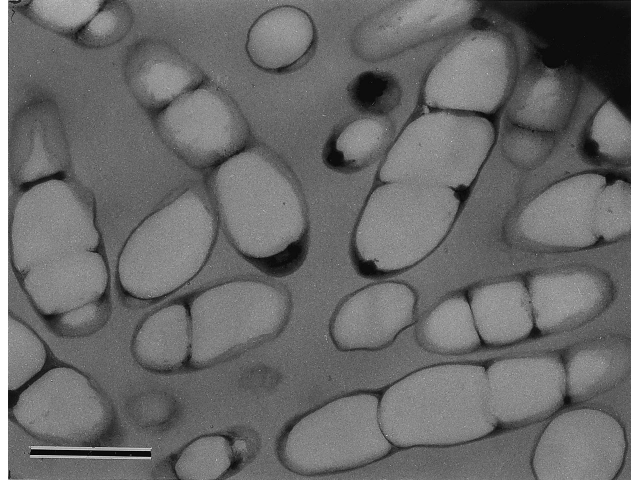
- Örnek olarak bitkilerden kütin

Kısa zincirli PHA'ların karakteristik üyeleri poli(3-hidroksibütirat) PHB; poli(3-hidroksivalerat) PHV; ve poli(3-hidroksibütirat-co-3-hidroksivalerat) PHBV kopolimeridir. Orta zincir uzunluğundaki PHA'ların karakteristik üyeleri ise, 3-hidroksiheksanoatın, HHx 3-hidroksiheptanoat ve/veya 3-hidroksidekanoat ile birlikte 3-hidroksinonanoat veya 3-hidroksioktanoatın kopolimeri olarak oluşmuş olan poli (3-hidroksinonanoat), PHN ve poli(3-hidroksioktanoat), PHO'tır (Gross et al. 1989). Bu hücreler karbon sınırlandırılmasına maruz bırakılırsa toplanmış olan PHA'lar monomerlerine bozunabilmekte ve bakteri tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak tekrar kullanılabilir (Witholt and Kessler 1999). *Pseudomonas oleovorans*, n-alkan ve 1-alken üzerinde büyütüldükten sonra PHA'ları toplayabilmektedir. Bu poliesterlerin bileşimi ve fiziksel karakteristikleri substrata bağlıdır. n-alkan (n-hekzandan n-dekana) kullanıldığı zaman, pendant grubunun etilden heptil grubuna doğru değiştiği (doymuş PHA), 3-hidroksi alkanoat monomeri içeren PHA'lar oluşmaktadır. Karbon kaynağı olarak 1-alken (1-okten ve 1-deken) kullanıldığı zaman poliester, propil ve heptil grubu (doymamış PHA) arasında çeşitli uzunluktaki pendant grubunun olduğu uçta doymamış 3-hidroksi alkenoat monomerleri ve 3-hidroksi alkanoattan oluşmaktadır. Doymamışlık derecesi, substrat olarak çeşitli oranlarda n-alkan ve 1-alken kullanıldığı zaman yaklaşık % 0'dan % 50'ye değişmektedir (Preusting et al. 1990). Kristalinite derecesine ve

PHA'nın yapısına bağılı olarak bu polimerler termoplastik elastomer olarak davranabilmektedirler (Marchessault et al.1990).

Termoplastik elastomerler T_m erime sıcaklığının üzerinde sıvı fazda hazırlanabilmektedir. T_m 'nin altında (ve T_g , camsı geçiş sıcaklığının üstünde) viskoelastik katıdırlar. Bu sıcaklık aralığındaki makromoleküler segmentler, arta kalan amorf zincir segmentleri için fiziksel çapraz bağlayıcı olarak davranıp kristal boşluklar oluşturabilmektedir. Bu termoplastik polimerler biyobozunur ve biyouyumludur.

0.2-0.5 μ m çapındaki PHA'lar ayrı kalıntı olarak hücre sitoplazması içinde lokalize olmuştur ve yüksek kırıcılıklarından dolayı faz kontrast ışık mikroskopunda oldukça net olarak görülebilmektedirler (Dawes and Senior 1973). Bakteri içeren PHA'nın ince bölümü transmisyon elektron mikroskobu ile gözleendiği zaman Şekil 2.17'de görüldüğü gibi PHA kalıntısı elektronca yoğun madde olarak görülmektedir (Sudesh et al. 2000).



Şekil 2.17 P(3HB-co-5 mol%3HHx)'nin geniş miktarını (kuru hücre ağırlığının %90'ı) içeren 4 hücre PHB rekombinant *R. eutropha* rekombinantın ince kesitinin transmisyon elektron mikroskop görüntüsü. Skala 0.5 μ m'yi göstermektedir (Sudesh et al. 2000).

rRNA homolog grup I'e ait olan çeşitli türdeki *Pseudomonas*, sınırlandırılmış besin koşulları altında büyütüldüğü zaman, serbest yağ asitleri, (*Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*) (Brandl et al. 1988, Huisman et al. 1989, Lageveen et al. 1988, Ramsay et al. 1992) triaçilgliseroller (*Pseudomonas resinovorans*) (Ashby and Foglia, 1998, Cromwick et al. 1996) ve şekerlerden (*P. putida*) (Huijberts et al. 1992) mcl-PHA toplamaktadır. Doymamış

hidrokarbon yan zincirleri içeren pek çok mcl-PHA'lar polimerlerin özelliklerini belirlemeye yardım ederler. Bu olefinik gruplar kimyasal maddeler (peroksitler, sülfür vulkanizasyonu ve epoksidasyon) ve fiziksel (ışınlama) ortam tarafından çapraz bağ yoluyla polimerin özelliklerini geliştirmede kullanılmaktadır (Ashby et al. 1998, Ashby et al. 1998, Koning et al. 1994, Gagnon et al. 1994, Gagnon et al. 1994, Ashby et al. 2000).

Poli(3-hidroksi alkanoatlar) (PHAs), (R)-3HA monomer birimini içeren optikçe aktif biyolojik poliester ailesindendir (Anderson and Dawes,1990). 3-hidroksialkanoik asitler, PHA sentez polimerize enzimin stereospesifikliğinden dolayı tümü R konfigürasyonundadır. Bazı mikroorganizmalar tarafından üretilen, hücre dışı enerji ve karbon depolama materyalleri olarak var olan doğal alifatik poliesterlerdir. Yüzün üzerinde farklı yapıdaki PHA'ların bileşimi, enzim spesifikliğine ve karbon substratına bağlıdır (Steinbüchel and Valentin, 1995). Bakteri hücresinden PHA'yı ayırmak için üç önemli prosedür kullanılmaktadır: çözücü ekstraksiyonu, kimyasal sindirim ve seçici enzimolozis (Lauzier et al. 1993). Birincisi en yaygın kullanılan tekniktir ve çözücü ekstraksiyon prosesleri, toplam kütleden PHA'nın ayrımı için geliştirilmiştir. Bu metodlar genellikle 1,2-dikloretan (Barham and Sealwood, 1982, Dufrense and Samain 1998'den, Holmes and Jones, 1980, Dufrense and Samain 1998'den), azeotropik karışımlar (örneğin su) (Vanlaudem and Gilain, 1987, Dufrense and Samain 1998'den) ile 1,1,2-trikloretan, metanol, etanol, aseton veya hekzandan (Stageman, 1985, Dufrense and Samain 1998'den) biri ile kloroform, asetik anhidrid (Schmidt et al. 1985, Dufrense and Samain 1998'den) veya siklik karbonatlar, etilen veya 1,2-propilen karbonat (Lafferty and Heinzle, 1978, Dufrense and Samain 1998'den) ve kloroform (Walker et al. 1982, Dufrense and Samain 1998'den, Vanlaudem and Gilain 1982, Dufrense and Samain 1998'den) gibi klorlanmış çözücü kullanımını içermektedir. Pahalı olmasının yanı sıra bu metodlar genellikle büyük miktarda toksik olan uçucu çözücüler içermektedirler. Çözücü ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında, diğer iki metod (kimyasal sindirim ve seçici enzimolozis) PHA olmayan bileşenlerin seçici uzaklaştırılmasını içermektedir ve çözücü-ekstraksiyonlu PHA'ya göre çeşitli uygulamalara olanak sağlayan bu metodlar başlangıç halini ve PHA'nın granüler morfolojisini koruyabilmektedir.

2.7.1.3.2 PHA'nın Fermantasyon Yoluyla Üretimi

Biyoteknolojik prosesler, hidroksialkanoik asit, dikarboksilik asit ve alkildiollerin, laktik asit bakterisi tarafından laktik asit üretimi ve bunun sonrasında poli (laktik asit)'e polimerizasyonu gibi kimyasal proses yoluyla polimerize olabildiğini sağlamaktadır. Alternatif olarak çeşitli biyoteknolojik prosesler (mikroorganizma kullanılarak fermantatif üretim, transgenik bitkilerde üretim ve izole edilmiş enzim kullanarak vitro sentezi) direkt olarak PHA'yı üretmektedir. PHA'nın üretimi için kullanılan bazı substratlar Çizelge 2.3'te listelenmiştir (Steinbüchel and Fuchtenbusch 1998).

Çizelge 2.3 PHA üretimi için uygun substratlar.

Karbon dioksit
Fosil kaynakları (metan, mineral yağ, linyit, kömür)
Yenilenebilir kaynaklar (nişasta, selüloz, sukroz, triağılgiseroller)
Atık materyaller (pekmez, kesilmiş süt suyu, gliserol)
Özel içerikli kimyasallar (propiyonik asit, 4-hidroksibütirik asit)

Bunlar, birçok substrattan çok çeşitli PHA'ları üreten *R. Eutropha*, *A. latus*, *Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas* türü *K*, *Azotobacter vinelandii* ve *P. Oleovorans* gibi bakterileri içermektedir. Aynı zamanda, 4-hidroksivalerik asit, 3HV, levulinik asitten, 3HB artı 3HA_{MCL}'yi içeren çok miktarda kopoliesteri üreten, *T. Pfennigii* PHA sentezini gerçekleştiren PHA-negatif *P. Putida* mutasyonunun rekombinant türünü veya glukoz, sukroz veya pekmezden çok miktarda poli (3HB)'yi üreten *E.coli* rekombinant türü gibi genetik açıdan tasarlanmış bakterileri içermektedir (Çizelge 2.4) (Steinbüchel and Fuchtenbusch, 1998). Çoğu proses besleme-yığın modunda yürütülmektedir; sürekli prosesler ise nadirdir ve önemli ölçüde hücre yoğunluğunu ve üretimi düşürmektedir.

Çizelge 2.4 PHA'nın biyoteknolojik üretimi için uygun bakteriyel sistem örnekleri.

Bakteri	Substrat	Polimer	Hücre yoğ.(g/l)	PHA içeriği(%)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Glukoz+balık pepton	Poli(3HB)	30	85
<i>Alcaligenes latus</i>	Sukroz	Poli(3HB)	112	88
<i>Pseudomonas strain K</i>	Metanol	Poli(3HB)	233	64
<i>Recombinant Escherichia coli</i>	LB+glukoz	Poli(3HB)	117	76
<i>Ralstonia eutropha</i>	Glukoz	Poli(3HB)	164	74
<i>Ralstonia eutropha</i>	Glukoz+propionik asit	Poli(3HB-co-3HV)	>100	70-80
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Valerik asit	Poli(3HV)	41	65-70
<i>Pseudomonas putida</i>	Oleik asit	Poli(3HHX-co-3HO- co-3HD-co-3HTD)	93	45
<i>Recombinant Pseudomonas putida</i>	Oktanoik asit+levulinik asit	Poli(3HB-co-3HV- co-4HV-co-3HHX- co-3HO)	20	43
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Oktan	Poli(3HHX-co-3HO)	40	35-40
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Glukanoik asit+ oktanoik asit	Poli(3HHX-co-3HO- co-3HD)	54	66

Kısaltmalar: 3HB, 3-hidroksibütirik asit; 3HD, 3-hidroksidekanoik asit; 3HDD, 3-hidroksidodekanoik asit; 3HTD, 3-hidroksitetradekanoik asit; 3HHx, 3-hidroksiheksanoik asit; 3HV, 3-hidroksivalerik asit; 3HO, 3-hidroksioktanoik asit; 4HV, 4-hidroksivalerik asit; LB, Luria-Bertani broth; PHA, poli(hidroksi alkanoyik asit).

2.7.1.3.3 PHA'nın Uygulama Alanları

PHA'nın Medikal Uygulamaları: Biyouyumluluk, memeliler ve insanlar için önemli bir unsurdur. Pekçok faktör maddenin uyumlu olup olmadığını belirlemektedir; şekil, yüzey gözenekliliği, materyalin kimyası ve birleştirildiği yerdeki çevre (doku). Silikon gibi geleneksel olarak kullanılan materyallerin yan etkiye ve kansere sebep olduğu düşünüldüğünden yeni materyallere gereksinim duyulmaktadır (Cammis et al. 1999). PHA medikal uygulamalar için önemli potansiyele sahip bir bileşiktir (Çizelge 2.5) (Zinn et al. 2001). R-3-hidroksibütirik asit 0.3 ve 1.3 mM (Adams et al. 1987, Wiggam et al. 1997, Yanik et al. 1997) arasındaki konsantrasyonda kanın normal bileşiminde olduğu ve ayrıca ökaryotların (Reusch 2000) hücre zarında da bulunduğu düşünüldüğünde PHB'nin biyouyumlu olması şaşırtıcı değildir.

Çizelge 2.5 PHA'nın tıptaki potansiyel uygulamaları.

Uygulama çeşidi	Ürünler
Yara yönetimi	Dikiş ipliği, deri değişimi, sinir parçası, cerrahi ağ, zımba, yara temizleme süngeri
Vasküler sistem	Kalp kapakçığı, kardiyovasküler doku, perikardiyal yama, vasküler graftlar
Ortopedi	Kıkırdak mühendisliği için çatı, spinal kafes, kemik graft değişimi, menisküs yenilenmesi, iç sabitleme cihazları (vida gibi)
İlaç salımı	Anti-kanser tedavisi için mikro ve nanoküreler
Üroloji	Ürolojik stentler
Diş	Beriyodont iltihabındaki direkt doku yenilenmesi için bariyer materyal
Bilgisayar destekli tomografi ve ultrasonik görüntüleme	Kontrast ajanlar

PHA'nın Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanımı: PHA, yan zincirinde kimyasal modifikasyona izin verecek fonksiyonel gruplara ve çeşitli kimyasal bileşimlere sahiptir ve ilaç salım cihazlarında uygulama alanları vardır (Pouton, 2001). Biyobozunur özellikteki blok kopolimerler bu amaç için kullanılabilirler. Blok kopolimerler, katı polimerlerin yüzey özelliklerini değiştirmeye elverişlidir ve bu sebeple ilaç salım özelliklerini modifiye edebilirler (Bures et al. 2001). Mcl-PHA kopolimerler, düşük erime noktası ve düşük kristanilite derecesinden dolayı ilaç salımı için cazip bir adaydır (Pouton 2001).

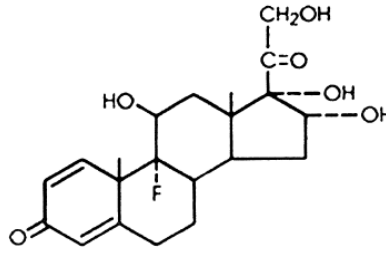
PHA'nın kontrollü salım sistemlerindeki kullanımlarından bir tanesi de göz alanındaki uygulamalarıdır. Oftalmik ilaçların salımı için çeşitli partikül sistemlerin gelişimi, müsünle biyoadesif polimer zincirlerinin etkileşimi ve oküler mukus tabakasındaki partiküllere hapsedilmesi temeline dayanmaktadır (Ludwig 2005).

Biyobozunur polimerler, katı veya enjekte edilebilir implantlar şeklinde veya nano veya mikropartikül şeklindeki partiküler sistemleri enkapsüle etmede kullanılabilirler. Partikül sistemler ince bir iğne vasıtasıyla enjekte edilebilir, boyutu ve bileşimi ile ilgili olarak oküler ortama dağıtılabilirler (Bourges et al. 2006).

Partikül sistemler, enjeksiyon yoluyla göz içine salım şeklinde avantajlara sahiptirler. Bunların boyutu ve polimer bileşimi, in vivo ortamdaki biyolojik davranışlarını önemli ölçüde etkilemektedir. Mikropartiküller, intravitral enjeksiyon sonrasında depo gibi davranırlar ve

vitreus jel içerisine zayıf bir şekilde difüze olurlar (Ogura and Kimura 1995, Veloso et al. 1997). Diğer taraftan nanopartiküller ise hızlı bir şekilde difüze olur ve oküler dokuların, ön taraftaki hücrelerin (Kozak et al. 2004) ve arka taraftaki segmentlerin (Kozak et al. 2004, Sakurai et al. 2001, Bourges et al. 2003, Bejjani et al. 2005) içerisine yerleşirler.

Göz içerisine ilacın kontrollü bir şekilde salımında çeşitli biyobozunur polimerlerden hazırlanan mikropartiküler sistemler kullanılmaktadır. Bu uygulamalardan bir tanesi göz ilacı olarak kullanılan triamsinolon asetonidin mikroküre içerisine hapsedildiği sistemlerdir (Cem et al. 2008). Triamsinolon asetonidin kimyasal yapısı Şekil 2.18’de görülmektedir (Jermak et al. 2007).



Şekil 2.18 Triamsinolon asetonidin kimyasal yapısı.

Kortikosteroidler gözdeki iltabın tedavisi için 1950’li yıllardan beri kullanılmaktadır ve 1974’ten beri göz içerisine enjekte edilmektedir (Peyman et al. 1974). Üveanın iltihabı ve retinal vasküler sistemlerin perioküler ve intraoküler tedavisi için geniş kullanım alanına sahiptir. Vitreoretinopati ve yaşa bağlı koroidal neovaskülarizasyon gibi göz içi üreme ve retinal vasküler rahatsızlıklardaki sekonder maküler ödem, üveanın iltihabı gibi uzun süreli oküler steroidin verilmesi gereken koşullarda oldukça etkin ve güvenlidirler (Jermak et al. 2007).

2.8 HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre kültürü, spontan migrasyon, mekanik veya enzimatik parçalanma ile bir dokudan ayrılmış olan hücrelerin üretilmesidir. Hücre kültürü başlıca; organ kültürü, doku eksplant kültürleri ve hücre kültürü olarak üçe ayrılabilir. Organ kültürü, organların belirli sürelerde vücut dışında canlı kalmalarının sağlanmasıdır. Doku eksplant kültürü ise, doku parçacıklarının canlılıklarını *in-vitro* ortamda yürütülmesinin sağlanmasıdır. Hücre kültürünün tarihçesi 1800’lü yıllara dayanır. İlk olarak 1866 yılında *in-vitro* doku kültürü çalışılmış ve amfibi kan hücrelerinin 35 gün canlı kalabilmeleri sağlanmıştır.

2.8.1 Hücre kültürünün kullanım alanları

Günümüzde hücre kültürünün kullanım alanları hızla artmaktadır. Hemen her alanda bu tür çalışmalara rastlamak mümkündür. Bunlar şu şekilde özetlenebilir:

1. Viral aşılar ve viral teşhis amaçlı
2. Monoklonal antikor, İnterferon, enzim, aşı, büyüme faktörü, İnterlökin gibi immunoregülatörler, hormon, üretimi
3. Somatik gen tedavisi
4. Tümör tedavisi
5. Canlı hücrelerinin farklı amaçlarla kullanılması
 - Eritrositlerin transfüzyon amaçlı kullanımı
 - Kemikiliği nakli
 - Parkinson tedavisinde beyin hücrelerinin kullanılması
6. Kompleks üç boyutlu dokular; yapay deri; kıkırdak, karaciğer ve yapay pankreas

2.8.2 Hücre kültürü koşulları

Hücre kültür ortamı; hücre ve kültür tipine göre değişmekle birlikte hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması için gerekli şartların eksiksiz sağlanması gereklidir. Kültür ortamı, osmotik olarak dengelenmiş enerji kaynağı, vitaminler, ko-faktörler, inorganik tuzlar, eser elementler, büyüme faktörü, minareller ve aminoasitlerden oluşmaktadır. Kültür ortamını etkileyen diğer faktörler ise sıcaklık, pH, nemlilik, gaz fazı bileşenleri, ozmolarite ve ışıktır. Hücre vasatları farklı hücre tipleri için, amaca göre değişmekle birlikte farklı özellikler sergilemelidir. Hayvan hücre kültür ortamı fizikokimyasal olarak, optimum pH 7.2–7.5; osmolarite 280–320 mOsmol/kg; CO₂ %2-5; sıcaklıkta 35-37 olmalıdır. Bikarbonat gibi tamponlayıcılar (özellikle toz vasat kullanıldığında), glutamin, kan serumu ve antibiyotik ortama sonradan ilave edilmektedir. Farklı hücre kültür ortamları için farklı özelliklerde kültür ortamları gereklidir. Örneğin hayvan hücre kültüründe pH 7.4 iken birçok deniz canlısında 7.2-7.8; insektelerde 6-7.7; lepitopterilerde 6.2-7.6, bazı salyangoz türlerinde 7-7.9 arasında değişmektedir.

2.8.3 Hücre kültür sistemleri

Hücre kültürleri, kaynaklarına ve büyüme biçimlerine göre sınıflandırılırlar.

A-Kaynaklarına göre:

- Primer kültürler; hayvan veya bitki hücreleri izole edildikten sonra kültür edilirse primer kültür elde edilir. Bu anda hücre soyu sonlu' dur, yani pasajlamalar sonunda hücreler yaşlanarak ölür. Bu nedenle, primer hücrelerde belirli sayıda pasajlama yapılabildiğinden deneyleri bu dönemde yapmak gerekir. Primer hücreler pasajlamalar sonunda ölümsüz olabilirler. Bu durumda bir hücre soyu elde edilmiş olur.
- Hücre soyları; primer hücrelerde spontan mutasyonlar sonucunda kendiliğinden, kimyasal ajanlar veya virüsler eklenerek insan eliyle oluşturulurlar. Tümör dokularından alınan hücrelerden de elde edilirler. Primer kültürlerden farkları; kültürde yüksek yoğunluğa ulaşabilirler, büyüme faktörüne ve seruma daha az ihtiyaç duyarlar, çoğalmak için zemine tutunma ihtiyaçları daha azdır ve sonsuz çoğalma yetenekleri vardır.

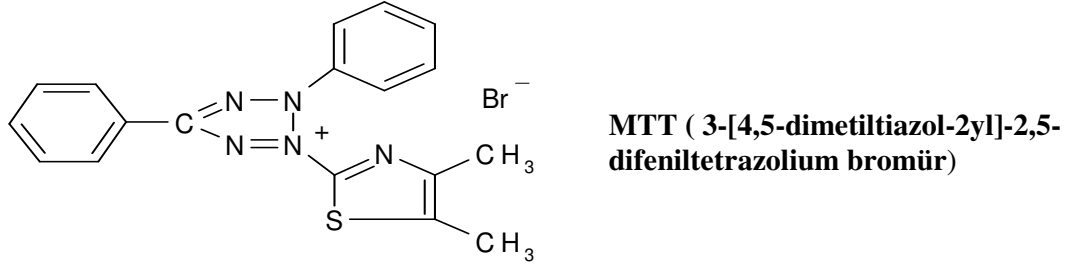
B-Büyüme biçimlerine göre:

- Süspanse kültürler ve tutunarak büyüyen hücreler olarak sınıflandırılır. Kan, dalak, kemik iliği kültürleri ve olgunlaşmamış hücreler bu şekilde ürerler.
- Tutunarak büyüyen hücreler: ektoderm ve endodermden oluşan hücreler (fibroblast ve epitel hücreleri), ekstraselüler matriks olarak adlandırılan ve kollojen, laminin, proteoglikanlar gibi makromoleküllerin bir karışımı olan kompleks bir yapı üzerinde, bu yapıdaki moleküller membran reseptörleri (integrin $\alpha1\beta3$, $\alpha1\beta5$, $\alpha2\beta3$ v.s.) aracılığı ile etkileşerek büyürler.

2.9 MTT TESTİ

Hücre kültürü çalışmalarda, hücre sayısının belirlenmesi esastır. Bu nedenle hücre sayımında birçok yöntem geliştirilmiştir. Hücreler, spesifik enzimler, substratlar veya boyalar kullanılarak sayılır. Tetrazolium tuzları (MTT, INT, NBT, TNBT, v.b.) bu boylardan biridir. MTT (Şekil 2.19) testi canlı hücrelerde mitokondriyal enzimlerin dehidrojenaz aktivitesi sonucu formazan kristalleri meydana gelmesine, bu kristallerin çözünmesi ve

spektrofotometrik yöntemle absorbanslarının belirlenmesi temeline dayanır. Ölü hücrelerde mitokondriyal aktivite gözlenemeyeceği için tetrazolium tuzları ile sadece canlı hücreler sayılabilir. Lizosomal enzimlerden olan hexoamidinaz da hücre sayımında kullanılan enzimlerdendir. Metilen mavisi kullanılan boyalardan bir diğeridir. Metilen mavisi hücrede negatif gruplara bağlanır (nükleik asit, fosfataz ve bazı proteinler gibi). Bu boyalara ilaveten jenus yeşili, tripan mavisi de hücre sayımında kullanılan boyalar içerisindedir.



Şekil 2.19 MTT 3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromürün kimyasal yapısı.

NAD(P)H, formazan kristallerinin oluşumunda indirgeyici olarak çalışmaktadır ve tetrazolium tuzuna elektron ve hidrojen vermektedir. Bunun sonucunda da formazan kristalleri oluşmaktadır. Çalışmalarda monotetrazolium tuzlarından MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromür) ile; farklı polimer ve bu polimerlerin farklı konsantrasyonları ile muamele edilen hücrelerin canlılıkları ve polimerin sitotoksik etkisi incelenmiştir. Plakta ilk sütuna sadece hücre ekilmiştir ve hiçbir aktif madde ile etkileştirilmemiştir. Bu sütun pozitif kontrol olarak kullanılmıştır ve en yüksek absorbans bu sütunda alınmıştır.

MTT testi için; hücre yapışmasına uygun 96 kuyucuklu plaklar kullanılmaktadır. Bu plakların satırında 12 kuyucuk, sütununda ise 8 kuyucuk bulunmaktadır. Çalışmada her bir konsantrasyon bir sütunda dolayısıyla 8 kuyuda çalışılmıştır. Yüzde canlılık hesaplanırken 8 kuyucuktan alınan absorbans verileri değerlendirilmektedir.

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 PHBHHX MİKROKÜRELER

- Ticari olarak satın alınan PHBHHX kopolimeri kullanılarak mikroküreler elde edilmiştir. PHBHHX/diklormetan yüzdesi, karıştırma hızı, emülsifier oranının mikrotasıyıcı boy-boy dağılımına etkileri incelenmiştir. Elde edilen PHBHHX mikroküreler optik mikroskop, SEM, ve Zeta Sizer kullanılarak karakterize edilmiştir.
- Hazırlanan ve karakterize edilen PHBHHx mikrotasıyıcılara göz tedavisinde kullanılan etken madde kenakort yüklenerek *in vitro* ilaç salım çalışmaları yapılmıştır.

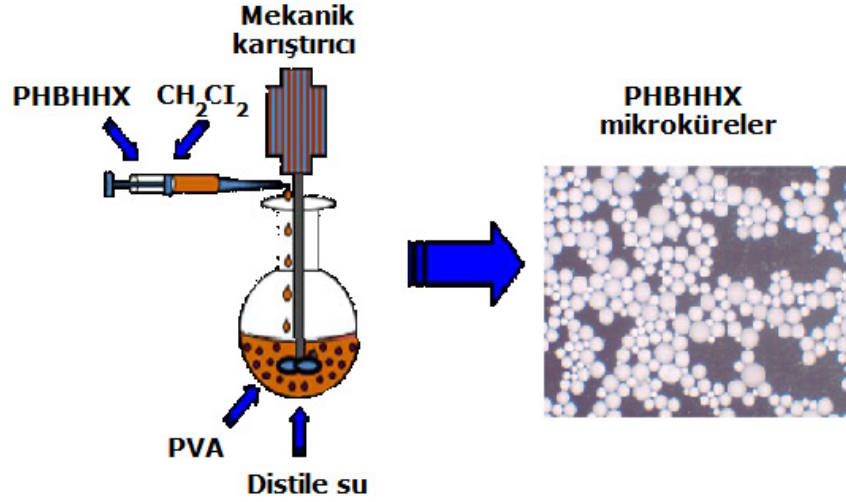
3.1.1 Kimyasallar

PHBHHX kopolimeri Procter & Gamble (Amerika) firmasından temin edilmiştir. Triamsinolon asetonid aktif ajanı (Kenokort ve BSS Dengelenmiş Tuz Çözeltisi içeren) Atatürk Eğitim Hastanesi Göz Kliniği'nden sağlanmıştır. Emülsifier olarak PVA (MA 72,000, Fluka, Amerika) ve çözücü olarak metilen klorür (Merck, Almanya) kullanıldı. Diğer bütün kimyasallar oldukça yüksek saflıktadır ve ileri saflaştırma olmadan kullanılmıştır.

3.1.2 Mikrokürelerin hazırlanması

40-200 μm boyutundaki PHBHHX partikülleri çözücü buharlaştırma tekniği ile elde edilmiştir. 0.25 g PHBHHX polimeri 5 ml metilen klorürde çözündü ve bu polimer çözeltisi, 1 ml/dak. akış hızında dozaj pompası kullanılarak, oda sıcaklığında 2000 rpm'de mekanik karıştırıcı ile karıştırılan 0.250 g emülsifier (PVA) ve 50 ml distile su içeren dağılma ortamına damla damla ilave edildi. Organik çözücü 2 saat vakum koşulları altında buharlaştırıldı. Küresel partiküller 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj ile sulu ortamdan ayrıldı ve distile su ile

iki kez yıkandı. Mikroküreler kurutuldu ve diğer basamaktaki deneyler için desikatörde saklandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 PHBHHX mikroküre hazırlama düzeneği.

3.1.3 Morfolojik Değerlendirmeler

PHBHHX polimerik partiküllerin morfolojik değerlendirmeleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirildi. Partiküllerin 100 μl 'lık sulu süspansiyonları 4 saat oda sıcaklığında vakum altında metal destek üzerinde kurutuldu ve SEM mikrografiklerini elde etmek için altın ile kaplandı.

3.1.3.1 Boy ve Boy Dağılımları

PHBHHX polimerik partiküllerin boy ve boy dağılımları, optik mikroskopla alınan görüntüden tayin edilmiştir. Görüntü üzerindeki partikül çapı (her biri en az 40 partikül içermektedir) ölçülmüştür ve standart sapmalı ortalama boyutlar görüntü analiz yazılım programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Ortalama partikül boy ve boy dağılımı üzerine karıştırma hızı, emülsifier konsantrasyonu ve polimer/organik çözücü oranının etkisi araştırılmıştır.

3.1.4 Boy ve Boy Dağılımı Üzerine Etkin Parametreler

3.1.4.1 Karıştırma Hızı

Polimerik mikrokürelerin hazırlanmasında en etkin parametrelerden biri dispersiyon ortamının karıştırma hızıdır. 500, 1000 ve 2000 rpm karıştırma hızları PHBHHX mikrokürelerin oluşumunda kullanılmıştır. Diğer parametreler (5 ml çözücü, emülsifier olarak 250 mg PVA ve dispersiyon ortamı olarak 50 ml distile su) sabit tutulmuştur.

3.1.4.2 Emülsifier Konsantrasyonu

Emülsifier, polimer ve sulu ortam arasındaki yüzey gerilim farkını azaltmaya neden olmaktadır. Bu sebeple mikrokürelerin boy ve boy dağılımları üzerine etkilerin belirlenmesi amacıyla bu çalışmada kullanılan konsantrasyon, dispersiyon ortamı olarak içerisinde 1'den 10 mg'a kadar değişen PVA/ml distile su şeklindedir.

3.1.4.3 Polimer/Çözücü Oranı

Dispersiyon ortamında polimerin vizkozite veya konsantrasyon farkı için ihtiyaç duyulan enerji değişiminden dolayı polimer konsantrasyonu boy ve boy dağılımını değiştiren diğer etkin parametredir. Polimer konsantrasyonunun etkisini araştırmak için seyreltik (25 mg PHBHHX/ml çözücü) ve konsantre (250 mg PHBHHX/ml çözücü) polimer çözeltileri, polimerik mikrokürelerin hazırlanması esnasında dispersiyon ortamına damla damla ilave edilmiştir. Çoğu durumda, mikroküre örneklerini elde etmek için kullanılan ortam konsantrasyonu 50 mg PHBHHX/ml çözücüdür.

3.1.5 İlaç Yükleme Çalışmaları

Triamsinolon asetonid kortikosteroid PHBHHX polimer çözeltisi içerisine dağıtılmıştır. Kütleye göre ilaç/polimer oranı sırasıyla 1/100, 2/100 ve 4/100 (w/w) olarak hazırlanmıştır. Karışım 30 dakika su banyosunda sonike edilmiştir ve sonra emülsifier olarak poli(vinil alkol) ve distile sudan oluşan dispersiyon ortamına damla damla ilave edilmiştir. İlaç yüklü mikroküreler ipek süzgeç yoluyla dağılma ortamından izole edilmiştir ve iki kere distile su ile yıkanmıştır ve daha sonra yapılacak olan in vitro salım analizleri için oda sıcaklığında

kurutulmuştur. Başlangıç ilaç/PHBHHX oranı (kütle/kütle), *in vitro* salım çalışmalarını karakterize etmede kullanılmıştır.

3.1.5.1 İlaç Hapsetme Etkinliği

İlaç yükleme oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{İlaç yükleme oranı} = \frac{\text{mikroküre içerisindeki ilacın ağırlığı}}{\text{formülasyonda kullanılan ilacın ağırlığı}} * 100$$

Mikrokürede varolan ilacın ağırlığı, formülasyonda kullanılan ilacın toplam kütesinden yıkama suyu ve dispersiyon ortamındaki serbest ilacın kütesinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. Serbest triamsinolon asetonid, maksimum absorpsiyon gözlemlendiği 240.5 nm dalga boyunda UV spektrofotometre kullanılarak tayin edilmiştir. Hapsedilen ilaç miktarı *in vitro* salım çalışmalarında salınan toplam ilaç miktarı ile korele edilmiştir.

3.1.5.2 İn vitro Salım Çalışmaları

PHBHHX mikrokürelerden triamsinolon asetonidin salım profilleri, 37°C sıcaklıkta çalkalamalı (50 rpm) su banyosunda 25 ml BSS'nin (dengelenmiş tuz çözeltisi) cam şişe içerisine doldurulduğu ortamda tayin edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında örneklerin (2 ml) UV spektrofotometrede ölçümleri alınmıştır ve taze ortam ile yenilenmiştir.

3.2 PHBHHX NANOKÜRELER

Araştırma kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar 4 ana bölümden oluşmaktadır.

1. Ticari olarak satın alınan PHBHHX kopolimeri kullanarak nanopartiküller elde edilmiştir. PHBHHX/diklormetan yüzdesi, sonikatör genliği, tween 80 oranının nanotaşıyıcı boy-boy dağılımına etkileri incelenmiştir. Elde edilen PHBHHX nanopartiküller AFM, SEM, FTIR ve Zeta Sizer kullanılarak karakterize edilmiştir.

2. Hazırlanan ve karakterize edilen PHBHHX nanotaşıyıcılara ovaryum kanser tedavisinde kullanılan etken madde etoposid yüklenerek *in vitro* ilaç salım çalışmaları yapılmıştır.

3. Etoposid yüklü PHBHHX nanotaşıyıcıların yüzeyine model ligand olarak seçilen folik asit bağlanmıştır.

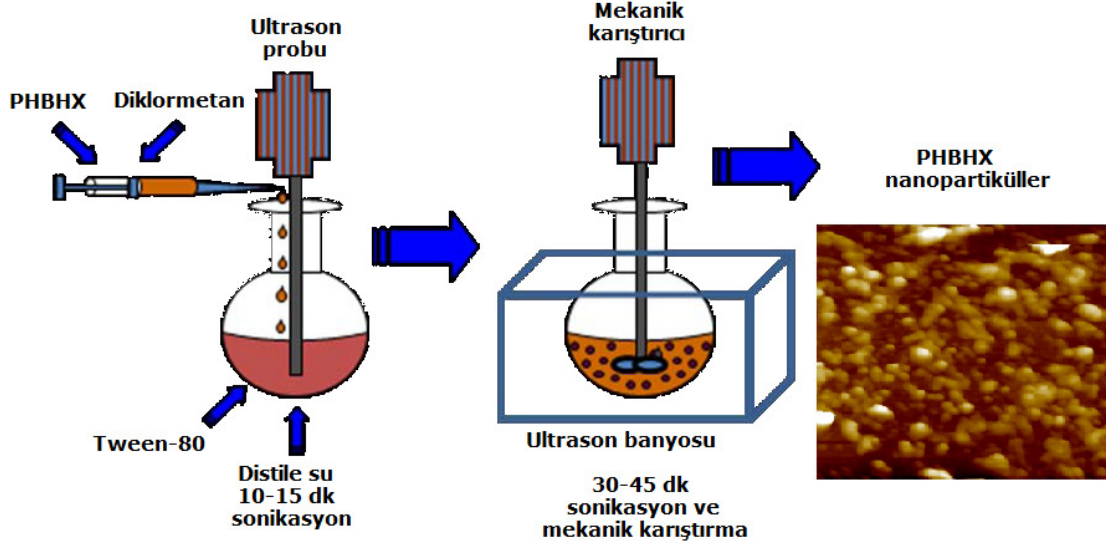
4. PHBHHX nanopartikül-hücre etkileşimleri ve kanser hücrelerine hedefleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla model kanser hücresi olarak HeLa (insan serviks kanseri hücreleri) ve L929 (fare fibroblast) hücreleri ile değerlendirilmiştir.

3.2.1 Kimyasallar

PHBHHX kopolimeri Procter & Gamble (Amerika) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan çözücü diklormetan Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Dağılma ortamı için Tween 80 (Fluka) kullanılmıştır. Hücre kültür deneyleri için, Tripsin-ETDA (Tripsin-Etilendiamin tetraasetik asit), DMEM F-12 (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”) besiyeri ve Fetal Sığır Serum (FCS), DMSO (Dimetilsülfoksit) ve EZ-DNA Biological Industries (İsrail) firmasından, Tetrazolium Tuzu (MTT) Serva’dan (ABD) temin edilmiş ve herhangi bir işleme tabi tutulmadan kullanılmıştır. Nanopartiküllere bağlanmak üzere ligand olarak folik asit seçilmiştir. Glisin (Fluka, İsviçre) ise folik asit (Sigma) bağlanmasında kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar ek bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan direkt kullanılmıştır.

3.2 2 PHBHHX Nanopartiküllerin Hazırlanması

PHBHHX nanopartiküller çözücü buharlaştırma metoduna göre hazırlanmıştır ve istenen boy-boy dağılımına sahip PHBHHX nanopartikülleri elde etmek için optimizasyon yapılmıştır. PHBHHX kopolimeri CH_2Cl_2 ’de çözünmüştür. Dağılma ortamı olarak Tween 80 ve distile su kullanılmıştır. Ultrason probu ile %90 genlikte dağılma ortamına polimer çözeltisi damla damla ilave edilmiştir ve daha sonra manyetik karıştırıcı ve ultrasonik banyo eşliğinde 2 saat karışmaya bırakılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 PHBHHX nanopartikül hazırlama düzeneği ve işlem basamakları.

Nanopartikülleri oluşturmak için gerekli enerjiyi sağlamak amacıyla ultrason probu (Bransonic, ABD, 250 W) %90 genlikte (50 Hz) kullanılmıştır. Sonraki basamakta nanopartiküllerin küresel biçimini koruyabilmesi ve diklormetanın ortamdan uzaklaşması için dağıtma işleminde mekanik karıştırıcı ve ultrason banyosu bir arada kullanılmıştır.

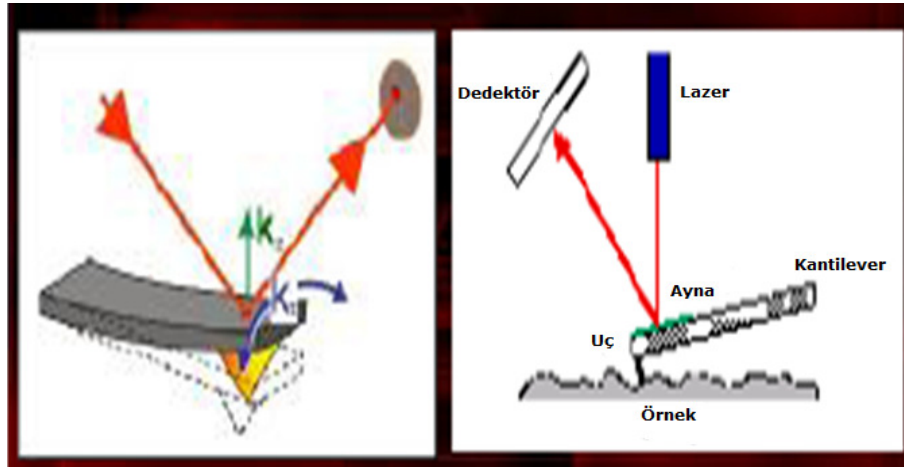
3.2.3 PHBHHX Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.2.3.1 Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Poli (3-hidroksibütirat-ko-3-hidroksiheksanoat) nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılmıştır. Nanotaşıyıcılar ince bir altın film tabakasıyla kaplanarak SEM görüntüsü alınmış ve böylelikle örnekler geometri, şekil ve boy-boy dağılım açısından değerlendirilmiştir.

Nanotaşıyıcıların ayrıca boy ve boy dağılımlarını belirlemek ve AFM'den elde edilen verilerle karşılaştırmak amacıyla Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır.

Atomik Güç Mikroskobu (AFM), geliştirilmiş taramalı mikroskoptur. Kuvvet-mesafe prensibiyle çalışmaktadır. Yüzey topografisini angstrom ($\text{\AA}$) mertebesinde 100 mikrona (μ) kadar görüntüleyebilen yeni kuşak mikroskoptur. Bu cihaz ile moleküllerarası nN boyutlarında kuvvetlerin ölçülmesi mümkün olmaktadır (Çınar et al. 2005). En önemli avantajı, özel bir hazırlama işlemi uygulamadan örneklerin doğrudan ve hemen hemen her ortamda görüntülenebilmesidir (Binnig et al. 1986). Çok duyarlı kantileverin yüzeyi taramasıyla üç boyutlu görüntüyü oluşturabilir, yine aynı hassas kantilever ile atomik seviyedeki kuvvetleri piko-newton (pN) mertebesindeki hassasiyetle ölçebilir. AFM ucu numuneye hafifçe değdirilmektedir. Taramalı Güç Mikroskobu olarak da bilinen AFM yüzeysel olarak üç boyutlu görüntü elde etmemizi sağlar. Yüzeyleri taramak için gezici uca sahiptir. AFM ucu, numune üzerindeyken yüzey ile fiziksel temas halindedir çünkü AFM herhangi bir yüzey üzerinde kullanılabilir. AFM'nin polimer yüzeylerin analizinde kullanımı çok daha uygundur (Şekil 3.3) (URL-1 2008).

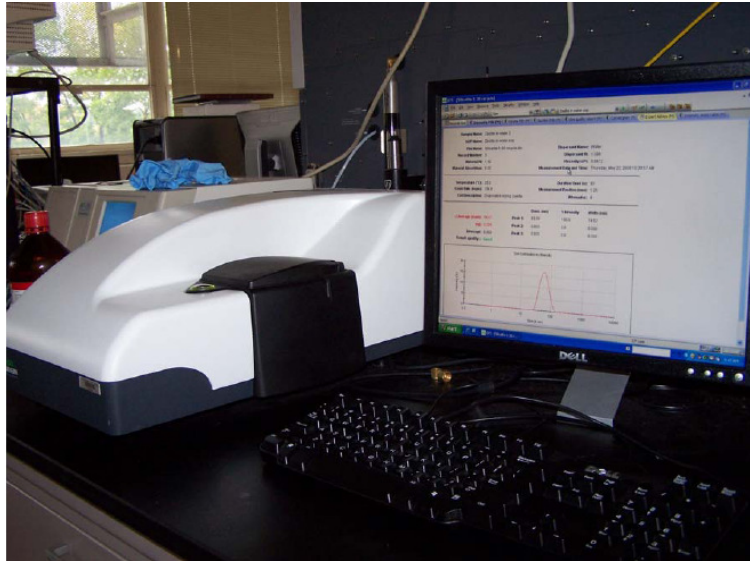


Şekil 3.3 AFM sistemi ve çalışma prensibi.

AFM çalışması için hazırlanan nanopartiküllerin boyutlarının homojenite yönünden incelenebilmesi için AFM örnek tutucu ünitesine yerleştirilmiştir.

Zeta Sizer, çözeltideki partiküllerin molekül ağırlığı, zeta potansiyel ve hidrodinamik boyut ölçümü için kullanılmaktadır. Partiküller için boyut oranı 0.6 nm ile 6 mikron, zeta potansiyel için 5 nm ile 10 mikron ve molekül ağırlığı için 1-20,000 kDa arasındadır. Bu cihaz, nanopartiküller, kolloidler ve biyomoleküller için çözeltideki partiküllerin boyutlarının tayininde kullanılabilir. Dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemiyle

çalışmaktadır. Dinamik ışık saçılması, en son teknoloji ile 1 nanometreden küçük olan ve sub mikron bölgesindeki partikül ve moleküllerin boyutlarının ölçümünde kullanılan bir tekniktir. Çözeltiden lazer saçılmasının meydana gelmesiyle, Brownian hareketinin hızı, partiküllerin boyutunun hesaplanmasında kullanılabilir. Süspansiyon içerisindeki partiküller, emülsiyonlar ve moleküller Brownian hareketine maruz kalmaktadırlar. Bu harekete, termal enerjilerinden dolayı kendi başlarına hareket eden çözücü molekülleri tarafından bombardıman yoluyla neden olunmaktadır. Partiküller veya moleküller lazer ile aydınlatıldığında, saçılan ışığın yoğunluğu, partiküllerin boyutuna bağlı bir hızla dalgalanmaktadır. Oldukça küçük partiküller çözücü molekülleri tarafından ileriye doğru itilmekte ve çok daha büyük hızla hareket etmektedirler (Şekil 3.4). Zeta potansiyel ise çözeltideki partiküllerin dağılma sabiti ve yüklerini ölçmektedir. Zeta potansiyel, partiküllerin elektrostatik olarak nasıl etkileştikleri hakkında bilgi sağlamaktadır.



Şekil 3.4 Zeta Sizer cihazı.

Hazırlanan nanopartiküller santrifüjlenerek yıkanmış ve seyreltilerek belirli miktarda polistiren küvete konulmuştur. Boyutunu tayin etmek amacıyla küvet içerisine konulan partiküller yukarıda görülen cihaza yerleştirilerek ölçüm alınmıştır.

3.2.3.2 Kimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

PHBHHX nanotaşıyıcıların kimyasal yapıları FTIR ile belirlenmiştir. Bu amaçla örnekler KBr ile karıştırılarak (ağırlıkça %1 olacak şekilde) 10 tonluk pres yardımıyla diskler haline getirilerek FTIR (Schimadzu, DR8101, Japonya) spektrumları alınmıştır.

3.2.4 Hücresel Etkileşimler için PHBHHX Nanopartiküllerin Hazırlanması

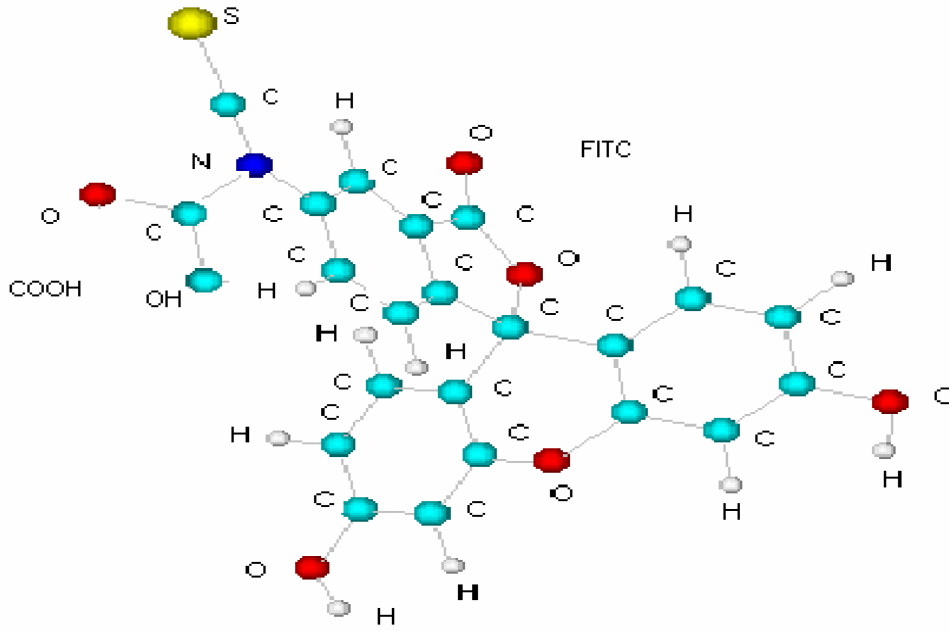
0,1 gram ticari PHBHHX polimeri 10 ml CH_2Cl_2 ' da çözüldü. 30 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. Dağılma ortamını hazırlamak amacıyla 200 ml distile su içine 2 ml Tween 80 eklendi. Ultrasonifikatörle karışımın homojenizasyonu sağlandı. 10 ml plastik enjektör içine alınan polimer çözeltisi damlalar halinde dağılma ortamına eklendi. Ultrasonifikatör bu işlem sırasında 60 genlikte çalıştırıldı. Örnek, 15 dakika süren işlemten sonra 2 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Polimer solusyonu sterilizasyon amacıyla 30 dakika ultraviyole altında bekletildi. Sterilizasyondan emin olmak için solusyonu 45μ çaplı filtreden geçirilerek 15 ml steril polipropilen tüplere dağıtıldı. Solusyondan alınan örnekler lam üzerine konarak ışık mikroskopu ile nanopartiküller izlendi. Zeta Sizer ile boyut ölçümünde ortalama boyutlar 150 nm olarak saptandı.

3.2.4.1 PHBHX Nanopartiküllerinin FITC (fluorescein isothiocyanate) ile işaretlenmesi

Floresan yoluyla biyomoleküllerin işaretlenmesi, biyoloji ve tıp alanında hedefleme analizlerini incelemeye kullanılan önemli bir metoddur. Organik floresan boyalar, tıbbi teşhis ve moleküler görüntülemeye yaygın olarak uygulanmaktadır. Organik boya molekülü yüklü organik polimer esaslı nanopartiküller ve inorganik nanopartiküllerin, organik floroforlara göre fotoğraf-ağarmasına karşı çok daha dayanıklı oldukları rapor edilmiştir (Jiayin and Jianmin 2006).

Kullanılan nanopartikül üzerinde aktif bölge olarak sadece COOH grubu bulunmaktaydı. Literatürde FITC florokromunun amino uçlarına bağlanmasına ilişkin yöntemler bildirilmesine rağmen, COOH ucu için yöntem bulunmamaktaydı. Bu nedenle öncelikle sanal ortamda FITC formülü üzerinde COOH ile bağlanma simüle edildi (Şekil 3.5). Teorik olarak bağlanabileceği görüldüğü için denemeye karar verildi. Literatürdeki FITC ile konjugasyon protokolleri incelenerek aşağıdaki modifiye protokol uygulandı.

1. 5 mg FITC isomer I (Sigma), 1 ml DMSO içinde çözüldü.
2. 1 mg nanopartiküle 20 µl FITC çözeltisi gelecek şekilde nanopartiküller FITC ile polipropilen tüp içinde oda ısısı ve karanlıkta 2 saat inkübe edildi.
3. Tüp içeriği dializ membranına aktarıldı ve üzerine 2ml PBS eklendi. PBS'e karşı bir beher içinde ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılırken 2 gün boyunca dializ yapıldı. Sarı-turuncu renk veren FITC başlangıçta dializ membranını renklendirdi. Dializ işlemi sırasında beherdeki dializ solusyonunun renklendiği, membran içi renklenmenin azaldığı dikkat çekti. Beher içindeki PBS yaklaşık 8 saatte bir değiştirildi. 2. gün sonunda membranın renksizleştiği izlendi.
4. Membran içindeki nanopartiküller steril polipropilen tüpe aktarıldı. Bir dakika vorteksle ajite edildi. Örnekten alınan bir damla floresan mikroskopunda incelendi. Nanopartiküllerin yeşil floresan verdikleri izlendi.



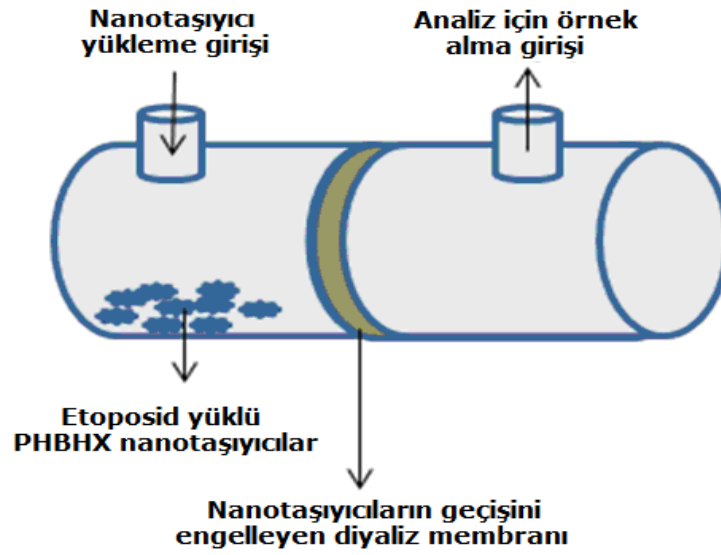
Şekil 3.5 FITC'nin formülü.

3.2.5 PHBHX Nanopartiküllere *in vitro* İlaç Yükleme ve Salım Çalışmaları

Anti kanser ilaç olarak etoposid kullanılmıştır. Öncelikle polimer, diklormetanda çözünmüştür ve polimer/ilâç (w/w) oranı 1/0.5, 1/0.25 ve 1/0.125 olacak şekilde polimer çözeltisine ilâç eklenip, ultrason banyosunda homojen şekilde dağılması sağlanmıştır. Bu çözelti, ultrason probu varlığında distile su ve tween-80 içeren dağılma ortamına damla damla ilave edilerek

ilaç yüklü PHBHHX nanopartiküller elde edilmiştir. Elde edilen çözeltideki diklormetanı uzaklaştırmak için ultrason banyosu ve mekanik karıştırıcı kullanılmıştır. Son basamakta ise nanopartiküller üç sefer distile su ile yıkanmıştır.

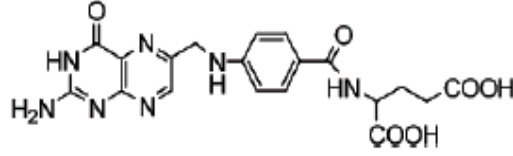
Elde edilen ilaç yüklü PHBHHX nanopartiküllerden salınacak ilaç miktarını tayin etmek amacıyla Şekil 3.6'da görülen ilaç salım düzeneği geliştirilmiştir. Söz konusu düzeneğin ortasına sadece etoposid geçişine izin veren diyaliz membranı yerleştirilmiştir (12-14 kDa aralığında). Düzeneğin bir tarafına sadece 2.5 ml fosfat tamponu, diğer tarafına ise 2.5 ml nanopartikül içeren fosfat çözeltisi konulmuştur. Nanodrop kullanılarak (Thermo Scientific, Nanodrop 1000) etoposid için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Ek 1) ve etoposidin absorbans değeri 284 nm olarak bulunmuştur. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak ilaç derişimlerini belirlemek amacıyla nanodropta absorbanslar okunmuştur.



Şekil 3.6 PHBHHX nanotaşıyıcılardan in vitro etoposid salım düzeneği.

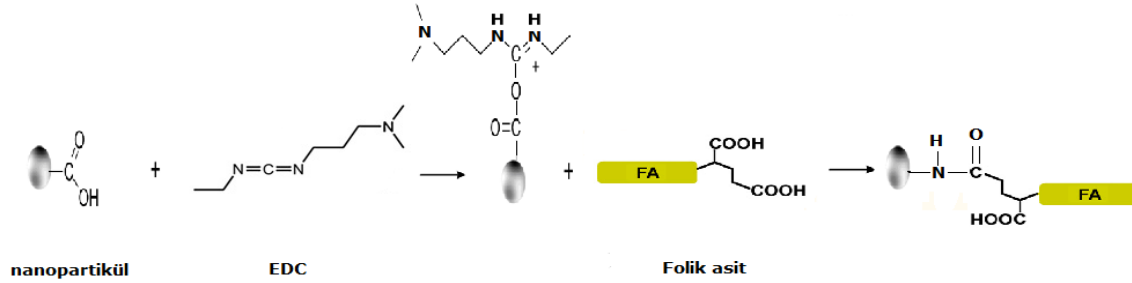
3.2.6 PHBHHX Nanotaşıyıcıların Folik Asit ile Modifikasyonu

Folik asit kararlı, pahalı olmayan ve immunojenik olmayan bir kimyasaldır ve hücre yüzey reseptörü olarak yüksek affiniteye sahip olan tumor hücrelerine hedeflemede kullanılan bir liganıdır. Folik asit iki adet karboksilik asit grubuna sahiptir. Bunlardan biri sterik olarak bloklanmıştır, diğer karboksil grubu ise amid grubu yoluyla nanopartiküllere ve diğer çeşitli organik moleküllere bağlanabilmektedir (Zhang 2008) (Şekil 3.7).



Şekil 3.7 Folik asitin kimyasal yapısı.

Bu çalışmada folik asit PHBHHX nanopartiküllere, PHBHHX, EDC ile etkileştirildikten sonra uçtaki amin (-NH₂) grubu üzerinden bağlanmıştır. Kovalent bağlanma EDC'li nanopartikülün (-NH₂) ucu ile folik asitin (-COOH) ucu arasında olmaktadır. Nanopartikül yüzeyine ligandın kovalent bağlanma mekanizması Şekil 3.8'de gösterilmiştir.



Şekil 3.8 Folik asitin PHBHHX nanopartiküllere kovalent bağlanma mekanizması.

Nanotaşıyıcıları aktive etmek amacıyla PHBHHX nanopartiküller 3 sefer pH 5.2 MES tamponu ile yıkanmış ve süspanse edilmiştir. Daha sonra bu nanotaşıyıcılar 25 mg/ml EDAC'la uygun hızda dönen karıştırıcı ile 30 dakika süreyle karıştırılmış ve böylelikle yapıda ligandaki amin grupları ile özgün aktif ara formun oluşması sağlanmıştır. Nanotaşıyıcılar 3 sefer pH 5.2 MES tamponu ile yıkanıp, süspanse edilerek ortamdaki fazla EDAC uzaklaştırılmıştır. Sırasıyla 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml ve 1000 µg/ml folik asit süspansiyonu % 0.1'lik NaOH çözeltisinde çözünüp, MES tamponunda hazırlanmıştır ve bağlanma verimini belirlemek amacıyla ligand süspansiyonundan 50 µl alınarak 950 µl MES tamponunda çözülerek "bağlanma öncesi örnek" elde edilmiştir. Kalan ligand süspansiyonu ile aktive nanotaşıyıcılar 24 saat oda sıcaklığında sabit hızda karıştırılmıştır ve sonunda süspanse edilerek üstteki süpernatant "bağlanma sonrası örnek" olarak test edilmiştir. 280 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede her iki örnek arasında ölçülen absorbans farkından yüzde bağlanma hesaplanmıştır.

Nanotaşıyıcılar üç kez pH 5.2 MES tamponu ile yıkanmıştır. Devam eden reaksiyonu durdurmak amacıyla ortama fazla amin kaynağı olarak pH 8’de 0, 1 M glisin çözeltisi eklenmiş ve nanotaşıyıcılar 30 dakika boyunca oda sıcaklığında sabit hızda dönen karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra süspanse edilerek 3 sefer pH 7.4 fosfat tamponu ile yıkanmış ve 2 ml fosfat tamponunda süspanse edilmiştir. Elde edilen modifiye nanotaşıyıcılar +4 °C’de saklanmışlardır.

3.2.7 PHBHHX Nanopartikül-Hücre Etkileşimleri

3.2.7.1 Hücrelerin Hazırlanması

Yapılan çalışmada kullanılan, HeLa hücreleri Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Bankasından temin edilmiştir. Çizelge 3.1’de verilen koşullarda hücre kültür ortamlarında çoğaltılmıştır. İki günde bir ortam değiştirilmiştir. Hücreler hücre kültür kabı zeminini kapladıklarında 1/3 pasaj yapılmıştır. Mantar ve bakteri kontaminasyonlarına karşı her gün mikroskopik incelemeye tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.1 HeLa hücrelerinin hücre kültür ortamında çoğaltılması.

Hücre Türü	: HeLa hücreleri (insan serviks karsinoma)
Kültür kabı	: 25 cm ³ ’lük polistren flask
Kültür vasatı	: %10 Fetal sıgır serumu içeren DMEM-F12;%1 penisilin-streptomisin.
Rutin sub-kültür	: 1/3
Kültür özelliği	: Monolayer
Toplam hacim	: 5 ml
PH	: 7,2-7,5
Sıcaklık	: 37±0,5°C
İnkübasyon ortamı	: % 5’lik CO ₂ etüvü

3.2.7.2 PHBHHX nanopartiküllerin in-vitro sitotoksiste çalışması

MTT (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazoluim bromide; Thiazolyl blue) testi hücre canlılığının ve böylelikle sitotoksitesinin kolorimetrik olarak ölçülebileceği bir testtir. PHBHHX’den sentezlenen nanopartiküllere ligand olarak folik asit ve antiproliferatif ajan

olarak da etoposid takılmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin sitotoksik etkileri HeLa üzerinde denenmiştir.

Bunun için HeLa hücreleri 96 kuyucuklu plaklara (12×10^3) ekilmiştir. Plaklar bir gece etüvde inkübe edilmiştir. Farklı formülasyonlarda hazırlanan PHBHHX nanopartiküller UV ışık altında 30 dakika bekletilerek steril edilmiştir. Daha sonra hücre kültür vasatı ile farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25 ve 50 $\mu\text{g/ml}$) seyreltilmiştir. 96 kuyucuklu plaklardaki vasat atılmıştır ve farklı konsantrasyonlarda nanopartikül içeren hücre kültür vasatları hücrelerin üzerine 200 μl pipetlenmiştir. Plaklar daha sonra bir gece 37°C , %5 CO_2 'li etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plaklardaki vasat atılıp kuyucuklara 100 μl serum içeren taze vasat ve 13 μl MTT solüsyonu (5 $\mu\text{g/ml}$, fenol-red içermeyen RPMI 1640 ile seyreltildi) pipetlenmiştir. 4 saat karanlıkta, etüvde inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki vasat ve MTT solüsyonu yavaşça dökülmüştür ve kuyucuklara 200 μl 0,04M HCl içeren saf izopropanol ilave edilmiştir. 30 dakika bekletildikten sonra plaklar 570 nm'de okutulmuştur.

MTT testi hücre canlılığının tesbiti için kullanılan bir testtir. biyomalzemelerin, ilaç taşıyıcı sistemlerin, aktif ajanların sitotoksik olup olmadıkları veya sitotoksosite oranları bu test ile saptanabilir. Yapılan MTT testinde, plağın ilk sütündeki sekiz kuyucuk kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrol çalışmasında hücreler rutin hücre kültür vasatı ile muamele edilmiştir. Her bir farklı formdaki PHBHHX, farklı konsantrasyonda sekiz tekrarlı olarak çalışılmıştır. Kontrol sütünündan alınan absorbanların ortalaması % 100 kabul edilmiştir, test kuyucuklarından alınan absorbanların ortalamaları ile mukayese edilmiş ve nanopartiküllerin sitotoksisiteyi hesaplanmıştır.

Örneğin HeLa hücreleri ile etkileştirilen 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonundaki folik asit takılı, 1/0.125 (polimer/etoposid oranı) etoposid yüklenmiş PHBHHX nanopartikülden alınan absorbanlardan birisi 0,852'dir. Kontrol kuyucuklarının ortalama absorbanı ise $1,288 \pm 0,13$ 'dir.

Buna göre;

$$\frac{1,288}{0,853} \times \%100 = X$$

$X : \%66,14$

Buna göre 50 µg/ml konsantrasyonundaki folik asit takılı, 1/0.125 (polimer/etoposid) PHBHHX nanopartiküller ile etkileşen hücrelerin % 66,14'ü canlıdır veya partikül % 33,86 sitotoksiktir.

3.2.8 Hücre Kültür Testleri

3.2.8.1 Kanser ilacı yüklenmiş, hedefleyici folik asit takılmış PHBHHX nanopartiküllerin, hücre kültüründe HeLa (kanser) hücreleri üzerine etkisinin araştırılması

Normal sağlıklı hücrelerde programlı bir yaşam döngüsü vardır. Bu döngü tamamlandığında hücre ölür. Bu olaya apoptozis denir. Fakat kanser hücrelerinde bu döngü bozularak kontrolsüz olarak çoğalırlar. Yani apoptoza uğramazlar. Apoptoza girmiş hücrede belirli değişiklikler ortaya çıkar ve en önemli belirtiler; hücre DNA'sında parçalanmaların oluşması, çekirdek yapısında şekilsel bozukluklar, DNA'da yoğunlaşma, boyandığında parlak görülmesi ve hücre membranında veziküllerin oluşmasıdır.

Hücreyi ölüme götüren nedenlerden bir diğeri ise nekrozistir. Nekrozis, hücre sitoplazma membranının çeşitli kimyasal ajanlar (toksik kanser ilaçları gibi), hormonal ve fiziksel etkiler sonucunda bütünlüğünün bozulması ile kendini gösterir. Bu bozunma sonucunda hücre madde alışverişi bozularak hücre sitoplazma içeriği dışarı çıkacağı gibi hücre içerisine fazla miktarda ekstraselüler sıvı girerek hücre ve çekirdekte şişme gözlenir ve sonuç olarak hücre ölür.

Çalışmanın bu kısmında amaç; tek başına kanser ilacı (etoposid), tek başına PHBHHX nanopartiküller, farklı oranlarda ilaç yüklü PHBHHX nanopartiküller ve kanser hücrelerine hedefleyici folik asit takılmış ilaç yüklü nanopartiküller kullanılarak HeLa kanser hücre kültürlerinde apoptotik ve nekrotik etkileri araştırılmıştır.

3.2.8.2 Hücre kültürü ve kompleksin hücrelerle etkileşimi

HeLa tümör hücreleri kültür ortamında çoğaltılarak hücre hatları hazırlanmıştır. Hücreler % 10 FCS, % 1 antibiyotik içeren DMEM-F12 kültür ortamında flasklarda 37°C'de karbondioksit etüvünde inkübe edilmiştir. Hücreler yeterli sayıya ulaşınca kadar 2 gün ara ile besi ortamının vasatı değiştirilmiştir. Belli sayıya ulaşan kültürler tripsin ile kaldırılarak 24 well plakelere (10.000 hücre/vell) ekimi yapılmıştır. 24 vellerdeki hücreler belli bir sayıya

ulaştıklarında serum ve antibiyotik içeren vasatlar serum ve antibiyotik içermeyen vasat ile değiştirilmiştir. Tümör hücreleri 0-100 $\mu\text{g/ml}$ miktarlarında kanser ilacı etoposid ile 24 saat muamele edilmiştir. Diğer taraftan aynı miktarda ilaç içeren 1/0.5, 1/0.25, 1/0.125 oranında PHBHHX nanopartikül/etoposid kompleksler, aynı oranlarda ilaç içeren folik asit bağlı PHBHHX nanopartikül/etoposid kompleksleri ve aynı miktarlarda sadece PHBHHX nanopartikülleri HeLa hücrelerine uygulanmıştır. İlaç, nanopartikül içermeyen medyum kontrol grubu olarak kanser hücrelerine uygulanmıştır. 2 saat sonra hücre ortamlarına serum ve antibiyotik ilave edilmiştir. Belirtilen sreler sonunda aşağıda belirtilen metodlarla komplekslerin etkileri araştırılmıştır.

3.2.8.3 Hücre içerisine floresein ile işaretli nanopartiküllerin aktarılması

Amaç, yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan hücrelere, floresein yüklenmiş nanopartiküllerin girip girmediğinin araştırılmasıdır. Bunun için de yine yukarıda belirtildiği gibi 24 vellerde hücreler hazırlanmıştır. Daha sonra da 250 μM nanopartikül, 1 μM floresein çözeltisi içerisinde 1 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Ardından partiküller santrifüj ile ortamdan ayrıldıktan sonra 0.15 M NaCl içerisinde hücrelere uygulanmıştır ve 30 dakika sonra vellere 500 μl serum içeren besi yeri ilave edilmiştir. 4 saat inkübasyonun sonunda besi yeri vellerden alınarak PBS ile 3 kez hücreler yıkanmıştır. Son olarak da floresan inverted mikroskopta hücreler FITC filtresi ile incelenmiştir.

3.2.8.4 Kaspaz-3-immunositokimyasal metod ile apoptosiz belirlenmesi

Bu metotta normalde apoptoza uğramayan kanser hücrelerinde kaspaz-3 proteini oluşmazken, apoptoza girmiş hücrelerde apoptoz yolunda oluşan proteinlerden biri de kaspaz grubu proteinlerdir ve kaspaz-3 bunlardan biridir. Bu nedenle yapılan immnositokimyasal boyama ile kaspaz-3 proteinleri onun için spesifik kaspaz antikoruna ile boyanarak uygulama sonucu apoptoza girip girmedikleri gösterilmiştir. Boyama işlemi sonucunda apoptoza girmemiş hücrelerin sitoplazmaları berrak, soluk mavi renkte görünürken, apoptoza uğramış kanser hücrelerinin sitoplazması kahverengiye boyanmaktadır.

Yukarıda belirtilen 24 saat uygulama sonucunda öncelikle spernatanttaki yüzen kalkmış hücreler 15 ml'lik Falcon tüpte toplanmıştır. Plate yüzeyinde yapışık olan hücreler süpernatantın alımını takiben, kuyucuklar 1 ml PBS ile 2 kez yıkandı, ardından 200 μl tripsin-

EDTA eklendi, 5 dakika beklendi ve hücreler toplanıp aynı Falcon'a ilave edildi. 3000 devir/dak hızda santrifüj edilerek hücreler elde edilmiştir. Santrifüj bittikten sonra süpernatantın aspire edilmesini takiben, pellet 1 ml PBS ile tek hücre süspansiyonu oluşturacak şekilde hazırlandı. Sitosantrifüj lam'ları (poli L lizinli) etiketlendi, hücrelerin toplanacağı bölge işaretlendi, santrifüj içine yerleştirildi, ardından 1 ml'lik hücre süspansiyonunun tamamı eklendi. 2200 rpm'de 4 dakika sitosantrifüj edildi. Lam'lar çıkartıldı ve oda ısısında bir gece kurumaya bırakıldı. Formalin ile fikse edildi. Lamalar önce % 0.2'lik Triton X 100 ile daha sonra PBS'de çözünmüş % 8'lik BSA ile 1 saat muamele edildi. BSA hafifçe lamellerin kenarından aspire edildi. Üzerine yıkama yapılmadan primer antikor (10 µL sulanmış kaspaz 3 alıp buna 990 µL PBS eklendi.) 100'ul pipetlendi. Buz üzerinde 1 saat bekletildi. Sekonder antikor uygulaması için her bir lamel üzerine Biotinden (link şişesi) 100 µL uygulandı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 2 mL PBS ile 2x3 dakika yıkandı ve PBS aspire edildi. Her bir lamel üzerine Streptavidin HRP şişesinden 100 µL uygulandı ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Lamellerin kenarından Streptavidin dikkatlice aspire edildi. 2 mL PBS ile 2x3 dakika yıkandı ve PBS aspire edildi. 100 µL DAB ile lameller muamele edildi (karanlıkta). Reaksiyon mikroskopta gözlendi. Kahverengi renkli boyanma gözlendiği zaman (yaklaşık 4-5 dakika) DAB lı lameller distile su ile yıkandı. 2x3 dakika lameller üzerine 100 µL Hematoxilen uygulandı. 3-4 saniye kadar bekletildi hemen önce çeşme suyu ile yıkandı ve daha sonrada 2x3 dakika distile su ile yıkandı. Gliserol damlatılıp mikroskop altında incelendi.

3.2.8.5 İkili boyama

İmmunositokimya protokolünde olduğu gibi falkona toplanan hücreler santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve üzerlerine ikili boyama solüsyonu (RNase, hoechst 33342, propidium iodide) konuldu ve 20 dakika etüvde inkübe edildi. Lam üzerine damlatıldıktan sonra lamelle kapatıldı ve floresan mikroskopta DAPI filitresi kullanılarak apoptoza uğramış ve FITC (480-520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapıldı. Değerlendirmede floresan mikroskopta (Leica DMI70, Almanya) 10 farklı alan (yaklaşık 1000 hücre) sayılarak ortalaması alınmıştır ve apoptotik indeks yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Değerlendirmede normal apoptotik olmayan hücreler çekirdekleri sönük mavi, çekirdekte DNA dağılmamış, hücrede veziküller oluşmamış olarak görülmektedir. Apoptoza girmiş hücre çekirdekleri ise normal hücre çekirdeklerine göre çok parlak, çekirdek homojenliği kaybolmuş, çekirdek kenarları düzgün olmayan, DNA parçalanmış, parlak mavi

görünümündedir. Kültür kabında yüzeye tutunan hücreler kaldırılmadan yukarıda belirtilen floresan boyama solüsyonu 100 µl/vell hücrelere uygulanarak da inceleme yapılmıştır. İkili boyama sonucunda apoptoza girmiş hücrelerin çekirdekleri Hoechst 33342 floresan boyası ile boyanmıştır. İkili boyamada kullanılan diğer boya propodium iyodid (PI) ise nekroza uğramış hücreleri göstermek amacı ile kullanılmıştır. PI floresan boyası normalde canlı ve hücre zarlarında hasar olmayan hücrelere giremez ve bu hücreler PI ile boyanmazlar. Fakat hücre nekroza uğradığında veya hücre zarı hasar gördüğünde hücre içersine girer ve çekirdeği kırmızıya boyar. Floresan ışık (FITC veya kırmızı floresan ışık) altında bakıldığında nekroza uğrayan hücrelerin çekirdekleri kırmızı renkte görülmektedir.

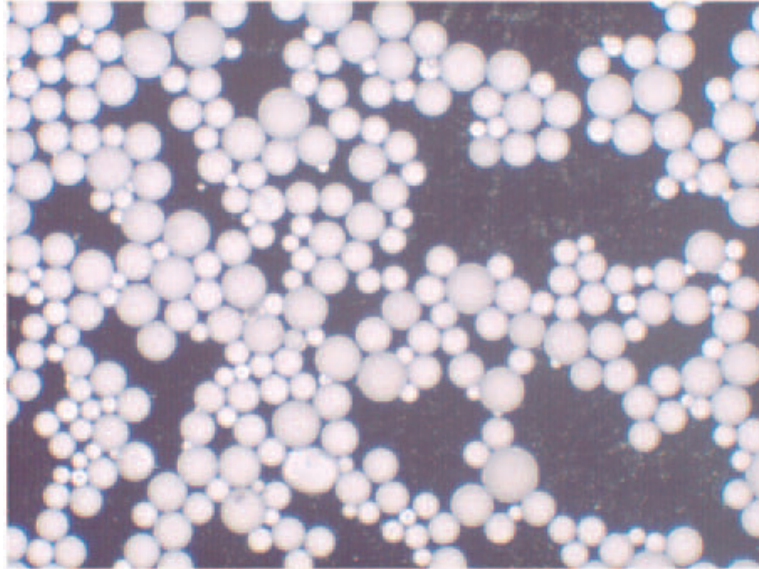
BÖLÜM 4

DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 PHBHHX MİKROKÜRELER

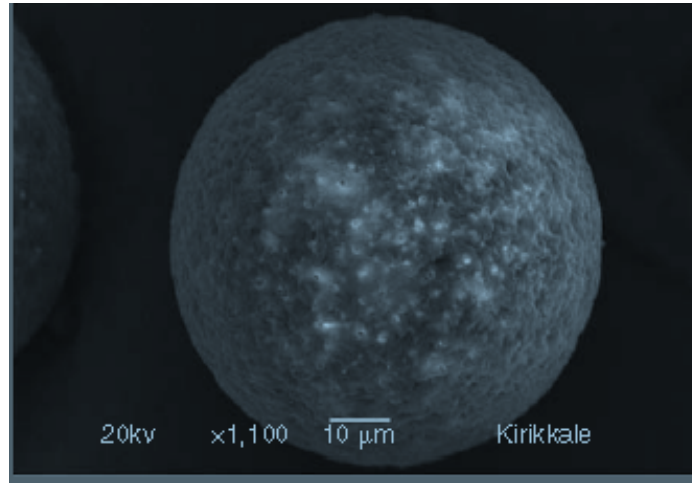
4.1.1 Morfolojik Değerlendirmeler

40-200 μm boyutundaki küresel PHBHHX polimerik mikroküreler çözücü buharlaştırma tekniği ile üretilmiştir. PHBHHX mikrokürelerin morfolojisi SEM ve optik mikroskop ile değerlendirilmiştir. PHBHHX mikrokürelerin SEM ve optik mikroskop görüntüleri sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1 PHBHHX mikrokürelerin optik mikroskop görüntüleri.

Mikroküreler oldukça düzgün küresel şekillidir ve Şekil 4.2’de yüzey morfolojisine bakıldığında, mikrokürelerin iç bölümüne doğru dönen bazı gözenekli yapılar tespit edilmiştir. Mikrokürelerin boy ve boy dağılımları, hazırlama koşulları ve formülasyonlara bağlıdır.



Şekil 4.2 PHBHHX mikrokürelerin SEM görüntüsü.

4.1.2 Partikül Boy ve Boy Dağılımlarını Etkileyen Parametreler

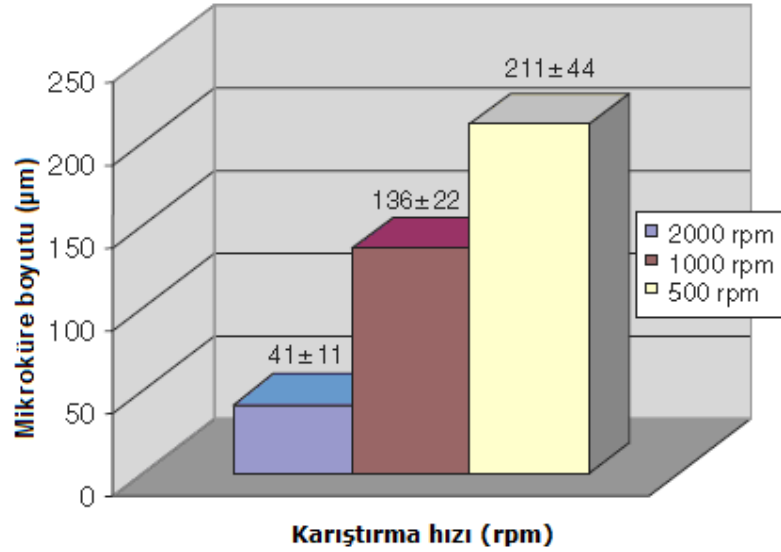
Ortalama boy ve boy dağılımı üzerine emülsifier konsantrasyonu, polimer/çözücü oranı ve karıştırma hızının etkisi araştırılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Mikrokürenin boy ve boy dağılımı üzerine etki eden parametreler.

Örnek no	PHBHHX konsantrasyonu (mg/mL)	PVA konsantrasyonu (mg/mL)	Karıştırma hızı (rpm)	Mikroküre çapı (µm)
Polimer konsantrasyonunun etkisi				
1	250	5	2000	101 ± 31
2	50	5	2000	41 ± 11
3	25	5	2000	39± 12
Emülsifier konsantrasyonunun etkisi				
2	50	5	2000	41 ± 11
4	50	1	2000	67± 23
5	50	10	2000	36 ± 9
Karıştırma hızının etkisi				
2	50	5	2000	41 ± 11
6	50	5	1000	136 ± 22
7	50	5	500	211 ± 44

4.1.2.1 Karıştırma Hızı

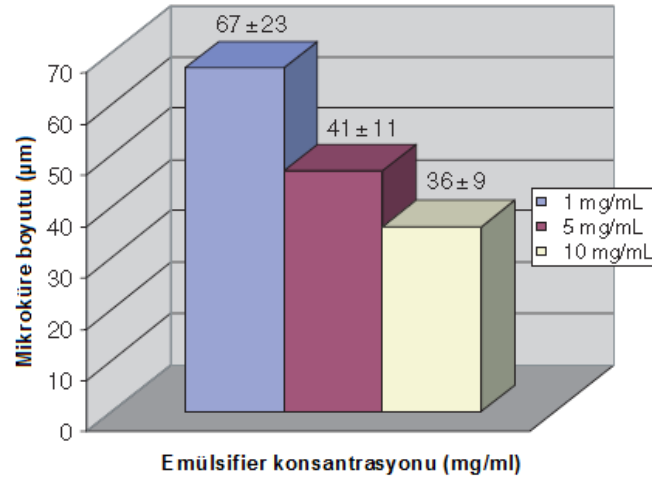
Dağılma ortamının karıştırma hızına etkisi sırasıyla 500, 1000 ve 2000 rpm’de değerlendirilmiştir. Karıştırma hızının mikroküre boyutuna etkisi Şekil 4.3’te gösterilmiştir. Karıştırma hızı azaldıkça ortama aktarılan enerji miktarı azalacağından partikül boyutu artmaktadır. Yüksek karıştırma hızı, polimer çözeltisinin daha küçük damlacıklara dağılmasına neden olmaktadır.



Şekil 4.3 PHBHHX mikroküre boyutu üzerine karıştırma hızının etkisi.

4.1.2.2 Emülsifier Konsantrasyonu

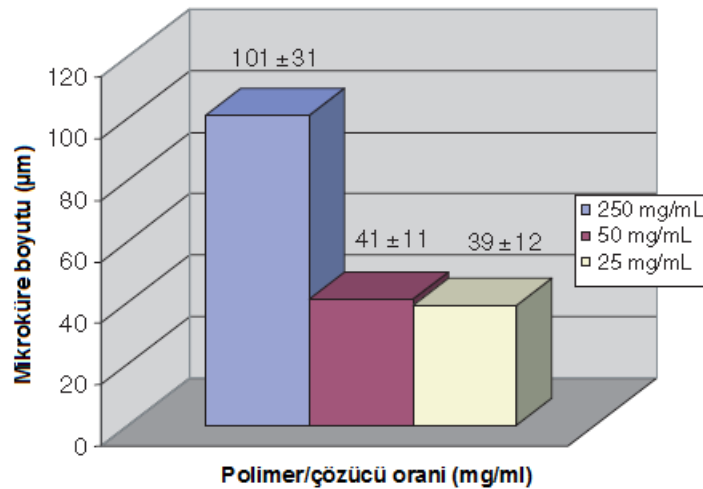
Emülsifier, çözücü buharlaştırma yöntemiyle polimerik mikroküreleri hazırlama aşamasında sulu ortam ve polimer arasındaki yüzey etkisini düzenlemektedir. Artan emülsifier konsantrasyonu, polimer ve sulu ortam arasındaki yüzey gerilimin azalmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada emülsifier konsantrasyonu, dispersiyon ortamı olarak 1-10 mg oranında PVA/mL distile su şeklinde değiştirilmiştir. Hazırlanan PHBHHX mikrokürelerin boy ve boy dağılım değerleri Şekil 4.4’te verilmiştir. Mikroküre boyutu, emülsifier konsantrasyonunun artmasıyla önemli ölçüde azalmıştır.



Şekil 4.4 PHBHHX mikroküre boyutu üzerine emülsifier konsantrasyonunun etkisi.

4.1.2.3 Polimer/Çözücü Oranı

Polimer konsantrasyonu, dispersiyon ortamındaki farklı polimer konsantrasyonu veya vizkozitesi için enerji değişimine dayalı, partikülün boy ve boy dağılımındaki değişimde kullanılan diğer etkin bir parametredir. Polimer konsantrasyonunun etkisini araştırmak için, seyreltik (25mg PHBHX/mL çözücü) ve konsantre (250 mg PHBHX/mL çözücü) polimer çözeltisi, polimerik mikroküre hazırlama esnasında dispersiyon ortamına damla damla eklendi. Şekil 4.5'te görülen boy ve boy dağılım değerleri, farklı polimer/çözücü oranları kullanılarak elde edilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi mikroküre boyutu, polimer/çözücü oranının artmasıyla artmıştır; yüksek polimer/çözücü oranı çözeltide vizkozite artışına neden olmaktadır, bu sebeple polimer çözeltisini dispers etmek oldukça zordur.



Şekil 4.5 PHBHHX mikroküre boyutu üzerine polimer/çözücü oranının etkisi.

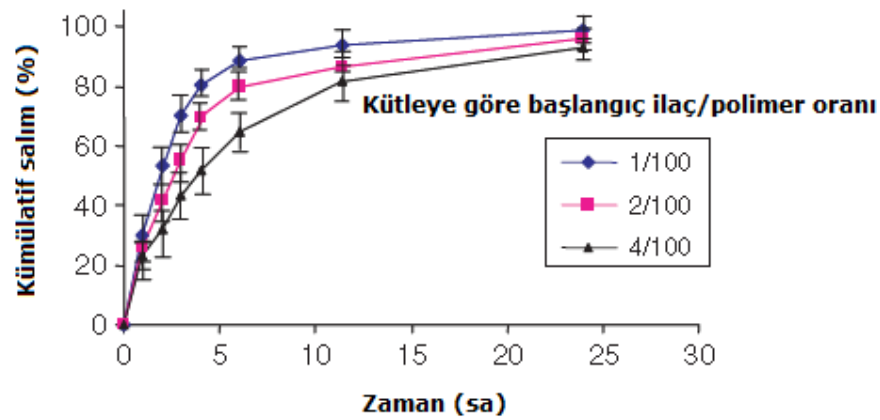
4.1.3 İlaç Yükleme ve İn vitro Salım Deneyleri

İlaç enkapsülasyon ve in vitro salım deneylerinde, kütleye göre başlangıçtaki ilaç/polimer oranı ilaç salım hızını etkileyen parametre olarak değerlendirilmiştir. Kütleye göre ilaç/polimer oranı 1/100, 2/100 ve 4/100 (w/w) olarak hazırlanmıştır ve enkapsülasyon etkinliği tayin edilmiştir. Başlangıçtaki ilaç/polimer oranı arttıkça ilaç salım hızı ve miktarı artmaktadır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6).

Ek olarak, zamana karşı salınan ilacın yüzdesine dayalı ilaç salım grafiğinde Şekil 4.6’da görüldüğü gibi ilaç salım hızı, ilaç yükleme miktarı arttıkça artmaktadır. Diğer taraftan, formülasyonların çoğunda, toplam ilaç miktarının %90’dan fazlası 24 saat içerisinde salınmıştır. Belirli zaman periyodundan sonra çok yavaş salım hızı gözlenmiştir.

Çizelge 4.2 İlaç enkapsülasyon verimi.

ilaç/polimer (w/w)	1/100	2/100	4/100
İlaç enkapsülasyon verimi (%)	0.8 ± 2.8	17.8 ± 3.3	15.1 ± 4.1



Şekil 4.6 Triamsinolon asetonid yüklü PHBHHX mikrokürelerin in vitro salım profili.

4.1.4 Sonuç

Bu çalışmada, hazırlama koşullarının (dispersiyon ortamının karıştırma hızı, emülsifier konsantrasyonu ve polimer/çözücü oranı) değiştirilmesiyle 40 ile 200 µm boyutları arasında değişen triamsinolon asetonid yüklü PHBHHX mikroküreler çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak hazırlanmıştır. Karıştırma hızı, prosedür esnasında polimerik damlacıkların oluşumu için ihtiyaç duyulan enerji desteğini etkilemektedir ve mikrokürenin boyutu, karıştırma hızının artmasıyla azalmaktadır. Daha fazla emülsifier miktarı ile, mikrokürenin boy ve boy dağılımı, ortamdaki yüzey gerilim farkının azaltılmasından dolayı azalmaktadır. Polimer/çözücü oranı, polimer çözeltisindeki viskozitenin artışıyla bağlantılı olarak boy ve boy dağılımını arttırmaktadır. Bu parametrelerin optimize edilmesiyle, farklı boy ve boy dağılımına sahip PHBHHX mikroküreler hazırlanmıştır. Triamsinolon asetonid, mikroküreyi hazırlamadan önce polimer çözeltisi içerisine dağıtılmıştır. İlk 24 saat içerisinde ilacın %90'ı salınmıştır, bundan sonra hızı daha yavaşlamıştır. Salım profili, başlangıçtaki ilaç/polimer oranının değiştirilmesiyle ayarlanabilmektedir ve partikül boy dağılımı, emülsifier, polimer konsantrasyonu ve karıştırma hızı ile kontrol edilebilmektedir. PHBHHX mikroküreler, ilacın kontrollü bir şekilde salımını gerçekleştirmektedir ve birçok hastalığın tedavisinde umut verici taşıyıcılardır (Bayram et al. 2008).

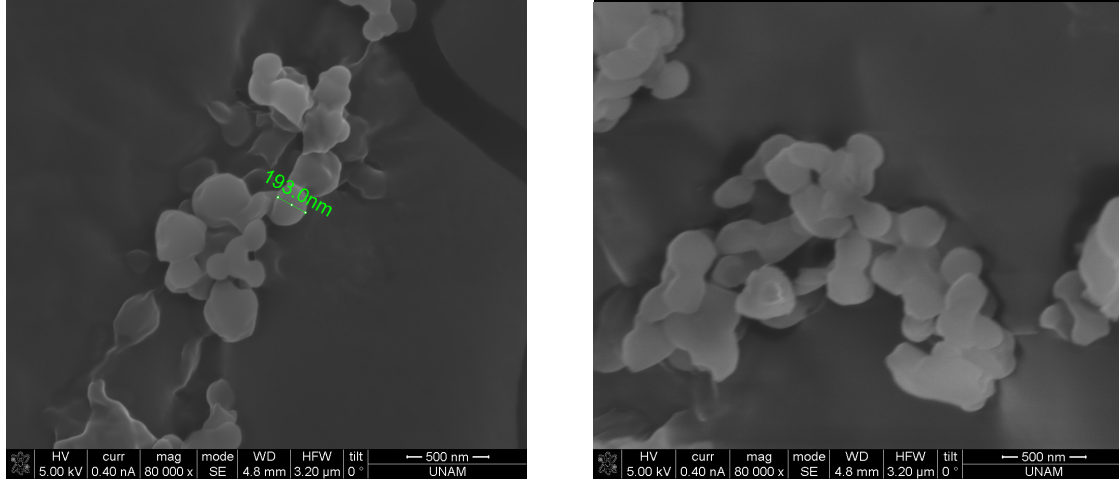
4.2 PHBHHX NANOKÜRELER

Bu bölümde çözücü buharlaştırma yöntemiyle PHBHHX nanopartiküller elde edilmiştir. Farklı boy ve boy dağılımına sahip nanopartikülleri elde etmek için polimer/çözücü oranı, karıştırma hızı ve emülsifier konsantrasyonu değiştirilerek bir dizi parametre gerçekleştirilmiştir.

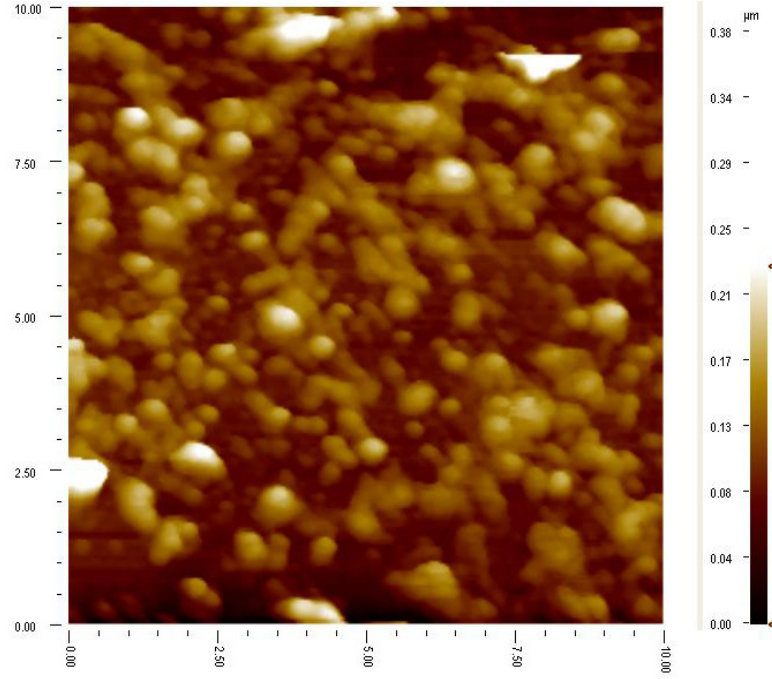
4.2.1 PHBHHX Nanopartiküllerin Morfolojik Özellikleri

PHBHHX nanopartiküllerin morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla SEM ve AFM görüntüleri Şekil 4.7 A ve B'de gösterilmiştir.

SEM ve AFM görüntülerine bakıldığında nanopartiküllerin ortalama boyutları 190-220 nm arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca şekilden de görüldüğü gibi nanopartiküllerin oldukça düzgün ve küresel formda oldukları anlaşılmaktadır.



(A)



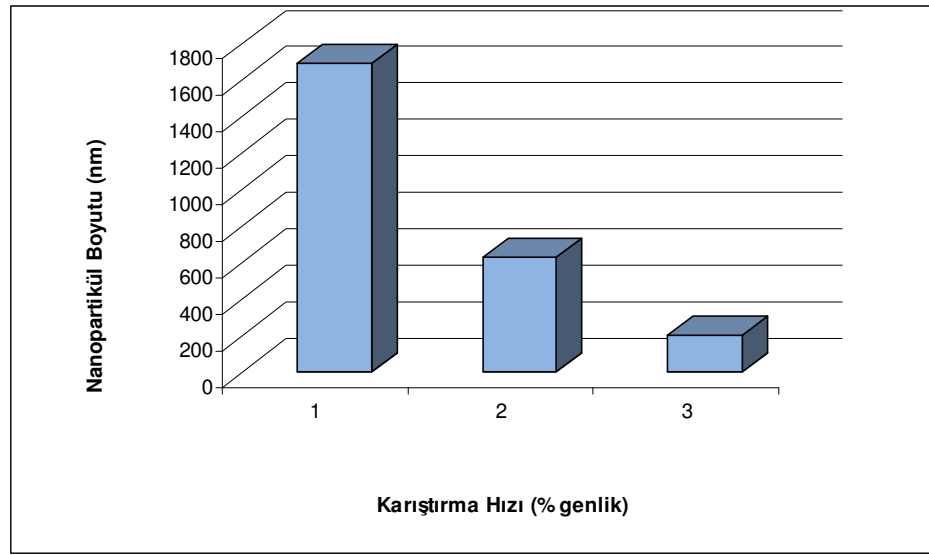
(B)

Şekil 4.7 A) PHBHHX nanopartiküllerin SEM görüntüsü. B) PHBHHX nanopartiküllerin AFM görüntüsü.

4.2.2 PHBHHX Nanopartiküllerin Boy-Boy Dağılımına Etki Eden Parametreler

4.2.2.1 Karıştırma Hızı

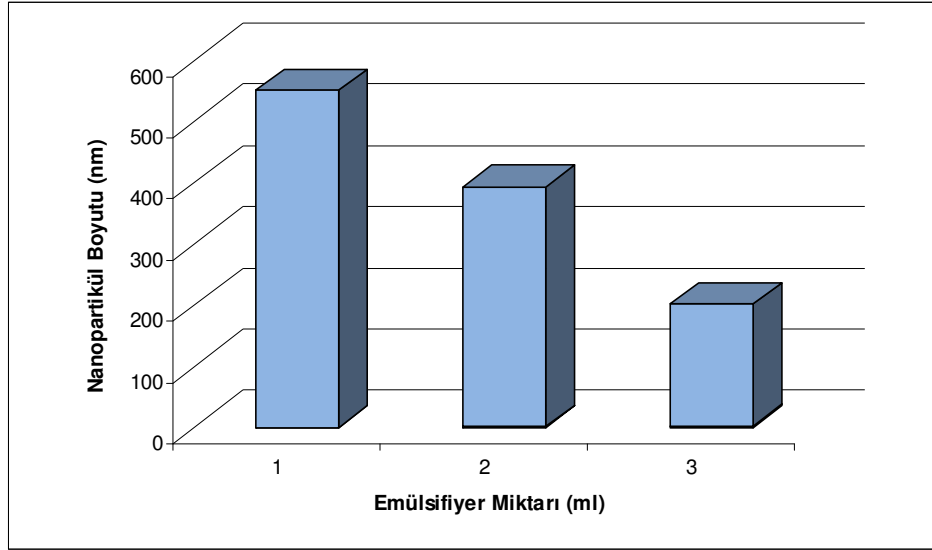
En önemli parametrelerden biri çözücü buharlaştırma tekniğini kullanarak hazırlanan polimerik nanopartiküllerdeki dispersiyon ortamının karıştırma hızıdır. Bu sebeple, dispersiyon ortamındaki karıştırma hızı PHBHHX nanopartiküllerin oluşumu esnasında % 60, %70 ve % 90 olarak değiştirilmiştir. Diğer parametreler sabit tutulmuştur. Şekil 4.8 de görüldüğü gibi yüzde genlik miktarı arttıkça, ortama aktarılan enerji miktarı arttığından dolayı nanopartikül boyutunun azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.8 Karıştırma hızının boy-boy dağılıma etkisi.

4.2.2.2 Emülsifier Konsantrasyonu

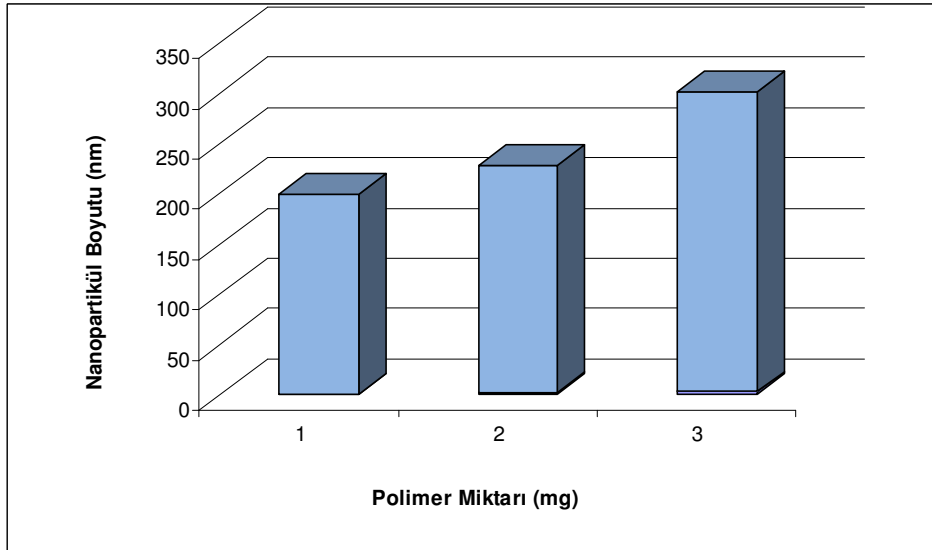
Emülsifier, sulu ortam ve polimer arasında ihtiyaç duyulan yüzey gerilimini sağlamaktadır. Emülsifier konsantrasyonunun artması polimer ve sulu ortam arasındaki yüzey gerilim farkının azalmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle Şekil.4.9’da görüldüğü gibi emülsifier konsantrasyonu arttıkça nanopartiküllerin boyutunun küçüldüğü gözlenmiştir.



Şekil 4.9 Emülsifier miktarının boy-boy dağılıma etkisi.

4.2.2.3 Polimer/Çözücü Oranı

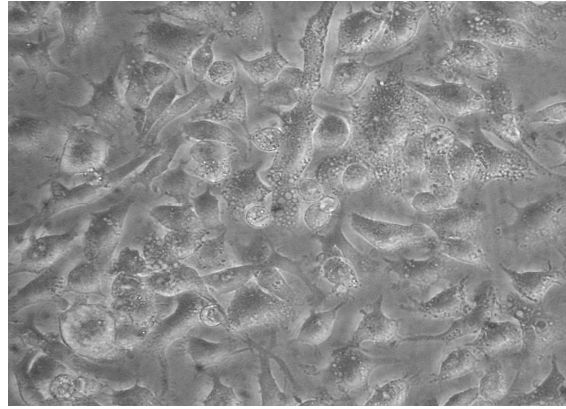
Polimer konsantrasyonu arttıkça vizkozite artışından dolayı polimerin dispersiyon ortamında dağıtılması zorlaşacağından partikül boyutunun artmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla Şekil 4.10'da da görüldüğü gibi ortamdaki polimer/çözücü oranı arttıkça vizkozite artacağından dolayı nanopartiküllerin boyutu da artmaktadır.



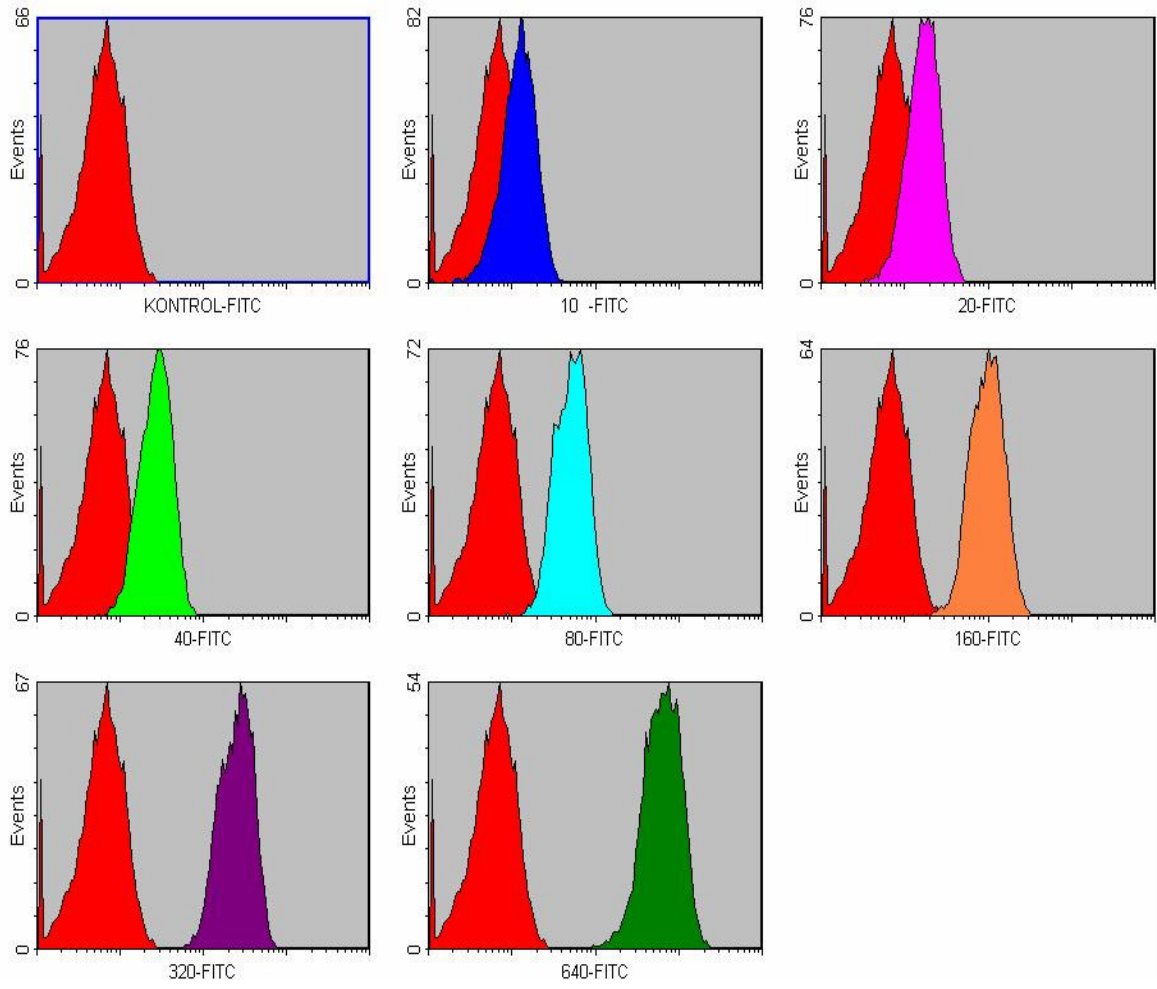
Şekil 4.10 Polimer miktarının boy-boy dağılıma etkisi.

4.2.3 FITC ile işaretli nanopartiküllerin fagositoz tayininde kullanımı

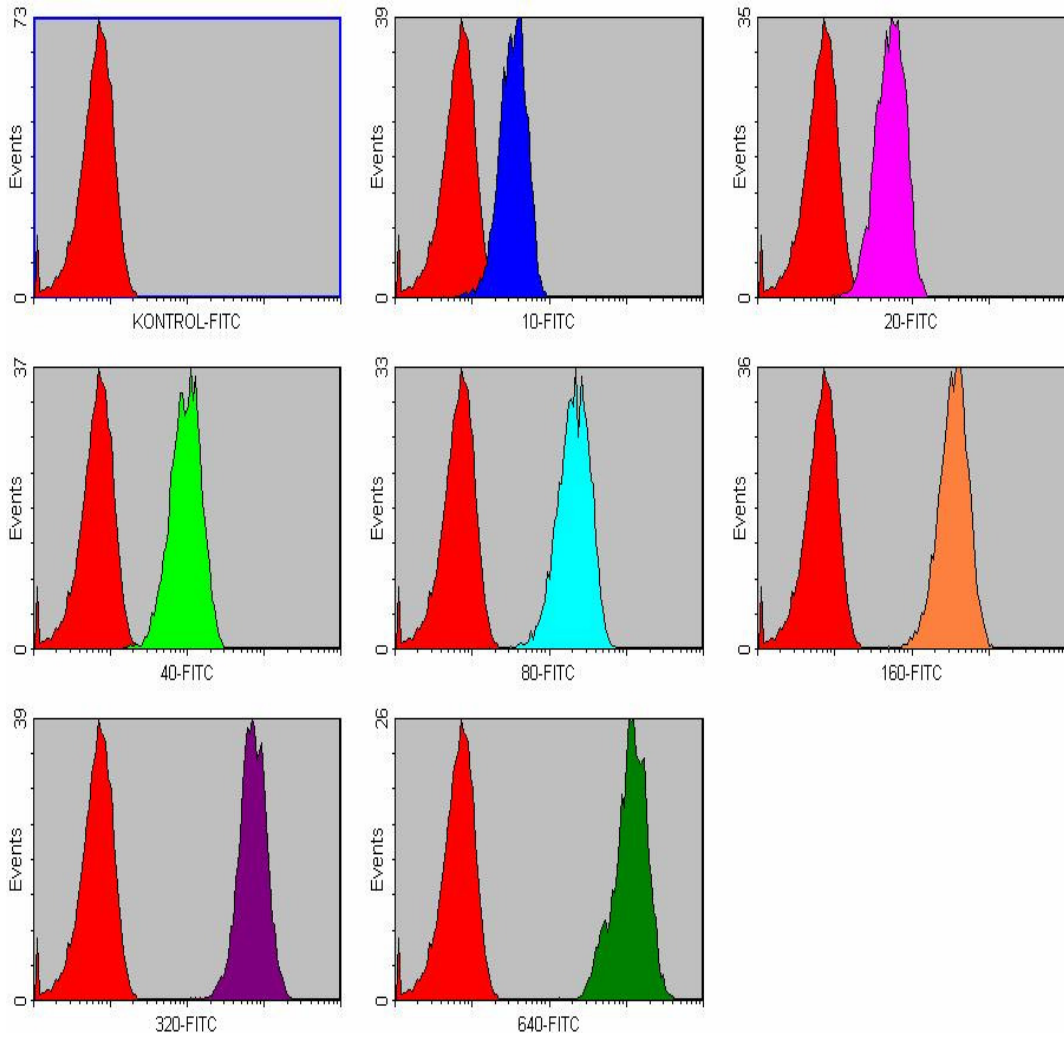
Fagositoz deneyi RAW 264.7 fare makrofajlarında gerçekleştirildi (Şekil 4.11). 2 adet 12 çukurlu hücre kültür plağında her çukura 5×10^5 hücre % 10 FCS içeren 2 ml RPMI 1640 içinde kondu. 16 saat sonra fagositoz deneyine başlandı. İlk çukur kontrol olarak ayrıldı. Diğer çukurlara sırasıyla 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 µl FITC ile işaretli nanopartikül eklendi. Bu işlemler iki plak için aynen uygulandı. Çukurlar içerisindeki hacim nanopartikül solusyonuyla birlikte RPMI 1640 ile 3 ml'ye tamamlandı. 4. (birinci plak) ve 24. (ikinci plak) saatlerde tüm çukurlardan elde edilen hücreler Flow cytometry (Beckman Coulter Epics XL MCL) cihazında okutuldu. Her bir örnekte 20 bin hücre sayıldı. 4 ve 24 saatlik fagositoz sonuçları ayrı ayrı histogramlarla alındı (Şekil 4.12 ve 4.13). Hücre başına düşen floresan yoğunlukları karşılaştırıldı. Eş zamanlı mikroskopik fotoğraf görüntüsü alındı (Şekil 4.14).



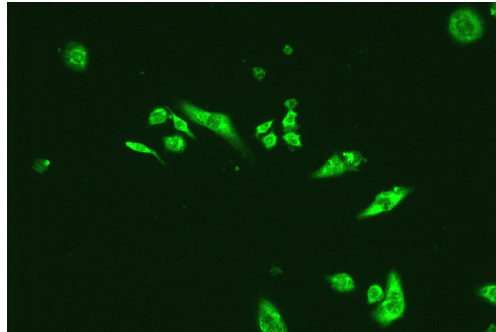
Şekil 4.11 RAW 264,7 hücrelerin faz-kontrast mikroskopik görünümü (400X).



Şekil 4.12 (4.saat) **Kontrol**: Nanopartikül bulunmayan RAW 264,7 makrofaj; **10-FITC**: 10μl işaretli nanopartikül eklenen hücreler. İşaretli nanopartikül miktarı arttıkça hücre içi floresan miktarı artmaktadır.



Şekil 4.13 (24 saat) **Kontrol**: Nanopartikül bulunmayan RAW 264,7 makrofaj **10-FITC**: 10µl işaretli nanopartikül eklenen hücreler. İşaretli nanopartikül miktarı arttıkça hücre içi floresan miktarı artmakta.



Şekil 4.14 Nanopartikül fagosit eden hücrelerde sitoplazmik floresan ışıması (200X), Nikon.

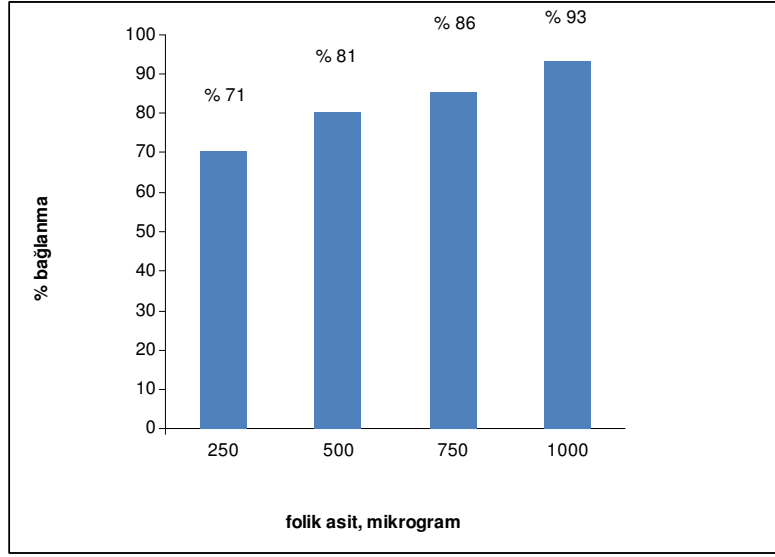
Mikroskop görüntülerine baktığımızda hazırladığımız FITC işaretli PHBHHX nanopartiküllerin hücre içerisine girdiği, hücre içerisinde floresan ışımaya başlamasıyla saptanmıştır. Sonuç olarak PHBHHX nanopartiküllerin hücre içerisine rahatlıkla girebildikleri gözlemlendiğinden dolayı bu çalışmada HeLa ve L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak ilaçlı ve ligandlı nanopartiküllerin kanser hücrelerindeki sitotoksik etkileri incelendi ve hücrelere hedefleme çalışmaları yapıldı.

4.2.4 PHBHHX Nanotaşıyıcılarının Folik Asit ile Modifikasyonu

UV spektrofotometre ile 280 nm dalga boyunda folik asitin nanopartiküllere bağlanma kapasitesi; bağlanma öncesi ve bağlanma sonrası şeklinde ölçülmüş olan absorban değerlerinin farkından yola çıkarak yüzde bağlanma hesaplanmıştır.

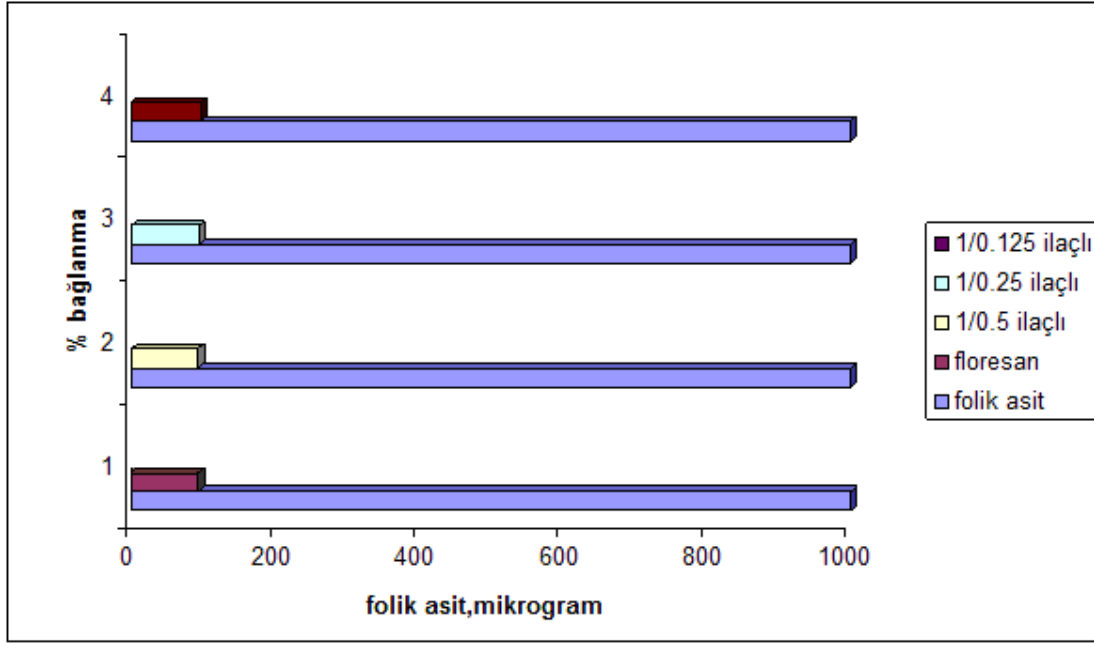
$$\% \text{ Bağlanma} : \frac{\text{Bağlanma sonrası örneğin abs.değeri} - \text{Bağlanma öncesi örneğin abs. değeri}}{\text{Bağlanma sonrası örneğin abs.değeri}} * 100$$

250, 500, 750 ve 1000 µg'lık folik asit kullanılarak bağlanma yüzdesi hesaplanmıştır (Şekil 4.15). 250 µg folik asit kullanıldığında ligand bağlanması % 71; 500 µg folik asit kullanıldığında %81; 750 µg folik asit kullanıldığında % 86; 1000 µg folik asit kullanıldığında % 93'tür. Şekil 4.15'de görüldüğü gibi folik asit miktarı arttıkça bağlanma yüzdesinin de arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.15 Folik asit miktarına karşı bağlanma yüzdesine ait grafik.

Elde edilen sonuçlara baktığımızda 1000 µg folik asit kullanıldığında ligand bağlanma yüzdesinin en fazla olduğunu görüyoruz. Bu sonuçtan yola çıkarak kanserli hücelere ligand bağlı partiküllerin hedefleme çalışmaları ve sitotoksite testleri için 1000 µg folik asit içeren 1/0.5 ilaçlı, 1/0.25 ilaçlı, 1/0.125 ilaçlı nanopartiküller ve floresan yüklü nanopartiküller hazırlanmıştır. Buna göre floresan yüklü nanopartiküldeki ligand bağlanma yüzdesi % 92.8; 1/0.5 ilaçlı nanopartikülde % 93.1; 1/0.25 ilaçlı nanopartikülde % 95.1 ve 1/0.125 ilaçlı nanopartikülde ise % 96.4 olarak bulunmuştur (Şekil.4.16). Bu sonuçlara göre nanopartiküle floresan yüklenmesi, farklı konsantrasyonlarda ilaç yüklenmesi durumunda ligand bağlanma yüzdeleri oldukça yüksek olmakla birlikte, bağlanma yüzdeleri arasında çok fark gözlenmemiştir.

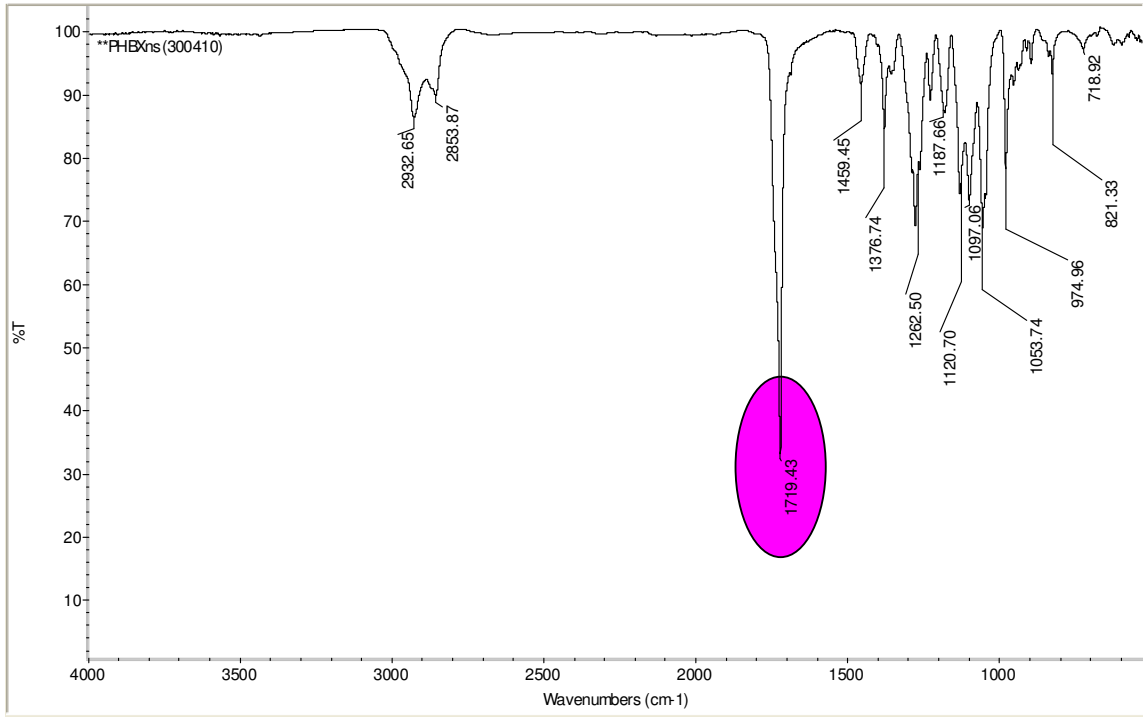


Şekil 4.16 1/0.5, 1/0.25, 1/0.125 oranında ilaç yüklü ve floresan yüklü nanopartiküllere folik asit bağlanma yüzdesi.

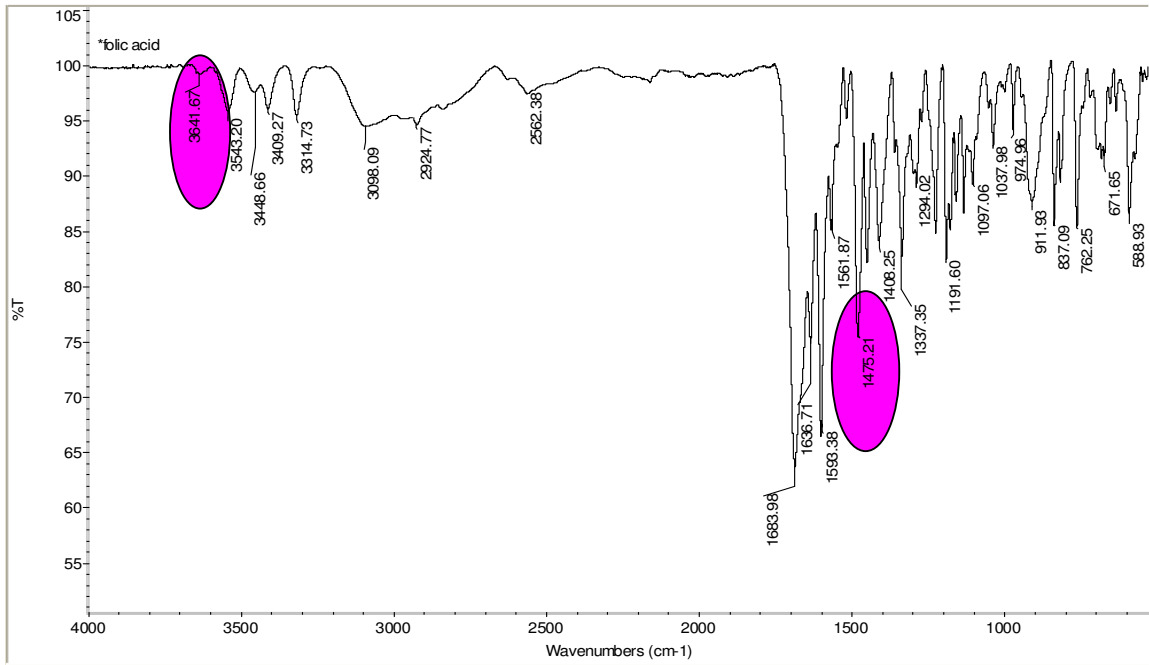
4.2.4.1 Folik Asit Bağlı PHBHHX Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.2.4.1.1 FTIR Spektrumları

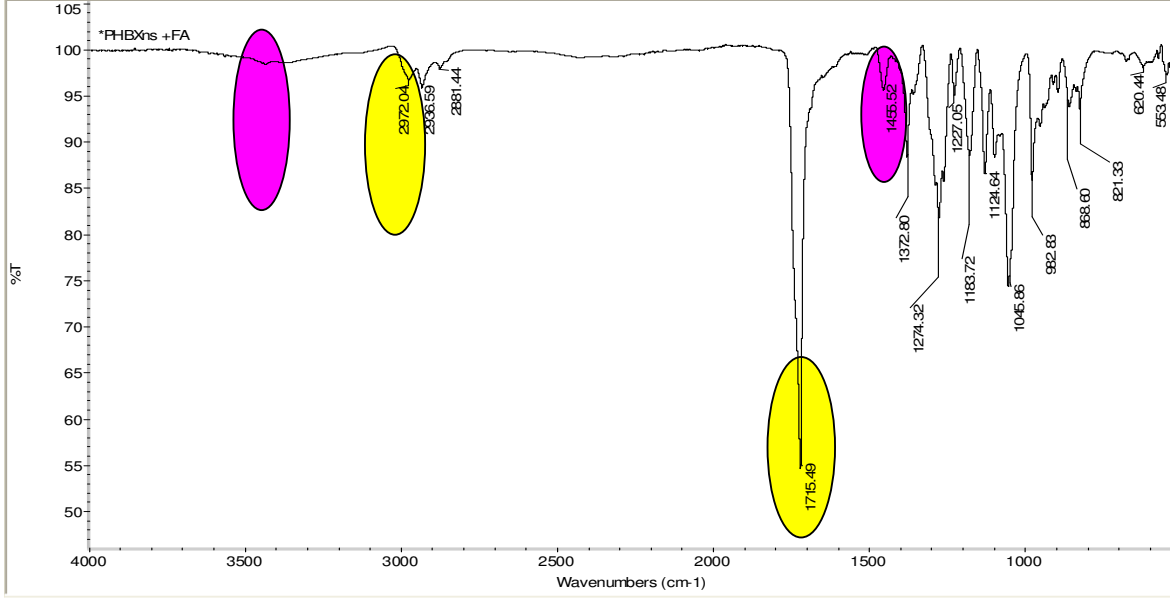
Folik asit bağlı PHBHHX nanotaşıyıcılar ile folik asitin ve PHBHHX nanopartikülünün FTIR spektrumları çekilmiştir. Şekil 4.17'de 1719 cm^{-1} 'de görülen band PHBHHX'deki karboksil grubuna aittir. Şekil 4.18'de folik asitin FTIR spektrumuna bakıldığında 3641 cm^{-1} 'de OH ve 1475 cm^{-1} 'de fenil halkasına ait karakteristik pikleri gözlenmiştir. Şekil 4.19'a baktığımızda 2972 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandı OH ve NH- grupları arasındaki bağlanmadan kaynaklanmaktadır. Folik asitle yapılan literatür çalışmalarında da benzer değerler bulunmuştur (Zhang et al. 2008). Folik asitin PHBHHX nanopartiküle bağlanmasından dolayı folik asitin 1455 cm^{-1} 'deki fenil halkasında ve 3400 cm^{-1} civarındaki OH pikinde az miktarda kayma gözlenmiştir.



Şekil 4.17 PHBHHX nanopartikül FTIR spektrumu.



Şekil 4.18 Folik asit FTIR spektrumu.



Şekil 4.19 Folik asit bağlı PHBHHX nanopartikül FTIR spektrumu.

4.2.5 PHBHHX Nanotaşıyıcılara İlaç Yükleme Etkinliği

PHBHHX nanopartiküllere sırasıyla 1/0.5, 1/0.25 ve 1/0.125 (w/w) oranında etoposid yüklenmiştir. İlaç yüklü nanopartiküllerin 284 nm’de absorbanları ölçülmüştür. İlacın kalibrasyon grafiğinden elde edilen denkleme göre nanopartiküllere yüklenen etken madde miktarları hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyonlardaki ilacın PHBHHX nanopartiküle hapsedilme oranları.

polimer (w/w)	% hapsedilen ilaç
1/0.5	%35
1/0.25	%45
1/0.125	%53

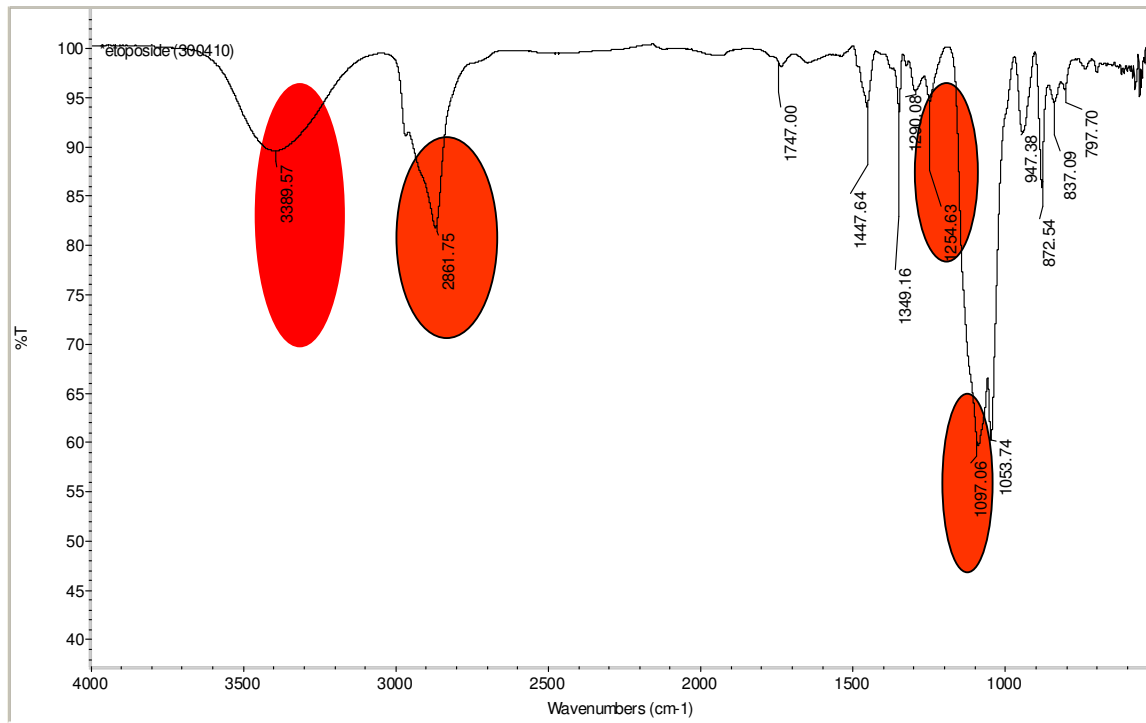
Sonuçlara baktığımızda ilaç yükleme miktarının artmasıyla ilaç yükleme konsantrasyonu artmaktadır. Dolayısıyla kullanılan ilaç miktarı arttıkça nanopartiküle yüklenen ilaç oranı da artış göstermektedir. Çizelge 4.3’deki sonuçlara göre kullanılan ilaç miktarı azaldıkça yüzde ilaç hapsedilme miktarında artış gözlenmiştir. Bunun sebebi polimer matriks ve dış sulu faz arasındaki konsantrasyon gradienti arttıkça üretim prosesinde çok daha fazla ilaç kaybı

olmakta ve dolayısıyla kullanılan ilaç miktarı arttıkça nanopartiküle ilaç hapsetme etkinliği azalmaktadır (Yun Lu et al. 2010).

4.2.5.1 Etoposid Yüklü PHBHX Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

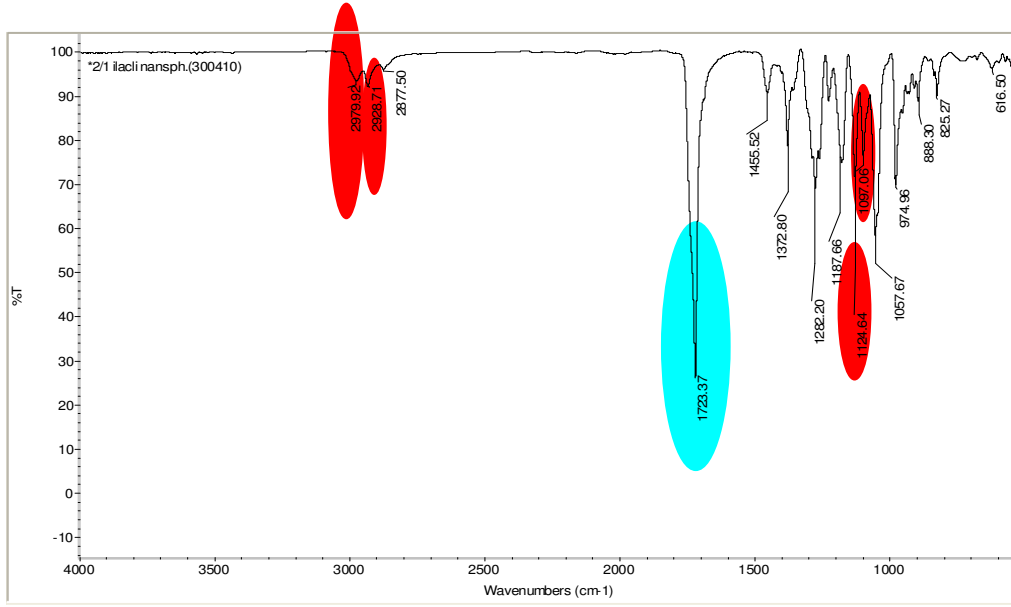
4.2.5.1.1 FTIR Spektrumları

Etoposid 3389 (O-H bandı), 2861 (C-H bandı), 1254 ve 1097 cm^{-1} 'de (C-O bandı) karakteristik pikler vermiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 Etoposid FTIR spektrumu.

Şekil 4.21'deki FTIR spektrumuna baktığımızda; PHBHHX'deki karboksil grubuna ait olan pik 1723 cm^{-1} civarında gözlenmiştir. 2979 cm^{-1} 'de OH, 2928 cm^{-1} civarında C-H, 1124 ve 1097 cm^{-1} arasında C-O gerilim bandı görülmektedir. Piklerde bir miktar kayma gözlenmiştir. Bu durum etoposid etken maddesinin PHBHHX nanotaşıyıcıya yüklenmiş olduğunu göstermektedir.

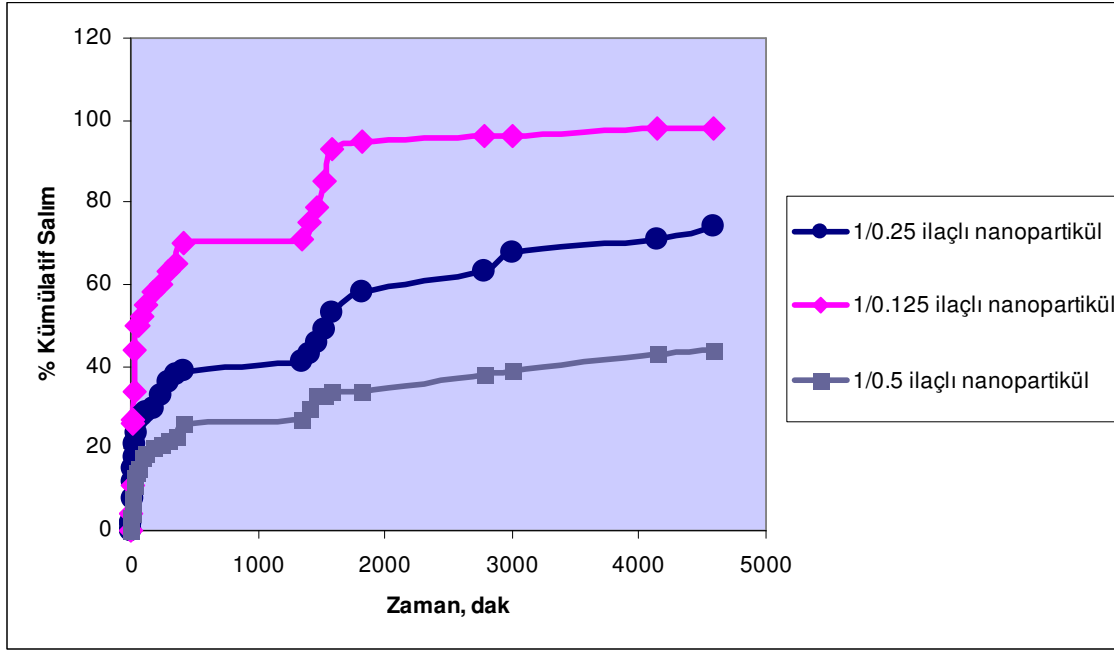


Şekil 4.21 Etoposid yüklü PHBHHX nanopartikül FTIR spektrumu.

4.2.6 Etoposid Yüklü Nanotaşıyıcıların in vitro İlaç Salımı

Bu çalışmada PHBHHX nanopartiküllere farklı oranlarda etoposid yüklenmiştir. Söz konusu yüklenen ilaç miktarları kütle/kütle cinsinden 1/0.5, 1/0.25 ve 1/0.125'tir. Belirli zaman aralıklarında nanopartiküllerden salınan ilaç miktarlarını tayin etmek amacıyla absorbands ölçümleri nanodrop kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve farklı zamanlarda absorbands değerleri elde edilmiştir. Etoposid için elde edilen kalibrasyon eğrisi, absorbands değerleri ve yüzde hapsedilen ilaç miktarları kullanılarak salınan ilacın mikrogram cinsinden değeri bulunmuştur ve farklı konsantrasyonlardaki ilacın zamana karşı % kümülatif değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.22). Şekil 4.22'ye baktığımızda 1/0.125 oranındaki nanopartikülün salım hızı en yüksek, buna karşılık 1/0.5 oranındaki nanopartikülün salım hızı ise en düşüktür. 1/0.5 oranında ilaçlı nanopartikülde kullanılan ilaç miktarı en fazladır. İlaç yükleme içeriği arttıkça nanopartiküle hapsedilen ilaç miktarı azalmaktadır. Çünkü, nanopartiküle yüklenen ilaçtan dolayı partiküldeki konsantrasyonla dış sulu faz arasındaki konsantrasyon farkı arttığından dolayı daha fazla ilaç partikülden salınmakta ve dolayısıyla 1/0.5 oranındaki nanopartikülden ilaç daha çok difüze olduğu için daha az miktarda ilaç enkapsüle olmaktadır. Sonuçta diğer ilaç yüklü nanopartikül oranlarıyla karşılaştırdığımızda 1/0.5'deki % hapsedilme miktarı diğerlerine göre azmış gibi görünse de aslında daha fazla ilaç kullanıldığından ilaç yükleme etkinliği daha fazladır. Dolayısıyla da Şekil 4.22'de de görüldüğü gibi 1/0.5 oranında ilaç

yüklü nanopartiküldeki ilaç miktarı, 1/0.125 oranındaki partikülden fazla olduğu için daha uzun süreli salım söz konusudur. 1/0.125 oranında ilaç içeren nanopartikülde bulunan ilaç miktarı en az olduğundan dolayı en hızlı salım gerçekleşmiştir. MTT ve hedefleme çalışmalarından elde edilen bulgular da bu durumu desteklemektedir. 1/0.125 oranındaki partikülden daha hızlı bir şekilde ilaç salındığından dolayı sitotoksik oranı ve kanser hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkisi en fazladır. Elde edilen sonuçlar literatür çalışmalarıyla da uyusmaktadır (Yun Lu et al. 2010).



Şekil 4.22 PHBHHX nanopartiküllerden etoposid salım grafiği.

4.2.7 PHBHHX Nanopartiküllerin in-vitro Sitotoksiste Çalışması

Bu çalışmada 5, 10, 25 ve 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda boş PHBHHX nanopartikül, farklı konsantrasyonlarda etoposid yüklenmiş (1/0.5, 1/0.25, 1/0.125 (polimer/etoposid oranı) PHBHHX nanopartiküller ve tek başına etoposid'in HeLa hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri incelenmiştir. Bunun için HeLa hücreleri 12×10^3 hücre/ml konsantrasyonda 96 kuyucuklu plaka ekilmiş ve bir gece etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 96 kuyucuklu plaktaki vasat atılmış ve 5, 10, 25 ve 50 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda farklı formlarda PHBHHX nanopartikül ve tek başına etoposid içeren vasat hücrelerin üzerine pipetlenmiştir. Bir gece etüvde inkübe edildikten sonra sitotoksiste testi yapılmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'deki gibidir.

Çizelge 4.4 1/0.5, 1/0.25, 1/0.125 (polimer/etoposid) oranlarında etoposid yüklenmiş PHBHHX nanopartiküllerin 5, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

	Nanopartikül konsantrasyonu (µg/ml)	Ortalama Absorbans ±STD	Hücre Canlılığı±STD (%)
Kontrol	0	1,288±0,130	100
PHBHHX nanopartikül	50	1,033 ±0,072	92,708±5,654
	25	1,145±0,072	88,898±5,647
	10	1,120±0,088	86,931±6,842
	5	1,078±0,042	83,696±3,268
PHBHHX nanopartikül-1/0.5 etoposid	50	1,072±0,077	83,281± 5,986
	25	1,030±0,072	79,981±5,631
	10	1,039±0,124	80,667±9,632
	5	1,122±0,081	87,150±6,361
PHBHHX nanopartikül-1/0.25 etoposid	50	1,154±0,032	82,117±5,987
	25	1,178±0,051	89,833±5,631
	10	1,176±0,122	91,343±9,483
	5	0,964±0,057	74,896±4,487
PHBHHX nanopartikül-1/0.125 etoposid	50	0,762±0,060	56,532±7,387
	25	0,804±0,037	69,221±8,727
	10	0,956±0,100	74,234±7,827
	5	0,884±0,081	89,884±4,719

Yapılan bu çalışmada PHBHHX nanopartiküllerin ve farklı oranlarda etoposid yüklü PHBHHX nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Etoposid yüklü PHBHHX nanopartiküllerle yapılan çalışmalara göre 1/0.5 (polimer/etoposid) oranında etoposid yüklü PHBHHX nanopartiküle % 35, 1/0.25 oranında etoposid yüklü PHBHHX nanopartiküle % 45, 1/0.125 oranında etoposid yüklü nanopartiküle ise % 53 oranında etoposid yüklendiği bulunmuştur. Yapılan salım çalışmalarına göre 1/0.125 oranında etoposid yüklü nanopartiküle %53 oranında etoposid yüklenebilmiş olmasına karşın kullanılan etoposid/polimer oranı dikkate alındığında, en yüksek ilaç yükleme oranının 1/0.5 (polimer/etoposid) oranındaki nanopartikülde gerçekleştiği anlaşılmıştır.

Yapılan hücre kültür testlerine göre farklı oranlarda PHBHHX nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerine sitotoksitelerine baktığında 50 µg/ml konsantrasyonda 1/0.125 oranında ilaç yüklü nanopartikülün %43,47; 1/0.25 oranında ilaç yüklü nanopartikülün %17,88; 1/0.5

oranında ilaç yüklü nanopartikülün 16,72; etoposid içermeyen PHBHHX nanopartikülün ise %7,29 oranında sitotoksik olduğu görülmüştür. 1/0.125 (polimer/etoposid) oranında etoposid içeren PHBHHX nanopartiküllerin diğerlerine göre daha sitotoksik olduğu bulunmuştur. Bu durum nekrotik indeks çalışması ile de uyumludur.

Çizelge 4.5 1/0.5, 1/0.25, 1/0.125 (polimer/etoposid) oranlarında etoposid yüklenmiş folik asit bağlı PHBHHX nanopartiküllerin 5, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonlarda HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkileri.

	Nanopartikül konsantrasyonu (µg/ml)	Ortalama Absorbans (570) ±STD	Hücre Canlılığı ± STD (%)
Kontrol	0	1,288±0,13	100
PHBHHX nanopartikül-folik asit	50	1,153±0,115	89,585±8,956
	25	0,970±0,404	86,904±7,922
	10	1,099±0,101	85,337±7,916
	5	1,251±0,174	95,781±8,631
PHBHHX nanopartikül-folik asit-1/0.5 etoposid	50	1,124±0,112	87,318±8,748
	25	1,185±0,117	92,003±9,133
	10	1,040±0,080	80,767±6,263
	5	1,033±0,083	80,224±6,427
PHBHHX nanopartikül-folik asit-1/0.25 etoposid	50	0,762±0,0603	59,217±4,682
	25	0,804±0,0374	62,433±2,901
	10	0,786±0,073	61,047±5,686
	5	0,884±0,082	68,644±6,330
PHBHHX nanopartikül-folik asit-1/0.125 etoposid	50	0,807±0,073	62,655±5,688
	25	0,798±0,051	61,956±3,950
	10	0,935±0,106	72,626±8,217
	5	0,918±0,076	71,284±5,895

Yapılan bu çalışmada folik asit takılı PHBHHX nanopartiküllerin ve farklı oranlarda etoposid yüklü folik asit bağlı PHBHHX nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Folik asit takılmış, farklı oranlarda etoposid yüklü PHBHHX nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkilerine bakıldığında 1/0.125 (polimer/etoposid) oranında etoposid yüklü ligand bağlı partiküllerin diğerlerine göre % 5-10 arasında daha sitotoksik olduğu görülmüştür. Bu nanopartiküllerin folik asit takılmış ve takılmamış formlarının sitotoksik etkileri incelendiğinde folik asit takılı nanopartiküllerin yaklaşık % 5 oranında daha

sitotoksik olduğu görülmüştür. Bu durum kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama ile elde edilen apoptotik indeks sonuçları ile uyumludur.

Yapılan diğer bir çalışmada 5, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonda etoposidin HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.6'daki gibidir.

İlaç salım sonuçlarına göre 1/0.5 (polimer/etoposid) oranında ilaç yüklü PHBHHX nanopartiküllerin etoposidi enkapsüle etme oranı % 35; 1/0.25'te % 45, 1/0.125'te ise bu oran % 53'dür. Bu sonuçlara göre etoposid enkapsülasyonu için kullanılan ve hapsedilen ilaç miktarları, 1mg polimer başına hesaplandığında 1/0.5 oranında ilaç yüklü nanopartiküllerin 292 µg; 1/0.25'in 137 µg; 1/0.125'de ise 138 µg etoposid içerdiği hesaplanmıştır.

Yapılan bu sitotoksisite çalışmasında 5, 10, 25 ve 50 µg/ml etoposid kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar nanopartiküllere hapsedilen etoposid miktarlarından çok daha düşük olmasına karşın sitotoksik oranları daha fazladır. Aynı zamanda etoposidin konsantrasyonu arttıkça sitotoksisitesinin de arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar nanopartikül içersindeki etoposidin birden salınmadığını ve kontrollü salım yaptığını göstermektedir. Bu durum kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama ile elde edilen apoptotik indeks sonuçları ile de uyumludur.

Çizelge 4.6 5, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonda etoposidin HeLa hücrelerine sitotoksik etkisi.

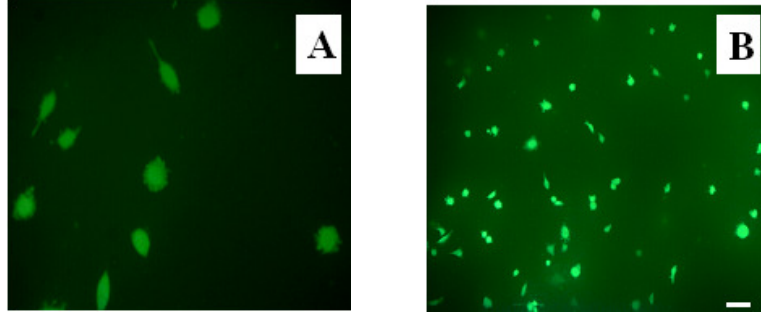
	Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Absorbans (570)±STD	Hücre Canlılığı±STD (%)
Kontrol	0	1,288±0,13	100
Etoposid	50	0,602±0,100	46,772±7,795
	25	0,746±0,074	57,953±5,768
	10	0,802±0,086	62,301±6,683
	5	0,722±0,032	56,001±2,487

4.2.8 PHBHX Nanotaşıyıcı-Hücre Etkileşimi

4.2.8.1 PHBHX Nanotaşıyıcıların Hücre İçerisine Aktarılmasından Sonra Elde Edilen Sonuçlar

İlaç yüklenmemiş boş nanopartiküller ve folik asit ile hedeflenmiş nanopartiküller hücrelere uygulandıktan sonra inverted mikroskopta incelenmiştir. Şekil 4.23'e bakıldığında hem boş

partiküllerin hemde folik asit ile hedeflenmiş partiküllerin hücre içersine girdiği görülmüştür. Şekil 4.23’de görüldüğü gibi inverted mikroskopta vellere yapışık hücreler partikül içersinde bulunan floreseinden dolayı floresan ışık altında yeşil renkte görünmektedirler. Bu da bize partiküllerin hücre içersine girdiğini göstermektedir.



A) 400X ‘de elde edilmiş görüntü, B) 100X ‘de elde edilmiş görüntü. Yeşil görünen yapılar floresein yüklü nanopartiküllerin hücre içersine alınışlarını göstermektedir. Bar 20 μ m dir.

Şekil 4.23 Floresein ile işaretlenmiş folik asit takılı nanopartiküllerin HeLa kanser hücre kültüründe inverted mikroskop ile, FITC filtrede elde edilmiş fotoğrafları.

4.2.8.2 Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Boyama ile Elde Edilen Apoptotik İndeks Sonuçları

Apoptotik oran iki şekilde elde edilmiştir. Birincisi kaspaz boyama ile ikincisi ise ikili boyama metodu ile tesbit edilmiştir. Çizelge 4.8’de bu iki metodun ortalaması verilmiştir. Yapılan çalışmadan elde edilen ışık mikroskobu fotoğrafları Şekil 4.24’de verilmiştir. Değişik konsantrasyonlarda ilaç miktarına (μ g/ml) karşı gelen ilaçlı partiküllerin μ g cinsinden toplam ağırlıkları verilmiştir (Çizelge 4.7). Yapılan çalışmadan elde edilen apoptotik sonuçlara göre; etoposid kanser ilacının düşük konsantrasyonda apoptotik etkisinin düşük olduğu tesbit edilmiştir. Fakat ilaç konsantrasyonu arttıkça apoptotik etkinin de arttığı gözlenmiştir. Aynı sonuç ilaç yüklü nanopartiküllerde ve folik asitle hedeflenmiş ilaç yüklü nanopartiküllerde de elde edilmiştir (Çizelge 4.8). Etoposid PHBHHX nanopartiküllere yüklenip kanser hücrelerine verildiğinde apoptotik indeksin % 5 civarında yükseldiği gözlenmiştir. İlaç yüklü partiküllere kanser hücrelerine hedefleyici folik asit takıldığında ise ilacın kendisine göre % 10-25 oranında ve ilaç yüklü hedeflenmemiş nanopartiküllerde ise % 10-20 arasında apoptotik etkinin arttığı gözlenmiştir. Özellikle 1/0.125 oranında ilaç yüklü folik asitle hedeflenmiş nanopartiküllerde bu etki en yüksek oranda elde edilmiştir. Farklı oranlarda ilaç yüklü

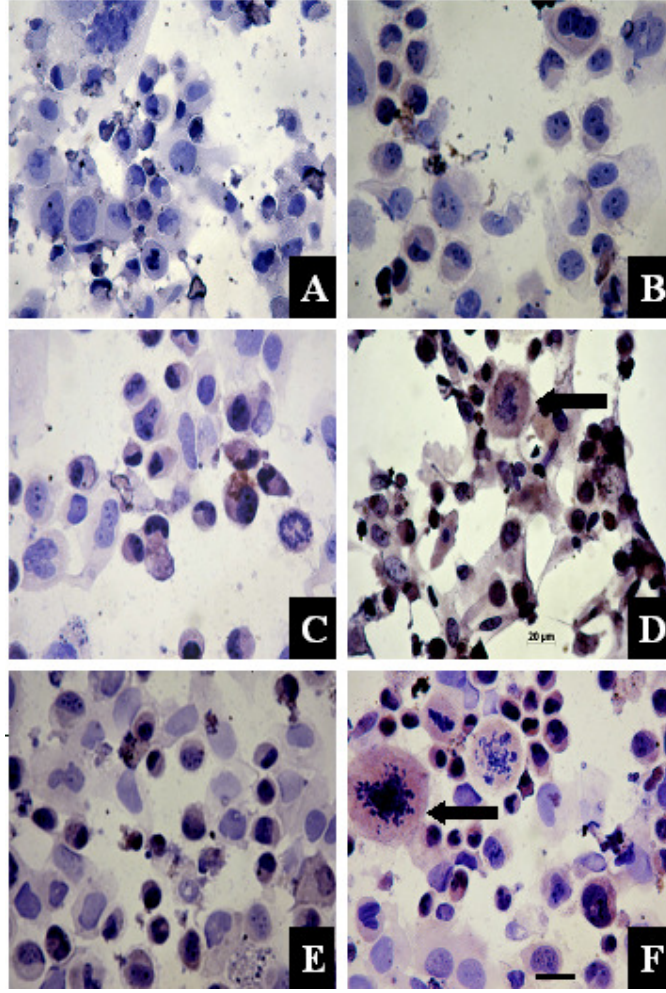
nanopartiküllerin apoptotik etkisi arasında çok fazla fark elde edilmezken, folik asit ile hedeflendiğinde apoptotik etkideki fark dikkat çekicidir. Bu sonuç bize folik asit bağlı ilaç yüklü partiküllerin hedeflenmesinin ilacın kanser hücreleri tarafından daha yüksek oranda alındığını göstermektedir. Buna ilave olarak partiküller ilacı kontrollu şekilde saldıkları için serbest ilaca göre daha uzun süre etkisini gösteriyor olması apoptotik etkinin artmasına neden olmuştur. Kaspaz boyamasından elde edilen fotoğraflara bakıldığında bu etki daha iyi anlaşılabilir. Özellikle Şekil 4.24 a kontrol grubunda apoptoz olmadığından sitoplazmada kaspaz-3 boyamasından gelen kahverengilik yok iken, Şekil 4.24 b, c, d, e ve f 'de kaspaz-3 antikoru ile reaksiyon oluştuğu için hücre sitoplazmalarında kahverengilik oluşmuştur. Ayrıca Şekil 4.24 d, folik asit ile hedeflenmiş 1/0.125 oranında (100µg/ml) ilaç taşıyan partiküllerin etkisini göstermekte olup hücre sitoplazmaları koyu kahverenge boyanmıştır.

Çizelge 4.7 Değişik konsantrasyonlarda ilaç miktarına (µg/ml) karşı gelen ilaçlı partiküllerin µg cinsinden toplam ağırlıkları.

ilaç miktarı, (µg/ml)	1/0.5 ilaçlı partikül miktarı, µg	1/0.25 ilaçlı partikül miktarı, µg	1/0.125 ilaçlı partikül miktarı, µg
5	17.1	36.5	36.2
10	34.3	73.0	72.5
20	68.5	146.0	145.0
40	137.0	292.0	289.9
80	274.0	584.0	579.7
100	342.5	730.0	724.6

Çizelge 4.8 Kanser ilacı etoposid, farklı oranlarda etoposid yüklü nanopartiküller ve farklı oranlarda etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş nanopartiküllerin HeLa hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % apoptotik indeksleri.

İlaç miktarı (µg/ml)	Apoptotik indeks(%)							
	E	P	E/P(0.5:1)	E/P(0.25:1)	E/P(0.125:1)	E/PF(0.5:1)	E/PF(0.25:1)	E/PF(0.125:1)
0	1	1	2	1	2	1	2	3
5	4	1	5	4	6	7	11	14
10	7	2	9	8	12	16	18	20
20	11	4	13	15	16	18	23	26
40	16	6	21	21	22	26	29	35
80	22	9	27	29	30	34	36	39
100	27	11	32	31	34	39	47	54

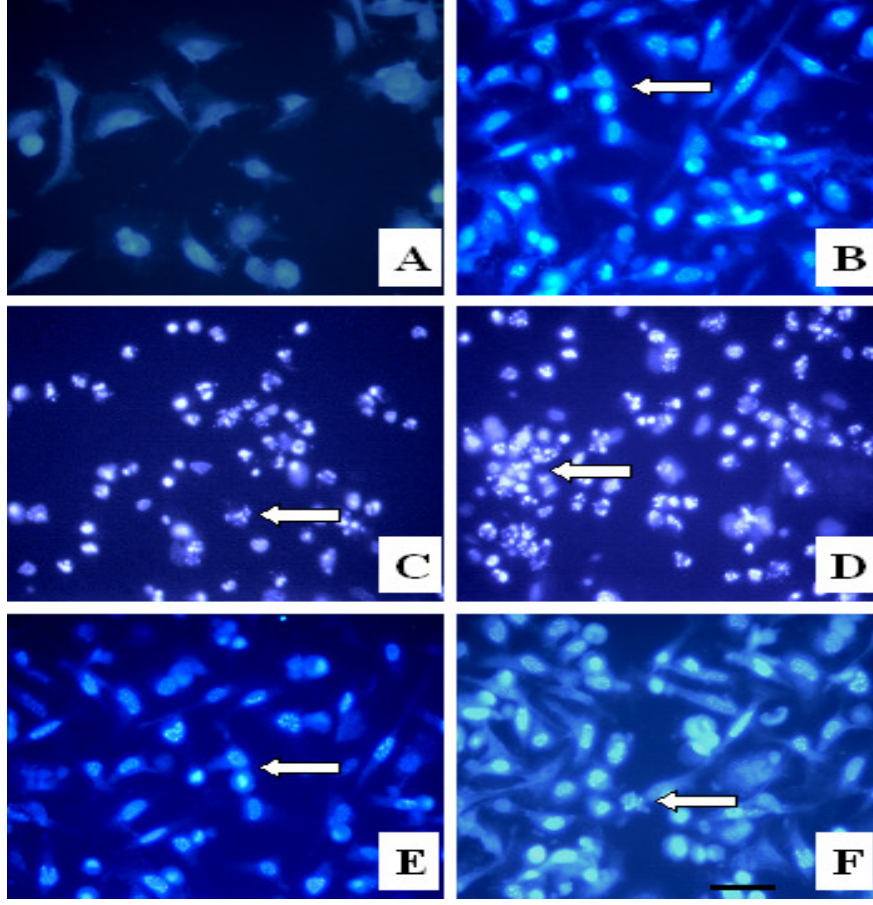


(A) Kaspaz-3 ile boyanmış HeLa hücreleri (kontrol grubu); Hücreler komplekslerle etkileştirilmediğinden sitoplazmaları mavi renkte yani apoptoza uğramamış görünmekte, (B) Kaspaz-3 ile boyanmış HeLa hücreleri; 1/0.5 oranında etoposid yüklü NP (40 µg/ml) ile etkileştirilmesi sonucu hücrelerin bir kısmı apoptoza uğramış sitoplazmaları kahverengiye boyanmıştır, apoptoza uğramayanlar mavi görünmektedir. (C) Yalnız etoposid (40 µg/ml) ile etkileştirilmiş HeLa hücreleri, (D) 1/0.125 oranında etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP (100 µg/ml) ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin görüntüsü. Hücrelerin sitoplazması koyu kahverengi.(E) Yalnız etoposid (100 µg/ml) ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin görüntüsü, (F) 1/0.125 oranında etoposid yüklü NP (100 µg/ml) ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin görüntüsü. Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Fotoğraflar Zeiss ışık mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 20 µm mesafeyi göstermektedir.

Şekil 4.24 Kaspaz-3 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyama fotoğrafları.

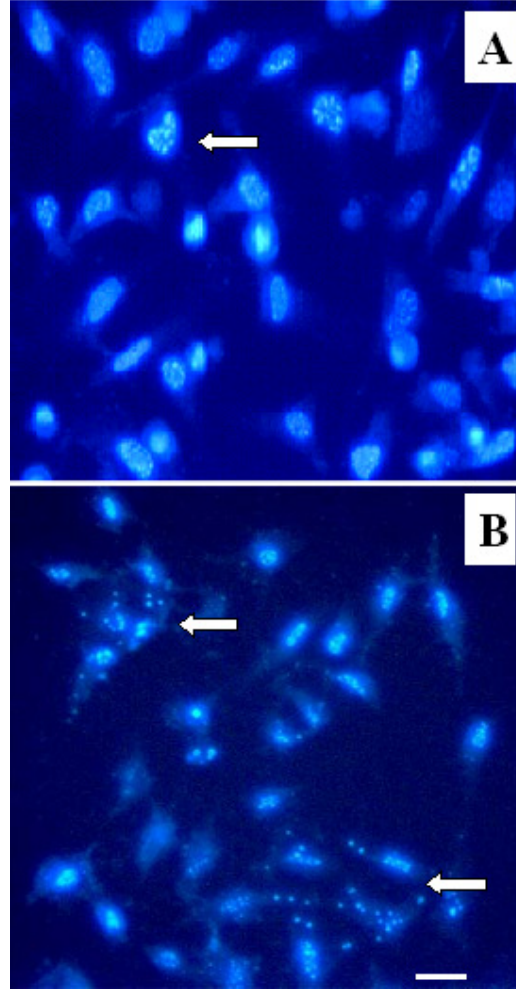
4.2.8.3 İkili Boyama ile Elde Edilen Apoptoz ve Nekroz Sonuçları

Apotozun belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem ikili boyama metodudur. Bu metotta kullanılan Hoechst 33342 floresan boyası canlı hücrelerin zarlarından geçerek çekirdeği boyar ve floresan mikroskopta DAPI filitresi ile çekirdeklerin mavi görünmesini sağlar. Aynı zamanda çekirdek morfolojisinin değerlendirilmesini sağlar. İkili boyama ile elde edilen apoptotik indeks Çizelge 4.8’de ve floresan inverted mikroskopta çekilen fotoğraflardan bazıları Şekil 4.25’de verilmiştir. Apoptotik etki kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama sonuçları ile paralel elde edilmiştir. Özellikle folik asit takılı ilaç yüklü nanopartiküllerin uygulandığı vellerde apoptotik etki çok net olarak görülmektedir. Şekil 4.25 a’da kontrol grubunun fotoğrafı görülmekte olup hücre çekirdeklerinde morfolojik olarak farklılık görülmemektedir. Fakat etoposid ilacı ve ilaç yüklü ligand bağlı nanopartiküller uygulandığında apoptotik hücre çekirdeklerinin parçalandığı apoptoza uğramayan hücrelere göre daha parlak mavi renkte olduğu görülmüştür (Şekil 4.25 c, d). İlaç yüklü nanopartiküller folik asit ile hedeflendiklerinde ise apoptotik etkinin arttığı şekil 4.25 b, e, f ‘de görülebilmektedir. Özellikle 1/0.125 ve 1/0.25 oranında ilaç içeren folik asit ile hedeflenmiş partiküllerin DNA üzerine etkisi şekil 4.26’da verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi çekirdekte bulunan DNA tamamen parçalanarak hücre sitoplazmasına boncuk tanesi gibi dağılmıştır. Bu görüntüler vell tabanına yapışmış hücrelerden elde edilmiştir. Vell tabanından kalkmış hücrelerde ise bu kadar detaylı görüntü elde edilememektedir.



(A) Hoechst 33342 ile boyanmış ilaç ve nanopartiküllerle muamele edilmemiş HeLa hücreleri (kontrol grubu); Hücreler komplekslerle etkileştirilmediğinden hücreler apoptoza uğramamış ve hücre çekirdekleri soluk mavi görünmekte, çekirdek sınırları normal, çekirdek parçalanmamış, (B); 1/0.5 oranında etoposid yüklü NP (40 μ g/ml ilaç) ile etkileştirilmiş HeLa hücreleri, (C) Yalnız etoposid (100 μ g/ml) ile etkileştirilmiş HeLa hücreleri, (D) 1/0.25 oranında etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP (100 μ g/ml ilaç) ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin görüntüsü, (E) 1/0.125 etoposid yüklü NP (100 μ g/ml ilaç) ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin görüntüsü, (F) 1/0.125 oranında etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP (100 μ g/ml) ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin görüntüsü. Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Apoptoza uğramış hücre çekirdekleri parlak, parçalanmış, apoptoza uğramayanlar soluk mavi görünmektedir. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 20 μ m mesafeyi göstermektedir.

Şekil 4.25 Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan ikili boyamadan elde edilen apoptotik hücre fotoğrafları.



(A) 1/0.25 oranında etoposid (80 µg/ml ilaç içeren) yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP'lerin HeLa hücre kültüründe elde edilmiş fotoğrafları. DNA parçalanmış ama çekirdek sınırları içersinde, (B) 1/0.125 oranında etoposid (40µg/ml ilaç içeren) yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP'lerin HeLa hücre kültüründe elde edilmiş fotoğrafları. Oklar DNA'sı parçalanmış bazı hücreleri göstermektedir. DNA tamamen parçalanmış, boncuk tanesi şeklinde hücre sitoplazması içerisine dağılmış durumda. Fotoğraflar 400X büyütmede, DAPI filtresi ile çekilmiştir. Bar 20 µm mesafeyi göstermektedir.

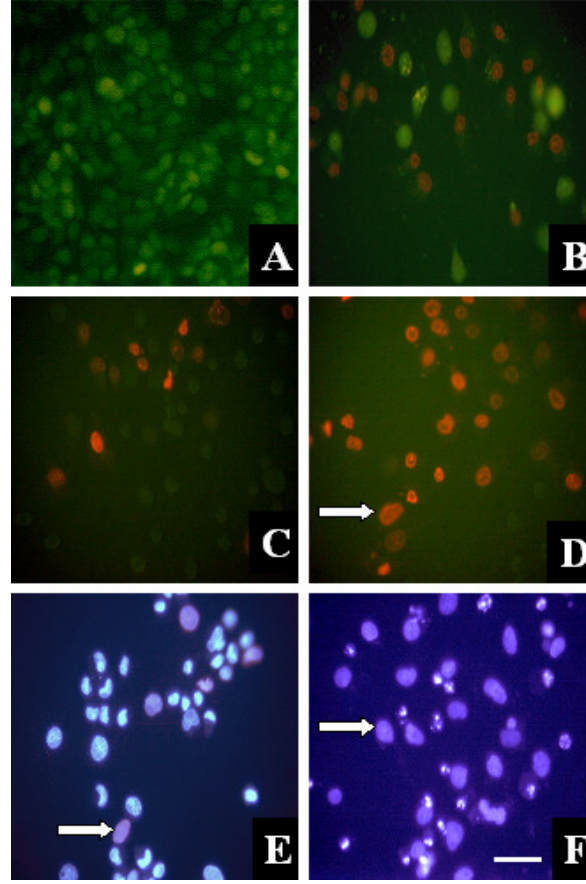
Şekil 4.26 Hoechst 33342 floresan boya kullanılarak yapılan İkili boyamadan elde edilen apoptotik hücre DNA'sının durumunu gösteren fotoğraflar.

İkili boyama metodunda kullanılan bir diğer boya ise PI (Propodiyum iyodid) floresan boyası olup ilaç ve ilaç yüklü partiküllerle etkileştirilen kanser hücrelerinin canlılığı tespit edilmiştir. Bu boya ölü ve plazma membranı hasarlı hücrelerin zarlarından geçerek, çekirdeklerin floresan ışık altında kırmızı görünmelerini sağlar. Normal sağlıklı ve apoptotik hücre çekirdekleri ise mavi renkte olup FITC floresan filitresi ile görüntülendiğinde yeşil renkte görülmektedir. Bizim yaptığımız çalışmada nekrotik indeks saptanması 480-520 nm dalga boyunda floresan ışık (FITC filitresi ile) altında incelenmiştir ve bu dalga boyunda

aynı anda nekrotik hücrelerin çekirdeği kırmızı, sağlıklı veya apoptotik hücrelerin çekirdekleri yeşil elde edilmiştir. Nekrotik hücreleri gösteren fotoğraflar şekil 4.27’de ve % nekrotik indeksi Çizelge 4.9’da verilmiştir. Çizelge 4.9’da görüldüğü gibi, düşük konsantrasyonlarda nekrotik indeks çok yüksek değildir. Fakat konsantrasyonun artması toksisiteyi de arttırdığı için nekrozun da artmasına sebep olmuştur. Özellikle folik asit ile hedeflenmiş ilaç yüklü nanopartiküllerin nekrotik etkisinin yüksek olduğu saptanmıştır. Şekil 4.27’de görüldüğü gibi folik asit ile hedeflenmemiş nanopartiküllerin nekrotik etkisi (Şekil 4.27 b, e), folik asit ile hedeflenmiş partiküllere göre daha düşüktür. Folik asit ile hedeflenmiş ilaç yüklü nanopartiküllerin nekrotik etkisi ise yalnız ilaç uygulanan örneklerle göre %20, hedeflenmemiş ilaç yüklü nanopartiküllerde ise %10 daha yüksek elde edilmiştir. En yüksek nekrotik indeks 1/0.125 oranında folik asit ile hedeflenmiş 100 µg/ml ilaç taşıyan nanopartiküllerden elde edilmiş olup % 40 civarındadır (Şekil 4.27 d).

Çizelge 4.9 Kanser ilacı etoposidin, farklı oranlarda etoposid yüklü nanopartiküllerin ve farklı oranlarda etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş nanopartiküllerin HeLa hücre kültürlerinde etkileştirilmeleri sonucu elde edilen % nekrotik indeksleri.

İlaç miktarı (µg/ml)	Nekrotik indeks(%)							
	E	P	E/P(0.5:1)	E/P(0.25:1)	E/P(0.125:1)	E/PF(0.5:1)	E/PF(0.25:1)	E/PF(0.125:1)
0	2	1	1	1	1	2	2	3
5	1	2	2	1	3	2	3	3
10	3	1	4	6	6	7	8	8
20	8	2	10	11	10	13	13	14
40	13	6	20	17	19	23	21	24
80	18	10	24	23	24	28	30	35
100	21	15	31	32	34	37	38	40



z(A) İkili boyama ile boyanmış, ilaç ve nanopartiküllerle muamele edilmemiş HeLa hücreleri (kontrol grubu); Hücreler komplekslerle etkileştirilmediğinden hücreler nekroza uğramamıştır ve hücre çekirdekleri yeşil görünmektedir (Hoescht 33342 ile boyanmış) (B); 1/0.125 oranında etoposid yüklü NP (100 µg/ml ilaç) ile etkileştirilmiş HeLa hücreleri, (C) Yalnız etoposid (100 µg/ml) ile etkileştirilmiş HeLa hücreleri, (D) 1/0.125 oranında etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP (100 µg/ml ilaç) ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin görüntüsü, nekroza uğramış hücre çekirdekleri kırmızı, uğramamış hücre çekirdekleri ise yeşil görünmektedir. (E) 1/0.25 etoposid yüklü NP (100 µg/ml ilaç) ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin görüntüsü, (F) 1/0.25 oranında etoposid yüklü folik asit ile hedeflenmiş NP (100 µg/ml) ile etkileştirilmiş HeLa hücrelerinin görüntüsü. Şekil E, F, DAPI filtresi kullanılarak çekilmiş fotoğraflar, parlak mavi çekirdekler apoptotik hücreleri, eflatun renkte olanlar ise nekrotik hücreleri göstermektedir. Oklar nekrotik hücrelerden bazılarını göstermektedir. Fotoğraflar Leica inverted floresan mikroskobu ile 400X büyütmede çekilmiştir. Ölçek 20 µm mesafeyi göstermektedir.

Şekil 4.27 Propodium Iyodid (PI) floresan boya kullanılarak yapılan İkili boyamadan elde edilen nekrotik hücre fotoğrafları.

BÖLÜM 5

SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında elde edilen bulgular ve sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Yapılan çalışmalarda çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak 40-200 µm arasında değişen PHBHHX mikroküreler ile 190-220 nm arasında değişen nanopartiküller elde edilmiştir.
- Çalışmaların ilk bölümünde PHBHHX mikrokürelerin boy-boy dağılımına etki eden parametreleri değerlendirmek üzere süspansiyon ortamı karıştırma hızı, polimer/çözücü oranı ve emülsifier miktarı değiştirilerek mikroküreler hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Buna göre karıştırma hızı, mikroküre hazırlanması esnasında polimerik damlacıkların oluşumu için ihtiyaç duyulan enerji desteğini sağlamaktadır ve mikrokürelerin boyutu karıştırma hızının artmasıyla azalmaktadır. Emülsifier miktarı arttıkça ise ortamdaki yüzey gerilim farkının azalmasından dolayı partikül boyutu azalmaktadır. Polimer/çözücü oranındaki artış süspansiyon ortamında polimerin dağıtılmasını zorlaştırdığından polimer çözeltisindeki viskozitenin artışıyla partikül boyutu da artmaktadır.
- PHBHHX mikrokürelerin ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirliğinin araştırıldığı bölümde göz hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan triamsinolon asetonid PHBHHX mikrokürelerin hazırlaması aşamasında yüklenmiştir. İlaç yükleme ve salım profillerinin elde edilmesinde ilaç/polimer oranı değiştirilerek farklı yükleme oranları elde edilmiştir (ilaç yükleme oranı; 1/100 ilaç/polimer oranı için % 0.8, 2/100 oranı için %17.8, 4/100 oranı için ise %15.1 şeklindedir). Salım profilleri incelendiğinde, ilk 24 saat içerisinde ilacın % 90'ı salınmış, daha sonra salım hızı yavaşlamıştır.

- Çalışmaların ikinci bölümünü oluşturan PHBHHX nanokürelerin hazırlanması ve karakterizasyonunda farklı boy ve boy dağılımına sahip nanoküreler hazırlanmıştır. Bu amaçla homojenizatörün genliği, polimer/çözücü oranı ve emülsifier miktarı değiştirilerek farklı boy-boy dağılımına sahip nanoküreler elde edilmiştir. Karıştırma hızı arttıkça ortama aktarılan enerji miktarı arttığından partikül boyutu azalmaktadır. Ortamdaki emülsifier miktarı arttıkça partiküllerin bir araya gelerek daha büyük partikül oluşturmalarını önlediğinden dolayı nanopartikül boyutu azalmıştır. Ortamdaki polimer/çözücü oranını arttırdığımızda ise vizkozite arttığından dolayı daha büyük nanopartiküller elde edilmiştir.
- PHBHHX nanopartiküllere folik asit model ligand olarak farklı miktarlarda (250, 500, 750 ve 1000 µg) bağlanmıştır. Buna göre 250 µg folik asit kullanıldığında ligand bağlanma yüzdesi % 71, 500 µg folik asit için % 81, 750 µg folik asit için % 86 ve 1000 µg folik asit için ise % 93 oranında bağlanmanın gerçekleştiği ve dolayısıyla folik asit miktarı arttıkça bağlanma yüzdesinde artış olduğu gözlenmiştir.
- Yapılan çalışmalarda en yüksek oranda folik asidin bağlandığı formülasyon (1000 µg folik asit kullanıldığı) kullanılmıştır. Daha sonra nanopartiküllere, floresan madde ve aynı zamanda 1/0.5, 1/0.25 ve 1/0.125 oranlarında model antikanser ilaç olan etoposid yüklenmiştir. Sonuçlara bakıldığında floresan madde ve değişik konsantrasyonlarda ilacı nanopartiküle yüklediğimizde ligand bağlanma yüzdeleri arasında önemli bir fark görülmemiştir.
- PHBHHX nanopartiküllere farklı oranlarda etoposid yüklendiğinde ilaç yükleme oranının başlangıçta kullanılan ilaç miktarının artmasıyla azaldığı (1/0.5 oranı için % 35, 1/0.25 oranı için % 45 ve 1/0.125 oranı için ise % 53) ancak aslında yüklenen ilaç miktarının arttığı belirlenmiştir. Bir başka deyimle ilaç miktarı azaldıkça hapsedilen ilacın yüzde miktarında artış gözlenmiştir. Bunun sebebi polimer matriks ve dış sulu faz arasındaki konsantrasyon gradiyenti arttıkça üretim prosesi esnasında çok daha fazla ilaç kaybı olmakta ve dolayısıyla kullanılan ilaç miktarı arttıkça nanopartiküle ilaç hapsetme etkinliği azalmaktadır.

- 1/0.125 oranında ilaç yüklü partiküllerdeki ilaç miktarı en az olduğundan, ilaç salım hızı en fazladır. Dolayısıyla da en yavaş ilaç salım hızı da 1/0.5 oranında ilaç yüklü partiküllerde gerçekleşmiştir. Elde edilen bu sonucu MTT ve ilaç hedefleme çalışmaları da doğrulamaktadır. Özetle salım hızı en fazla olan 1/0.125 oranında ilaç yüklü nanopartiküllerin sitotoksik etkisi ile kanser hücreleri üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkisi en fazladır.
- PHBHHX nanopartiküllere immünohistokimyasal uygulamalarda kullanılmak üzere FITC yüklenmiş ve fagositoz deneyleri RAW 264.7 fare makrofajlarında gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak FITC işaretli PHBHHX nanopartiküllerin hücre içerisine girdiği yaydıkları ışımlar sayesinde belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak çalışmada HeLa ve L929 fare fibroblast hücreleri kullanılarak ilaçlı ve ligandlı nanopartiküllerin kanser hücrelerindeki sitotoksik etkileri incelenmiş ve kanser hücrelerine hedefleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- Hücre kültür testi sonuçlarına göre; farklı oranlarda PHBHHX nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkilerine bakıldığında 50 µg/ml konsantrasyonda 1/0.125 oranında ilaçlı nanopartikülün % 43.47; 1/0.25 oranında % 17.88; 1/0.5 oranında % 16.72 ve etoposid içermeyen PHBHHX nanopartikülün ise % 7.29 oranında sitotoksik olduğu görülmüştür. 1/0.125 oranında etoposid içeren PHBHHX nanopartiküllerin diğerlerine göre daha sitotoksik olduğu bulunmuştur. Bu durum nekrotik indeks çalışması ile de uyumludur.
- Folik asit takılı, farklı oranlarda etoposid yüklü PHBHHX nanopartiküllerin HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkilerine bakıldığında ise 1/0.125 oranında ligand bağlı etoposid yüklü partiküllerin diğerlerine göre % 5-10 arasında daha sitotoksik olduğu görülmüştür. Bu nanopartiküllerin folik asit takılı ve folik asit takılı olmayan formlarının sitotoksik etkileri incelendiğinde folik asit takılı nanopartiküllerin yaklaşık % 5 oranında daha sitotoksik olduğu görülmüştür. Bu durum kaspaz-3 immunositokimyasal boyama ile elde edilen apoptotik indeks sonuçları ile uyumludur.

- 5, 10, 25 ve 50 µg/ml konsantrasyonda etoposidin HeLa hücreleri üzerine sitotoksik etkisi incelenmiştir. Etoposidin konsantrasyonu arttıkça sitotoksitesinin de arttığı görülmüştür. Farklı oranlarda etoposid içeren nanopartiküllerle karşılaştırıldığında tek başına etoposidin çok daha düşük konsantrasyonda olmasına karşın daha sitotoksik olduğu görülmüştür. Bu da nanopartikül içerisindeki etoposidin birden salınmadığını ve kontrollü salım yaptığını göstermektedir. Bu durum kaspaz-3 immunositokimyasal boyama ile elde edilen apoptotik indeks sonuçları ile uyumludur.
- İmmunolojik testler için öncelikle floresan madde yüklü ve folik asit bağlı nanopartiküller hücrelere uygulandıktan sonra inverted mikroskopta incelenmiş ve hem floresan madde yüklü partiküller hem de folik asit bağlı partiküllerin hücre içerisine girdiği saptanmıştır.
- Apoptotik oran, kaspaz ve ikili boyama metodu ile tespit edilmiştir. Kaspaz-3 antikoru ile yapılan boyama sonucuna göre; etoposidin düşük konsantrasyonda apoptotik etkisinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Fakat ilaç konsantrasyonu arttıkça apoptotik etkinin de arttığı gözlenmiştir. İlaç yüklü nanopartiküller kanser hücrelerine verildiğinde apoptotik indeksin % 5 civarında yükseldiği gözlenmiştir. İlaçlı-ligandlı nanopartiküllerde ise ilacın kendisine göre % 10-25 oranında, ilaçlı nanopartiküllerde ise % 10-20 arasında apoptotik etkinin arttığı gözlenmiştir. Özellikle 1/0.125 oranında ilaçlı-ligandlı nanopartiküllerde bu etkinin en yüksek olduğu anlaşılmıştır. Farklı oranlarda ilaç yüklü nanopartiküllerin apoptotik etkisi arasında çok fazla fark elde edilemezken, folik asit ile hedeflendiğinde apoptotik etkideki fark dikkat çekicidir. Bu sonuç bize ligandlı ilaç yüklü partiküllerin kanser hücreleri tarafından daha yüksek oranda alındığını göstermektedir. Ayrıca nanopartiküller ilacı kontrollü şekilde saldıklarından dolayı serbest ilaca göre daha uzun süre etkisini gösteriyor olması apoptotik etkinin artmasına neden olmuştur.
- İkili boyama metodu ile yapılan boyama sonucuna göre; apoptotik etki kaspaz-3 immunositokimyasal boyama sonuçları ile paralel elde edilmiştir. Folik asit takılı ilaç yüklü nanopartiküllerde apoptotik etki çok net olarak görülmektedir. Mikroskop görüntülerine bakıldığında ilaç ve ilaçlı nanopartiküller hücrelere uygulandığında apoptotik hücre çekirdeklerinin parçalandığı apoptoza uğramayan hücrelere göre daha parlak mavi renkte olduğu görülmüştür. İlaçlı-ligandlı nanopartiküllerde apoptotik etkinin daha da arttığı görülmüştür.

- İkili boyama metodunda kullanılan PI (Propodiyum iyodid) floresan boyası, ilaç ve ilaç yüklü partiküllerle etkileştirilerek kanser hücrelerinin canlılığı tespit edilmiştir. Nekrotik hücrelerin çekirdeği kırmızı, sağlıklı veya apoptotik hücrelerin çekirdekleri yeşil elde edilmiştir. Folik asit ile hedeflenmiş ilaç yüklü nanopartiküllerin nekrotik etkisinin yüksek olduğu saptanmıştır. Folik asit ile hedeflenmemiş nanopartiküllerin nekrotik etkisi, folik asit ile hedeflenmiş partiküllere göre daha düşüktür. Folik asit ile hedeflenmiş ilaç yüklü nanopartiküllerin nekrotik etkisi, yalnız ilaç uygulanan örneklerle göre % 20, hedeflenmemiş ilaç yüklü nanopartiküllere göre ise % 10 daha yüksek elde edilmiştir. En yüksek nekrotik indeks 1/0.125 oranında folik asit ile hedeflenmiş 100 µg/ml ilaç taşıyan nanopartiküllerden elde edilmiş olup % 40 civarındadır.

KAYNAKLAR

- Acharya G and Park K** (2006) Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents. *Adv. Drug Delivery Rev*, 58: 387–401.
- Adams J H, Irving G, Koeslag J H, Lochner J D, Sandel R C I and Wilkinson C** (1987) Beta-adrenergic blockade restores glucose's antiketogenic activity after exercise in carbohydrate-depleted athletes. *J. Physiol. Lond*, 386: 439-454.
- Agarwal A, Saraf S, Asthana A, Gupta U, Gajbhiye V and Jain N K** (2008) Ligand based dendritic systems for tumor targeting. *International Journal of Pharmaceutics* 350: 3–13.
- Alain Dufresne and Eric Samain** (1998) Preparation and characterization of a Poly(β -hydroxyoctanoate) latex produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, 31: 6426-6433.
- Alberto Ballistreri, Mario Giuffrida, Salvatore P P Guglielmino, Santina Carnazza, Annamaria Ferreri and Giuseppe Impallomeni.**(2001) Biosynthesis and structural characterization of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas aeruginosa* from fatty acids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 29: 107-114.
- Alexis F, Rhee J W, Richie J P, Radovic-Moreno A F, Langer R and Farokhzad O C** (2008) New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 26: 74–85.
- Aminabhavi T M, Kulkarni R V and Kulkarni A R** (2004) Polymers in Drug Delivery. Polymeric Transdermal Drug Delivery Systems. *Polym. News*, 29 (7): 214–218.
- Anderson A J and Dawes E A** (1990) Occurance, metabolism, metabolic rate, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev*, 54(4): 450-72.
- Arnedo A, Irache J M, Merodio M, Espuelas M and Millan S** (2004) Albumin nanoparticles improved the stability, nuclear accumulation and anticytomegaloviral activity of a phosphodiester oligonucleotide. *J. Controlled Release*, 94: 217–227.
- Ashby R D and Foglia T A** (1998) Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 49: 431.
- Ashby R D, Cromwick A M and Foglia T A** (1998) Radiation crosslinking of a bacterial medium-chain-length poly(hydroxyalkanoate) elastomer from tallow. *Int. J. Biol. Macromol*, 23: 61.
- Ashby R D, Foglia T A, Liu C K and Hampson J W** (1998) Improved film properties of radiation treated medium chain length poly(hydroxyalkanoates). *Biotechnol Lett*, 20: 1047-1052.
- Ashby R D, Foglia T A, Solaiman D K Y, Liu C K, Nunez A and Eggink G** (2000) Viscoelastic properties of linseed oil-based medium chain length poly(hydroxyalkanoate) films: effects of epoxidation and curing. *Int. J. Biol. Macromol*, 27: 355.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Ashley D, Meier L, Kerby T, Zlduondo F, Friedman H, Gajjar A, Kun L, Duffner P, Smith S and Longee D** (1996) Response of recurrent medulloblastoma to low-dose oral etoposide. *J. Clin. Oncol*, 14: 1922–1927.
- Au J L, Jang S H, Zheng J, Chen C T, Song S and Hu L** (2001) Determinants of drug delivery and transport to solid tumors. *J. Controlled Release*, 74: 31-46.
- Bae Y, Jang WD, Nishiyama N and et al.** (2005) Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Mol Biosyst*, 1:242–50.
- Bayram Cem, Denkbaş Emir B, Kılıçay E, Hazer B, Çakmak Hasan B and Noda İsao** (2008) Preparation and Characterization of triamcinolone acetone-loaded poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHX) microspheres. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23: 334-347.
- Bejjani R A, BenEzra D, Cohen H, Rieger J, Andrieu C, Jeanny J C, Gollomb G and Behar-Cohen F F** (2005) Nanoparticles for gene delivery to retinal pigment epithelial cells. *Mol. Vis*, 11: 124–132.
- Binning G, Quate C F and Gerber Ch** (1986) “Atomic force microscope,” *Physics Review Letters* Cilt 56: 930.
- Birn H, Selhub J and Christensen E I** (1993). Internalization and intracellular transport of folate-binding protein in rat kidney proximal tubule. *Am. J. Physiol*, 264: C302–C310.
- Bose S and Bogner R H** (2007) Solventless pharmaceutical coating processes: a review. *Pharm. Dev. Technol*, 12: 115–131.
- Bourges J L, Bloquel C, Thomas A, Froussart F, Bochet A, Azan F, Gurny R, BenEzra D and Behar-Cohen F** (2006) Intraocular implants for extended drug delivery: Therapeutic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58: 1182-1202.
- Bourges J L, Gautier S E, Delie F, Bejjani R A, Jeanny J C, Gurny R, BenEzra D and Behar-Cohen F F** (2003) Ocular drug delivery targeting the retina and retinal pigment epithelium using polylactide nanoparticles. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci*, 44: 3562–3569.
- Brandl H, Gross R A, Lenz R W and Fuller R C** (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Environ. Microbiol*, 54: 1977.
- Brannon-Peppas L** (1995) Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 116: 1-9.
- Brannon-Peppas L** (1997) Polymers in controlled drug delivery. *Medicinal Plastics and Biomaterials*, 4: 34-44.
- Brannon-Peppas L and Vert M** (2000) Polylactic and polyglycolic acids as drug delivery carriers. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Eds: D. Wise, L. Brannon-Peppas, A. M. Klibanov, R. Langer, A. G. Mikos, N. A. Peppas, D. J. Trantolo, M. J. Yaszemski, G. E. Wnek, Dekker, New York, 345-367.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Brayden D. J** (2003) Controlled release technologies for drug delivery. *Drug Discovery Today*, 8: 976-978.
- Breimer D D** (1999). Future Changes for Drug Delivery. *J. Controlled Release*, 62 (1-2): 3–6.
- Bures P, Huang Y B, Oral E and Peppas N A** (2001) Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications. *J Control Release*, 72: 25-33.
- Byrom D** (1994) In: Mobley DP, editor. *Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors* Munich: Hanser, p. 5-33.
- Cammas S, Bear M M, Moine L, Escalup R, Ponchel G, Kataoka K and Guerin P** (1999) Polymers of malic acid and 3-alkylmalic acid as synthetic PHAs in the design of biocompatible hydrolyzable devices. *Int. J. Biol. Macromol*, 25: 273-282.
- Campobell I G, Jones T A, Foulkes W D and Trowsdale J** (1991) Folate binding protein is a marker for ovarian cancer. *Cancer Res*, 51: 5329–38.
- Carino G P, Jacob J S and Mathiowitz E** (2000) Nanosphere based oral insulin delivery. *J. Controlled Release*, 65: 261–269.
- Casini E, de Rijk T C, de Waard P and Eggink G** (1997) Synthesis of Poly(hydroxyalkanoate) from Hydrolyzed Linseed Oil. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 5(3): 153-158.
- Chamberlain M** (1993) Recurrent brainstem gliomas treated with oral VP-16, *J. Neuro-Oncol*. 15: 133–139.
- Chan H** (2006) Dry powder aerosol drug delivery-opportunities for colloid and surface scientists. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 284-285: 50-55.
- Chan L W, Ong K T and Heng P W** (2005) Novel film modifiers to alter the physical properties of composite ethylcellulose films. *Pharm. Res*, 22: 476–489.
- Chandra R and Rustgi R** (1998) Biodegradable Polymers. *Prog. Polym. Sci*. 23: 1273-1335.
- Chow A H L, Tong H H Y, Chattopadhyay P and Shekunov B Y** (2007) Particle engineering for pulmonary drug delivery. *Pharm. Res*, 24 (3): 411–437.
- Christopher P L and Philip S L** (2001) Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery. *DDT*, 6: 44–51.
- Coates M S, Chan H K, Fletcher D F and Chiou H** (2007) Influence of mouthpiece geometry on the aerosol delivery performance of a dry powder inhaler. *Pharm. Res*, 24 (8): 1450–1456.
- Cohen M H** (2003) Microfabrication of silicon-based nanoporous particulates for medical applications. *Biomed. Microdevices*, 5: 253–259.
- Coley W B** (1991) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases, 1893. *Clin. Orthop*, 3–11.
- Coulie P G, Hanagiri T and Takenoyama M** (2001) From tumor antigens to immunotherapy, *Int. J. Clin. Oncol*, 6: 163–170.
- Cromwick A M, Foglia T A and Lenz R W** (1996) The microbial production of poly(hydroxyalkanoates) from tallow. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 46: 464.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Curley J M, Hazer B, Lenz R W and Fuller R C (1996) Production of poly(3-hydroxyalkanoates) containing aromatic substituents by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, 29: 1762.
- Çınar Oya M, Doğutan Ülgen Ş, Çubukçu Emrehan ve Koçum İ Cengiz (2005) Moleküler algılama amaçlı atomik kuvvet mikroskobu tasarımı ve üretilmesi. *National Symposium on Biomedical Engineering*, İstanbul-TURKEY, 230-234.
- Dash A K and Cudworth G C (1998) Therapeutic applications of implantable drug delivery systems. *Pharmacol. Toxicol. Meth*, 40: 1–12.
- De Koning G J M, van Bilsen H M M, Lemstra P J, Hazenberg W, Witholt B, Preusting H, van der Galien J G, Schirmer A and Jendrossek D (1994) A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoate) from *Pseudomonas oleovorans*. *Polymer*, 35: 2090.
- Delaney G, Jacob J, Featherstone C and Barton M (2005) The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*, 104: 1129–37.
- Doi Y (1995) Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. *Macromol. Symp.* 98: 585.
- Doi Y and Abe C (1990) Biosynthesis and characterization of a new bacterial copolyester of 3-hydroxyalkanoates and 3-hydroxy- β -chloroalkanoates. *Macromolecules*, 23: 3705.
- Doi Y, Kitamura S and Abe H (1995) Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, 28: 4822–4828.
- Drummond D C, Meyer O, Hong K, Kirpotin D B and Papahadjopoulos D (1999) Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.* 51: 691-743.
- Dube D, Francis M, Leroux JC and Winnik FM (2002). Preparation and tumor cell uptake of poly(N-isopropylacrylamide) folate conjugates. *Bioconjugate Chem*, 13: 685–92.
- Dufresne A, Reche L, Marchessault R H and Lacroix M (2001) Gamma-ray crosslinking of poly(hydroxyoctanoate-coundecenoate). *Int. J. Biol. Macromol*, 29: 73.
- Eaimtrakarn S, Prasad Y V R, Puthli S P, Yoshikawa Y, Shibata N and Takada K (2003) Possibility of a patch system as a new oral delivery system. *Int. J. Pharm*, 250: 111–117.
- Eastoe J E and Leach A A (1977). Chemical constitution of gelatin. In: Ward, A.G. and Courts, A., In: *The science and Technology of Gelatin*, London: Academic press, p. 73.
- Eggink G, van der Wal H, Huijberts G N M and de Waard P (1993) Oleic acid as substrate for poly-3-hydroxyalkanoate formation in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas putida*. *Ind. Crop. Product*, 1: 157.
- Eldem T and Speiser P (1989) Endocytosis and intracellular drug delivery. *Acta Pharmaceutica Technologica*, 35: 109-115.
- Ellerhorst J A, Bedikian A, Ring S and et al.(1999) Phase II trial of Doxil for patients with metastatic melanoma refractory to frontline therapy. *Oncol Rep*, 6:1097–9.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Eroğlu M S, Hazer B, Ozturk T and Caykara T** (2005) Hydroxylation of pendant vinyl groups of poly(3-hydroxyundec-10-enoate) in high yield. *J. Appl. Polym. Sci*, 97: 2132.
- Eschenbach von A C** (2004) A vision for the National Cancer Institute Program in the United States, *Nat. Rev. Cancer* 4 (10): 820-828.
- Eva M Martin del Valle, Miguel A Galan and Ruben G Carbonell** (2009) Drug Delivery Technologies: The Way Forward in the New Decade. *Ind. Eng. Chem. Res*, 48: 2475-2486.
- Farokhzad O C and Langer R** (2006) Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Adv Drug Deliv Rev*, 58: 1456–9.
- Farokhzad O C, Karp J M and Langer R** (2006) Nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer targeting. *Expert Opin Drug Deliv*, 3: 311–24.
- Fassas A and Anagnostopoulos A** (2005) The use of liposomal daunorubicin (DaunoXome) in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 46: 795-802.
- Feng Si-Seng and Chien S** (2003) Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science*, 58: 4087-4114.
- Ferrari M** (2005) Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer* 5:161–71.
- Fetterly G J and Straubinger R M** (2003) Pharmacokinetics of paclitaxel-containing liposomes in rats. *AAPS Pharm. Sci*, 5:E32.
- Foraker A B, Walczak R J, Cohen M H, Boiarski T A, Grove C F and Swaan P W** (2003) Microfabricated porous silicon particles enhance paracellular delivery of insulin across intestinal CaCO₂ cell monolayers. *Pharm. Res*, 20: 110–116.
- Foss F M** (2002) Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin. Oncol.* 29: 5–11.
- Fritzsche K, Lenz R W and Fuller R C** (1990a) Production of unsaturated polyesters by *Pseudomonas oleovorans*. *Int, J. Biol. Macromol*, 12, 85.
- Fritzsche K, Lenz R W and Fuller R C** (1990b) An unusual bacterial polyester with a phenyl pendant group. *Makromol. Chem*, 191: 1957.
- Fukui T, Abe H and Doi Y** (2002) Engineering of *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from fructose and solid-state properties of the copolymer. *Biomacromolecules*, 3: 618–624.
- Gagnon K D, Lenz R W, Farris R J and Fuller R C** (1994) Chemical modification of bacterial elastomers: 1. Peroxide crosslinking. *Polymer*, 35: 4358.
- Grassie N, Murray E J and Holmes P A** (1984) The thermal degradation of poly(-(D)-β-hydroxybutyric acid): part 3 the reaction mechanism. *Polym Degrad Stab*, 6: 127–134.
- Green MR, Manikhas GM, Orlov S and et al** (2006). Abraxane, a novel Cremophor- free, albumin-bound particle form of paclitaxel for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*, 17: 1263–8.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Gref R, Luck M, Quellec P and et al.** (2000) “Stealth” corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 18:301–13.
- Gref R, Minamitake Y, Peracchia M T and et al.** (1994) Biodegradable longcirculating polymeric nanospheres. *Science*, 263:1600–3.
- Gross R A, DeMello C, Lenz R W, Brandle H and Fuller R C** (1989) Biosynthesis and characterization of poly(β -hidroksialkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, 22: 1106-1115.
- Guney O and Akgerman A** (2002) Synthesis of Controlled-Release Products in Supercritical Medium. *AIChE J*, 48 (4): 856–866.
- Guy R H, Hadgraft J and Bucks D A** (1987) Transdermal drug delivery and cutaneous metabolism. *Xenobiotica*, 17: 325–343.
- Gürsoy A** (2002). Kontrollü Salım Sistemleri (1bs). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayınları, 310 s.
- Hany R, Bohlen C, Geiger T, Hartmann R, Kawada J, Schmid M, Zinn M and Marchessault R H** (2004) Chemical synthesis of crystalline comb polymers from olefinic medium-chain-length poly[3-hydroxyalkanoates]. *Macromolecules*, 37: 385.
- Hazer B** (2002) Chemical modification of bacterial polyester. *Curr Trends Polym Sci* 7: 131–138.
- Hazer B** (2003) Chemical modification of synthetic and biosynthetic polyesters. In: Steinbüchel A (ed) *Biopolymers*, vol 10. Wiley VCH, Weinheim, pp 181–208.
- Hazer B, Lenz R W and Fuller R C** (1996) Bacterial production of poly-3-hydroxyalkanoates containing arylalkyl substituent groups. *Polymer*, 37: 5951-5957.
- Hazer B, Torul O, Borcakli M, Lenz R W, Fuller R C and Goodwin S D** (1998) Bacterial production of polyesters from free fatty acids obtained from natural oils by *Pseudomonas oleovorans*. *J. Environ. Polym. Degrad*, 6: 109-113.
- Hazer D B, Hazer B and Kaymaz F** (2009) Synthesis of microbial elastomers based on soybean oily acids. Biocompatibility studies. *Biomed. Mater*, 4: 035011.
- Henne A W, Doorneweerd D D, Lee J, Low P S and Savran C** (2006) Detection of folate binding protein with enhanced sensitivity using a functionalized quartz crystal microbalance sensor. *Anal. Chem*, 78: 4880-4884.
- Hoarau D, Delmas P, David S, Roux E and Leroux J C** (2004) Novel long-circulating lipid nanocapsules. *Pharm. Res*, 21: 1783-1789.
- Holmberg O** (2007) Accident prevention in radiotherapy. *Biomed Imaging Interv J*;3:e27. Available from: <http://www.bijj.org/2007/2/e27> [accessed 18 June 2007].
- Hrabak O** (1992) Industrial production of poly- β -hydroxybutyrate. *FEMS Microbiol Rev*, 103: 251–256.
- Hughes G A** (2005) Nanostructure-mediated drug delivery. *Nanomedicine*, 1: 22-30.
- Hughes L G, Vick T A and Wang J H** (2004) Coated Implants. *European Patent* 1250164.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Huijberts G N M, Eggink G, de Waard P, Huisman G and Witholt B** (1992) *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Appl. Environ. Microbiol*, 58: 536.
- Huisman G W, de Leeuw O, Eggink G and Witholt B** (1989) Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol*, 55: 1949.
- İbaoglu K, Hazer B, Arkin A H and Lenz R W** (2000) Production of poly-3-hydroxyalkanoates from methyl branched alkanolic acids by *Pseudomonas oleovorans*. *Bull. Chem. Technol. Maced*, 19: 41.
- Jain R A** (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21: 2475–2490.
- Jain R K** (1990) Physiological barriers to delivery monoclonal antibodies and other macromolecules to tumors. *Cancer Res*, 50: 814–9.
- Jain R K** (1998) Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors. *J. Control. Release*, 53: 49-67.
- Jemark C M M D, Dellacroce J T M D, Heffez J M D and Peyman G A M D** (2007) Triamcinolone acetonide in ocular therapeutics. *Survey of Ophthalmology*, 52 (5): 503-522.
- Jesmin Shafiq, Michael Barton, Douglas Noble, Claire Lemer and Liam J Donaldson** (2009) An international review of patient safety measures in radiotherapy practice. *Radiotherapy and Oncology* 92: 15-21.
- Jiayin Zhao and Jianmin Wu** (2006) Preparation and characterization of the fluorescent chitosan nanoparticle probe. *Chin J. Anal. Chem*, 34 (11): 1555-1559.
- Junping W, Takayama K, Nagai T and Maitani Y** (2003) Pharmacokinetics and antitumor effects of vincristine carried by microemulsions composed of PEG-lipid, oleic acid vitamin E and cholesterol. *Int. J. Pharm*, 251: 13–21.
- Kataoka K** (1997) Targetable polymeric drugs. In: Park K, editor. Controlled drug delivery challenges and strategies. Washington, DC: *American Chemical Society*; p. 49.
- Kidron M, Dinh S, Menachem Y, Abbas R, Variano B, Goldberg M, Arbit E and Bar-On H** (2004) A novel per-oral insulin formulation: proof of concept study in non-diabetic subjects. *Diabet. Med*, 21: 354–357.
- Kiil S S and Dam-Johansen K** (2003) Controlled drug delivery from swellable hydroxypropylmethylcellulose matrices: model-based analysis of observed radial front movements. *J. Controlled Release*, 90: 1–21.
- Kilicay E, Çakmaklı B, Hazer B, Denkbaş E B and Açıkgöz B** (2010a) Acetylsalicylic Acid loading and release studies of the PMMA-g-Polymeric oils/oily acids micro and nanospheres. *Journal of Applied Polymer Science*, kabul edildi.
- Kilicay E, Hazer B, Çoban B and Scholz C** (2010b) Synthesis and Characterization of the Poly(ethylene glycol) Grafted Unsaturated Microbial Polyesters. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 38 (1): 9-17.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Kim O and Gross R A** (1995) Bioengineering of poly(β -hydroxyalkanoates) for advanced material applications: incorporation of cyano and nitrophenoxy side chain substituents. Rutherford D R. *Can J Microbiol*, 41: 32.
- Kim O, Gross R A, Hammar W J and Newmark R A** (1996) Microbial synthesis of poly(β -hydroxyalkanoates) containing fluorinated side-chain substituents. *Macromolecules*, 29: 4572.
- Kim S W** (1996) Advanced Biomaterials in Biomedical Engineering and Drug Delivery Systems; *Springer*: Tokyo, 319-320.
- Kim Y B, Lenz R W and Fuller R C** (1992) Poly(β -hydroxyalkanoates) copolymers containing brominated repeating units produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*, 25: 1852.
- Kim Y B, Rhee Y H, Han S H, Heo G S and Kim J S** (1996) Poly-3-hydroxyalkanoates produced from *Pseudomonas oleovorans* grown with ω -phenoxyalkanoates. *Macromolecules*, 29: 3432.
- Klausner E, Lavi A, Friedman E and Hoffman M A** (2003) Novel levodopa gastroretentive dosage form: in-vivo evaluation in dogs. *J. Controll. Rel*, 88 (1): 117-126.
- Konig G J M, van Bilsen H M M, Lemstra P J, Hazenberg W, Witholt B, Preusting H, van der Galien J G, Schirmer A and Jendrosseck D** (1994) A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoate) from *Pseudomonas oleovorans*. *Polymer*, 35: 2090.
- Koo O, Rubinstein I and Onyuksel H** (2005) Camptothecin in sterically stabilized phospholipid micelles: a novel nanomedicine. *Nanomedicine*, 1: 77–84.
- Kost J** (1993) Ultrasound induced delivery of peptides. *Journal of Controlled Release*, 24: 247-255.
- Kost J, Liu L S, Gabelnick H and Langer R** (1994) Ultrasound as a potential trigger to terminate the activity of contraceptive delivery implants. *Journal of Controlled Release*, 30: 77-81.
- Kozak Y de, Andrieux K, Villarroya H, Klein C, Thillaye-Goldenberg B, Naud M C, Garcia E and Couvreur P** (2004) Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles: a new treatment of experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur. J. Immunol*, 34: 3702–3712.
- Kristl J, Volk B, Gasperlin M, Sentjurc M and Jurkovic P** (2003) Effect of colloidal carriers on ascorbyl palmitate stability. *Eur. J. Pharm. Sci*, 19: 181–189.
- Kurth N, Renard E, Brachet F, Robic D, Guerin Ph and Bourbouze R** (2002) Poly(3-hydroxyoctanoate) containing pendant carboxylic groups for the preparation of nanoparticles aimed at drug transport and release. *Polymer*, 43: 1095.
- Kutcher G J, Coia L, Gillin M and et al.** (1994) Comprehensive QA for radiation oncology: report of AAPM Radiation Therapy Committee Task Group 40. *Med Phys*, 21: 581–618.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Lageveen R G, Huisman G W, Preusting H, Ketelaar P, Eggink G and Witholt B** (1988) Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2924.
- Langer R and Peppas N A** (2003) Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology. *AIChE J*, 49 (12): 2990–3006.
- Larina IV, Evers BM, Ashitkov TV and et al** (2005). Enhancement of drug delivery in tumors by using interaction of nanoparticles with ultrasound radiation. *Technol Cancer Res Treat*, 4:217–26.
- Lauzier C A, Monasterios C J, Saracovan I, Marchessault R H and Ramsay B A** (1993) Film formation and paper coating with poly (b-hydroxyalkanoate), a biodegradable latex. *Tappi J*, 76, 5, 71.
- LaVan D A, McGuire T and Langer R** (2003) Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nat Biotechnol*, 21: 1184 –91.
- Lee E S, Na K and Bae U H** (2003) Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. *J Controlled Release*, 91: 103–13.
- Lee J C, Pushpala S and Lee C E** (2000) Polymeric microporous film coated subcutaneous implant. US Patent 6,022,554.
- Lee M Y, Park W H and Lenz R W** (2000) Hydrophilic bacterial polyesters modified with pendant hydroxyl groups. *Polymer*, 41: 1703.
- Lee S H, Oh D H, Ahn W S, Lee Y, Choi J and Lee S Y** (2000a) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnol Bioeng*, 67: 240–244.
- Leer J W, McKenzie A, Scalliet P and Thwaites D I** (1998) Practical guidelines for the implementation of a quality system in radiotherapy. ESTRO physics for clinical radiotherapy booklet No. 4. Brussels, Belgium. *European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* (ESTRO).
- Lemoigne M** (1926) Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide b-oxybutyric, *Bull. Soc. Chem. Biol*, 8: 770–782.
- Lenz R W and Marchessault R H** (2005) Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*, 6: 1-8.
- Lenz R W, Fuller R C and Scholz C** (1993) Touraud, F.; Special Publication in 3rd International Scientific Workshop on Biodegradable Plastics and Polymers, Osaka, Japan, November.
- Lenz R W, Kim Y B, Ulmer H W, Fritzsche K, Knee E and Fuller R C** (1990) In *Novel Biodegradable Microbial Polymers* (Dawes, E. A., Ed.), 23.
- Leong K W and Langer R** (1987) Polymeric controlled Drug Delivery. *Adv. Drug Delivery Rev*, 1: 199–233.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Lin C C and Metters A T** (2006) Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 58: 1379–1408.
- Ludwig A** (2005) The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57: 1595-1639.
- Maeda H, Sawa T and Konno T** (2001) Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of prototype polymeric drug SMANCS*, *J. Control. Release*, 74: 47– 61.
- Marchessault R H, Monasterios C J, Morin F G and Sundararajan P R** (1990) Chiral poly(beta-hydroxyalkanoates): an adaptable helix influenced by the alkane side chain. *Macromol*, 12: 158.
- Marin A, Sun H, Hussein G A, Pitt W G, Christensen D A and Rapoport N Y** (2002) Drug delivery in pluronic micelles: effect of high-frequency ultrasound on drug release from micelles and intracellular uptake. *J. Control. Release*, 84: 39– 47.
- Martin F J and Grove C** (2001) Microfabricated drug delivery systems: concepts to improve clinical benefit. *Biomed. Microdevices*, 3: 97–108.
- Mathiowitz E, Kreitz M R and Barnnon-Peppas L** (1999) Microencapsulation. *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery*, Ed: E Mathiowitz, Wiley, New York, 493-546.
- Mehier-Humbert S and Guy R H** (2005) Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 57:733–753.
- Mestiri M, Benoit J P, Hernigou P, Devissaguet J P and Puisieux F** (1995) Cisplatin-loaded poly(methyl methacrylate) implants: a sustained drug delivery system. *J. Controlled Release*, 33: 107–113.
- Minchinton A I and Tannock I F** (2006) Drug penetration in solid tumors. *Nat. Rev. Cancer*, 6(8): 583-592.
- Mitchell M S** (2002a) Cancer vaccines, a critical review—Part I, *Curr. Opin. Invest. Drugs*, 3: 140–149.
- Mitchell M S** (2002b) Cancer vaccines, a critical review—Part II, *Curr. Opin. Invest. Drugs* 3: 150–158.
- Moghimi S M and Szebeni J** (2003) Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog. Lipid Res*, 42: 463–478.
- Moghimi S M, Hunter A C and Murray J C** (2001) Long-circulating and target specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.*, 53: 283–318.
- Mourgues A, Charmette C, Sanchez J, Marti-Mestres G and Gramain P** (2004) EO/EP copolymer membranes as reservoir in a transdermal therapeutic system for caffeine delivery. modeling and simulation. *J. Membr. Sci*, 241: 297–304.
- Nakanishi T, Fukushima S, Okamoto K, Suzuki M, Matsumura Y, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y and Kataoka K** (2001) Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin, *J. Control. Release* 74: 295– 302.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Nam K, Watanabe J and Ishihara K** (2004) Modeling of swelling and drug release behavior of spontaneously forming hydrogels composed of phospholipid polymers. *Int. J. Pharm*, 275: 259–269.
- Nasongkla N, Bey E, Ren J and et al** (2006) Multifunctional polymeric micelles as cancer-targeted, MRI-ultrasensitive drug delivery systems. *Nano Lett*, 6:2427–30.
- Nomura T, Saikawa A, Morita S, Sakaeda T, Yamashita F, Honda K, Takakura Y and Hahida M** (1998) Pharmacokinetic characteristics and therapeutic effects of mitomycin C-dextran conjugates after intratumoral injection, *J. Control. Release*, 52: 239– 252.
- Novotny J, Izewska J, Dutreix A and van der Schueren E** (1998) A quality assurance network in Central European countries: radiotherapy infrastructure. *Acta Oncol*, 37: 159–65.
- Ogura Y and Kimura H** (1995) Biodegradable polymer microspheres for targeted drug delivery to the retinal pigment epithelium. *Surv. Ophthalmol*, 39 (Suppl 1): pp. 17–S24.
- Owens DE III and Peppas NA** (2006) Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharmacol*, 307: 93–102.
- Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M and Macheras P** (2006) On the use of the weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int. J. Pharm*, 309: 44–50.
- Park K** (1997) Challenges and Strategies; American Chemical Society: Washington, DC. *Controlled Drug Delivery*, 629.
- Park K and Marshy R** (2000) ACS Symposium Series 752. Controlled Drug Delivery Designing Technologies for the Future , *American Chemical Society*: Washington, DC., 459.
- Park W H, Lenz R W and Goodwin S** (1998) Epoxidation of bacterial polyesters with unsaturated side chains. I. Production and epoxidation of polyesters from 10-undecenoic acid. *Macromolecules*, 31: 1480.
- Perez C, Sanchez A, Putnam D and et al.** (2001) Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J Control Release*, 75:211–24.
- Peyman G A and Herbst R** (1974) Bacterial endophthalmitis. Treatment with intraocular injection of gentamicin and dexamethasone. *Arch Ophthalmol*, 91: 416—8.
- Pouton C W** (2001) Polymeric materials for *advanced drug delivery*. *Adv Drug Deliver Rev*, 53: 1-3.
- Powell M F** (1996) Drug delivery issues in vaccine development. *Pharm. Res*, 19 (12): 1777–1785.
- Prausnitz M R, Mitragotri S and Langer R** (2004) Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov*, 3: 115–124.
- Preusting H, Nijenhuis A and Witholt B** (1990) Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkenoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. *Macromolecules* 23: 4220-4224.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Puttipipatkachorn S, Nunthanid J, Yamamoto K and Peck G E** (2001) Drug Physical State and Drug-Polymer Interaction on Drug Release from Chitosan Matrix Films. *J. Controlled Release*, 75: 143–153.
- Qiu Y Z, Han J, Guo J J and Chen G Q** (2005) Production of poly(3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate) by *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Lett*, 27: 1381–1386.
- Qiu Y Z, Ouyang S P, Shen Z, Wu Q and Chen G Q** (2004) Metabolic engineering for the production of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate by *Aeromonas hydrophila*. *Macromol Biosci*, 4: 255–261.
- Ramakrishna S, Mayer J, Wintermantel E and Leong K W** (2001) Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composite Sci. Technol*, 61: 1189–1224.
- Ramsay B A, Saracovan I, Ramsay J A and Marchessault R H** (1992) Effect of nitrogen limitation on long-side-chain ploy-beta-hydroxyalkanoate synthesis by *Pseudomonas resinovorans*. *Appl. Environ. Microbiol*, 58: 744.
- Reusch R N** (2000) Transmembrane ion transport by polyphosphate-poly-(R)-3-hydroxybutyrate complexes, *Biochem. Engl. Trans*, 65: 280-295.
- Rijnboutt S, Jansen G, Posthuma G, Hynes J B, Schornagel J H and Strous G J** (1996). Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor-alpha. *J. Cell Biol*, 132, 35–47.
- Ross J F, Chaudhuri PK and Ratnam M** (1994) Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo as in established cell lines physiological and clinical applications. *Cancer*, 73: 2432–43.
- Sakurai E, Ozeki H, Kunou N and Ogura Y** (2001) Effect of particle size of polymeric nanospheres on intravitreal kinetics. *Ophthalmic Res*, 33: 31–36.
- Salazar M D and Ratnam M** (2007) The folate receptor: what does it promise in tissue-targeted therapeutics. *Cancer Metastasis Rev*, 26: 141-152.
- Schabel Jr and F M** (1977). Surgical adjuvant chemotherapy of metastatic murine tumors. *Cancer*, 40: 558-568.
- Seong H, An T K, Khang G, Choi S U, Lee C O and Lee H B** (2003) BCNU-loaded poly (d,l-lactide-co-glycolide) wafer and antitumor activity against XF-498 human CNS tumor cells in vitro, *Int. J. Pharm.* 251: 1– 12.
- Sheppard N F and Langer R** (1992) The use of ultrasound attenuation to characterize release of proteins from polymer matrix devices. *Journal of Controlled Release*, 22: 245-252.
- Si-Shen Feng and Shu Chien** (2003) Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science* 58: 4087-4114.
- Slingluff C L** (1999) Targeting unique tumor antigens and modulating the cytokine environment may improve immunotherapy for tumors with immune escape mechanisms [see comments]. *Cancer Immunol. Immunother*, 48: 371–373.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Slivniak R and Domb A J** (2005) Macrolactone and polyesters from ricinoleic acid *Biomacromolecules*, 6: 1679.
- Slivniak R, Ezra R A and Domb A J** (2006) Hydrolytic degradation and drug release of ricinoleic acid-lactic acid copolyesters. *Pharmaceutical Research*, 23: 6: 1306.
- Sobol E N** (1998) Kinetics of Diffusion of Organometallic Compounds into Polymers from Solutions in Supercritical Carbon Dioxide. *Russ. J. Phys. Chem*, 72 (1): 17–20.
- Soykan O and Donovan M G** (2004) Implantable System with Drug-Eluting Cells for On-Demand Local Drug Delivery, European Patent 1426021.
- Steinbüchel A and Fächtenbusch B** (1998). Bacterial and other biological systems for polyester production. *Tibtech*, 16: 419-427.
- Steinbüchel A and Valentin H E** (1995) Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbial. Lett*, 128: 219.
- Stella B, Arpicco S, Peracchia MT, Desmaele D, Hoebeke J, Renoir M, D'Angelo J, Cattel L and Couvreur P** (2000) Design of folic acidconjugated nanoparticles for drug targeting. *J Pharm Sci*, 89: 1452-64.
- Stigers D J and Tew G N** (2003) Poly(3-hydroxyalkanoate)s functionalized with carboxylic acid groups in the side chain. *Biomacromolecules*, 4: 193.
- Stru"bing S, Metz H and Mader K** (2007) Mechanistic analysis of drug release from tablets with membrane controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 66: 113–119.
- Sudesh K and Doi Y** (2005) Polyhydroxyalkanoates. In: Bastioli, C. (Ed), Handbook of Biodegradable Polymers. RAPRA Technology Ltd., United Kingdom, pp: 219, 256.
- Sudesh K, Abe H and Doi Y** (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci*, 25: 1503-1555.
- Sudimack J and Lee RJ** (2000) Targeted drug delivery via the folate receptor. *Adv Drug Del Rev*, 41: 147–6.
- Szymura-Oleksiak J, Slosarczyk A, Cios A, Mycek B, Paszkiewicz Z, Szklarczyk S and Stankiewicz D** (2001) The kinetics of pentoxifylline release in vivo from drug-loaded hydroxyapatite implants. *Ceram. Int*, 27: 767–772.
- Tan I K P, Stuart E S, Lenz R W and Fuller R C** (1998) Compositional limitations in poly-3-hydroxyalkanoates produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 6: 67-72
- Tao S L, Lubeley M W and Desai T A** (2003) Bioadhesive poly(methyl methacrylate) microdevices for controlled drug delivery. *J. Controlled Release*, 88: 215–228.
- Timm A and Steinbüchel A** (1990) Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*, 56: 360-3367.
- Tobio M, Gref R, Sanchez A and et al.**(1998) Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharmacol Res*, 15: 270–5.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- Tom J W and Debendetti P G** (1991) Formation of Bioerodible Polymeric Microspheres and Microparticles by Rapid Expansion of Supercritical Solutions. *Biotechnol. Prog.*, 7: 403–411.
- Torchilin VP** (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*, 4:145– 60.
- Tsuge T, Saito Y, Kikkawa Y, Hiraishi T and Doi Y** (2004) Biosynthesis and compositional regulation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) in recombinant *Ralstonia eutropha* expressing mutated polyhydroxyalkanoate synthase genes. *Macromol Biosci*, 4: 238–242.
- Tunçay M ve Çalış S** (1999) İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan biyoparçalanabilir sentetik ve doğal polimerler. *FABAD-Farmasötik Bilimler Dergisi*, 24: 109-123.
- Turek JJ, Leamon CP and Low PS** (1993) Endocytosis of folate-protein conjugates: ultrastructural localization in KB cells. *J Cell Sci*, 106: 423–30.
- URL-1** (2010) (<http://www2.aku.edu.tr/~evcin/nanomaterials/characterization.pdf> (12.02.2010)).
- Valle del Martin E. M, Galan M A and Carbonell R G** (2009) Drug delivery technologies: The way forward in the new decade. *Ind. Eng. Chem. Res*, 48: 2475-2486.
- Veloso A A Jr, Zhu Q, Herrero-Vanrell R and Refojo M F** (1997) Ganciclovir-loaded polymer microspheres in rabbit eyes inoculated with human cytomegalovirus. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci*, 38: 665–675.
- Vyas S P, Singh A and Sihorkar V** (2001) Ligand-receptor mediated drug delivery: an emerging paradigm in cellular drug targeting. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 18: 1-76.
- Wang R F and Rosenberg S A** (1999) Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol. Rev.* 170: 85–100.
- Wang S, Luo J, Lantrip D A, Waters D J, Mathias C J, Green M A, Fuchs P and Low P S** (1997) Design and synthesis of [In]DTPA-folate for use as a tumor targeted radiopharmaceutical. *Bioconjugate Chem*, 8: 673–9.
- Wang Y X, Hussain S M and Krestin G** (2001) Superparamagnetic iron oxide contrast agents: Physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol*, 11:2319 –31.
- Watts P J, Davies M C and Melia C D** (2001) Microencapsulation using emulsification/solvent evaporation: an overview of techniques and applications. *Critical Reviews Therapeutic Drug Carrier Systems*, 7: 23-259.
- Weiss R B and DeVita V T** (1979). Multimodal primary cancer treatment (adjuvant chemotherapy): Current results and future prospects. *Annals of Internal Medicine*, 91: 251-260.
- Weitman S D, Lark R H, Coney L R, Fort D W, Frasca V, Zurawski Jr V R and Kamen B A** (1992) Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues. *Cancer Res*, 52: 3396–401.
- Wermuth, C G** (2002). In Camille, G (Ed.), Practice of medicinal chemistry (2nd ed). London: Academic Press.

KAYNAKLAR (devam ediyor)

- White C A, Weaver R L and Grillo-Lopez A J** (2001) Antibody-targeted immunotherapy for treatment of malignancy. *Annu. Rev. Med.*, 52: 125–145.
- Whitehead K Z, Shen S and Mitragotri S** (2004) Oral delivery of macromolecules using intestinal patches: applications for insulin delivery. *J. Controlled Release*, 98: 37–45.
- Whitesides G M** (2003) The “right” size in nanobiotechnology. *Nat Biotechnol*, 21: 1161–5.
- Widdler K J and Senyei A E** (1984) Magnetic albumin microspheres in drug delivery. *Microspheres and Drug Therapy*, Eds.: S. S. Davis, L. Illum., J. G. McVie, E. Tomlinson, *Elsevier*, Amsterdam, 393-411.
- Wiggam M I, Kane M J O, Harper R, Atkinson A B, Hadden D R, Trimble E R and Bell P M** (1997) Treatment of diabetic ketoacidosis using normalization of blood 3-hydroxybutyrate concentration as the endpoint of emergency management, *Diabetes Care*, 20: 1347-1352.
- Witholt B and Kessler B** (1999) Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr Opin Biotechnol* 10: 279-285.
- Yanik C S, Sardesai B S, Bhat D S, Naik S S, Raut K N, Shelgikar K M, Orskov H, Alberti K G and Hockaday T D** (1997) Ketosis resistance in fibrocalculous pancreatic diabetes: II. Hepatic ketogenesis after oral medium-chain triglycerides. *Metabolism*, 46: 1-4.
- Yun-Xiao L, Zhang Y and Wang L** (2010) Preparation and in vitro drug-release behavior of 5-fluorouracil-loaded poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) nanoparticles and microparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 116: 2944-2950.
- Zhang J, Rana S, Srivastava R S and Misra R D K** (2008) On the chemical synthesis and drug delivery response of folate receptor-activated, polyethylene glycol-functionalized magnetite nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 4: 40-48.
- Zhang K E, Rossin R, Hagooley A, Chen Z, Welch J M and Wooley L K** (2008) Folate-mediated cell uptake of shell-crosslinked spheres and cylinders. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 46: 7578-7583.
- Zhang Y, Kohler N and Zhang M** (2002) Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*, 1553-1561.
- Zinn M, Witholt B and Egli T** (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53: 5-21.

BİBLİYOGRAFYA

- Abe C, Taima Y, Nakamura Y and Doi Y** (1990) *Polym Commun*, 31: 404.
- American Cancer Society** (2002b) *Cancer Prevention & Early Detection, Facts and Figures*.
- American Cancer Society**, (2002a). *Cancer Facts & Figures*
- Barham P J and Sealwood A** (1982) Eur. Pat. Appl, 58: 480
- Bellhouse B J and Kendall M A F** (2003) *Modified-Release Drug Delivery Technology*: Marcel Dekker: New York, 607.
- Comprehensive audits of radiotherapy practices** (2007): a tool for quality improvement: Quality Assurance Team for Radiation Oncology (QUATRO). *Vienna: International Atomic Energy Agency*.
- European Commission** (2000) Guidelines on education and training in radiation protection for medical exposures. Radiation protection 116. Luxembourg: Environment Directorate-General, Office for Official Publications of the European Communities.
- Haystead J** (2003) New Particle Engineering Technology Improves Drug Solubility. *Pharm. Technol*
- Holmes P A and Jones E** (1980) Eur. Pat. Appl, 46: 335.
- International Commission on Radiological Protection (ICRP)** (1996). Radiological protection and safety in medicine. *ICRP 73. Ann ICRP*, 26: 1–47.
- L** (1997) Polymers in Controlled Drug Delivery in Medical Plastics and Biomaterials. November.
- Lafferty R M and Heinzle E** (1978) U.S. Pat. 4: 101, 533.
- National Science and Technology Council Committee on Technology**. (2005) *The National Nanotechnology Initiative: research and development leading to a revolution in technology and industry*, Office of Science and Technology Policy, Washington, D.C.
- Prevention of accidental exposures to patients undergoing radiation therapy** (2000): a report of the International Commission on Radiological Protection (ICRP). *Ann ICRP*, 30: 7–70.
- Setting up a radiotherapy programme** (2008) Clinical, medical physics, radiation protection and safety aspects. *Vienna: International Atomic Energy Agency (IAEA)*
- Schmidt J, Biederman B and Schmiechen H** (1985) Ger. (East) Pat. DD 223, 428.
- Stageman J F** (1985) U.S. Pat. 4: 562, 245.
- The Swedish council on technology assessment in health care (SBU)** (2003) Systematic overview of radiotherapy for cancer including a prospective survey of radiotherapy practice in Sweden 2001 summary and conclusions. *Acta Oncol*;42: 357–65.

BİBLİYOGRAFYA (devam ediyor)

Vanlaudem N and Gilain J (1982) U.S. Pat. 4: 310, 684.

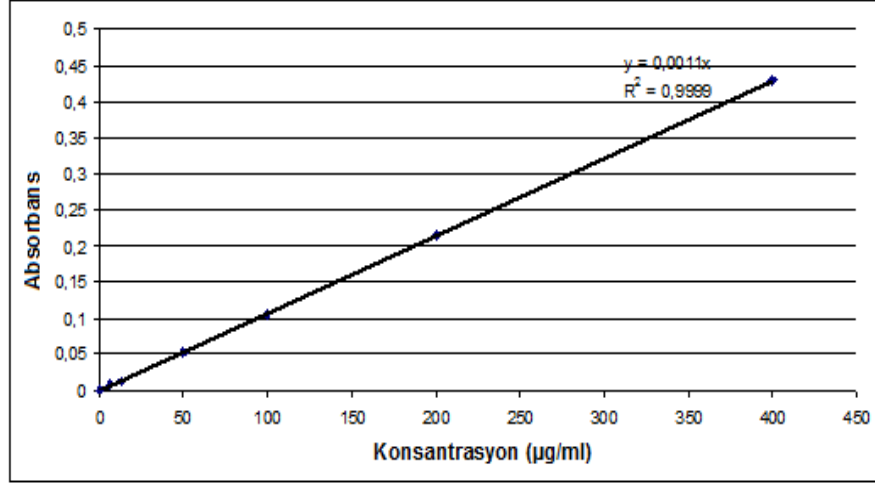
Vanlaudem N and Gilain J (1987) U.S. Pat. 4: 705, 604.

Walker J, Whitton J R and Alderson B (1982) Eur. Pat. *Appl.* 46, 017.

World Health Organization (WHO) (1988) Quality assurance in radiotherapy. Geneva: WHO.

EK AÇIKLAMALAR A
ETOPOSİDİN KALİBRASYON EĞRİSİ

EK 1: Etoposidin Kalibrasyon Eğrisi



Ek A1: Etoposid kalibrasyon eğrisi.

ÖZGEÇMİŞ

Ebru KILIÇAY 1973 yılında Ankara’da doğdu; ilk, orta ve lise öğrenimini aynı şehirde tamamladı. Hacettepe Üniversitesi (HÜ) Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümünü bitirdi. HÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans yaptı. Ankara Üniversitesi İbni Sina Hastanesi Hematoloji Bölümü Koagülasyon Ünitesi’nde çalıştı. Sonrasında ZKÜ Meslek Yüksekokulu Teknik Programlar Bölümü Biyomedikal Cihaz Teknolojisi Bölümü’nde öğretim görevlisi oldu. Halen aynı bölümde görevini yürütmektedir.

ADRES BİLGİLERİ

Adres : Karaelmas Üniversitesi Meslek Yüksekokulu
 Teknik Programlar Bölümü, Biyomedikal Cihaz Teknolojisi Programı
 ZONGULDAK/Merkez

Tel : 0372 2574010

E-posta: ebru_kilicay@yahoo.com

Ebru KILIÇAY