

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLOREKTAL KANSERLERİN LOKAL TEDAVİSİNDE ORAL
UYGULANABİLEN NANOPARTİKÜLER İLAÇ TAŞIYICI SİSTEM
GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO/İN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ecz. Sedat ÜNAL

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2020

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, sürekli ilham veren, her aşamada ve şartta desteklerini esirgemeyerek sabır gösteren, beraber çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum saygıdeğer danışman hocam **Prof. Dr. Erem BİLENSOY**'a,

Çalışmalarımı gerçekleştirirken her zaman destek ve yardımını yanımda hissettiğim, zor günlerde yanımda olan, güç veren, bilgi ve tecrübesiyle yoluma ışık tutan değerli hocam **Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ**'a,

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Ailesi olarak tez çalışmalarım sırasında her türlü imkânı sağlayarak beni aralarına kabul eden başta **Prof. Dr. Levent ÖNER** ve **Prof. Dr. Sema ÇALIŞ** nezdinde **Anabilim Dalı Başkanlığı**'na ve tüm değerli öğretim üyesi/elemanı Hocalarıma,

Tez çalışmalarım süresince tez izleme komitesi jüri üyesi olarak gösterdikleri destek ve yardımlarından dolayı Sn. **Prof. Dr. Hakan EROĞLU** Hocama,

Doktora çalışmalarım sürecinde ihtiyaç duyduğum her an yardımlarını esirgemeyerek yanımda olan başta **Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ERDOĞAR**, **Öğr. Gör. Dr. Cem VARAN**, **Dr. Gamze VARAN** ve **Ecz. Safiye AKKIN** olmak üzere **Bilensoy Lab.** ekibimizin değerli üyelerine,

In vivo deneysel çalışmalarım süresince yardımlarıyla her türlü imkan ve desteği sağlayan, bu süreçte beraber çalışmaktan onur duyduğum **Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI** ve **Dr. Süleyman Can ÖZTÜRK** olmak üzere **Esendağlı Lab.** ekibinin değerli üyelerine,

Karşılıksız destekleriyle zor günleri aşmamı sağlayan, varlıkları ve sonsuz sevgileriyle güç veren, her koşulda inanan ve beni ben yapan değerleri kazanmamı sağlayarak her zaman yanımda olan **Sevgili Aileme**,

Üzerinde yaşadığımız toprakları Türk Milletine vatan kılan başta Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK ve değerli silah arkadaşlarına, bu uğurda yüzyıllardır canı pahasına toprağa karışmış kahramanlara, gazilerimize ve kaybettiklerimize,

Sonsuz Saygı, Sevgi ve Teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarım boyunca sağladıkları destek için TÜBİTAK BİDEB 2211-C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı'na teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Sedat, Ü., Kolorektal Kanserlerin Lokal Tedavisinde Oral Uygulanabilen Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve *in vitro/in vivo* Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020. Antikanser ilaçlar fizikokimyasal özelliklerine bağlı kısıtlamalardan dolayı genellikle parenteral olarak uygulanmak zorundadır. İlacın seçici olmayan biyodağılım ve parenteral uygulamanın zorluğu, hasta uyuncu ve tedavinin etkinliğini azaltmaktadır. Bu çalışmada, kolorektal kanser tedavisi için, oral olarak uygulanabilen, hastanın kendi kendine uygulama olanağı olduğu için uyuncu daha yüksek, taşıdığı etkin maddeyi kolona ulaştırarak tümörlü bölge için lokal bir tedavi imkanı sunan bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kolon kanseri hücrelerine karşı güçlü antikanser etkinliği bilinen ancak çözünürlük ve fizyolojik koşullarda stabilite sorunundan dolayı klinik uygulamada sınırlı kalınan kamptotesin model etkin madde olarak seçilmiştir. Kolonik bakterilerce parçalanarak taşıdığı etkin maddeyi büyük oranda kolonda serbestleştirmesi öngörülen amfifilik siklodekstrinlerin (6-O-CAPRO- β -CD ve Poly- β -CD-C6) nanopartikülleri hazırlanmış ve (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikülleri ayrı ayrı kitosan (CS) ve polietilenimin (PEI) polimerleri ile kaplanarak pozitif yüzey yükü kazandırılmıştır. Nanopartiküller nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmış, boş ve ilaç yüklü formülasyonların *in vitro* karakterizasyonları, simüle gastrointestinal sıvılarda salım ve stabilite, müsinle etkileşim ve mukus tabakasına penetrasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Oral uygulama için geliştirilen nanopartiküllerin güvenlik (L929), intestinal permeabilite (Caco-2) ve antikanser etkinlikleri (HT-29) *in vitro* hücre kültürü çalışmalarıyla değerlendirilmiştir. *In vitro* çalışmalarla, optimum özellikleri taşıdığı görülen (Poly- β -CD-C6) nanopartikülleri ile *in vivo* etkinlik ve *in vivo* görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonunda, kamptotesin yüklü (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin kolorektal tümörlerin tedavisinde oral yolla uygulanabilen, kolonda lokalize olarak taşıdığı ilacı tümörlü bölgeye ulaştırabilen ve etkin bir tedavi imkanı sunan ilaç taşıyıcı sistem özelliği ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: kanser, kamptotesin, siklodekstrin, kolon tümörü, oral uygulama

ABSTRACT

Sedat, U., Formulation of Orally Administered Nanoparticulate Drug Delivery System in the Local Treatment of Colorectal Cancer and in vitro/in vivo Evaluation, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmaceutical Technology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2020. Anticancer drugs need to be administered via the parenteral route because of limitations arising from their physicochemical properties. Non-specific biodistribution and difficulty in parenteral administration adversely affect patient compliance and efficacy of treatment. In this study, it is aimed to develop a drug delivery system that can be administered orally, which provides a local treatment opportunity for the tumor region by delivering the active substance to the colon in the treatment of colorectal cancer. Camptothecin, known for its potent anticancer activity against colon cancer cells, but limited in clinical practice due to poor solubility and stability under physiological conditions, has been selected as the model drug. Nanoparticles of the amphiphilic cyclodextrins (6-O-CAPRO- β -CD and Poly- β -CD-C6) intended to be degraded by colonic bacteria to release the drug in the colon were prepared and (6-O-CAPRO- β -CD) nanoparticles coated with chitosan (CS) and polyethyleneimine (PEI) polymers to give positive surface charge. Blank and drug loaded nanoparticles were prepared by nanoprecipitation method and their in vitro characterization, release profiles in gastrointestinal fluids, physical stability, interaction with mucin and penetration to mucus layer were performed. The safety of nanoparticles (L929), intestinal permeability (Caco-2) and anticancer activities (HT-29) were evaluated by in vitro cell culture studies. In vivo studies and in vivo imaging studies were performed with nanoparticles (Poly- β -CD-C6) which were found to have optimum properties during in vitro studies. Conclusion, it has been shown that with camptothecin loaded Poly- β -CD-C6 nanoparticles, an orally administered nanoparticulate drug delivery system can deliver the drug to the tumor area localized in the colon and provides an effective treatment for colorectal cancers via the oral route.

Key-words: cancer, camptothecin, cyclodextrin, colon tumor, orally administration

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET BEYANLARI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kolorektal Kanserler ve Kolorektal Kanserin Evreleri	5
2.1.2. Kolorektal Kanser Tedavisinde Mevcut Yaklaşımlar	7
2.2. Kamptotesin	8
2.2.1. Kamptotesinin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri	8
2.2.2. Kamptotesinin Formülasyon Yaklaşımları	10
2.3. Siklodekstrin	11
2.3.1. Amfifilik Siklodekstrinler	15
2.4. Oral Yoldan İlaç Uygulaması	16
2.4.1. Gastrointestinal Kanal Fizyolojisi ve İlişkili Engeller	18
2.4.2. İntestinal Absorpsiyon	21
2.5. Nanoteknoloji ve Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	22
2.6. Oral Uygulamada Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	27
2.6.1. Oral İlaç Uygulamasındaki Engellerin Nanopartiküler Sistemler ile Aşılabilmesi Stratejileri	29
2.7. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Oral Yoldan Uygulama Alanları	35
2.7.1. Kanser Tedavisi	35

2.7.2. Protein Peptid Yapılı İlaçların Taşınımı	37
2.7.3. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı	39
2.8. Kolona İlaç Hedefleme	43
2.8.1. Kolona İlaç Hedeflemede Oral Yoldan Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Uygulanması	46
3. GEREÇ ve YÖNTEM	50
3.1. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar	50
3.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler	51
3.3. Analitik Yöntem Validasyonu	53
3.3.1. Kamptotesinin HPLC ile <i>in vitro</i> Miktar Tayini Yöntemi	53
3.3.2. Analitik Yöntem Validasyonu	53
3.4. Önformülasyon Çalışmaları ve Nanopartiküllerin Hazırlanması	57
3.4.1. Kamptotesin Yüklü Amfifilik Siklodekstrin Nanopartiküllerinin Eldesi	60
3.5. Nanopartiküllerin In vitro Karakterizasyonu	61
3.5.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini	61
3.5.2. Zeta Potansiyeli Tayini	61
3.5.3. Nanopartiküllerin Morfolojilerinin İncelenmesi	61
3.5.4. Enkapsülasyonun Etkinliğinin Değerlendirilmesi	62
3.5.5. <i>In vitro</i> Salım Çalışmaları	63
3.5.6. Gastrointestinal Simüle Sıvılarda Stabilite Çalışmaları	63
3.5.7. İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Zamana Bağlı Fiziksel Stabilite Çalışmaları	65
3.6. Mukus ile Etkileşim Çalışmaları	65
3.6.1. Türbidimetrik Tayin	65
3.6.2. Nanopartiküllerin Mukus Varlığında In vitro Karakterizasyonu	67
3.7. Yapay Mukus Tabakasına Penetrasyon Çalışmaları	67
3.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	69
3.8.1. Güvenlilik Çalışmaları; Boş Nanopartiküllerin L929 Hücreleri Üzerinde Sitotoksitesinin Araştırılması	70
3.8.2. Antikanser Etkinlik Çalışmaları; Kamptotesin Yüklü Nanopartiküllerin HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksitesinin Araştırılması	73

3.8.3. Permeabilite Çalışmaları; Kamptotesin Yüklü Nanopartiküllerin CaCo-2 Hücrelerinden Geçişlerinin Araştırılması	77
3.9. <i>İn vivo</i> Etkinlik Çalışmaları	84
3.9.1. Farelerde Cerrahi Olarak Kolorektal Tümör İnokülasyonu	85
3.9.2. Kolorektal Kanser Modeli Geliştirilmiş Farelere Uygulanan Tedavi Protokolü	88
3.10. <i>İn vivo</i> Görüntüleme Çalışmaları	89
3.11. Histolojik Değerlendirme	90
3.12. İstatistiksel Analiz	91
4. BULGULAR	93
4.1. Analitik Yöntem Validasyonu	93
4.1.1. Kamptotesinin HPLC ile <i>in vitro</i> Miktar Tayini Yöntemi	93
4.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu	94
4.2. Önformülasyon çalışmaları ve Nanopartiküllerin Hazırlanması	104
4.2.1. Önformülasyon çalışmaları Sonunda Elde Edilen Nanopartiküllerin Karakterizasyonları	104
4.3. Optimum Nanopartikül Parametrelerinin Belirlenmesi ve İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	111
4.3.1. Nanopartiküllerin Morfolojilerinin İncelenmesi	112
4.3.2. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	114
4.3.3. <i>İn vitro</i> Salım Çalışmaları	115
4.3.4. Gastrointestinal Simüle Sıvılarda Nanopartiküllerin Fiziksel Stabilite Çalışmaları	116
4.3.5. Fiziksel Stabilite Çalışmaları	118
4.4. Mukus ile Etkileşim Çalışmaları	120
4.4.1. Türbidimetrik Tayin	120
4.4.2. Nanopartiküllerin Mukus Varlığında Karakterizasyonu	123
4.5. Yapay Mukus Tabakasına Penetrasyon Çalışmaları	126
4.6. <i>İn vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	128

4.6.1. Güvenlilik Çalışmaları; Boş Nanopartiküllerin L929 Hücreleri Üzerinde Sitotoksitesinin Araştırılması	128
4.6.2. Antikanser Etkinlik Çalışmaları; Kamptotesin Yüklü Nanopartiküllerin HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksitesinin Araştırılması	130
4.6.3. Permeabilite Çalışmaları; Etkin Madde İçeren Nanopartiküllerin CaCo-2 Hücrelerinden Geçişlerinin Araştırılması	133
4.7. <i>İn vivo</i> Etkinlik Çalışmaları	134
4.7.1. Farelerde Cerrahi Olarak Kolorektal Tümör İnokülasyonu	135
4.7.2. Kolorektal Kanseri Modeli Geliştirilmiş Farelere Uygulanan Tedavinin Etkinliği	139
4.8. <i>İn vivo</i> Görüntüleme Çalışmaları	145
4.9. Histolojik Değerlendirme	149
5. TARTIŞMA	153
5.1. Analitik Yöntem Validasyonu	153
5.2. Önformülasyon Çalışmaları ve Nanopartiküllerin Hazırlanması	154
5.3. Önformülasyon Çalışmaları Sonunda Hazırlanan Nanopartiküllerin Değerlendirilmesi	159
5.3.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu Çalışmaları	159
5.3.2. Nanopartiküllerin Morfolojilerinin İncelenmesi	162
5.3.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi	163
5.3.4. <i>In vitro</i> Salım Çalışmaları	165
5.3.5. Gastrointestinal Simüle Sıvılarda Stabilite	167
5.3.6. Fiziksel Stabilite Çalışmaları	169
5.4. Mukus ile Etkileşim ve Yapay Mukus Tabakasına Penetrasyon Çalışmaları	170
5.4.1. Türbidimetrik Tayin	170
5.4.2. Yapay Mukus Tabakasına Penetrasyon	172
5.5. <i>In vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	174
5.5.1. Güvenlilik Çalışmaları	175
5.5.2. Antikanser Etkinlik Çalışmaları	176
5.5.3. İntestinal Permeabilite Çalışmaları	179

5.6. <i>İn vivo</i> Etkinlik ve Görüntüleme Çalışmaları	182
5.6.1. Farelerde Cerrahi Olarak Tümör Modeli Geliştirilmesi	183
5.6.2. Kolorektal Tümörlü Farelere Uygulanan Tedavinin Etkinliği	185
5.6.3. Görüntüleme Çalışmaları	189
5.7. Histolojik Değerlendirme	192
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	195
7. KAYNAKLAR	198
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2: Turnitin Dijital Makbuz	
EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
EK-3: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
5-FU	5-Florourasil
AJCC	Amerikan Kanser Komitesi
CD	Siklodekstrin
CH	Chrohn Hastalığı
CPT	Kamptotesin
CS	Kitosan
dk	Dakika
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DTPA	Dietilentriaminpentaasetik asit
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
g	Gram
GİK	Gastrointestinal Kanal
GRAS	Genellikle Güvenilir Kabul Edilen
HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
LOD	Saptama Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
mL	Mililitre
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
M_w	Kütle Ortalamalı Molekül Ağırlığı
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
NR	Nil Kırmızısı

OPB	Ortalama Partikül Büyüklüğü
PBS	Fosfat Tamponu
PDI	Polidispersite İndeksi
PEI	Polietilenimin
r²	Korelasyon Katsayısı
Rpm	Dakika Başına Devir Sayısı
SCoF	Simüle Kolon Sıvısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SGF	Simüle Gastrik Sıvı
SIF	Simüle İntestinal Sıvı
SS	Standart Sapma
TEER	Transepitelyal Elektriksel Direnç
UV	Ultraviyole, Morötesi
ÜK	Ülseratif Kolit
VK	Varyasyon Katsayısı
WST-1	Suda Çözünür Tetrazolyum Tuzu
ZP	Zeta Potansiyel

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kolorektal kanserlerin evreleri.	6
2.2. Kamptotesinin kimyasal yapısı.	9
2.3. Kamptotesinin aktif lakton ve inaktif karboksilat formu.	10
2.4. α , β ve γ Siklodekstrinlerin kimyasal yapıları	13
2.5. Doğal siklodekstrinlerin yapısı ve ilaçlarla kompleks oluşturmaları.	13
2.6. Piyasada bulunan ürünlerde ekspiyan olarak kullanılan siklodekstrin türevleri ve dağılımları.	15
2.7. Amfifilik Siklodekstrinler.	16
2.8. Oral yoldan ilaç uygulaması sonrası karşılaşılan çoklu bariyer.	18
2.9. İntestinal lümen fizyolojik yapısı ve intestinal hücreler.	19
2.10. Oral yolla uygulanan bir ilacın gastrointestinal kanalda karşılaçağı pH aralığı ve geçiş süreleri	20
2.11. Oral yolla uygulanan bir preparatın gastrointestinal kanalda karşılaçağı süreç.	21
2.12. İntestinal lümen yapısı ve transepitelyal taşıma mekanizmaları	22
2.13. Nanoteknoloji temelli olarak hazırlanan nano-ilac formülasyonlarının serbest ilaç molekülüne göre sağladığı üstünlükler.	27
2.14. Oral yolla uygulanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin karşılaştığı çoklu engeller ve nanopartiküler sistemlerin bu engelleri aşabilme stratejileri.	28
2.15. İntestinal lümeden ilaç ve/veya ilaç taşıyıcı sistemin epitelyal hücre bariyerini aşabilmesi süreci ve efflux pompa sisteminin etkisi.	33
2.16. Kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemler ve geliştirilen stratejiler	44
3.1. Nanoçöktürme yöntemi ile organik fazın sulu faza ilave edilerek nanopartiküllerin oluşması işlemi (Organik faz; aseton veya etanol, Sulu faz; ultrasaf su, katyonik kaplı formülasyonlar için ise kaplama polimerinin sulu çözeltisi).	58
3.2. Nanoçöktürme yöntemine ilişkin sürecin özeti.	58
3.3. Hazırlanan nanopartiküllerin gastrointestinal simüle sıvılarda stabilitelerinin değerlendirilmesi amacıyla inkübe edilmeleri işlemi.	64
3.4. Müsine etkileşim çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen türbidimetrik tayin analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla müsün dispersiyonu hazırlanması işlemi.	66

3.5.	Müsinle etkileşim çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen türbidimetrik tayin analizlerinin spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmesi süreci.	66
3.6.	Yapay mukus tabakasına penetrasyon çalışması aşamaları.	68
3.7.	Yapay mukus tabakasına penetrasyon çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin uygulanmasının ardından inkübasyon süreci.	69
3.8.	L929 Hücrelerinin 96 kuyucuklu hücre plağında kuyucuklara tutunmaları amacıyla 24 saatlik inkübasyona bırakılmaları öncesi hücrelerin ekim işlemi.	71
3.9.	Deney kapsamında kullanılacak nanopartikül dispersiyonlarının seyreltme işlemlerinin gerçekleştirilmesi.	71
3.10.	Nanopartiküllerin hücrelere uygulanması işlemi.	72
3.11.	Seyreltilmiş olan nanopartiküllerin hücrelere uygulandıktan sonra 48 saat inkübasyon öncesi son hali.	72
3.12.	HT-29 hücrelerinin her bir kuyucuğa ekilmesi ve tutunmaları için inkübasyona bırakılması işlemi.	74
3.13.	HT-29 hücrelerinin mikroskop altında görüntüleri.	74
3.14.	Kamptotesin çözeltisinin ve eşdeğer miktarda kamptotesin içeren nanopartikül formülasyonlarının DMEM ile seyreltilmesi ve 96 kuyucuklu hücre plaklarının formülasyonların uygulanması öncesi hazırlanması.	75
3.15.	Hazırlanan ilaç çözeltisi ve nanopartikül dispersiyonlarının hücrelere uygulanması ve sonrasında etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla 48 ve 72 saat süresince inkübasyona bırakılmaları.	75
3.16.	İnkübasyon süresi sonunda hücre canlılığının ölçülebilmesi amacıyla kuyucuklara WST boyasının eklenmesi ve ölçüm öncesi boya ile 4 saat inkübasyona bırakılması işlemi.	76
3.17.	48 saat (plak 1-3-5) ve 72 saat (plak 2-4-6) inkübasyon sonrası hücre canlılığının ölçülmesi öncesi plakların hazırlanması	76
3.18.	Hücre canlılığının tayin edilebilmesi amacıyla plak okuyucu ile her bir kuyucuktaki absorbansın ölçümü işlemi.	77
3.19.	Caco-2 hücrelerinin flasklarda çoğaltılması süreci ve çoğalarak konfluente ulaşan hücrelerin flask tabanında oluşturduğu yapının mikroskopik görüntüsü.	78
3.20.	Hücre sayım işleminin gerçekleştirildiği cihaz (Cedex XS Cell Analyzer) ve 1:4 oranında seyreltilerek tripan mavisi ile boyanan hücrelerin sayım aпаратыne uygulanması işlemi.	79
3.21.	Hücre sayım analizi sonucu cihaz yazılımından elde edilen görüntü ve hücre sayımına ilişkin verilerin sunum şekli.	79

3.22.	Caco-2 hücrelerinin, permeabilite çalışmalarının gerçekleştirileceği hücre plaklarına ekimi ve sonrasında 48 saatte bir besiyeri değiştirilmesi suretiyle 18-21 gün süresince inkübasyona bırakılması	80
3.23.	Apikal (0,5 mL) ve bazolateral (1 mL) ortamların 48 saatte bir taze besiyeri ile besiyerlerinin değiştirilmesi işlemi	81
3.24.	Caco-2 hücrelerinin insertlerde filtreler üzerinde çoğalarak farklılaştırıldığı ve tek tabakalı bir hücre yapısı oluşturduğunun kontrol göstergesi olan transepitelyal elektriksel direnç (TEER) değerinin EVOM ² cihazı ile ölçümü işlemi.	82
3.25.	Permeabilite çalışmalarının gerçekleştirilmesi amacıyla tasarlanan deney planı özeti.	83
3.26.	İn vivo deneyler süresince farelerin barındırıldıkları yaşam alanları.	84
3.27.	In vivo deney süreci akış şeması.	85
3.28.	Farelerde kolorektal tümör oluşturmak amacıyla gerçekleştirilen cerrahi yönteme ilişkin işlem basamakları.	87
3.29.	İn vivo deneyler süresince formülasyonların uygulama yolu olan oral gavaj uygulaması ve tümör indüklemiş farelerde deneysel süreç içerisinde makroskopik olarak gözlemlenebilen tümör kitlelerine bağlı şişlik.	88
4.1.	Kamptotesinin aktif lakton formunun 50 mcg/mL çözeltisine ait HPLC kromatogramı.	93
4.2.	Kamptotesinin inaktif karboksilat formunun 50 mcg/mL çözeltisine ait HPLC kromatogramı.	94
4.3.	Kamptotesinin lakton formuna ait kalibrasyon doğrusu.	95
4.4.	Kamptotesinin karboksilat formuna ait kalibrasyon doğrusu.	96
4.5.	HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında lakton formuna ait elde edilen kromatogram.	102
4.6.	HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında karboksilat formuna ait elde edilen kromatogram.	102
4.7.	HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında DMSO'ya ait elde edilen kromatogram.	103
4.8.	HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında kitosana ait elde edilen kromatogram.	103
4.9.	HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında PEI'e ait elde edilen kromatogram.	103
4.10.	HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında 6-O-CAPRO-β-CD ait elde edilen kromatogram.	104
4.11.	HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında Poly- β-CD-C6 ait elde edilen kromatogram.	104

4.12.	(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.	113
4.13.	Kitosan kaplı (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.	113
4.14.	Polietilenimin kaplı (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.	114
4.15.	(Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.	114
4.16.	Nanopartiküllerden kamptotesinin 24 saat süreli in vitro salım grafiği.	116
4.17.	Gastrointestinal simüle sıvılarda gerçekleştirilen stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğündeki değişimleri (n=3, \pm SS).	117
4.18.	Gastrointestinal simüle sıvılarda gerçekleştirilen stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin polidispersite indekslerindeki değişimler (n=3, \pm SS).	117
4.19.	Gastrointestinal simüle sıvılarda gerçekleştirilen stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerindeki değişimler (n=3, \pm SS).	118
4.20.	Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüklerindeki değişimler (n=3, \pm SS).	119
4.21.	Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin polidispersite indekslerindeki değişimler (n=3, \pm SS).	119
4.22.	Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerindeki değişimler (n=3, \pm SS).	120
4.23.	Müsinle etkileşim çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin 120. dk süresince gerçekleştirilen türbidimetrik ölçüm sonuçları (n=3, \pm SS).	122
4.24.	Nanopartiküllerin müsin varlığında 120. dk süresince gerçekleştirilen karakterizasyon parametrelerinin değerlendirilmesi kapsamında ortalama partikül büyüklüğü bulguları (n=3, \pm SS).	124
4.25.	Nanopartiküllerin müsin varlığında 120. dk süresince gerçekleştirilen karakterizasyon parametrelerinin değerlendirilmesi kapsamında polidispersite indeksi bulguları (n=3, \pm SS).	125
4.26.	Yapay mukus tabakasına penetrasyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre mukus tabakasına penetre olabilen kamptotesinin % miktarları (n=3, \pm SS).	127
4.27.	MTT uygulaması sonrasında DMSO ilavesi ile çözünerek hücre canlılığını gösteren formazan kristallerinin verdiği renk yoğunlukları.	128
4.28.	Boş anyonik ve katyonik nanopartiküllerin L929 hücre hattı üzerinde sitotoksikite çalışması sonucu elde edilen % hücre canlılığı değerleri (\pm S.S., n=3).	129

- 4.29.** İlaç yüklü ve boş anyonik ve katyonik nanopartiküllerin ilaç çözeltisi ile karşılaştırmalı olarak HT-29 hücreleri üzerinde 48 saatlik sitotoksosite çalışması sonrası % hücre canlılıkları (\pm S.S., n=3). 131
- 4.30.** İlaç yüklü ve boş anyonik ve katyonik nanopartiküllerin ilaç çözeltisi ile karşılaştırmalı olarak HT-29 hücreleri üzerinde 72 saatlik sitotoksosite çalışması sonrası % hücre canlılıkları (\pm S.S., n=3). 132
- 4.31.** Kamptotesin yüklü nanopartikül formülasyonları ve kamptotesin çözeltisi için görünür permeabilite katsayıları (Papp), (n=3, \pm S.S.) 134
- 4.32.** Deney sürecinde (8.gün) farelerde primer tümör kitlesinin makroskopik gözlemlenmesi. 136
- 4.33.** Tümör oluşumunun doğrulanabilmesi amacıyla farelerin bağırsak yapılarının incelenmesi işlemi. Sağlıklı bağırsak yapısıyla karşılaştırılarak erken evre ve geç evre tümörlerin gözlemlenmesi. 137
- 4.34.** Kolorektal tümör indüklenen farelerde, geç evre tümör modelini temsil eden 17.günde ascites tablosunun oluşumu. 138
- 4.35.** Kolorektal tümör indüklenen farelerde tümör oluşumunun makroskopik olarak gözlenebilmesi. 138
- 4.36.** Kolorektal kanser indüklenmiş farelerde geç evre tedavi protokolü şeması. 140
- 4.37.** Kolorektal kanser indüklenmiş farelerde erken evre tedavi protokolü şeması. 140
- 4.38.** Geç evre tedavi protokolü uygulanan farelerde, tedavi süresi sonunda çıkarılan tümör kitlelerinin ağırlıkları (*; p<0,05), (n=6, \pm SH). 141
- 4.39.** Erken evre tedavi protokolü uygulanan farelerde, tedavi süresi sonunda çıkarılan tümör kitlelerinin ağırlıkları (*; p<0,05), (n=6, \pm SH). 141
- 4.40.** Kolorektal tümörlü farelerde geç evre tedavi protokolü uygulanması sonunda farelerden çıkarılan tümör kitlelerinin makroskopik görüntüleri. 142
- 4. 41.** Kolorektal tümörlü farelerde erken evre tedavi protokolü uygulanması sonunda farelerden çıkarılan tümör kitlelerinin makroskopik görüntüleri. 142
- 4.42.** Geç evre tedavi protokolü uygulanan kolorektal kanserli farelerde % sağ kalım verileri. 143
- 4.43.** Erken evre tedavi protokolü uygulanan kolorektal kanserli farelerde % sağ kalım verileri. 143
- 4.44.** Kolorektal kanserli farelerde geç evre tümörlere yönelik gerçekleştirilen tedavi sürecinde farelerin ağırlık değişimleri. 144
- 4.45.** Kolorektal kanserli farelerde erken evre tümörlere yönelik gerçekleştirilen tedavi sürecinde farelerin ağırlık değişimleri. 144

- 4.46.** Nil kırmızısı enkapsüle nanopartiküllerin kolorektal tümörlü fareye oral gavaj yoluyla uygulama sonrası 24. saatte gastrointestinal dağılımının gastrointestinal kanal yapısı bozulmadan incelenmesi amacıyla *in vivo* görüntüleme sistemiyle elde edilen görüntü. 146
- 4.47.** Kolorektal tümörlü farelerde nil kırmızı çözeltisi ve nil kırmızısı enkapsüle nanopartiküllerin oral gavaj yoluyla uygulanması sonrası 24. saat sonunda farelerden çıkarılan gastrointestinal kanal dokularında *in vivo* görüntüleme sistemi ile edilen görüntü. 147
- 4.48.** Kolorektal tümörlü farelerde nil kırmızı çözeltisi ve nil kırmızısı enkapsüle nanopartiküllerin oral gavaj yoluyla uygulanması sonrası 24. saat sonunda farelerden çıkarılan gastrointestinal kanal segmentlerinde tespit edilen nil kırmızısı miktarına bağlı elde edilen absorbans değerleri. 148
- 4.49.** Kolorektal tümörlü farelerde nil kırmızı çözeltisi ve nil kırmızısı enkapsüle nanopartiküllerin oral gavaj yoluyla uygulanması sonrası 24. saat sonunda farelerden çıkarılan gastrointestinal kanalın farklı segmentlerinde tespit edilen ortalama floresans şiddeti (MFI) ilişkin grafik. 148
- 4.50.** Erken evre tümör modelinde tedavi uygulanan gruplara ait mikrograflar. CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül formülasyonu gruplarına ait karaciğer (A,B) ve kolona ait (C,D) mikrograflar. 150
- 4.51.** Erken evre tümör modelinde tedavi uygulanan gruplarda karaciğerdeki toplam odak alanı (μm^2). 150
- 4.52.** Geç evre tümör modelinde tedavi uygulanan gruplara ait mikrograflar. CPT süspansiyonu (A,E), CPT yüklü nanopartikül formülasyonu (B,F), boş nanopartikül (C,G), kontrol (D,H) gruplarına ait sırasıyla karaciğer ve kolona ait mikrograflar. 151
- 4.53.** Geç evre tümör modelinde tedavi uygulanan gruplarda karaciğerdeki toplam odak alanı (μm^2). 152

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Doğal siklodekstrinlerin fizikokimyasal özellikleri.	12
2.2. Siklodekstrinler ve kullanılabildikleri dozaj şekilleri.	15
3.1. Önformülasyon çalışmaları kapsamında değerlendirilen değişkenler.	59
3.2. Tez çalışması kapsamında elde edilen amfifilik siklodekstrin nanopartikül formülasyonları.	60
4.1. Kamptotesinin lakton ve karboksilat formuna ait HPLC analizi verileri.	95
4.2. Kamptotesinin lakton formu için doğruluk validasyonu verileri.	97
4.3. Kamptotesinin karboksilat formu için doğruluk verileri.	97
4.4. Kamptotesinin lakton formu için tekrar edilebilirlik verileri.	98
4.5. Kamptotesinin karboksilat formu için tekrar edilebilirlik verileri.	99
4.6. Kamptotesinin lakton formu için tekrar elde edilebilirlik verileri.	99
4.7. Kamptotesinin karboksilat formu için tekrar elde edilebilirlik verileri.	100
4.8. Kamptotesinin lakton formu için günler arası farklılık verileri.	100
4.9. Kamptotesinin karboksilat formu için günler arası farklılık verileri.	101
4.10. HPLC ile miktar tayini yönteminin, lakton ve karboksilat formlarına ait duyarlılık parametreleri sonuçları.	101
4.11. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın anyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi.	106
4.12. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın aseton olması durumunda polimer konsantrasyonunun anyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi.	106
4.13. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın etanol olması durumunda polimer konsantrasyonunun anyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi.	107
4.14. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, kaplama materyali olan kitosan polimeri konsantrasyonunun anyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi.	108
4.15. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, kaplama materyali olan polietilenimin polimeri konsantrasyonunun anyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi.	109
4.16. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın polikatyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi.	109

- 4.17.** Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın aseton olması durumunda polimer konsantrasyonunun polikationik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi. 110
- 4.18.** Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın etanol olması durumunda polimer konsantrasyonunun polikationik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi. 110
- 4.19.** Önformülasyon çalışmaları sonucunda tespit edilen optimum formülasyon parametrelerine ilişkin veriler. 112
- 4.20.** Optimum formülasyon parametrelerine göre hazırlanan boş ve kamptotesin yüklü nanopartiküllere ait karakterizasyon verileri. 112
- 4.21.** Amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerin kamptotesin enkapsülasyon etkinlikleri. 115
- 4.22.** Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen müsin varlığında ve yokluğunda zeta potansiyel değeri bulguları. 126

1. GİRİŞ

Günümüzde kronikleşerek toplum sağlığını tehdit etmekte olan hastalıkların başında gelen kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve yayılması olarak tanımlanabilir. Kanserler, maliyeti ve mortalite oranı halen en yüksek olmaya devam eden hastalıklardan biridir ve kemoterapideki gelişmelere rağmen, klinik ilaç tedavileri yetersiz kalabilmektedir. Kemoterapinin etki ve güvenilirliğinin kontrol edilmesinde halen bazı kısıtlamalar mevcuttur. En önemli güçlük, pekçok antikanser ilacın suda çözünürlüğünün düşük olmasıdır ve fizyolojik koşullardaki stabilite sorunudur. Antikanser ilaçlar, yardımcı çözücü ile birlikte formüle edilerek intravenöz olarak uygulanabilmektedir fakat kullanılan bu yardımcı çözücüler hastanın yaşam kalitesini ve tedavinin etkinliğini olumsuz yönde etkileyecek yan etkiler gösterebilmektedir. Bir diğer önemli nokta ise, antikanser ilaçların vücutta geniş oranda dağılımı ve böylece kanserli hücrelerin yanısıra sağlıklı hücreleri de öldürmesi yani seçici olmayan sitotoksitedir. Kemoterapötik moleküllerin terapötik indekslerinin dar olması ve kandaki ilaç konsantrasyonundaki ani yükselme ve düşmeler de kanser tedavisinin sınırlamalarından biridir. Kemoterapide intravenöz yol en sık tercih edilen uygulama yolu olsa da, ilacın sistemik olarak tüm vücuda dağılımı yan etki profili açısından önemli sorunlara yol açmaktadır. Tedavi sırasında kendi kendine uygulama mümkün olmadığı için hasta uyuncunun düşük olması, tedavi maliyetinin yüksek olması, yan etkilerin sıklığı ve kemoterapiye özgü tekrarlanan uygulama zorluğu, parenteral yola alternatif uygulama yolları üzerinde çalışma zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır. Nazal, pulmoner, bukkal, transdermal gibi alternatif uygulama yolları arasında oral yol, uygulama kolaylığı, sağlık ekonomisine olan yükün azaltılması ve hasta uyuncu açısından kronik tedavilerde en umut vaad eden yol olarak öne çıkmaktadır.

Kamptotesin (CPT); kolon, meme ve akciğer kanseri gibi geniş bir kanser spektrumunda hücre kültürü çalışmalarında etkinliği kanıtlanmış, oldukça güçlü antikanser bir etkin maddedir. Ancak, suda çözünürlük ve fizyolojik koşullarda pH'ya bağlı hidrolitik stabilite sorunu nedeniyle klinikte halen etkin olarak kullanılamamaktadır. Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS) kriterlerine göre,

CPT Sınıf IV olarak kategorize edilmiş olup düşük çözünürlük ve düşük permeabiliteye sahip bir ilaçtır. *In vitro* koşullarda antikanser etkinliğinin saptanmasına rağmen, fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklanan sorunlardan ve görülen yan etkilerden ötürü, bugüne kadar henüz yaygın olarak klinik kullanımına geçilememiştir. Bu durum, CPT'nin etkin kullanımı için çözünürlük ve stabilite sorununu çözmeye yönelik farklı bir formülasyon yaklaşımını gerektirmektedir.

Kolorektal kanserler, kolon veya rektumda başlayan kanserlerdir. Pekçok kolorektal kanser adenokarsinomadır. Kolorektal kanser kolon veya rektumun iç duvarında oluşan oluşum şeklinde yani polip olarak başlar. Bazı polipler zamanla kansere dönüşür. Günümüzde kolorektal kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar daha çok parenteral yol ile uygulanabilmekte, oral yol ile uygulanmaları noktasında ciddi biyoyararlanım ve ilaç stabilitesi sorunları meydana geldiğinden dolayı oral yol çok daha az olarak uygulanabilmektedir.

Çalışma kapsamında, kalın bağırsakta gelişen kolorektal tümörlerin tedavisi için model antikanser ilaç olarak "Kamptotesin" (CPT) taşıyan, kolona kadar yapısını koruyan ve kolon mikroflorası tarafından degrade edilen amfifilik siklodekstrin (CD) bazlı nanopartiküller hazırlanacaktır. Böylece oral uygulanabilen ve taşıdığı ilacı etki bölgesine ulaştırarak lokal tedavi sağlayan bir nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi planlanmaktadır. Kemoterapi uygulamasına bağlı olarak görülen bulantı, kusma gibi yan etkilerin giderilememesi, azalan yaşam kalitesi ve iş kaybına bağlı olarak artan harcamalarla sonuçlanmaktadır. Bu sebeple oral olarak uygulanabilen ancak lokal olarak etki gösteren, böylece içerdikleri ilacın sistemik yan etkilerini önleyen veya en aza indirebilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem geliştirilerek CPT'nin hem yan etkilerinin azaltılabilmesi hem de stabilitesinin artırılması amaçlanmıştır. Ayrıca nanopartiküllerin submikron boyutları sayesinde artmış permeabilite ve geçirgenlik etkisine bağlı olarak tümör dokusunda yüksek oranda lokalize olabilen nanopartiküle bağlı olarak bölgedeki ilaç konsantrasyonunda artış sağlanabilecektir.

Bu amaçla; non-iyonik özellikte olup sulu ortamda negatif yüklü olan 6-O-CAPRO- β -CD ve pozitif yüzey yüküne sahip Poly- β -CD-C6 gibi iki farklı amfifilik CD

türevi ile nanopartiküller hazırlanmıştır. Nihai oral nanopartiküler taşıyıcının pozitif yüklü olması planlandığından, sulu ortamda negatif yüklü olan (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikülü de pozitif yük kazandırmak için Kitosan (CS) veya Polietilenimin (PEI) polimerleri ile kaplanmıştır. Nanopartikül materyali olarak oligosakkarit yapıdaki amfifilik CD türevlerinden faydalanılması da hem sistemin biyouyumluluğunun artmasını, hem kolona hedeflemeyi kolaylaştırması, hem de farklı hidrofobik çekim bölgeleri ile CPT'nin ilaç taşıyıcı sisteme etkin konsantrasyonda yüklenebilmesini ve stabil olarak fizyolojik koşullarda etki yerine taşınmasını sağlayabilecektir.

Hazırlanan boş ve CPT yüklü nanopartiküllerin *in vitro* karakterizasyon çalışmaları, *in vitro* sitotoksitesite ve simüle biyolojik sıvılarda fiziksel stabilite çalışmaları ve intestinal permeabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ardından, kolona kadar intakt kalarak terapötik yükünü taşıyacağı öngörülen CD nanopartiküllerinin tedavideki etkinliği hayvan deneyleri ile incelenmiştir. Bu amaçla; farelerde kolon tümörü indüklenerek ve oluşan tümörler üzerinde, geliştirilen nanopartiküllerin oral yolla uygulanması sonucu antitümör etkinliği değerlendirilmiştir.

Tüm *in vitro* karakterizasyon, hücre kültürü ve *in vivo* bulgular birlikte değerlendirilerek, kolon tümörü tedavisi amacıyla geliştirilen "Kamptotesin" yüklü anyonik ve katyonik CD nanopartiküllerinin etkinliği ve güvenliliği karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma sonunda varılmak istenen nokta; genelde kanser tedavisinde çok sınırlı olarak ve adjuvan tedavi amaçlı uygulanabilen ve özelde de sindirim kanalı tümörlerinin tedavisinde uygulaması olmayan oral yoldan uygulanan katyonik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerle kemoterapötik tedavinin, hedeflenmiş bir nanotaşıyıcı sistem ile gerçekleştirilecek olmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve yayılması olarak tanımlanan ve Dünya üzerinde en yaygın görülen hastalıklardan biridir (1). Kanser; temelinde çeşitli hücrel mutasyonların varolduğu düşünülen ve bu mutasyonlar sonucunda hücrel onkogen işlevlerin aktivitesinin artması ve tümör baskılayıcı genlerinde aktivitesinin azalmasıyla sonuçlanan karmaşık bir süreçtir (2).

Hücrelerin kontrolsüzce çoğalması sonucu oluşan hücre topluluğuna tümör adı verilmektedir. Oluşan tümörler invazyon gösterme ve çevre dokulara dağılma (metastaz) eğiliminde olmaları durumunda "malign" "kötü huylu tümörler", oluşması sonrasında dokulara invazyon göstermemeleri ve oluştuğu bölgeden uzaklaştırılmaları durumunda da tekrar nüksetmemelerine göre "benign" "iyi huylu tümörler" olarak isimlendirilmektedirler. Malign tümörler kanseröz tümörlerdir ve etkin tedavilerinde mevcut kemoterapötik ilaçlar pekçok kısıtlayıcı sebepten dolayı halen yetersiz kalmaktadır (3, 4).

Kanser tedavisi amacıyla uygulanan üç temel strateji mevcuttur. Bunlar; cerrahi operasyon, radyoterapi ve kemoterapi uygulamalarıdır. Cerrahi operasyonların uygulama zorluğu, hasta uyuncunun düşük olması ve vücut bütünlüğünü bozabiliyor oluşu bu yaklaşımın başlıca sorunlarıdır. Radyoterapinin ise temelinde lokal etki prensibi yatmaktadır fakat pratikte kanserli hücre ve dokuların yakın bölgelerinde bulunan sağlıklı hücrelere de zarar verme riski taşıması bu yöntemin olumsuz yanısıdır. Kanser tedavisinde üçüncü yaklaşım olan kemoterapi ise hastaya sitotoksik etkili bir antikanser ajanın uygulanmasını temel almaktadır. Kemoterapide öncelikli temel amaç, kanser hücrelerinin çoğalmasını önleyerek tedavinin gerçekleştirilmesidir. Kanserin tamamen tedavi edilmesinin mümkün olmadığı durumlarda, kemoterapi ile tümörlü dokunun küçültülmesi veya büyümesinin engellenmesi, ileri evrede bulunan kanser vakalarında ise semptomların azaltılması ve hastanın yaşam kalitesini artırması amaçlanmaktadır (5, 6).

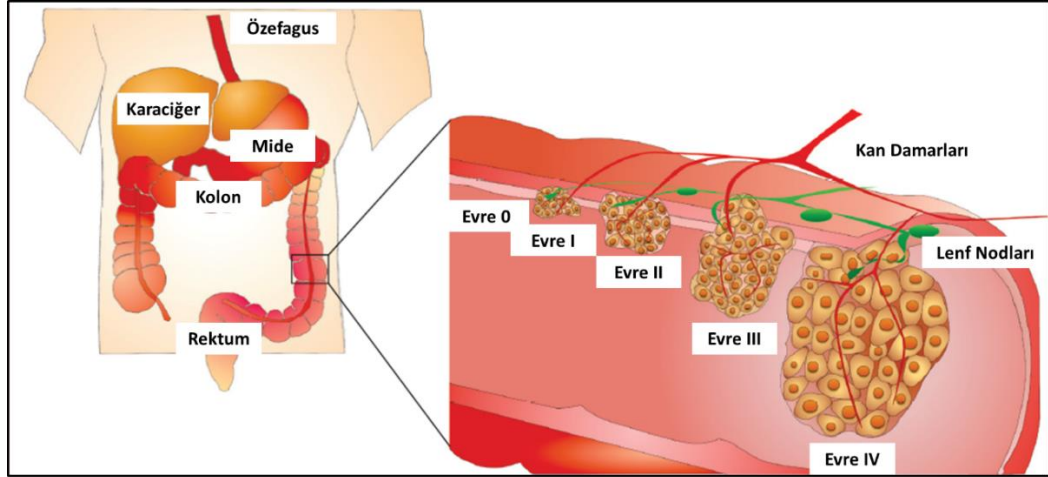
Kanserler, vücutta bulunan farklı hücre tiplerinin herhangi birinden kaynaklı olarak gerçekleşebilmesi sebebiyle, köken aldığı hücre tipine bağlı olarak oluşum yeri, oluşum süreci ve tedaviye verdikleri cevaplar bakımından farklılık gösterebilmektedir. Temelinde hücrel mutasyonlar gibi bozuklukların yattığı düşünülen ve bunun sonucunda da hücrenin başta proliferasyon olmak üzere normal hücrel mekanizmalarında anormallik oluşturan kanserin, oluşum aşamalarında çevresel faktörlerin de etkin olabileceği, ayrıca ortaya çıkan kanser patolojisinin sonuç itibarıyla tek bir hastalık olarak düşünülmekten ziyade, kontrolsüzce çoğalan hücrelerin vücutta başta tümör oluşumu olmak üzere sebep olduğu bir dizi anormallik ve hastalıktan oluşan karmaşık bir durum olarak değerlendirilmesi gerekmektedir (7, 8).

2.1.1. Kolorektal Kanserler ve Kolorektal Kanserinin Evreleri

Kolorektal kanserler; genellikle kolon epitelinin iç duvarında oluşan, anormal büyüme ve çoğalma gösteren kolorektal polipler olarak, kolon ve rektum mukozasında malign bir neoplazm olarak gelişir. Kolon iç epitelinde gelişen ve büyüyen polip kaynaklı tümörler daha sonra kas dokuları ve lenf düğümlerini istila ederek diğer organlara metastaz eğilimi göstermektedir. Tümör nüksü ve uzak metastaz eğilimleri kolorektal kanserli hastalarda sağkalımı etkileyen en önemli iki kritik faktördür (9-11).

Kolorektal kanserler dünya genelinde görülen en yaygın üçüncü malign tümör sınıfını oluşturmaktadır. Tanısal ve terapötik ilerlemelere rağmen halen yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkili olması sebebiyle yeni tanı ve tedavi arayışlarına yönelik çalışmalar sürdürülmektedir (12, 13).

Kanser hücrelerinin ilerleme evrelerini değerlendirerek, Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC; American Joint Committee on Cancer) kolorektal kanserleri beş aşamada sınıflandırmıştır (Şekil 2.1.) (14). Evre 0, cerrahi operasyon sonrası %100 tedavi edilmiş kabul edilmektedir. Evre I-IIC içinde standart tedavi prosedürü cerrahi operasyondur ve %37-74 aralığında 5 yıllık bir sağkalım öngörülmektedir. İleri evrelerde (IIIA-IV) tanı alan hastalarda ise cerrahi operasyon ve sonrasında adjuvan kemoterapi uygulanır ancak yüksek metastaz ve nüks ihtimali nedeniyle sağkalım oranları %6'ya düşmektedir (14, 15).



Şekil 2.1. Kolorektal kanserlerin evreleri.

Kolorektal kanserler tanımlandıkları evrelere ve ilgili evrelerin taşıdıkları özelliklere göre aşağıdaki şekilde gruplandırılmıştır (16);

Evre 0: Kolon iç mukoza epitelinde poliplerin oluştuğu, kolorektal kanserin çok erken bir evresidir. Kolonoskopi sırasında polipler tamamen polipektomi ile yok edilebilir ve kolorektal kanseröz oluşumu engellenebilir.

Evre 1: Bu evrede polipler bir tümör haline gelmeye ve kolon iç mukoza epitelinde yoğunlaşmaya başlamıştır. Bu aşamada da cerrahi operasyon ile kanserli hücrelerin oluşturduğu yapı uzaklaştırılabilmektedir. Bu evrede tanı konularak müdahale edilen hastalar için sağ kalım oranı %90'dan fazladır.

Evre 2: Bu evre kanserin kolon dışına yayılması ancak henüz lenf bezlerine metastaz yapmamış olması ile karakterizedir. Kanserın kas dokusuna, kolonun en dış tabakasına veya kolon ötesine yayılmış olmasına göre sırasıyla üç evrede tanımlanmıştır (IIA, IIB ve IIC). Cerrahi operasyon ile hastaların bu evrede %80 sağkalım oranları sağlanabileceği belirtilmektedir.

Evre 3: Kanser tanı konulduğu aşama itibariyle bütün kolon duvarına ve kolonu çevreleyen lenf nodlarına dağılmış durumdadır. Sağ kalım oranı %30-%60 aralığında belirtilmektedir. Evre 3 kolorektal kanserler, kolon duvarını iç, orta ve dış duvarını ve lenf nodlarını sarmış olmasına göre IIIA, IIIB ve IIIC olarak sınıflandırılmıştır. Bu aşamada tanı konan kanserlere, cerrahi operasyon ve kemoterapi uygulanmaktadır.

Evre 4: Kanserin hızla vücudun karaciğer, ovaryum, testisler gibi çevre doku ve organlara dağıldığı aşamadır. Sağ kalım oranı yalnızca %3 seviyelerindedir. Kanserli doku ve organlardan cerrahi operasyonla tümörlerin uzaklaştırıldığı, bununla beraber yoğun bir şekilde kemoterapi ve radyoterapinin uygulandığı kolorektal kanserlerin en ileri evresidir.

Kolorektal kanserlerin tedavisi için günümüzde halen en etkili ve en çok başvurulan strateji cerrahi ve kemoterapidir. Sistemik kemoterapiyle ilgili en önemli sınırlayıcı faktör, ilaçların vücutta seçici olmayan dağılımlarıdır. Tümörlü dokulara istenen konsantrasyonda ilacın ulaşabilmesi sağlıklı dokularında ciddi oranda ilaca maruziyeti ile sonuçlanmaktadır. Sistemik kemoterapinin vücutta seçici olmayan dağılımı ve buna bağlı ciddi yan etkiler de kemoterapinin düşük başarı oranının başlıca nedenleri arasındadır (17, 18).

2.1.2. Kolorektal Kanser Tedavisinde Mevcut Yaklaşımlar

Yukarıda belirtildiği gibi kolorektal kanserler çok erken evrelerde kemoterapötiklere ihtiyaç duyulmaksızın cerrahi operasyon ile tedavi edilme potansiyeline sahiptir. Ancak özellikle evre III ve evre IV'ün ve zaman zamanda evre II'nin son aşamalarında tanı alıp tedaviye başlanması durumunda kemoterapötikler büyük ölçüde kullanılmaktadır ve endikedir (19, 20).

Kolorektal kanserlerin kemoterapötiklerle tedavi edilmesi yaklaşımında uzun yıllar boyunca kullanılan tek sitotoksik ilaç, bir timin analogu olarak DNA replikasyonunu inhibe eden 5-FU idi (5-florourasil). Gastrointestinal emiliminin düşük ve değişken olması nedeniyle 5-FU intravenöz (i.v.) olarak uygulanmaktadır (21, 22). İntravenöz uygulamanın hasta uyuncu üzerindeki olumsuz etkileri ve sağlık ekonomisine olan maliyeti sebebiyle, 5-FU'in oral olarak uygulanabilecek ön ilaç formülasyonları geliştirilmiştir (23). 2000'li yılların başından itibaren kolorektal kanserlerin tedavisi amacıyla başka sitotoksik ajanlarda kullanıma girmiştir. Örneğin, CPT'nin yarı sentetik bir analogu olan irinotekan, topoizomeraz I inhibitörü olarak hücre replikasyonu sırasında DNA'nın çözülmesini engelleyerek antikanser aktivite göstermekteyken, oksaliptatin ise DNA ile çapraz bağ oluşturarak hücre transkripsiyon

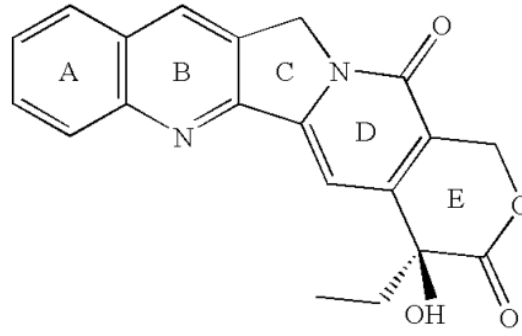
ve replikasyonunu engeleyerek antikanser aktivite göstermektedir (24, 25). Söz konusu sitotoksik ajanlar, çeşitli türevleri ve/veya tuzları halinde çözünürlük sorunu aşıl原因 parenteral uygulanabiliyor olmasının yanında gerek kullanım kolaylığı, hasta uyuncu ve tedavi maliyetleri açısından gerekse etkinlik ve seçici olmayan sitotoksositeye bağlı istenmeyen yan etkilerden dolayı halen etkinlik ve güvenlik açısından optimum bir tedavi sağlamaları konusunda sorunlar taşımaktadırlar (13, 26, 27).

2.2. Kamptotesin

Kamptotesin (CPT), topoizomeraz I inhibitörü aktivitesi olan antineoplastik bir ajandır. Topoizomerazlar DNA replikasyonu, transkripsiyonu gibi DNA'nın hayati fonksiyonlarında görev alan enzimlerdir (28). 20(S)-Kamptotesin (CPT), "kanser ağacı" veya "hayat ağacı" olarak da bilinen *Camptotheca acuminata* bitkisinden ilk olarak 1966 yılında izole edilmiştir. CPT ile 1970'lerde başlayan ilk klinik çalışmalar ise doğal CPT ile değil, suda çözünür tuz formu ile gerçekleştirilmiştir. Doğal olarak yapısında bulunan pentasiklik alkaloidinden dolayı CPT, metastatik kolon kanserleri, küçük hücreli akciğer kanserleri, yumurtalık kanserleri, meme kanserleri gibi geniş bir kanser spektrumunda güçlü antikanser aktivite gösterebilmektedir (29-32).

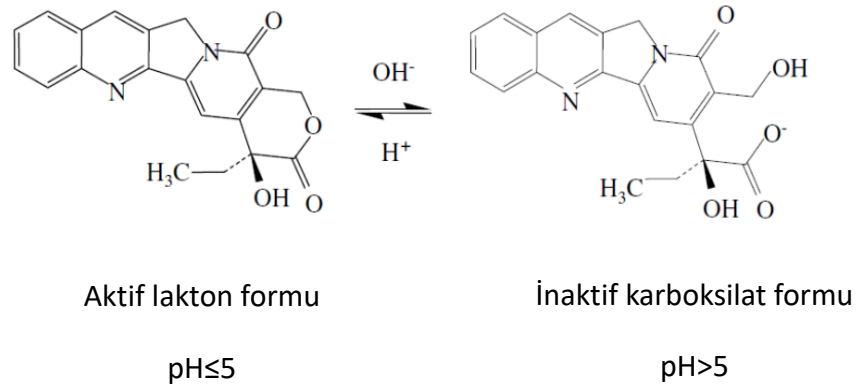
2.2.1. Kamptotesinin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri

Kamptotesin ($C_{20}H_{16}N_2O_4$), molekül ağırlığı 348.35 g/mol olan IUPAC isimlendirmesi ise 4-etil-4-hidroksi-1H-piranol[3',4':6,7] indolizin[1,2-b] kinolin-3,14-(4H,12H)-dion olan bir moleküldür (Şekil 2.2.). Suda çözünmez, DMSO ve kloroform:metanol (4:1, h/h) karışımında çözünür (33, 34).



Şekil 2.2. Kamptotesinin kimyasal yapısı.

CPT, lakton ve karboksilat olmak üzere iki farklı forma sahiptir (Şekil 2.3.). Aktif lakton formundaki halkanın (E) açılarak karboksilat formuna geçişi söz konusudur. Formlar arası dönüşüm pH bağımlı ve geri dönüşümlüdür. CPT, pH 5'in altında aktif lakton formunda iken, alkali veya fizyolojik pH'da hızla karboksilat formuna geçmektedir ve bu geçiş azalan klinik aktivite ve artan toksisite ile sonuçlanmaktadır. CPT yapısında bulunan ve karboksilat formuna geçiş yapmamış olan lakton formu antikanser aktiviteden birincil olarak sorumlu olan fonksiyonel kısımdır, çünkü yalnızca lakton formundaki CPT hücrel membranlardan geçebilmektedir. Karboksilat formu suda çözünürlük bakımından aktif lakton formuna göre üstünlük gösterse de, lakton formu antikanser aktivite bakımından yaklaşık 10 kat daha etkilidir. Söz konusu durumdan dolayı, CPT fizyolojik ortamda ciddi stabilite ve aktivite sorunu göstermekte, ayrıca oral uygulamada düşük permeabilite, P-glikoprotein efluks pompa sistemi etkisi ve suda çözünürlük problemlerine bağlı olarak düşük biyoyararlanım göstermektedir (31, 35-37).



Şekil 2.3. Kamptotesinin aktif lakton ve inaktif karboksilat formu.

2.2.2. Kamptotesinin Formülasyon Yaklaşımları

Günümüzde CPT içeren farmasötik ürün olmamakla birlikte suda çözünür ve FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onayı almış sentetik analogları piyasada mevcuttur; Topotekan (Hycamtin®) ve İrinotekan (Camptosar®) ticari olarak intravenöz uygulanmak üzere hazırlanmış sulu çözelti formlarıdır (38, 39). CPT ve CPT analogları moleküller için temel formülasyon yaklaşımları lakton halkasının stabilitesinin sağlanması ve tümör bölgesine spesifik olarak kontrollü salım sağlayabilmesi üzerine yoğunlaşmaktadır. CPT analogları geliştirilmesine yönelik çalışmalarla ilgili olarak ise aktivitenin artırılması ve toksisitenin azaltılması halen en büyük soru işaretini teşkil etmektedir. Klinik olarak denenilen mevcut CPT analoglarından henüz hiçbiri CPT'nin mevcut potensini aşabilmiş değildir. Ayrıca bu çalışmalar zaman ve maliyet açısından ciddi kayıplara da yol açmaktadır. Bu bağlamda, CPT, klinik olarak kullanılabilmesinin önündeki bariyerlerin aşılabilmesi durumunda halen analoglarına göre daha umut verici bir pozisyondadır. Farmasötik alanda, nanopartiküler formülasyonlardan, çözünürlüğü artırabilmesi, yan etkileri azaltabilmesi, uzatılmış farmakolojik etki sağlayabilmesi ve biyoyararlanımı artırabilmesi imkanından dolayı formülasyon geliştirme yaklaşımlarında faydalanılabilmektedir (36, 40). Ayrıca enkapsüle sistemler ile fizyolojik ortamda CPT'nin aktif lakton formunun inaktif karboksilat formuna hızla dönüşü

engellenebilmektedir. Literatürde, CPT için alternatif formülasyon yaklaşımları geliştirebilmek noktasında, polimerik nanopartiküler sistemler, mikropartiküler sistemler, lipozom, mikroemülsiyon gibi formülasyonlarına ilişkin pek çok çalışma görülmektedir (40-51).

2.3. Siklodekstrin

Siklodekstrinler (CD), nişastanın glukoziltransferaz enzimi ile enzimatik degradasyonu ile elde edilen siklik oligosakkarit yapıda doğal polimerlerdir (52). İlk olarak, 1891 yılında Antoine Villiers tarafından keşfedilen CD'ler o günden sonra birçok bilim insanı tarafından araştırılmaya başlanmıştır. Bu çalışmaların sonunda ilk siklodekstrin ilişkili patent 1953 yılında Freudenberg, Cramer ve Plieninger tarafından alınmıştır (53). Biyouyumlu, doğal makromoleküller olmaları ve doğal kaynaklı olması nedeniyle keşfinden itibaren farmasötik alan başta olmak üzere tarım, gıda, kozmetik, tekstil gibi alanlarda yaygın şekilde kullanılmaya ve araştırılmaya başlanmıştır (54, 55). Makrosiklik yapıda doğal oligosakkaritler olan CD'ler, α -1,4 bağlı glikopiranoz ünitelerinden oluşmaktadır ve sahip oldukları glikopiranoz ünitelerinin sayısına göre isimlendirilmektedirler. Farmasötik alanda en sık kullanılan CD'ler; α -CD (6 glikopiranoz birimi), β -CD (7 glikopiranoz birimi) ve γ -CD(8 glikopiranoz birimi)'dir (Şekil 2.4.) (56). CD türevlerinin sahip olduğu fizikokimyasal özellikleri taşıdıkları glikopiranoz birimi sayısına göre de farklılık göstermektedir (57). Üç boyutlu morfolojileri koniye benzer olarak nitelendirilen CD'lerin iç kavitelerinin hidrofobik olup dış kavitelerinin ise hidrofilik olması farmasötik alandaki üstünlüklerinin temelini oluşturmaktadır; suda çözünürlük sorunu gösteren ilaçlar CD'lerin hidrofobik iç kavitelerince hapsedilerek suda çözünür kompleksler elde edilebilmektedir. Doğal CD türevlerinin fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.1.'de sunulmuştur (58).

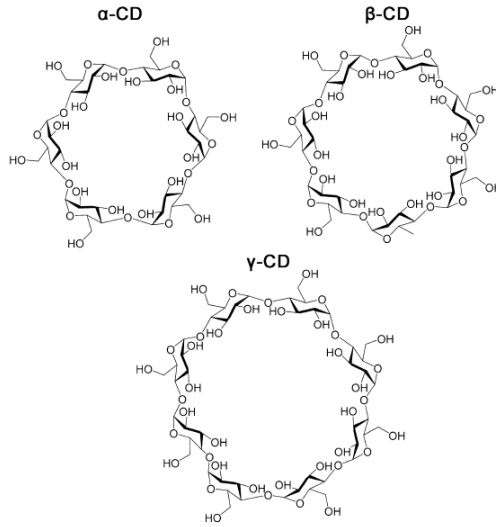
Tablo 2.1. Doğal siklodekstrinlerin fizikokimyasal özellikleri (58).

Karakteristik Özellik	Siklodekstrin (CD)		
	α -CD	β -CD	γ -CD
Glukopiranoz ünite sayısı	6	7	8
Molekül ağırlığı (g/mol)	972	1135	1297
Sudaki çözünürlük, 25°C (% a/a)	145	18,3	233
İç çap (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Dış çap (Å)	14,6	15,4	17,5
Kavite hacmi (Å ³)	174	262	427

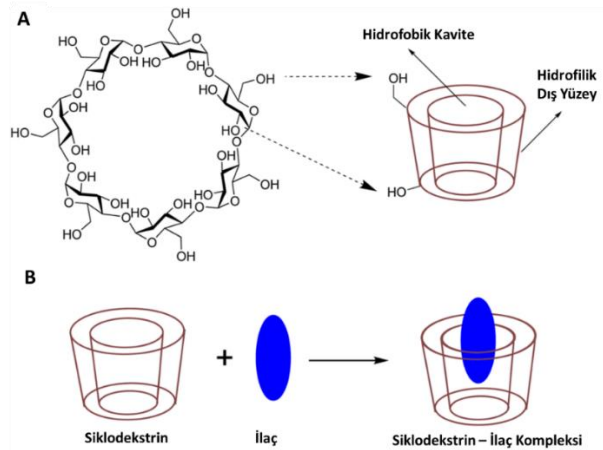
Farmasötik alanda, ilaç-siklodekstrin kompleksleriyle;

- İlaçların sudaki çözünürlüğünün iyileştirilmesi,
- Biyoyararlanımlarının artırılması,
- İlacın fiziksel ve/veya kimyasal stabilitesinin artırılması,
- Gastrointestinal veya oküler uygulamalarda görülmesi muhtemel iritasyonun azaltılması,
- İlaça bağlı kötü tad ve kokunun maskelenmesi,
- İlaç-ilaç ve/veya ilaç-eksipiyan etkileşimlerinin önlenmesi sağlanabilmektedir (59, 60).

Böylece oluşan ilaç-siklodekstrin inklüzyon kompleksleriyle, ilaçlar fizyolojik ortamda enzim etkisinden korunabilmekte ve ilaçların enzimatik degradasyondan korunmuş, stabil ve çözünürlüğü artmış olarak daha yüksek biyoyararlanım gösteren formülasyonları elde edilebilmektedir (Şekil 2.5.) (56, 61, 62).



Şekil 2.4. α , β ve γ Siklodekstrinlerin kimyasal yapıları



Şekil 2.5. Doğal siklodekstrinlerin yapısı ve ilaçlarla kompleks oluşturmaları; A) Doğal siklodekstrinlerin hidrofobik iç kavite ve hidrofilik dış yüzeylerinin şematize edilmesi, B) Doğal siklodekstrinlerin, hidrofobik yapıdaki ilaçları iç kavitelerine hapsederek kompleks oluşturma yapıları (56).

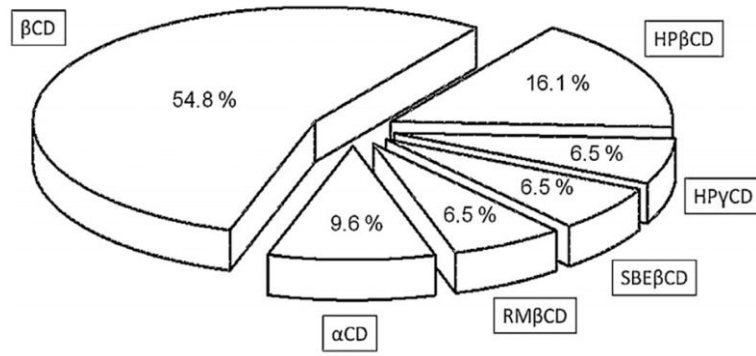
Doğal CD'lerin bahsedilen avantajlarına rağmen, suda nispeten düşük çözünürlükleri ve fizyolojik ortamlarda biyolojik membranlarla zayıf etkileşimleri farmasötik formülasyonlarda kullanımları açısından sınırlayıcı bir faktördür. Özellikle α - ve β -siklodekstrinlerin neden olduğu hemoliz ve nefrotoksisite parenteral uygulamalar açısından bir güvenlik sorunu teşkil etmektedir. Bu nedenlerden dolayı; sudaki çözünürlüğü (Özellikle β -CD) ve biyolojik membranlarla etkileşimi artırmak, intravenöz uygulamalarda karşılaşılan hemolizi ve nefrotoksisiteyi azaltmak, CD ve konuk molekül arasındaki etkileşimi artırmak, CD'nin enkapsülasyon kapasitesini artırmak, ilaç salım profillerini değiştirmek veya CD'lere ara yüzeylerde kendi kendine organizasyon özelliği (self-organization) kazandırarak kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler elde etmek amaçlarıyla farklı CD türevleri sentezlenmiştir (63, 64). Farmasötik alanda en yaygın olarak kullanıma girmiş olan CD türevleri; metillenmiş, hidrosillenmiş ve sülfobütillenmiş CD türevleridir. Her bir türevin kendi içinde birbirine göre çözünürlük, nefrotoksik etki ve hemolizi azaltması ve ilaç stabilitesine katkısı bakımından üstünlükleri mevcuttur. Hedeflenen farmasötik amaç doğrultusunda farklı CD türevleri kullanılabilir (57, 65). Ayrıca, her üç türev içinde (metil, sülfobütileter, hidroksipropil) elde edilen β -CD türevleri FDA tarafından GRAS (Genellikle Güvenilir Kabul Edilen) sınıfında kabul edilmektedir (66). Yüzlerce modifiye edilmiş CD türevi hazırlanmış ve uygulamaları gösterilmiş olsa da, farmasötik alanda hidroksipropil, metil ve sülfobütül eter gruplarını içeren türevler farmasötik eksipyan olarak ticari alanda daha sık kabul görmüştür (67).

İlaç pazarında kullanılan doğal ve modifiye CD'lerin kullanım yoğunlukları Şekil 2.6.'da sunulmuştur. Avrupa İlaç Ajansı (EMA)'da CD'lerle ilgili yayınladığı kılavuzlarda CD'lerin oral, parenteral, nazal, rektal, dermal ve oküler kullanımlarına ilişkin açıklamalar yapmıştır. EMA kılavuzlarında, siklodekstrinler; ilaçların suda çözünürlüklerini ve biyoyararlanımlarını artırmak amacıyla kullanılan siklik oligosakkaritler olarak tanımlanmıştır. Farklı CD türevleri ile hazırlanmış farklı formlarda müstahzarlar mevcuttur. Örnek olarak; setirizin tablet ve sisaprid tabletlerde β -CD, minoksidil çözeltisinde γ -CD, intravenöz vorikonazol preparatlarında SBE- β -CD, itrakonazol oral ve intravenöz preparatlarında HP- β -CD ve 17 β -östradiol

nazal sprey formülasyonunda RM- β -CD'den faydalanılarak hazırlanmış piyasa preparatları mevcuttur. EMA tarafından yayınlanan, CD türevleri ve kullanılabilirlikleri dozaj şekilleri Tablo 2.2.'de sunulmuştur (68, 69).

Tablo 2.2. Siklodekstrinler ve kullanılabilirlikleri dozaj şekilleri (68).

	α -CD	β -CD	γ -CD	HP- β -CD	SBE- β -CD	RM- β -CD
Oral		X	X	X	X	
Nazal						X
Rektal		X		X		
Dermal		X	X	X		
Oküler		X		X		X
Parenteral	X			X	X	



Şekil 2.6. Piyasada bulunan ürünlerde ekspiyen olarak kullanılan siklodekstrin türevleri ve dağılımları (67).

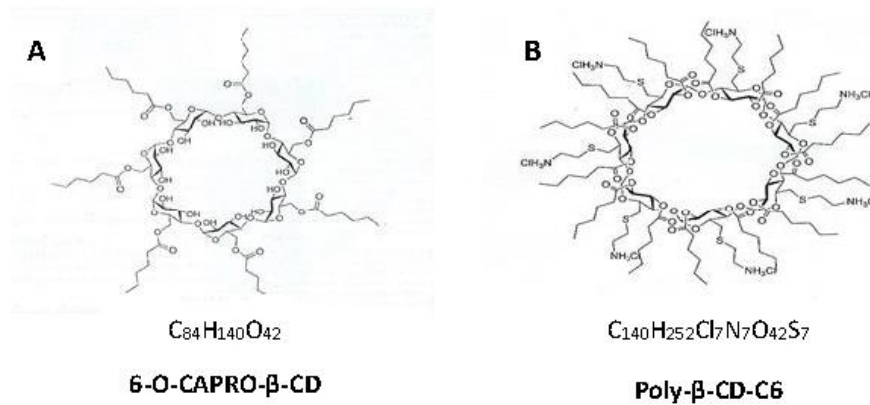
2.3.1. Amfifilik Siklodekstrinler

Amfifilik siklodekstrinler, doğal CD'lerin farmasötik alandaki kısıtlamalarının aşılabilmesi amacıyla tıpkı diğer CD türevleri gibi sentezlenen siklodekstrinlerdir (Şekil 2.7.). Amfifilik CD'ler, doğal CD'lerin primer ve/veya sekonder yüzeylerine farklı uzunluk ve/veya yapılarıdaki lineer veya dallanmış alifatik zincirlerin bağlanması sonucu elde edilir ve modifikasyonu sağlayan zincirin özellikleri ve bağlanma noktaları gibi farklılıklar sonucu değişik özelliklerde türevler elde edilebilir (70, 71).

Amfifilik CD'lerin doğal CD'lere göre üstünlükleri ve başlıca sentezlenme sebepleri özetle şu şekilde açıklanabilir (72);

- Hidrofobik molekülleri yükleme kapasitelerinin artırılabilmesi
- Fizyolojik ortamda biyolojik membranlarla etkileşimlerinin artırılabilmesi
- En önemli özellik ve farklılıkları ise sulu ortamda herhangi bir yardımcı çözücü ve/veya yüzey etkin maddeye gerek duymaksızın kendiliğinden organize olarak nanoboyutlu taşıyıcılar oluşturabilmeleridir.

Çalışmamız kapsamında iki farklı amfifilik CD türeği ile nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler hazırlanmıştır. Bunlar; non-iyonik ve sulu çözeltileri negatif yüzey yüküne sahip olan 6-O-CAPRO- β -CD ve polikasyonik özellikteki Poly- β -CD-C6 siklodekstrinleridir. Ayrıca, negatif yüzey yüküne sahip olan 6-O-CAPRO- β -CD nanopartiküllerine pozitif yüzey yükü kazandırmak amacıyla nanopartiküller, pozitif yüklü birer polimer olan Polietilenimin (PEI) ve Kitosan (CS) polimerleri ile kaplanmıştır.



Şekil 2.7. Amfifilik Siklodekstrinler; A) 6-O-CAPRO- β -CD Kimyasal Yapısı ve Formülü (Molekül ağırlığı: 1813 g/mol, suda zeta potansiyeli -20 mV), B) Poly- β -CD-C6 Kimyasal Yapısı ve Formülü (Molekül ağırlığı: 3178,15 g/mol, suda zeta potansiyeli +60 mV)

2.4. Oral Yoldan İlaç Uygulaması

Özellikle uygulama şeklinin kolaylığı sebebiyle oral yol en çok tercih edilen ilaç uygulama yoludur. Kullanım kolaylığı sağlaması ve bununla birlikte artan hasta uyuncu ile uzun süre ilaç kullanması gereken kronik hasta grubu tarafından sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca oral yolla uygulanan preparatların steril üretim gerektirmemesi üretim maliyetlerinin düşürülebilmesi açısından da fayda sağlamaktadır (73, 74).

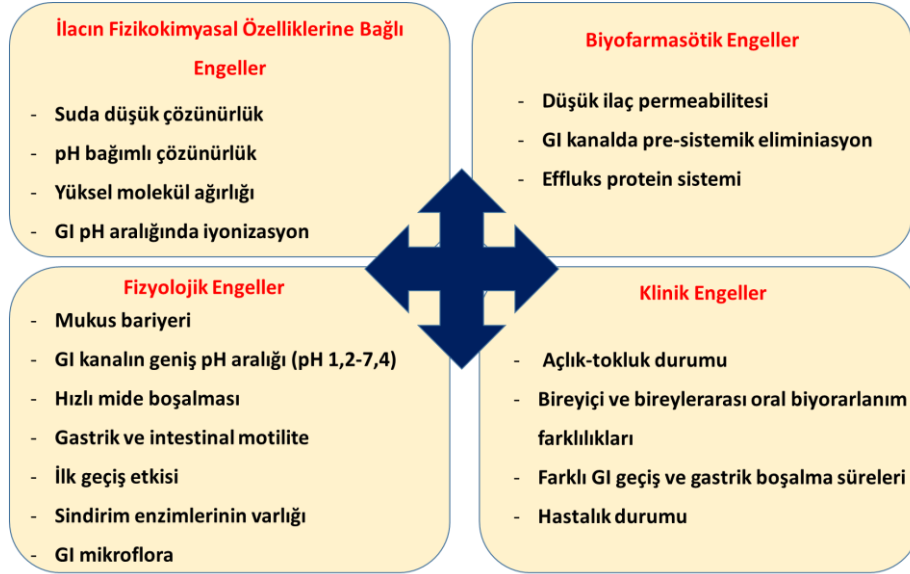
Hasta açısından parenteral uygulamalara nazaran acısız ve kendi kendine uygulanabilir olması ve her bir dozlama için sağlık kuruluşuna gitmesine gerek olmaması daha az stresli ve daha düşük maliyetli bir tedavi süreci sunmaktadır. Sonuç olarak, hasta uyuncunun uzun süreli olarak artırılabilmesi, daha esnek ve programlanabilir bir dozaj rejimi sunması, tedavi maliyetlerinin azaltılması, hastane kaynaklı enfeksiyon risklerinin azaltılması ve sistemik toksisite riskinin daha düşük olması oral yolla ilaç uygulamasının üstünlüklerini oluşturmaktadır (75, 76).

Günümüzde ilaç pazarının büyük kısmını oluşturan oral yoldan uygulanan ilaçlar, özellikle hasta tarafından pratikte sağladığı faydalara paralel olarak artan talep doğrultusunda hızla büyümektedir. Söz konusu taleple orantılı olarak da oral yolla ilaç uygulamasına yönelik bilimsel çalışmalar artarak devam etmektedir.

Günümüz bilgi birikiminde birçok hastalıkla ilgili patofizyoloji büyük ölçüde aydınlatılmış, buna bağlı olarak da yeni tedavi şekilleri ortaya çıkmıştır. İnjesiyon yoluyla ilaç uygulama, tedavi rejimi sırasında hasta uyuncu, yan etkilerin şiddeti ve sıklığı ve uygulama zorluğu nedeniyle tedavinin etkisini azaltmaktadır. Bu nedenle, parenteral uygulamaya alternatif olarak, transdermal, nazal, bukkal, pulmoner veya oral uygulama şekilleri üzerinde çalışılmaktadır. Bütün bu alternatifler arasında oral uygulama; uygulama kolaylığı ve hasta uyuncu açısından, kronik hastalıklarda kullanılabilir en avantajlı yol olarak öne çıkmaktadır (77).

Oral yoldan uygulanan ilaçlar, gastrointestinal kanal (GİK) hastalıklarını lokal olarak tedavi etmek veya kan dolaşımına geçerek sistemik etki elde etmek üzere tasarlanabilmektedir.

Oral yolla ilaç uygulaması ile sağlanan avantajların yanında, farmasötik açıdan değerlendirildiğinde aşılması gereken bazı engeller de mevcuttur. Bu engeller; GİK'in karmaşık fizyolojik yapısından kaynaklanan veya biyokimyasal engeller olabilirken, oral yolla uygulanması hedeflenen etkin maddenin kendi fizikokimyasal özellikleri de ilaç biyoyararlanımında kısıtlamalara neden olabilmektedir (77, 78). Oral yoldan ilaç uygulamasında karşımıza çıkan engeller Şekil 2.8.'de özetlenmiş ve ileriki bölümlerde açıklanmıştır (79-83).



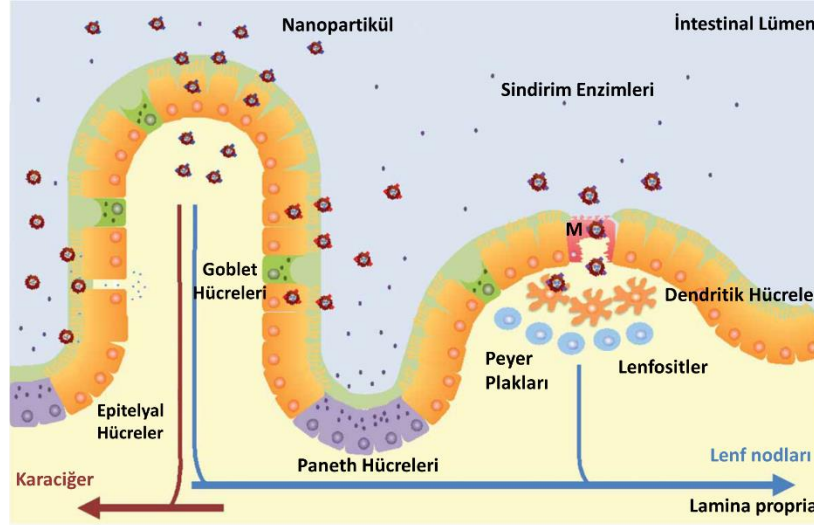
Şekil 2.8. Oral yoldan ilaç uygulaması sonrası karşılaşılan çoklu bariyer.

2.4.1. Gastrointestinal Kanal Fizyolojisi ve İlişkili Engeller

Oral uygulamadan sonra, kan dolaşımına geçerek sistemik etkinin beklendiği tedavilerde, ilaç GİK lümenini geçip plazmaya ulaşabilmeli ve absorbe olmalıdır. Absorpsiyonun gerçekleştiği primer bölge ince bağırsaktır. İnce bağırsakta absorpsiyon, villi ve mikrovilliler üzerinden gerçekleşmektedir. Villi epiteli, materyallerin intestinal lümeden lamina propria'ya geçişini düzenleyen polarize hücre tabakasından oluşmaktadır. Epitelyal hücreler ise ekstrasellüler matriksin bazal lamina denilen en üst kısmında gömülü haldedirler ve epiteli lamina propriadan ayırmaktadırlar (84). Her bir villi içerisindeki lamina propria, epitelyal bariyerden geçen moleküllerin absorplanması için kapiller ağ içermektedir. Kapillerler venüllerle birleşmekte, venüllerden de portal ven aracılığıyla absorbe olan maddeler karaciğere ulaşmaktadır.

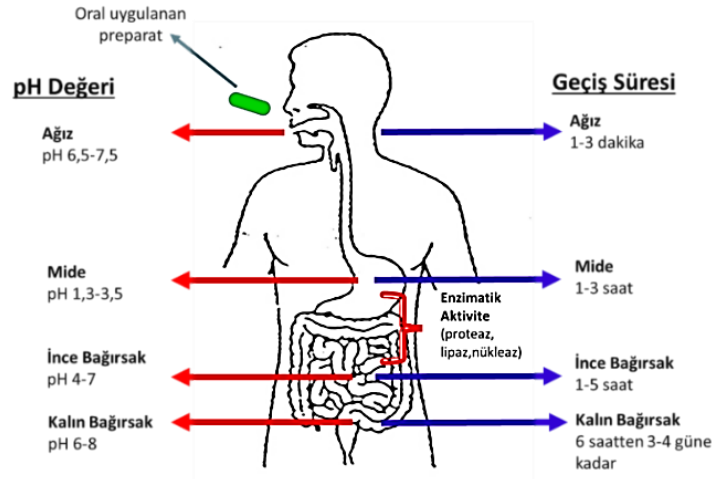
İntestinal epitel, farklı hücre tipleri içermektedir. Bunlar; absorpsiyon yapan epitelyal hücreler (enterositler), müsin salgılayan goblet hücreleri, endokrin hücreler, lizozim ve antimikrobiyal ajan salgılayan Paneth Hücreleridir. Enterositler lümeneye sindirim enzimleri salgılamakta ve ayrıca saç benzeri mikrovilli denen yapılarıyla absorpsiyon alanını 300-400 m²'ye kadar artırmaktadır (85). Bir başka hücre tipi M hücreleridir ve intestinal epiteldeki rolleri antijenlerin, dejeneratif olmayan yolak ile

dendritik hücelere transportunu sağlamaktır. Oral ilaç taşıyıcı sistemler tasarlanırken karşılaşılan engeller çoğunlukla GİK'in kendi fizyolojisi tarafından oluşturulmaktadır (Şekil 2.9.).



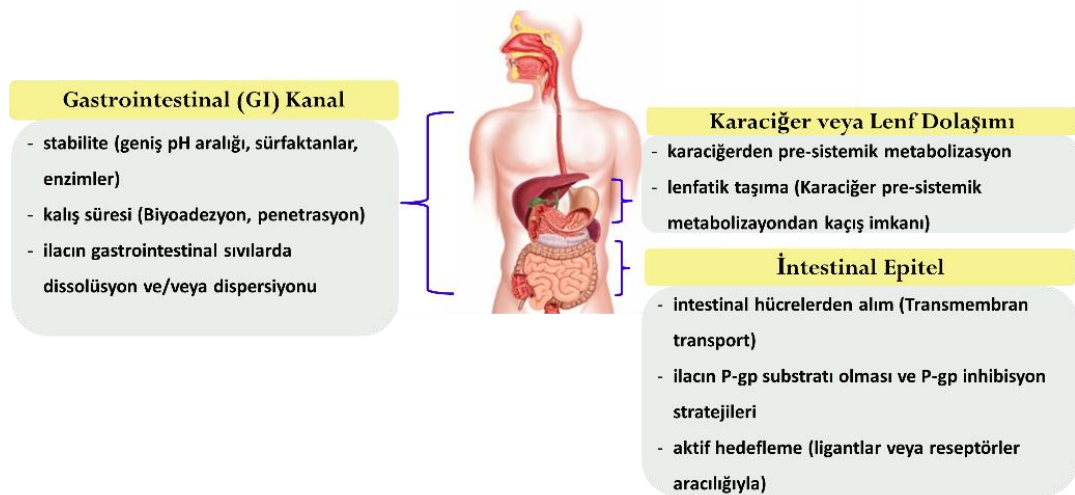
Şekil 2.9. İntestinal lümen fizyolojik yapısı ve intestinal hüceler (77).

GİK'in geniş pH aralığı, enzimatik degradasyon, intestinal epitelden permeabilitenin düşük olması gibi zorlayıcı koşullar nedeniyle oral uygulanan ilaç taşıyıcı sistemlerin etki yerine fizikokimyasal stabilitelerini ve yapılarını koruyarak ulaşabilmesi güçleşmektedir. GİK'in pH'sı farklı bölgelerinde 1 ile 8 arasında değişebilmektedir (86). Bu pH'lara maruz kalındığında, pH indüklü oksidasyon, protein yapıda ilaçların deamidasyonu veya hidrolizi gerçekleşebilmektedir (87). Enzimatik degradasyon, biyolojik moleküllerin absorpsiyondan önce sindirilmeleri için salgılanan proteazlar ve nükleazlar tarafından gerçekleştirilir. Eğer pH ve enzimatik aktivite kaynaklı engeller aşılabılırsa, ilaç taşıyıcı sistem bağırsaktaki epitelyal bariyere ulaşabilmektedir. Oral yolla uygulanan bir preparatın gastrointestinal kanalda karşılaçağı pH aralığı ve geçiş süreleri Şekil 2.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Oral yolla uygulanan bir ilacın gastrointestinal kanalda karşılaacağı pH aralığı ve geçiş süreleri

Epitelyal bariyer ise, dış ve iç bariyerler olmak üzere iki kısımdır. Dış bariyer, epitelyal hücreleri çevreleyen mukus tabakasıdır. Mukus tabakası; protein, karbonhidrat, lipid, tuz, antikor, bakteri ve hücre artıklarından oluşmaktadır. Kalınlığı bölgelere göre değişen yer yer gevşek ve yer yer sıkı olarak bağlanmış tabakalardan oluşur. Mukus tabakası epitel yüzeyini patojen ve yabancı partiküllere karşı korumaktadır (88). İç bariyer ise epitel hücre tek tabakalarından oluşur. Ayrıca epitel hücreler P-gp adı verilen "efflux" pompaları içermektedir. Bu da P-gp substratı olan düşük molekül ağırlıklı ilaçların oral biyoyararlanımını azaltmaktadır. Sağlıklı intestinal bariyer, salgılanmış mukus tabakası, epitelyal hücreler ve onun altında epitelyal olmayan mukozal hücre tabakasından oluşmaktadır. Mukus kalınlığı 50-800 μm olup, mikroorganizma, toksin ve virüslerin adezyon ve invazyonuna karşı fiziksel ve kimyasal bariyer oluşturur. Mukus yapısı son derece komplekstir ve halen tam olarak aydınlatılmamıştır. Mukozal akış hızı dakikada 5 mm'dir. Epitelyal hücreler intestinal bariyerin yapısal engelidir, dış çevre ve bağırsakla ilişkili lenfoid doku (GALT) arasında kontrol merkezi olarak düşünülebilir. Daha altta bulunan mukozal hücreler (Goblet hücreleri, Paneth hücreleri), bazı komponentler üreterek epitelyal hücre fonksiyonunu etkilemektedirler (77). Oral yolla uygulanan bir ilacın gastrointestinal kanalda (GİK) geçireceği süreç Şekil 2.11.'de özetlenmiştir.



Şekil 2.11. Oral yolla uygulanan bir preparatın gastrointestinal kanalda karşılaşıcağı süreç.

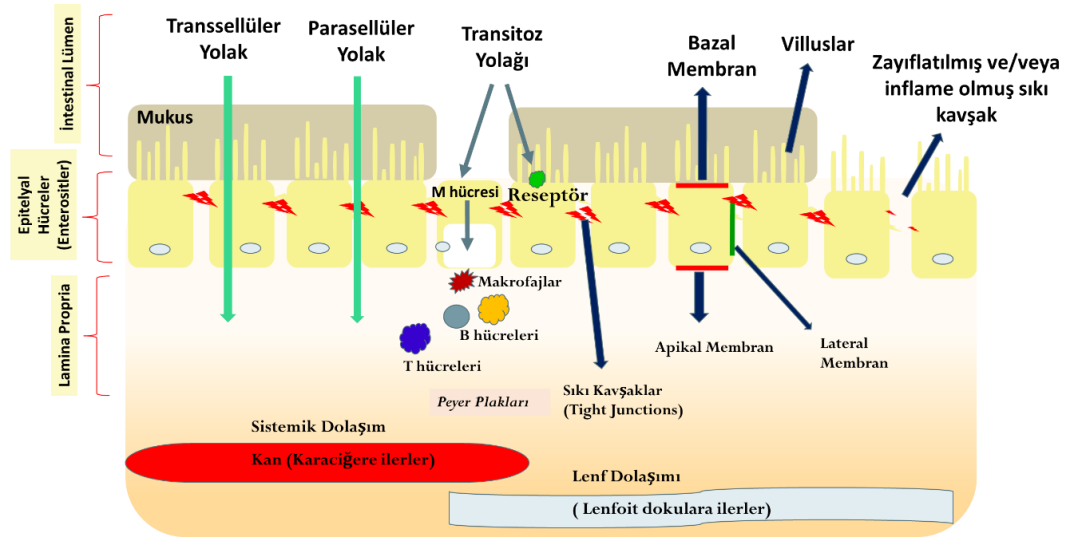
2.4.2. İntestinal Absorpsiyon

Gastrointestinal kanalı geçmeyi başaran ve intestinal lümene ulaşan ilaç için bir sonraki aşama sistemik kan dolaşımına geçişi sağlayacak olan intestinal bariyerleri geçebilmesidir. Oral ilaç uygulamasında epitelyal bariyerlerin aşılmasında fizyolojik olarak tanımlanmış; transselüler, paraselüler ve transitöz yolağı mevcuttur (85).

Transselüler yol intestinal hücrelerin apikal ve bazolateral hücre zarlarından ve sitoplazmalarından geçişini ifade eder. Bu yolak, intestinal bariyerin lipid çift katlı membranından dolayı hidrofilik maddelerin pasif geçişine karşı çok kısıtlayıcıdır ve büyük moleküller için ise geçirgen değildir. Transselüler yolak hidrofobik moleküller için pasif difüzyon esasına göre gerçekleşebilirken ayrıca bazı spesifik moleküller için ise moleküle özgü hücre zarı pompa sistemi ile gerçekleşebilir. Bir diğer yol olan paraselüler yol ise, küçük moleküllerin epitel hücreleri arasındaki “tight junction” olarak ifade edilen sıkı kavşaklardan, moleküllerin büyüklüklerinin ve yüzey yüklerinin bir fonksiyonu olarak pasif difüzyonunu ifade eder (89-93) (Şekil 2.12.).

Transitöz yolağı, bir moleküle özgü reseptörlere dayanan ve molekülü hücre boyunca herhangi bir bozunmaya uğramadan taşıyan aktif bir yolaktır. Büyük hidrodinamik boyutlarından dolayı biyolojik maddeler gibi makromoleküller veya

nanopartiküllerin intestinal taşınmasında bu yolak ayrıca önemlidir. İntestinal lümenin yapısı ve transepitelyal taşınma mekanizmaları Şekil 2.12’de özetlenmiştir.



Şekil 2.12. İntestinal lümen yapısı ve transepitelyal taşınma mekanizmaları

2.5. Nanoteknoloji ve Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknoloji, günümüzde birçok bilimsel disiplin tarafından özellikle kendi alanlarıyla ilgili olarak yoğunlukla çalışılmakta ve şüphesiz ki içinde bulunduğumuz yüzyılın en önemli odak noktalarından birisini oluşturmaktadır. Kimya, optik, elektronik, gıda, tekstil, kozmetik veya ilaç gibi birbirinden farklı birçok disiplin ve sektör tarafından çalışılmasının bir sonucu olarak da literatürde nanoteknoloji terimi ile ilgili birden fazla tanıma rastlamak mümkündür.

Bu sebeple, EMA, 2006 yılında yayınladığı raporda, literatürde mevcut farklı tanımlamaları da göz önüne alarak nanoteknoloji için genel bir tanımlama yapma gereği duymuştur. Buna göre; Nanoteknoloji, malzemenin şeklini ve boyutunu nano ölçeklerde kontrol altında tutarak yapıların, cihazların ve sistemlerin üretilmesini ve uygulanmasını ifade eden bilimsel yaklaşımdır. Nano ölçek aralığı atomik büyüklük düzeylerini ifade eden 0.2 nm’den 1000 nm’ye kadar bir aralığı ifade etmektedir. Nanotıp ise nanoteknolojinin hastalıkların önlenmesi, teşhisi veya tedavisi amacıyla kullanılmasıdır (94).

Bilim dünyası başta olmak üzere birçok disiplin tarafından yoğun şekilde araştırılan ve çalışılan nanoteknoloji konusunda farklı tanımlamalar ve yaklaşımlardan dolayı, benzer şekilde FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)'da nanoteknoloji konusunda rehberler yayınlamış, açıklama ve tanımlamalar yapmıştır. FDA tarafından yayınlanan ve 2014 yılında güncellenen kılavuzda FDA nanoteknoloji ile ilgili olarak şu açıklamaları yapmıştır; "Nanoteknoloji; tıbbi ürünler, yiyecekler ve kozmetikler dahil olmak üzere FDA kontrolündeki geniş bir ürün yelpazesinde kullanılabilen ve hızla gelişmekte olan bir teknolojidir. Nanoteknoloji, malzemenin partikül büyüklüğünün nano ölçek aralığında olmasını (yaklaşık 1 nanometre (nm) ile 100 nm aralığında) ifade etmektedir." (95). Ayrıca, NBCD (Non-biological complex drugs) çalışma grubu tarafınca, nanoteknoloji temelli olarak hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler non-biyolojik kompleks ilaçlar olarak tanımlanmaktadır. Bu tanımlamanın gerekçesi ise, nanoteknoloji temelli olarak hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemlerde etkin maddenin konvansiyonel ilaçlarda olduğu gibi sadece mono-moleküler yapıda etkin maddeden oluşmaması, nanoteknolojik ilaçların kompleks yapısı ve birden çok bileşenden oluşması sebebiyle yapısal olarak biyoteknolojik ilaçlara daha çok benzemesi ancak biyolojik kaynaklı bir ürün olmamaları nedeniyle de non-biyolojik kompleks ilaç olarak isimlendirilmesine yol açmıştır (96, 97).

Nanoteknoloji temelli olarak elde edilen nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin nanotıp alanında sağladığı faydalar taşıdığı özelliklerinden ileri gelmektedir. Bunlar ana hatlarıyla; hazırlanan nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemin partikül büyüklüğünde ve yüzey özelliklerinde amaca göre modifikasyon yapılabilmesi, ilaç taşıyıcı sistemin hazırlandığı polimer özelliklerinin değiştirilerek etkin maddenin yükleme ve salım profillerinin değiştirilebilmesi, ilacın etki göstermesi istenen bölgeye hedeflendirilebilmesi ve ilaç taşıyıcı sistemde enkapsüle halde bulunan etkin maddenin fizyolojik koşullar altında ve etki bölgesinde fiziksel ve kimyasal olarak stabilitesinin sağlanabilmesidir (98).

Nanotıp uygulamalarıyla elde edilen nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler, konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemlerde görülebilen spesifik olmayan biyolojik dağılım, hedefleme sorunu, etkin maddenin çözünürlük sorunu ve düşük biyoyararlanım gibi

problemlerin aşılmasında fayda sağlamakta ve bu doğrultuda da araştırmalar hızla ilerlemektedir (99).

Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler, kullanılan madde ve/veya yöntemle bağlı olarak farklı şekillerde hazırlanabilmektedir. Bu sistemler, polimerik nanotaşıyıcılar, lipid-temelli nanotaşıyıcılar, metal ve inorganik temelli nanotaşıyıcılar olarak kendi içinde gruplandırılmaktadır. Polimerik nanotaşıyıcılar ise polimerik miseller, dendrimerler veya nanopartiküller olacak şekilde alt gruplara ayrılmaktadır. Nanopartiküller olarak tanımlanan grup; hazırlanan nano-taşıyıcının yapısına ve bileşimine göre nanoküre ve nanokapsülleri ifade etmekte ve her ikisini de kapsamaktadır (100).

Nanopartiküller, boyutları 10-1000 nm arasında değişen, çoğunlukla doğal yollarla veya sentetik olarak elde edilmiş polimerlerle hazırlanan, submikron kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir (98-101). Bu tanım, ilacın bir matriks üzerine adsorbe edilebildiği, matriks içinde çözündürüldüğü veya disperse edildiği nanoküreleri veya ilaç içeren sulu veya yağlı bir çekirdeğin polimerik bir duvarla çevrelendiği nanokapsülleri kapsamaktadır (102). Yağlı çekirdek içeren nanokapsüller; yüksek ilaç yükleme kapasitesi, ilacın degradasyonunun önlenmesi ve patlama etkisinin azaltılması gibi bazı üstünlüklere sahiptir (103). İlacın nanokapsülün yağlı iç çekirdeğine enkapsülasyonu ile, ilaç patlama etkisinden kurtulabilmekte ve dokularla direkt temas halinde olmadığından degradasyonu da önlenmektedir (104, 105).

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, 1970'lerden bu yana, ilk olarak "bölgeye özgü" (site-specific) ilaç taşınması fikri ile ortaya çıkmış ve halen üzerinde yoğunlukla çalışılmakta olan bir alandır. Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerde etkin madde; çözünmüş halde, enkapsüle halde ve/veya partikül yüzeyine adsorbe halde bulunabilmektedir ve lokal veya sistemik ilaç taşınmasında yoğunlukla çalışılmaktadır (98, 101).

Nanopartiküller; farklı yüzey yükü, moleköl ağırlığı, hidrofobisite/hidrofilisiteye sahip çeşitli polimer ve kopolimerler kullanılarak hazırlanabilir. Kullanılan doğal polimerler arasında; jelatin, albümin, dekstran, kitosan ve aljinat sayılabilir. Bunun yanısıra sentetik biyodegradasyona uğrayabilen polilaktik

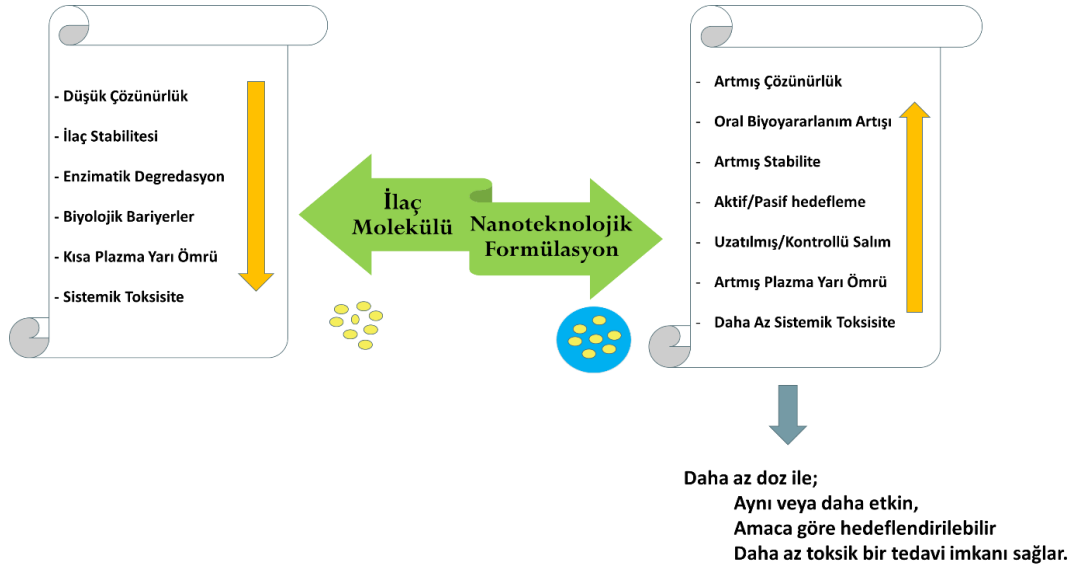
asit, poliglikolik asit, laktik ve glikolik asit kopolimeri, polikaptolakton, polimetakrilatlar, polietilenimin gibi polimerler de kullanılabilir (106, 107).

Polimer karakteristikleri nanopartikülün nihai özelliklerini etkilemektedir. Katyonik polimerlerin, kuvvetli hücrel etkileşimleri ve hücre içine alım özelliklerini göstermeleri nedeniyle özellikle son yıllarda üzerinde durulmaya başlanmıştır. Bu durumun temelini, pozitif yüzey yüküne sahip katyonik nanopartiküllerin negatif yüzey yüküne sahip biyolojik membranlarla hücrel etkileşiminin artması ve böylece hücre içine alımın artması oluşturmaktadır (108, 109). Polimer karakteristiklerinin nanopartikülün nihai özellikleri üzerinde etkisini sağlayan bir diğer konu ise hazırlanan kolloidal sistemin stabilitesidir. Yüzey yükü, nanopartiküllerin fiziksel olarak stabil kolloidal sistemler oluşturabilmesinde de önemli bir faktördür, ± 30 mV'un üstünde zeta potansiyele sahip nanopartiküllerin, birbirleriyle etkileşimleri ve fiziksel stabiliteleri açısından daha stabil kolloidal sistemler oluşturabileceği belirtilmektedir (110-112). Ayrıca, katyonik polimerlerin pozitif yüzey yükü, DNA'nın negatif yükünün baskılanmasına yardımcı olur ve hücre içine girişi kolaylaştırır. Katyonik polimerlerin; antikanser ilaçlar, DNA veya siRNA ile polipeks adı verilen nanoboyutta kompleksler oluşturduğu literatürde göze çarpmaktadır (113, 114). Bu nedenlerle katyonik polimerlerin antikanser ilaçlar, DNA, oligonükleotid ve peptidlerin taşınmasında etkili nanomalzemeler olduğu düşünülmektedir (1).

Özellikle kanser terapisinde nanoyapılı ilaç taşıyıcı sistemlerin tümör hedefleme amacıyla sağladığı farklı üstünlükler de mevcuttur. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, konvansiyonel antikanser ilaçların özgüllük sorununu giderebilmek noktasında umut verici özelliklere sahiptir (115). İlaç taşıyıcı sistemler, özellikle tümörlü bölgeyi hedeflemek, antikanser ilaçların etkinlik ve farmakokinetik profillerini iyileştirmek için kullanılabilir. Literatürde EPR (enhanced permeability and retention) olarak tanımlanan artan geçirgenlik ve alıkonma etkisi, antikanser ilaç yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin partikül büyüklüğünün etkisiyle tümörlü dokuya daha fazla ulaşabilmesine imkan sağlayabilmektedir (116). Tümörlü bölgede oluşan hasarın bir sonucu olarak normal damar yapısının ve fizyolojik koşulların bozulmasıyla ilgili bölgede EPR koşulları gelişebilmektedir. Tümör dokusu büyüdükçe

bölgede fizyolojik olarak var olan damarlar gerekli oksijen ve besini sağlama noktasında yetersiz kalmaya başlar. Bunun bir sonucu olarak anjiyogenezi tetikleyen büyüme faktörleri salgılanır ve tümörlü doku çevresinde yeni kılcal damar yapılarının oluşumu başlar. Tümörlü bölgede gelişen anjiyogenez, süreksiz bir epitel sunan ve normal vasküler yapılanmanın bazal membranından yoksun, düzensiz damarların oluştuğu bir süreçtir (117). Yeni oluşan damarların endotel hücreleri arasında fenestre denilen boşluklar bulunmaktadır ve tümör çeşidine, tümör gelişen bölgenin özelliklerine göre söz konusu boşluklar 200 nm ila 2000 nm arasında olabilmektedir (118). Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde partikül büyüklüklerine bağlı olarak endotel hücreleri arasındaki bu boşluklardan sızarak tümör dokusuna ulaşabilme imkanına sahip olabilmektedir. Ayrıca, tümörlü bölgede gelişen bir dizi bozukluk sonucunda, lenfatik sistem fonksiyonlarına bağlı olarak tümör bölgesindeki lenfatik drenaj da bozulmuştur (119). EPR etkisiyle; tümörlü bölgedeki normal damar yapısının bozulmuş olmasından faydalanarak partikül büyüklüğünün bir fonksiyonu olarak tümörlü bölgeye ulaşabilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, yine tümörlü bölgedeki lenfatik drenaj fonksiyonlarının bozulmasından dolayı bölgede daha uzun süre kalabilmekte, lokalize olup bir ilaç rezervuarı oluşturabilmektedir (116). Antikanser nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için tümöral hedefleme noktasında önemli bir konu olan EPR etkisi özetle bu şekilde açıklanabilir.

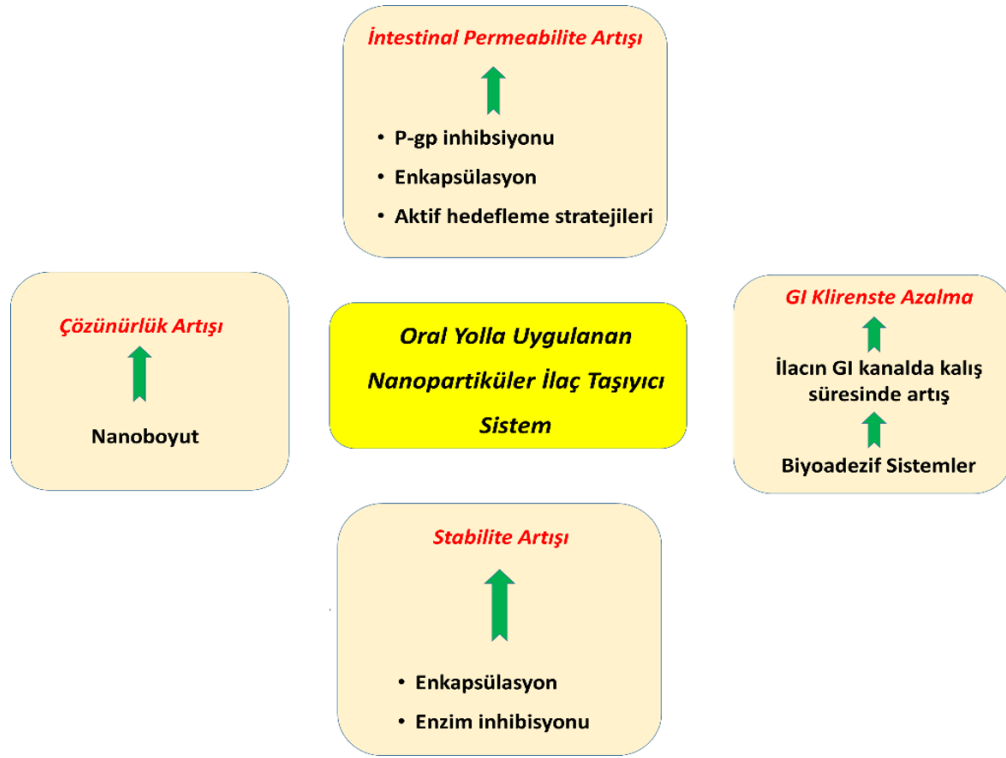
Şekil 2.13.'te nanoteknoloji temelli olarak hazırlanan nano-ilâç formülasyonlarının serbest ilâç molekülüne göre sağladığı üstünlükler özetlenmiştir.



Şekil 2.13. Nanoteknoloji temelli olarak hazırlanan nano-ilaç formülasyonlarının serbest ilaç molekülüne göre sağladığı üstünlükler.

2.6. Oral Uygulamada Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin oral olarak uygulanmalarında GİK kaynaklı çoklu bariyerlerin aşılabilmesi, hem ilaç taşıyıcı sistemin nano boyutlarda olmasından dolayı hem de etkin maddenin taşıyıcı sistemin içinde enkapsüle halde olmasından dolayı sağlanabilmektedir. Nanopartiküller enkapsüle haldeki etkin maddenin kimyasal veya enzimatik degradasyondan korunmasına, sistemik dolaşımında daha uzun süre kalabilmesine ve ilaç taşıyıcı sistemden etkin maddenin salım profilinin kontrol edilebilmesine imkan sağlamaktadır. Böylelikle tedavi daha etkin hale gelebilmekte, doz miktarı, dozlama sıklığı ve görülmesi muhtemel yan etkiler azaltılabilmekte ve tüm bunların bir sonucu olarak da hasta uyuncu artırılabilir (120). Şekil 2.14'te oral yolla uygulanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin karşılaştığı engelleri hangi yaklaşımlarla aşabildiği şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 2.14. Oral yolla uygulanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin karşılaştığı çoklu engeller ve nanopartiküler sistemlerin bu engelleri aşabilme stratejileri.

Nanopartiküllerle oral ilaç taşınması üzerinde günümüzde yoğun bir şekilde çalışılmaktadır ve bu teknoloji diğer ilaç formülasyon yaklaşımlarına göre oral uygulama açısından bazı üstünlüklere sahiptir (121). Uygun şekilde hazırlanmış olan polimerik nanopartiküller gastrointestinal çevrede stabildirler ve içerdikleri terapötik maddeyi, pH'dan, enzimatik degradasyondan ve intestinal lümende efflux pompalarının etkisinden korumaktadır. Bu bağlamda yapılmış bir çalışmada, proteazlara karşı insülin ve kalsitoninin stabiliteleri nanopartiküler sistemde enkapsüle edilerek artırılmıştır (122). Ayrıca nanopartikül elde etmek üzere kullanılan polimerin fizikokimyasal özellikleri değiştirilerek (büyüklük, yüzey yükü, hidrofobisite) nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemden ilacın salım özellikleri (kontrollü veya dış uyaran ile) farklılaştırılabilmektedir (123). Yüzey özellikleri ise farklı polimer sonlanma gruplarının kullanılmasıyla veya polimerin nanopartikül yüzeyine konjuge edilmesiyle değiştirilebilmektedir. Antikor, peptid veya küçük moleküller gibi hedeflendirici

ligandlar ilaç taşıyıcı sistemin doku komponentleri ve hücre reseptörleri ile spesifik etkileşimlerini artırmak amacıyla nanopartikül yüzeyine konjuge edilebilir. Nanopartiküller küçük molekülü ilaç ve biyolojiklerin yanısıra, DNA ve siRNA gibi nükleik asitleri ve makromolekülleri de enkapsüle edebilmektedir. Nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün küçük olması spesifik yüzey alanını genişletmekte, bu da epitel yüzeyi ile temasını artırmaktadır. Ayrıca konvansiyonel oral ilaç taşıyıcı sistemlerle karşılaştırıldığında, nanopartiküllerle mide ve ince barsakta ilaç salım hızını ve stabilitesini kontrol etmek mümkün olabilmektedir, böylelikle ilacın ince bağırsaktan sistemik dolaşıma daha fazla geçmesi veya kolon gibi spesifik bir bölgede daha fazla lokalize olabilmesi sağlanabilmektedir. Yapılmış bir çalışmada, nanopartikül hazırlama materyali olarak poli(akrilik asit ko akrilamid) kullanılmış ve hazırlanan 5-FU taşıyan nanopartiküller ile yüklenen 5-FU'in % 60'ı gibi büyük bir oranının kolona taşınabildiği gösterilmiştir (124).

2.6.1. Oral İlaç Uygulamasındaki Engellerin Nanopartiküler Sistemler ile Aşılabilmesi Stratejileri

Oral yolla ilaç uygulaması sonrası ilacın karşılaşacağı engeller Şekil 2.8.'de, bu engellerin aşılabilmesi amacıyla nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin diğer formülasyon yaklaşımlarına göre sağladığı üstünlükler ise Şekil 2.13.'te özetlenmiştir. Bu üstünlükler formülasyon geliştirme sürecinde birer strateji olarak kabul edilebilmekte ve oral yolla uygulanması hedeflenen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem formülasyonu bu stratejiler çerçevesinde geliştirilebilmektedir. Bu yaklaşımlar; çözünürlüğün artırılması, ilaç stabilitesinin sağlanması, GİK'te kalış süresinin uzatılması ve intestinal membranlardan difüzyonun artırılması ana başlıkları altında incelenebilir.

İlaç Çözünürlüğünün Artırılması

Oral yolla uygulanması amaçlanan birçok ilacın sudaki zayıf çözünürlüğü ve düşük intrinsik çözünürlüğü oral biyoyararlanımını olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörlerin başında gelmektedir. Zira, ilacın absorpsiyon bölgesinden emilebilmesi

büyük ölçüde molekülün o bölgedeki çözünürlüğüne ve pKa değeri yani partiyon katsayısına bağlıdır (125).

Nanopartiküler formülasyon geliştirme yaklaşımı özellikle zayıf çözünürlük göstermelerinden dolayı oral biyoyararlanımı sorunlu olarak kabul edilen BCS II ve BCS IV sınıfı ilaçlar için faydalı bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Nanopartiküllerin çok geniş yüzey alanlarına sahip olması sebebiyle çözünürlük problemi gösteren ilaçların nano boyutlara indirgenerek veya nanosistemde enkapsüle edilerek çözünürlüklerinin artırılabilirdiği bilinmektedir (126). Oral yolla uygulanması amaçlanan suda düşük çözünürlük gösteren bir ilacın nanoboyutlu formülasyon yaklaşımı ile artmış çözünürlük ve çözünme hızı sonucu artmış absorpsiyon ve dolayısıyla biyoyararlanım elde edilebileceği çalışmalar ile gösterilmiştir (127-129).

Gastrointestinal Kanalda İlacın Stabilitesinin Artırılması

Oral yoldan uygulanan bir ilaç veya ilaç taşıyıcı sistemin GİK'in kimyasal ve enzimatik ortamında kanal boyunca stabilitesini koruyarak ilerleyebilmesi oral uygulamayı takiben terapötik etki elde edebilmek için en önemli şartlardan birisidir. Gastrointestinal kanal boyunca ilaç ve/veya ilaç taşıyıcı sistemin stabilitesini etkileyen birden fazla faktör söz konusudur. Bunlar aşağıdaki gibi sınıflandırabilmektedir;

1. Fiziksel faktörler (Gastrointestinal motilite, gastrointestinal içeriğin girişimsel etkisi)
2. Kimyasal faktörler (geniş pH aralığı, sürfaktanlar, gastrointestinal sıvı enzimleri) (120).

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde ilaç molekülü nanopartiküler sistem içerisinde enkapsüle ve/veya konjuge halde olmasından dolayı gastrointestinal degradasyondan korunabilmektedir (73, 130-132).

Gastrointestinal Mukozada Adezyon ve Difüzyonun Artırılması

Oral yolla ilaç uygulamasında hedef çoğu zaman ilacın sistemik dolaşıma geçebilmesidir. Bu amaca yönelik olarak geliştirilen bir formülasyonda ilaç molekülünün çözünürlük sorununun aşılması, GİK boyunca karşılaşılaacağı ortamda

stabilitesini koruması sonucu intestinal bölgeye yani en geniş absorpsiyon bölgesine ulaşmasının ardından, ilaç molekülü için aşılması gereken son basamak, intestinal bariyerleri aşarak kan dolaşımına geçebilmesidir.

Oral yoldan uygulanan bir ilacın GİK'te geçireceği süreçler incelendiğinde aşağıdaki şekillerde gerçekleşebileceği bildirilmektedir;

1. İlaç, GİK'i hızlı bir şekilde geçerek doğrudan feçes ile eliminasyona uğrayabilir,
2. GİK'i kısmen daha yavaş geçerek intestinal bölgede kalma eğilimi gösterebilir fakat müsin tabakasının sürekli klirens etkisi ile intestinal bölgeden temizlenerek feçes ile eliminasyona uğrayabilir ya da,
3. İntestinal bölgede kalış süresini artıran bir formülasyon yaklaşımı ile mukusla daha fazla etkileşir ve kalış süresinin artışı sonucunda mukus bariyerinden penetre olabilir (133).

Oral yolla uygulanan bir ilaçtan optimum terapötik etkinliği elde edebilmek için formülasyonun intestinal bölgede mukus ile yeterli düzeyde etkileşerek kalış süresini artırabilmesi, mukusa penetre olabilmesi ve sonrasında, hedeflenen etki doğrultusunda ya direkt ilaç taşıyıcı sistem olarak intestinal hücre tabakasını geçmesi ya da ilacı o bölgede salarak bir ilaç rezervuarı oluşması sonucunda serbest ilacın intestinal hücre tabakasından geçebilmesini sağlaması gerekir.

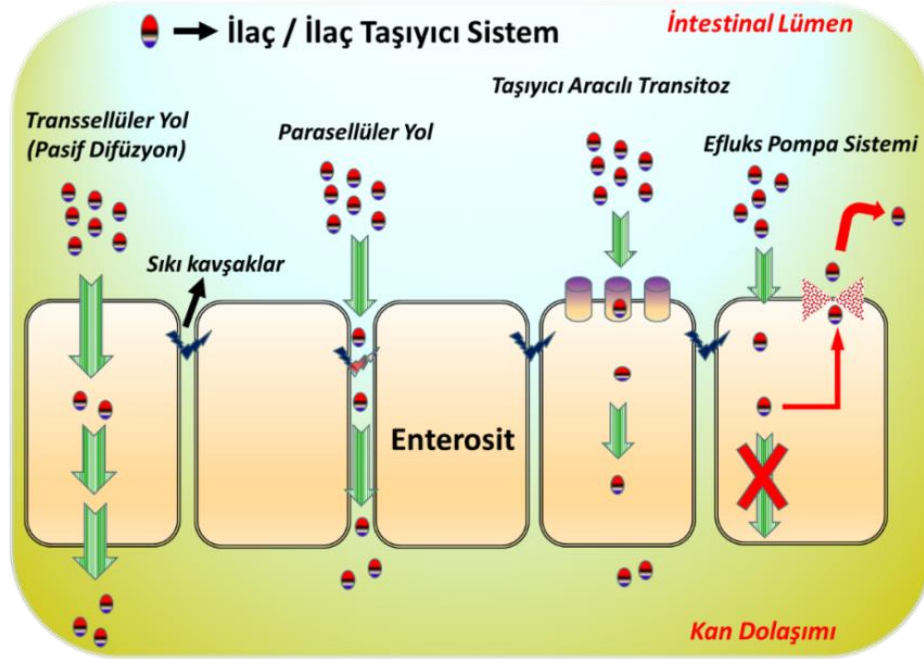
Oral yolla uygulanan bir çok ilaç intestinal bölgede yeterli süre kalamamaktadır ve bu sebeple terapötik etkinlik istenen düzeylerde elde edilememektedir. Bu amaçla nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem formülasyonları geliştirilirken "mukoadezif" olarak tanımlanan, mukus tabakası ile daha uzun süre ve daha fazla etkileşen sistemler geliştirilmektedir. Mukoadezyon amacıyla sıklıkla kullanılan iki yaklaşım; elektrostatik güçler ve disüfit bağları yaklaşımıdır. Bu amaç doğrultusunda ya hazırlanan nanopartikülün yüzey karakteristikleri modifiye edilmekte ya da nanopartikül materyali olarak kullanılan polimerler bu amaca uygun polimerler olarak seçilmektedir. Sulu müsin tabakasının negatif yüklü olması sebebiyle yüzey yükü pozitif olan kitosan gibi polimerler ile hazırlanan nanopartiküllerin elektrostatik etkileşme sonucu, disüfit bağları içeren nanopartiküllerin ise müsinin yapısında

bulunan sistemin sülfidril grupları ile etkileşmesi sonucu mukusta daha uzun süre kaldığı bildirilmiştir (78, 120, 134, 135).

İntestinal bölgede müsin tabakasında yeterli süre kalarak klirens karşı koyabilmiş bir nanopartikülün aşması gereken bir diğer basamak ise intestinal hücre tabakasına ulaşabilmesi ve intestinal duvardan permeabilitesidir. Oral yolla uygulanan bir ilacın sistemik dolaşımına ve oradan da hedef etki bölgesine ulaşabilmesi için mukus bariyerini aştıktan sonra intestinal epitel hücre tabakasını geçebilmesi gerekir (136, 137). İlaçların intestinal epiteli aşabilmesi sürecinde, Şekil 2.12.'de görüldüğü gibi parasellüler yolak, transsellüler yolak ve transitoz gözlenebilmektedir.

Partikül büyüklüğü 50 nm'den küçük nanopartiküller parasellüler yolak ile sıkı kavşaklar üzerinden taşınabilirken, 50 nm – 200 nm dolaylarında partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküllerin enterosit hücrelerince endositozla alınabildiği ve 200 nm – 5 µm partikül büyüklüğüne sahip kolloidal taşıyıcıların ise Peyer plaklarında bulunan M hücreleri aracılığıyla alınabildiği gösterilmiştir [52]. Ayrıca nanopartiküllerin M hücreleri aracılığıyla alımı, bu hücrelerin nanopartikülleri karaciğerde ilk geçiş etkisinden kurtaran bir mekanizma olan lenfoid dokulara doğru taşınması sebebiyle de önemli bir avantaj sağlamaktadır (138).

Paraselüler yolak, toplam mukozal alanın %1'inden daha azını oluşturması ve sıkı kavşakların açıklarının 1-2 nm dolaylarında olmasından dolayı nanopartiküllerin alımı için oldukça sınırlı bir yoldur (130). Ayrıca, formülasyon geliştirme sürecinde nanopartiküllerin kitosan ve/veya poli(akrilat) gibi sıkı kavşakları açma ve daha geçirgen hale getirme kabiliyetine sahip çeşitli polimerlerle hazırlanması veya nanopartikül yüzeyinin sonradan bu polimerlerle kaplanması yaklaşımı ile parasellüler yolak ile nanopartiküllerin alımının kısmen de olsa artırılacağı bildirilmiştir (75). İntestinal lümeninden ilaç ve/veya ilaç taşıyıcı sistemin epitelyal hücre bariyerini aşabilmesi sürecinde gerçekleşmesi muhtemel yollar ve efflux pompa sisteminin etkisi Şekil 2.15.'de özetlenmiştir.



Şekil 2.15. İntestinal lümeden ilaç ve/veya ilaç taşıyıcı sistemin epitelyal hücre bariyerini aşabilmesi süreci ve efluks pompa sisteminin etkisi.

Efluks pompa sistemi ve özellikle bu sistemin birçok substrata sahip önemli bir üyesi olan P-glikoprotein (P-gp) ilaçların intestinal hücre bariyerini aşarak farmakolojik etki gösterebilmesinin önündeki önemli bir engeldir. Oral yoldan ilaç uygulamasında efluks pompa sistemi proteinlerinin inhibe edilmesi yaklaşımı düşük biyoyararlanıma sahip ilaçların biyoyararlanımlarının artırılabilmesi noktasında tercih edilebilmektedir (139). İlaç uygulaması ile birlikte formülasyonda bir efluks protein inhibitörünün de uygulanması ile efluks pompa sisteminin biyoyararlanım üzerindeki olumsuz etkisinden kurtulmak veya bu etkiyi azaltmak mümkündür. Bu amaçla, efluks pompa sisteminin en önemli üyelerinden biri olan P-gp'in inhibisyonu stratejisi sıklıkla çalışılmaktadır ve P-gp inhibitörleri kendi içinde üç ana grupta incelenebilmektedir. Bunlar; birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyon P-gp inhibitörleridir. Birinci jenerasyon P-gp inhibitörleri verapamil ve siklosporin gibi yarışmalı bir şekilde P-gp'e afinite gösteren ve efluks sistemi bloke eden ilaçlardır. Fakat düşük afinitelerinden dolayı yüksek dozlarda uygulanmaları gerekir ve bu da istenmeyen yan etkiler ile sonuçlanabilmektedir. Bu sebeple klinik olarak çok fazla tercih edilmemektedirler.

İkinci jenerasyon ise farmakolojik olarak inaktif yapıda olan, P-gp'e yüksek afinite gösterecek şekilde sentezlemiş moleküllerdir. Daha düşük toksisite riski göstermelerinden dolayı birinci jenerasyon inhibitörlere göre daha fazla tercih edilebilmektedir. Fakat kullanımları ile ilgili olarak en büyük engel sitokrom enzimleri ile olan olası etkileşimleridir. Birinci ve ikinci jenerasyon inhibitörlerin olumsuz yönlerinin tespiti üzerine üçüncü jenerasyon P-gp inhibitörleri geliştirilmiştir. Bunlar Elakridar, Tarikuidar gibi P-gp'e daha spesifik ve daha yüksek afinite gösteren moleküllerdir. Fakat bu grubun klinik olarak kullanımını kısıtlayan durum ise uzun süreli kullanıma bağlı olarak immün sistem baskılanması gibi klinik komplikasyonların görülebilmesi olasılığının gözlenmiş olmasıdır (120, 140-144).

Bu sebeplerden dolayı, benzer şekilde P-gp inhibitör etkisi gösteren sürfaktanlar, polimerler, lipidler gibi biyoyararlanım artırıcı ekspiyanlar klinik olarak daha yaygın şekilde kullanılabilir. Dekstran, sodyum aljinat gibi doğal polimerler, polietilen-glikol ve türevlerinden elde edilen polimerler, tiyollenmiş polimerler, pluronik ko-polimerleri ve polisorbitat gibi sürfaktanlar ve CD'ler P-gp efluks sistemi inhibitörü olarak kullanılabilir. Örnek olarak; rifampisin oral biyoyararlanımın P-gp inhibisyonu etkisi ile artırılması hedeflenen bir çalışmada, Pluronik F68 sürfaktanının verapamil kadar P-gp inhibitör etkisi gösterebildiği ve rifampisin intestinal absorpsiyonunu artırdığı gösterilmiştir (145). Benzer şekilde Pluronik P123 ve Pluronik F127 sürfaktanlarının intestinal P-gp inhibisyonu aktivitesi de gösterilmiştir (146). Ayrıca; oral yolla uygulanması hedeflenen bir ilacın polimerik nanopartiküler bir ilaç taşıyıcı sistem ile enkapsüle halde uygulanması esnasında efluks protein substratı olan ilacın nanopartikül içerisinde enkapsüle halde olması sebebiyle efluks pompası etkisinden kurtulabildiği de bilinmektedir (75). Nanopartiküllerin intestinal etkileşimleri açısından ilave olarak immün sistemden mutlaka bahsedilmelidir. Lamina propria özellikle M hücrelerinin olduğu bölgede pek çok immün hücre (T hücreleri, makrofajlar vb.) bulunmaktadır ve bu immün hücreler nanopartiküller gibi sistemlere karşı aktivite gösterebilmektedir. Ayrıca eğer nanopartikül intestinal bölgede immün sistem bileşenlerinden kurtularak absorbe

olup, kan dolaşımına ulaşmayı başarır, RES dışı organlarda terapötik etki sağlayabilmek açısından mononükleer fagositik sistemden de kaçabilmelidir (77).

2.7. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Oral Yoldan Uygulama Alanları

2.7.1. Kanser Tedavisi

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve yayılması olarak tanımlanabilir. Dünya’da en yaygın hastalıklardan biridir ve kemoterapideki gelişmelere rağmen, klinik tedaviler yetersiz kalmaktadır (1). Kemoterapinin etkinlik ve güvenilirliğinin kontrol edilmesinde hala bazı kısıtlamalar mevcuttur. En önemli güçlük ise pek çok antikanser ilacın suda çözünürlüğünün düşük olmasıdır (147). Örneğin, paklitaksel, dosetaksel, kamptotesin, doksorubisin, tamoksifen gibi sıklıkla kullanılan antikanser ilaçların oral biyoyararlanımlarının düşük olması oral yoldan uygulanmalarına imkan vermemektedir (148-152).

Bu sebeple birçok antikanser ilaç, formülasyona dahil edilen yardımcı çözücülerle birlikte intravenöz olarak uygulanmakta fakat kullanılan bu yardımcı çözücüler hastanın yaşam kalitesini ve tedavinin etkinliğini olumsuz yönde etkileyecek yan etkiler gösterebilmektedir. Bir diğer önemli nokta ise, antikanser ilaçların vücutta geniş oranda dağılımı ve kanserli hücrelerin yanısıra sağlıklı hücrelere de sitotoksik etki göstermesidir. Kemoterapötiklerin terapötik indeksi dardır ve kandaki ilaç konsantrasyonunun ani yükselme ve düşmesi de kanser tedavisinin sınırlamalarından biridir. Kemoterapide intravenöz yol en sık tercih edilen uygulama yolu olsa da, gelecekte oral kemoterapideki gelişmelerle kanser tedavisinde önemli bir adım atılacağı öngörülmektedir. Hasta açısından düşünüldüğünde ise ağrısız ve evde tedavi imkanı tanınması sebebiyle oral yol en tercih edilen ilaç uygulama yoludur. Oral uygulama ile intravenöz uygulamadaki kan konsantrasyonundaki ani düşme ve yükselmeler de önlenmektedir. Ancak, bahsedildiği üzere kanser ilaçlarının pek çoğu GİK’tan düşük absorpsiyon ve dolayısıyla düşük biyoyararlanım göstermeleri nedeniyle oral uygulamaları pratikte etkin bir şekilde gerçekleştirilememektedir (147). Oral olarak kullanılan adjuvan kemoterapötikler olsa da bunların fizikokimyasal özellikleri veya P-gp substratı olmaları nedeniyle biyoyararlanımları düşüktür ve

primer tedaviden ziyade adjuvan tedavi amacıyla kullanılmaktadırlar. Antikanser ilacın fizikokimyasal özellikleri (intrinsik çözünürlük, permeabilite, stabilite) ve biyolojik bariyerler (gastrointestinal geçiş zamanı, absorpsiyon penceresi, efflux pompa sistemleri, presistemik metabolizasyon) limitli oral biyoyararlanım nedenidir. Birçok antikanser ilaç BCS II ve BCS IV sınıfında olmalarından dolayı oral yoldan uygulanmaları açısından kısıtlamalarla karşı karşıyadır. Antikanser ilaçların nanopartiküler sistemde enkapsüle halde olmasına dayanan formülasyon yaklaşımları ile bu ilaçlar parenteral yol dışındaki uygulama yollarına da uygun hale gelebilmektedir (152).

Rapamisin ile yapılmış bir çalışmada, ilacın N-izopropilakrilamid, metilmetakrilat ve akrilik asit nanopartikülleri hazırlanmış ve oral olarak farelere uygulanmıştır. Pankreatik kanser modeli geliştirilmiş farelerde, nanopartikül formülasyonunun oral olarak uygulandığı grupta serbest rapamisin uygulanan gruba göre daha yüksek kan düzeyi saptanmış ve 4 hafta uygulama sonunda ise bağırsak bölgesinde veya diğer iç organlarda herhangi bir toksisite belirtisine rastlanmadığı rapor edilmiştir (153).

Araştırma grubumuzca yapılan bir çalışmada ise, fizyolojik ortamda stabilite sorunu gösteren CPT'nin (antikanser ilaç) oral uygulanmak üzere amfifilik CD ve poli-ε-kaprolakton kullanılarak nanokapsülleri hazırlanmıştır. Yüzey modifikasyonu ise kitosan ile yapılmıştır. Hazırlanan CPT yüklü anyonik ve kitosanla kaplanmış katyonik nanokapsüller in vitro olarak karakterize edilmiştir. Gastrointestinal alımın, kitosan kaplı CD nanokapsüllerle belirgin oranda arttığı belirlenmiştir. Metillenmiş CD'lerin, biyolojik membranların lipid komponentleri (özellikle kolesterol) ile etkileşerek membran akışkanlığını ve permeabilitesini modifiye edebildikleri gösterilmiştir (45, 147). Bu nanoteknolojik ve/veya CD içeren yaklaşımın kanserde ilaç direncini yenmede de önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Örneğin; MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları ile yapılan bir çalışmada ise, metillenmiş CD'ler kullanılarak 5-florourasil ve karboplatin için hücrelerin geçirgenliğinin arttığı gösterilmiştir (154). Doksorubisin tek başına ve metil CD türevleri ile uygulandığında, HL-60 S (S: Sensitive, duyarlı) ve HL-60 R (R: Resistant, dirençli) hücre hatlarında, doksorubisinin hücre içinde birikme

oranının tek başına olduğu duruma göre 2-4 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar, K562 S, MCF7 S ve A2780 S hücre hatları üzerinde denenen dosetaksel için de gösterilmiştir (S: Sensitive, duyarlı) (155). Özellikle dirençli hücrelerde fazla miktarda bulunan hücre membran kolesterolünün CD tarafından ortamdaki uzaklaştırılması ile kanser hücrelerinin membran geçirgenliği artırılmakta, hücrede apoptotik yolak uyarılmakta ve antikanser ilacın terapötik etkinliği artırılmaktadır (156, 157).

Paklitakselin CD ile kompleks halinde kullanıldığında, kanser hücre hatlarına karşı *in vitro* sitotoksitenin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durum, CD'ler ile efflux pompalarının inhibisyonu ve permeabilitenin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (158). Bu bulgulardan yola çıkılarak; paklitakselin CD polianhidrit nanopartikülleri içerisinde verildiğinde, sıçanlarda görünür permeabilitenin Taxol®'e göre 12 kat arttığı gözlemlenmiştir (159). Takrolimusun oral biyoyararlanımının dimetil- β -CD ile kompleksleştirildiğinde belirgin derecede arttığı gösterilmiştir (160). β -CD polimeri kullanılarak paklitakselin nanosünger formülasyonları hazırlanmış ve paklitaksel yüklenmiş nanosüngerlerin Taxol®'e göre plazma konsantrasyon eğri altı alanlarının (EAA) 3 kat fazla olduğu görülmüştür (161). Benzer şekilde ekzemestan ile yapılmış bir çalışmada da, hidroksipropil- β -CD kullanılarak Caco-2 hücre hattından ekzemestanın görünür permeabilitesinin 3 kat arttığı gözlemlenmiştir (162).

2.7.2. Protein Peptid Yapılı İlaçların Taşınımı

Protein ve peptid yapıları ilaçların oral yolla uygulanabilmesi noktasında halen en yoğun çalışmalar kronik bir hastalık olması ve ilacın günde birden fazla enjeksiyon gerektirebilmesinden dolayı insülin üzerinde yoğunlaşmaktadır. Subkutan uygulama yolu insülin uygulaması için en yaygın yoldur, fakat tekrarlı uygulamalar açısından değerlendirildiğinde bu durum ciddi bir uyuncu sorunu doğurmaktadır. Gün içinde tekrarlı uygulamaların bir sonucu olarak enjeksiyon bölgesinde hipertrofi ve enfeksiyon riski bir diğer sorundur (163). Oral uygulanabilir bir insülin formülasyonu ile kullanım kolaylığına bağlı olarak artan hasta uyuncuna ilaveten oral uygulama sonrası elde edilen farmakokinetik profilin endojen insülinin farmakokinetik profiline

daha yakın olması da bir diğer avantajdır. Subkutan insulin uygulamasında ise insülin karaciğere ulaşmadan sistemik dolaşıma geçtiği için kaslar ve böbrekler gibi organları hedeflemektedir (164). Karaciğer, pankreas tarafından salgılanan insülinin %50-%75'ini metabolize ederken subkutan uygulanan insülinin sadece %25'ini metabolize edebilmektedir (165). Oral uygulanan insülin ise intestinal bölgede absorbe olduktan sonra karaciğere geçerek pankreastan salgılanan endojen insüline benzer etki gösterebilmektedir (166). Bu avantajlarından dolayı; geçtiğimiz son onbeş yılda oral uygulanabilen nanopartiküler bir insülin formülasyonu geliştirilebilmesi üzerine yoğunlukla çalışılmaktadır (167).

Fizyolojik açıdan, oral uygulanan insülin nanopartikülü gastrointestinal emilim sonrası gerçekleşen karaciğerdeki endojen salgı yolunu taklit ederek glukoz homeostazını artırır, hipoglisemi, kilo alımı ve subkutan enjeksiyon yoluyla indüklenen periferik hiperinsülinemi riskini aza indirir. Fizyolojik açıdan, mevcut parenteral insülin preparatlarına göre daha avantajlı olan bu durum, oral yolla uygulanabilir bir insülin formülasyonu geliştirilebilmesi noktasındaki çalışmaların da temellerinden birini oluşturmaktadır (163, 168, 169).

İnsülinin nanoenkapsülasyonu sonucu elde edilen nanopartiküler sistem, insülini GİK'in asidik ve enzimatik degradasyonundan korurken, ilacın kontrollü ve/veya uzatılmış salım göstermesine imkan verecek şekilde tasarlanabilir, nanopartiküler sistem hedef bölgedeki ligandlara hedeflendirilebilir, nanopartikül materyalinin tasarlanması ile de GİK'te kalış süresi ve parasellüler ve/veya transsellüler absorpsiyonu artırılabilir (170). Yapılmış çalışmalarda, lipozom ve/veya emülsiyon bazlı diğer kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerle kıyaslandığında polimerik nanopartiküler sistemler ile GİK'te daha iyi stabilite elde edildiği bildirilmiştir (171).

Oral yolla uygulanabilen nanopartiküler insülin formülasyonları mukoadesif sistemler, M hücrelerine hedefleme ve enterositlere hedefleme gibi stratejilerle kombine şekillerde tasarlanabilmektedir. Fakat, in vivo çalışmalarda yeterli hipoglisemik cevabın alınması için çok yüksek dozlarda insülin gerekmesi sebebiyle yetersiz terapötik etkinlik sorunundan dolayı, bu kapsamda gerçekleştirilen çalışmaların birçoğu kısıtlanmaktadır. Ayrıca, uzun süreli ve yüksek dozlarda insülinin

oral olarak uygulandığı çalışmalarda insülinin aynı zamanda bir büyüme faktörü olmasından ileri gelen, gastrointestinal epitelde mitojenik değişimlerin indüklendiği tespit edilmiştir (172). Ancak güncel çalışmalarda bu sorunun aşılabileceğini belirten, klinik olarak kullanılabilir dozlarda insülin kullanarak farelerde yeterli düzeyde hipoglisemik yanıtın alınabildiği çalışmalar da yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar hazırlanan nanopartiküler formülasyonun etkinliğini artırabilmek ve bu sayede dozu düşürebilmek amacıyla nanopartiküler hedefleme stratejileri ile daha etkili formülasyonlar geliştirilebilmesi çabasının bir sonucu olarak başarılmıştır (173). Ayrıca oral uygulamada insülinin nanopartikülden kontrollü salımı ile subkütan uygulamalara nazaran kan glukoz seviyesinde daha uzun süreli bir hipoglisemik yanıtın alınabildiği belirtilmiştir (174).

Peptit ve proteinlerin oral yolla nanopartiküler sistemlerle uygulanmasına yönelik başka çalışmalar da mevcuttur. Multipl skleroz tedavisinde kullanılan fakat günlük enjeksiyon yapılmasından ileri gelen bir uyunç sorunu olan İnterferon Beta *in vivo* tavşan modeli bulgularına göre, subkutan uygulamaya kıyasla oral uygulanan nanopartiküler sistemle 24 saat süresince daha yüksek ilaç plazma konsantrasyonu elde edilmiştir (175). Kandaki kalsiyum düzeyini düşürerek osteoporoz tedavisinde kullanılan peptit yapılı kalsitonin; Eudragit-PLGA nanopartiküllerine enkapsüle edilerek ratlara oral olarak uygulanmış ve subkutan uygulamaya göre 24 saat boyunca kan kalsiyum düzeyi anlamlı derecede daha düşük seviyelere indirilmiştir (176, 177).

2.7.3. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı

İnflamatuvar bağırsak hastalığı (İBH), genellikle genç bireylerde görülen, GİK'in kronik enflamasyonu ile karakterize olan bir hastalıktır. İBH tedavisi için, antiinflamatuvar ve immün baskılayıcı ilaçlar kullanılmaktadır. Kullanılan tedavi sistemlerinde etki düşük fakat yan etki görülme ihtimali yüksektir. Daha etkili bir tedavi için, hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde durulmaktadır. Crohn hastalığı (CH) ve ülseratif kolit (ÜK) inflamatuvar barsak hastalıkları olarak tanımlanmakta ve GİK'in kronik inflamasyonu olarak kabul edilmektedir (178). Avrupa'da 2,2 milyon insanın İBH'dan etkilendiği tahmin edilmektedir. Yıllık prevalans

ÜK ve CH için 100.000'de 50-250 olarak verilmektedir (179, 180). İBH'nın başlangıç nedeni, genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişkendir. Bu faktörler, intestinal bariyer fonksiyonları, doğuştan ve zamanla elde edilmiş immünite, otofaji, apoptoz ve sinyal fonksiyonlarında azalma; çevresel faktörler, oral kontraseptif kullanımı, emzirme, mikrobiyal ajanlar, sigara, apandisit ameliyatı, sanitasyon ve stres olarak sıralanabilir (181). İBH için kalıcı bir tedavi henüz yoktur, bu yüzden ömür boyu ilaç kullanımı gerekmektedir (182). ÜK ve CH tedavisi; hastalığın şiddetine, alt tipine, var olan hastalığa ve hastanın ilaca olan toleransına göre değişmektedir ve sıklıkla antienflamatuvar ve immün baskılayıcı ilaçlar kullanılmaktadır. Tedavi için 5-Aminosalisilatlar (5-ASA) ve kortikosteroidler tedavinin ana basamağını oluşturur. 5-ASA ilaçlar, genellikle mesalazin ve oksalazin, hafif ataklar için tercih edilirken, prednizolon gibi kortikosteroidler daha şiddetli İBH tedavisi için tercih edilmektedir. Azatiyotropin, 6-merkaptopürin, metotreksat ve anti TNF- α antikorları gibi immün baskılayıcı ilaçlar hastalığın daha şiddetli evrelerinde kullanılmaktadır. İBH hastalığının tedavisinde en önemli zorluk, ilaçla ilişkili olan yan etkilerin önlenememesi veya azaltılamamasıdır. Kortikosteroidler, hipertansiyon, hiperglisemi, osteoporoz, glokom, depresyon gibi kısa veya uzun süreli yan etkiler gösterebilir. İmmün baskılayıcı ilaçlarla tedavi ise hastada enfeksiyonlara yatkınlığı artırmaktadır.

Sonuç olarak, İBH'nin tedavisi yüksek terapötik etkinlik ve yan etkiler arasında denge gerektirmektedir (149). Bu da ilaç hedefleme ve nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı ile çözümlenebilir. İBH'nin patofizyolojisindeki yeni görüşler, hastalığa hedeflendirilmiş yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Burada amaç var olan tedaviden daha etkin bir tedavi gerçekleştirebilmektir. Yeni araştırmalar, ilaçların inflamasyonlu bölgede birikebilmesi üzerinde gerçekleştirilmektedir. Bu araştırmalar daha çok hastalığa hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler ve hedefleme mekanizmaları üzerinde yoğunlaşmaktadır. Mikropartiküler, nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerle mukoadesyon, biyoadesyon, mukopenetrasyon, M hücreleri tarafından alım gibi mekanizmalar, lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler, polimerik veya lipozomal taşıyıcı ile siRNA tedavisi, bakteri bazlı ilaç taşıyıcı sistemler, ökaryotik bazlı ilaç taşıyıcı sistemler, sentetik ökaryotik hücreler

bahsedilen çalışmalara örnek olarak verilebilir (183). Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, hafif ve orta derecede hastalık görülen hastalar için uygundur. Bu sistemlerdeki strateji, öncelikle luminal belirti gösteren hastalıklarda (örneğin distal kolit) erken etkili tedavi için önemlidir. Hedeflendirme, ilacın sadece hastalıklı bölgede etki göstermesini sağlayacağı ve etkin madde sistemik dolaşıma girmeyeceği için yan etkileri azaltacak; ayrıca hastalıklı bölgede etkin madde miktarının artması sonucu, ilacın etkinliği artmış olacak ve böylece ilaç uygulama sıklığı azaltılarak hasta uyuncu artırılmış olacaktır (149). Söz konusu ilaç taşıyıcı sistemlerin başarılı olabilmesi sistemin GİK'te yeterli süre tutunabilmesine ve bunu sürdürebilmesine imkan sağlayacak şekilde oral formülasyonların tasarlanması gerekmektedir (183-185).

İBH'da intestinal bariyerin yapısı bozulmuştur. Sekretuar hücre sayısının azalmasıyla, antimikrobiyal sekresyonun azalması, bozulmuş sıkı kavşaklar nedeniyle artmış permeabilite, ülserasyonun olduğu kısımda epitel kaybı söz konusu olabilmektedir. Dahası, İBH'da mukus tabakası azalmaktadır, bu durum goblet hücre sayısının azalmasından ileri gelmektedir. İntestinal bariyer disfonksiyonuna bağlı olarak, luminal kısımdaki bakteri mukozal yüzeye saldırır, inflamasyonun derecesine göre epitelyal tabaka, submukoza ve derin dokuları kaplar. Mikrobiyal invazyon, abartılı bir immün cevap oluşturur, sonuç olarak intestinal inflamasyon oluşur (183). Yapılan bir çalışmada, ilaç yüklü nanopartikülün inflamasyon bölgesine nasıl hedeflendirileceği ve kolona spesifik farklı ilaç taşıma stratejileri değerlendirilmiştir. 3 farklı polimerik nanopartikül (pH duyarlı nanopartiküller, mukoadesif nanopartiküller, immün hücreleri hedefleyen mannoz gibi bir ligandın grafte edildiği nanopartiküller) hazırlanmıştır. Sonuç olarak mannoz grafte edilmiş nanopartiküller ile kolona aktif hedeflendirmenin daha etkin olduğu gösterilmiştir (186).

Oral ilaç taşıyıcı sistemler, sistemik etki göstermesinin istenmesinin yanısıra lokal etki için de tasarlanabilir. İBH tedavi stratejisi, ilacın hastalık bölgesine gidebilmesi için hastalığın patofizyolojik süreci ile ilgilidir. İntestinal inflamasyon bölgesinde mukus üretimi ve intestinal bariyerin geçirgenliği artmıştır. Antiinflamatuvar tedavinin sistemik olarak değil de lokal olarak uygulanması ile maksimum etki ve minimum yan etki amaçlanmaktadır (77). Fizikokimyasal nanopartikül parametreleri inflamasyonlu

instestinal dokunun hedeflendirilmesinde kullanılabilir. Bir sıçan İBH modelinde, nanopartiküllerin partikül büyüklerinden dolayı inflamasyon bölgesinde toplanmanın arttığı gösterilmiş, inflamasyona uğramış doku içerisinde, mukus ve ülserasyonun daha yoğun olduğu bölgelerde birikmenin daha fazla olduğu görülmüştür (187). Kemirgenler üzerinde oluşturulan İBH modellerinde, NP'lerin çeşitli terapötik molekülleri (rolipram, 5-amino salisilik asit, takrolimus, deksametazon) taşımada etkili olduğu gösterilmiştir (188-190). İBH'da hedeflendirmedeki bir diğer yaklaşım ise ligandın NP yüzeyine tutturulmasıdır. Yapılan bir çalışmada, F4/80 antikörünün Fab kısmı, TNF- α siRNA içeren PLA-PEG nanopartikülünün yüzeyine konjuge edilmiştir. Kolitli farelere uygulandığında, kontrol grubuna göre hedeflendirilmiş nanopartiküllerin enflamasyon ve vücut ağırlığı kaybını önlediği gösterilmiştir. Bu yaklaşımda, enkapsüle edilen nanopartiküllerin fizyolojik bariyerleri aşabildiği ve siRNA'nın kolonun istenen inflamasyonlu bölgesine gittiği gösterilmiştir. TNF- α siRNA nanopartiküllere fareye uygulanmak üzere çok düşük konsantrasyonda yüklenebilmiş, nanopartiküllerin kolitin fizyolojik sonuçlarına göre tasarlanması ile hücre içine alım kinetiği artırılmıştır (191). İBH modellerinde, hedeflendirme amacıyla polimer mühendisliği de kullanılmaktadır. Yapılmış bir başka çalışmada, reaktif oksijen türlerinin varlığında (ROS) selektif olarak degrade olan tiyoketal polimeri sentez edilmiştir. İnflamasyonlu bölgede ROS seviyesinin yüksek olması ve tiyoketal polimerinden oluşan nanopartiküllerin bu bölgede degrade olarak oral uygulama sonrası taşıdıkları terapötüğü lokal olarak etki bölgesinde salması başarılmıştır (192).

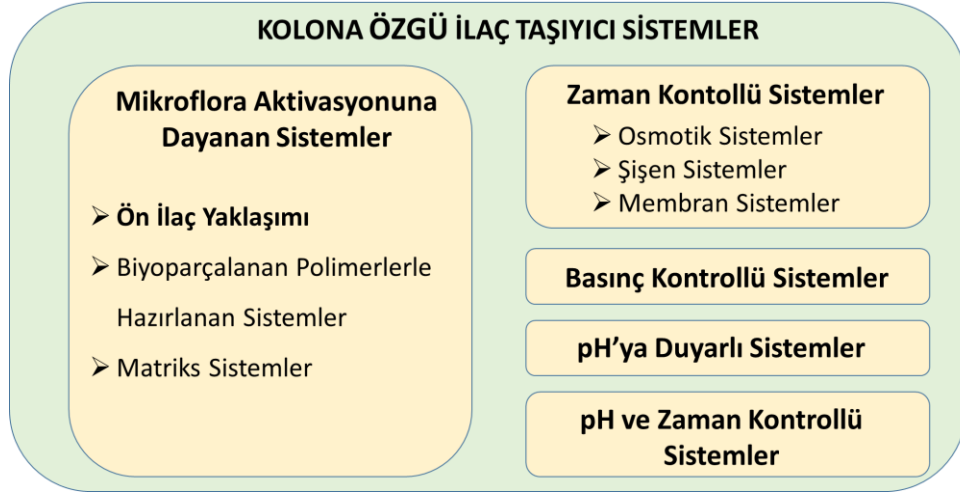
Tez çalışması kapsamında, oral yolla uygulanabilir amfifilik CD türevi bir nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem ile kolorektal kanserlerin tedavisinde, lokal olarak kolon bölgesine ulaşabilen ve bölgede tümörlü dokulara penetre olarak taşıdığı antikanser model ilaç CPT'ni hedef bölgeye ulaştırabilen bir tedavi geliştirilebilmesi hedeflendiğinden dolayı, kolona ilaç hedefleme ile ilgili genel bilgiler ayrı bir bölüm olarak Bölüm 8.'de açıklanmıştır.

2.8. Kolona İlaç Hedefleme

Kolona hedeflenen ilaç taşıyıcı sistemler; başlıca ülseratif kolit, irritabl bağırsak hastalığı ve kolorektal kanserler gibi kolon bölgesine spesifik hastalıkların lokal tedavisi ve/veya emilim bölgesi kolon olması istenen peptit-protein yapılı ilaçların ilgili bölgeye ulaşabilmesi ve uygulanabilmesini sağlamak üzere tasarlanan sistemlerdir. Gastrointestinal kanalın çeşitli bölgelerindeki fizyolojik koşullardan (pH, enzimler vs.) bozulan ilaçların yapılarının bozulmadan kolonik bölgeye ulaştırılması ve/veya emiliminin sağlanması gerçekleştirilebilir (193, 194).

Kolona ilaç taşınmasına yönelik olarak çeşitli formülasyon yaklaşımları benimsenmiştir. Bunlar temelde gastrointestinal kanalın fizyolojik olarak sergilediği özelliklerden bir veya birkaçından yararlanarak ilaçları kolon bölgesine ulaştırmayı hedefleyen yaklaşımlardır. Gastrointestinal kanalın farklı segmentlerinin farklı pH aralığında olması, gastrointestinal kanalda faaliyet gösteren enzimler ve kolon bölgesinde varolan kolonik bakterilerin aktiviteleri kolona spesifik ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde göz önünde bulundurularak yararlanılan temel koşullardır (195).

Gastrointestinal kanalın oldukça karmaşık ve segmentlerine göre farklılık gösteren yapısından dolayı, oral yolla uygulanan bir ilaç taşıyıcı sistemin taşıdığı etkin maddeyi zarar görmeden kolon bölgesine ulaştırabilmesi de oldukça zor ve karmaşık bir süreçtir. Bu sürecin tasarlanmasında, gerek gastrointestinal kanalın fizyolojik olarak gösterdiği bütün özellikler gerekse ilacın ve ilaç taşıyıcı sistemin fizikokimyasal özellikleri göz önüne alınmalıdır (196). Kolona hedefli ilaç taşıyıcı sistemler Şekil 2.16.'da özetlenmiştir (194, 197).



Şekil 2.16. Kolona özgü ilaç taşıyıcı sistemler ve geliştirilen stratejiler

Mikroflora aktivasyonuna dayanan sistemler; ön ilaç yaklaşımı, biyoparçalanan polimerlerle hazırlanan sistemler ve matriks sistemler olarak gruplandırılmaktadır. Bu sistemlerin temeli kolon mikroflorasında fizyolojik olarak bulunan azoredüktaz, siklodekstrinaz, esteraz, peptidaz gibi enzimlerin aktivasyonuna dayanmaktadır (197, 198). Ön ilaç yaklaşımıyla geliştirilen kolona hedefli sistemlere örnek olarak; kolonda bulunan azoredüktaz enzimine yönelik tasarlanan azo konjugatları, kolon bölgesinde *Bacteriodes*'ler tarafından parçalanan CD konjugatları ve yine kolon bölgesinde bulunan endodekstranazlar tarafından parçalanan dekstran konjugatlarıyla yapılmış çalışmalar mevcuttur (198-201). Bu kapsamda gerçekleştirilen bir çalışmada, antienflamatuvar bir etkin madde olan bifenil asetik asit ile β -CD ester bağlarıyla kolona hedefli ön ilaç konjugatları hazırlanmıştır. Elde edilen konjugatların sulu çözeltiler ve biyolojik sıvılarda stabil kalabildiği ve etkin maddeyi açığa çıkarmadığı, maddeyi mide ve ince bağırsaklarda koruduğu, kolona ulaştığında ise esteraz aktivitesinin bir sonucu olarak ilacı serbestleştirerek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (202). Biyoparçalanan polimerlerle hazırlanan sistemlerin temelini ise doğal ve/veya sentetik kaynaklı polimerlerden faydalanılarak kaplı dozaj şekilleri geliştirilmesi oluşturmaktadır. Bu amaçla en sık kullanılan polimerler, azopolimerler ve polisakkaritlerdir. Kaplama materyalinin kolon bölgesine spesifik olarak parçalanması sonucu etkin maddenin ilgili bölgede salınması sağlanmaktadır (203-

205). Bir diğ er ön ilaç yaklaşımı olan matris şeklinde hazırlanan sistemler ise; kaplama işleminin gerçekleştirilemediği durumlarda etkin maddenin kolona spesifik polimerlerle matris tipi tabletlerinin hazırlanmasını temel almaktadır. Bu amaçla; dekstranlar, guar zamkı, pektin, Na-aljinat gibi polimerle kullanılabilir. Bu kapsamda gerçekleştirilen bir çalışmada, kolorektal kansere karşı kemoprotektif olarak kullanılabilen antiinflamatuar bir etkin madde olan Selekoksisib'in guar zamkı kullanılarak matris tabletleri hazırlanmış ve sistemin etkin maddeyi mide ve ince bağırsaklarda sadece %2-4 oranlarında saldığı, kolon ortamında ise bakteriyel aktiviteye bağlı degradasyon sonucu %37 düzeyinde saldığı tespit edilmiştir (194, 206).

Kolona ilaç hedefleme amacıyla uygulanan bir diğ er yaklaşım ise pH'ya duyarlı sistemlerdir. Gastrointestinal kanal pH'sı mide, ince bağırsak ve kolon bölgesine doğru artmaktadır. Mide pH'sı asidik iken ince bağırsak ve kolonda pH değeri artmaktadır. Bu durum pH'ya duyarlı olarak gastrointestinal kanalın farklı segmentlerine hedefleme imkanı sunmaktadır. Bu amaçla, etkin maddelerin pH'ye duyarlı polimerle kaplanması sonucu hedefleme yaklaşımı pratik oluşu ve düşük maliyeti nedeniyle öne çıkmaktadır. Ancak, söz konusu sistemlerle ilgili olarak, gastrointestinal kanal pH'sının birçok dış etkende de etkilenebiliyor oluşu (hastalık, yaş, cinsiyet, açlık-tokluk gibi) hedeflemenin özgünlüğü önündeki en önemli engel olmaktadır. pH duyarlı hedefleme yaklaşımıyla hazırlanmış müstahzarlarda bulunmaktadır. Örnek olarak; ülseratif kolit tedavisi amacıyla kullanılan Mesalazin etkin maddesinin Eudragit S ile kaplanmış (Asacol®) (pH>7) ve Eudragit L (Salofalk®) (pH>6) ile kaplanmış preparatları mevcuttur (194, 198, 203). Kolona ilaç hedefleme amacıyla geliştirilen zaman kontrollü sistemler ile gastrointestinal geçiş süreleri göz önüne alınarak tasarlanmış sistemlerdir. Temel yaklaşımı, dozaj şeklinin mideyi geçtikten sonra 4-5 saat boyunca etkin maddeyi açığa çıkarmaması oluşturmaktadır (198, 207). Zaman kontrollü sistemler; osmotik sistemler, şişen sistemler ve membran sistemler olarak 3 farklı yaklaşımla tasarlanabilmektedir (208). Zaman kontrollü kolona hedefleme yaklaşımına örnek olarak; ilki 1990 yılında Theeuwes ve arkadaşları tarafından tasarlanan osmotik pompa sistemi bir örnek olarak verilebilir (198). OROS-CT adı verilen bu sistem, bir

jelatin kapsül içine yerleştirilen osmotik ünite ve etkin madde ünitesinden oluşmaktadır. Her iki kompartmanda yarı geçirgen bir membran ile kaplanmıştır ve membranda bir delik mevcuttur. Ünite kolona gelince, kolon sıvısı ile kaplama çözülmekte ve osmotik polimer ve osmotik ajan içeren osmotik itme kompartmanı şişerek etkin maddenin delikten çıkmasını ve etki bölgesinde serbestleşmesi sağlanmaktadır (194, 203, 209). Basınç kontrollü sistemler ile kolona hedefleme yaklaşımı ise basınç-kontrollü kolona taşıyıcı kapsüller (PCDC_s; Intestinal pressure-controlled colon delivery capsules) adı verilen ve kolon bölgesindeki güçlü peristaltik hareketler neticesinde artan luminal basınçtan dolayı etkin maddeyi serbestleştiren sistemlerdir (200, 210). Bu kapsamda gerçekleştirilen bir çalışmada, kolona basınç kontrollü hedefleme amacıyla iç kısmı etilselüloz kaplı olan jelatin kapsül hazırlanmış ve uygulama sonrasında kapsülün kolon bölgesinde peristaltizm kaynaklı basınçtan dolayı dağılarak taşıdığı etkin maddeyi serbestleştirebildiği tespit edilmiştir (211).

Tez çalışmamızda da temel oluşturan, kolona ilaç hedefleme stratejilerinden biri olan ve ön ilaç prensibine göre tasarlanan, kolonik mikroflora tarafından parçalanmasının ardından konjuge haldeki etkin maddeyi kolon bölgesinde serbestleştiren CD konjugatları ise uzun yıllardır bilimsel olarak çalışılmakta olan stratejilerden biridir (212).

Çalışmamız kapsamında, kolona ilaç hedefleme amacıyla yeni ve özgün bir yaklaşım olarak, nanopartikül hazırlama materyali olarak kullandığımız CD türevi olan amfifilik CD'lerin gastrointestinal kanalın üst segmentleri boyunca intakt kalıp kolon bölgesinde kolonik mikroflora tarafından parçalanması ve böylelikle nanopartikül içinde enkapsüle haldeki etkin maddenin kolonik bölgeye kadar korunarak nanopartiküllerin kolon mikroflorasınca parçalanması ardından açığa çıkması hipotezi üzerinden hareket edilmiştir.

2.8.1. Kolona İlaç Hedeflemede Oral Yoldan Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Uygulanması

Diğer ilaç uygulama yolları ile karşılaştırıldığında, önceki bölümlerde de açıklandığı üzere oral ilaç uygulaması hasta açısından kolay uygulanabilir ve kabul

edilebilir bir yoldur ancak oral yoldan ilaç uygulamasının temelinde gastrointestinal kanal kaynaklı ve ilacın fizikokimyasal özellikleri (özellikle makromoleküller ve/veya protein-peptit yapılı ilaçlar olmak üzere) ile de ilişkili olmak üzere birçok engel mevcuttur (212). Söz konusu sorunların aşılması için kolorektal kanserleri oral kemoterapi ile tedavi yaklaşımı üzerinde çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların temelinde yeni ilaç taşıyıcı sistemler olarak adlandırılan nanosistemler yer almaktadır. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile çeşitli modifikasyonlardan yararlanılarak oral yolla uygulanan ilaç taşıyıcı sistemin, taşıdığı ilacı kolona kadar bozulmadan, etkin ve stabil bir halde ulaştırması ve etki bölgesinde serbest bırakması amaçlanabilmektedir (13).

Oral yoldan uygulanmak üzere tasarlanmış nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem ile kolit ilişkili kolorektal kanserlerin tedavisine yönelik yapılmış bir çalışmada, kolorektal kanser vakalarında kolonik mukozada normale göre artış gösteren reaktif oksijen türevleri (ROS)'ne duyarlı bir nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Geliştirilen nanopartiküler sistemin kolon mukozasında spesifik olarak birikebildiği ve kanser hücrelerine daha seçici olarak penetre olabildiği tespit edilmiştir. Uzun süreli oral uygulama da diğer uygulama yollarına göre çok daha düşük toksisite gösterebilmesi, geliştirilen nanopartiküllerin sistemik dolaşıma absorbe olmaması ve sağlıklı bağırsak hücrelerince alınımının çok düşük olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca tasarlanan ROS duyarlı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sisteme antikanser bir ilaç olan irinotekan enkapsüle edilerek ilaç yüklü nanopartiküller hazırlanmış ve oral olarak uygulanmıştır. Sonuçlar, geliştirilen nanopartiküler sistemde enkapsüle halde uygulanan irinotekanın kolon bölgesindeki kanser hücreleri üzerinde antikanser aktivitesinde artış olduğunu ve ilaca bağlı gastrointestinal yan etkilerin dramatik olarak azaldığını göstermiştir. Çalışma sonunda, kolorektal kanserlerin tedavisi amacıyla oral yoldan uygulama amacıyla tasarlanmış ROS duyarlı nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem ile gerek etkinlik gerekse hasta uyuncu ve yan etkiler bakımından diğer uygulama yollarına göre daha kabul edilebilir bir tedavi rejimi sağlanabileceği belirtilmiştir (213).

Kolona ilaç hedefleme amacıyla yeni ilaç taşıyıcı sistemler kapsamında geliştirilen farklı bir yaklaşıma örnek olarak ise ilaç yüklü nanopartiküllerin bir

mikropartiküler sistem içerisinde enkapsüle edilmesi de verilebilir. Bu kapsamda gerçekleştirilmiş bir çalışmada, elde edilen oksaliplatin yüklü polimerik nanopartiküller mukoadesif özellik gösteren aljinat mikropartikülleri içerisine enkapsüle edilmiştir. Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemin etkinliğini değerlendirmek amacıyla ortotopik model ile farelerde kolon kanseri oluşturulmuş ve 17 hafta süresince geliştirilen ilaç taşıyıcı sistem farelere oral yolla uygulanmıştır. 17 hafta sonrasında ilaç uygulanan grup ile kontrol grubu hayatta kalma ve tümör gelişimleri bakımından karşılaştırılmış ve geliştirilen yeni ilaç taşıyıcı sistemin uygulandığı grubun hayatta kalma sürelerinin uzadığı, tümör gelişimlerinin ise azaldığı tespit edilmiştir. Çalışma sonunda, nanoteknoloji temelli ilaç taşıyıcı sistemler ile kolorektal kanserlerin tedavisinde oral yoldan uygulanabilen ve kolona spesifik bir tedavi rejimi geliştirilebileceğinin mümkün olduğu belirtilmiştir (214).

Tez çalışmamız kapsamında, kalın bağırsakta gelişen kolorektal tümörlerin tedavisi amacıyla;

- Model antikanser ilaç olarak "Kamptotesin" (CPT) taşıyan,
- Oral uygulama sonrasında, kolona kadar yapısını koruyarak kolon mikroflorası tarafından degrade edilmesi öngörülen amfifilik CD bazlı nanopartiküller hazırlanacaktır.
- Bu amaçla; non-iyonik özellikte olup negatif yüzey yüküne sahip 6-O-CAPRO- β -CD ve pozitif yüzey yüküne sahip Poly- β -CD-C6 olmak üzere iki farklı amfifilik CD türevi ile nanopartiküller hazırlanacaktır.
- Yüzey yükünün hücresel etkileşim açısından da önemli olduğu bilindiğinden, negatif yüklü biyolojik membranlarla daha yüksek etkileşim ve hücre içine alım gösterebileceği düşünülen pozitif yüzey yüküne sahip katyonik nanopartiküller elde edilmesi planlanmaktadır.
- Nihai oral nanopartiküler taşıyıcının pozitif yüklü olması planlandığından, sulu ortamda negatif yüklü olan 6-O-CAPRO- β -CD nanopartiküllerine pozitif yüzey yükü kazandırmak amacıyla ayrı ayrı Kitosan (CS) veya Polietilenimin (PEI) polimerleri ile kaplanacaktır.
- Hazırlanan boş ve CPT yüklü nanopartiküllerin;

- *in vitro* karakterizasyon çalışmaları, *in vitro* sitotoksisite ve simüle biyolojik sıvılarda fiziksel stabilite çalışmaları ve intestinal permeabilite çalışmaları gerçekleştirilecektir.
- Kolona kadar intakt kalarak terapötik yükünü taşıyacağı öngörülen amfifilik CD nanopartiküllerinin tedavideki etkinliği ise hayvan deneyleri ile incelenecektir.
- Bu amaçla; kolon tümörü indüklenmiş farelerde, hazırlanan nanopartiküllerin oral yolla uygulanması sonucu antitümör etkinliği değerlendirilecektir.
- Tüm *in vitro* karakterizasyon, hücre kültürü ve *in vivo* bulgular birlikte değerlendirilerek, kolon tümörü tedavisi amacıyla geliştirilen “Kamptotesin” yüklü anyonik ve katyonik amfifilik CD nanopartiküllerinin etkinliği ve güvenliliği karşılaştırılmalı olarak değerlendirilecektir.
- Çalışma sonunda varılmak istenen nokta; genelde kanser tedavisinde çok sınırlı olarak ve adjuvan tedavi amaçlı uygulanabilen ve özelde de sindirim kanalı tümörlerinin tedavisinde uygulaması olmayan oral yoldan uygulanan katyonik nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerle kemoterapötik tedavinin, hedeflenmiş bir nanotaşıyıcı sistem ile gerçekleştirilecek olmasıdır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar

Cihaz/Yazılım	Marka/Program Adı
Termostatlı yatay çalkalayıcı	Memmert WNE22, Almanya
UV spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Santrifüj aleti	Hettich EBAS21, Almanya
Hassas terazi	Mettler Toledo XS, İsviçre
Liyofilizatör	Labconco FreeZone 4.5, A.B.D.
Isıtıcıli manyetik karıştırıcı	IKA RCT Basic, Almanya
Çok noktali manyetik karıştırıcı	Variomag HP, Almanya
Çok noktali manyetik karıştırıcı	IKA RT-5, Almanya
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
Dinamik Işık Saçılımı Cihazı	Malvern Zeta Sizer Nano ZS, İngiltere
pH-metre	Sartorius PP-20, Almanya
Rotavapor	IKA RV/HB 10, Almanya
Ultra saf su sistemi	Milipore, A.B.D.
Vorteks	Heidolph, Almanya
Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi	HP Agilent 1100 Serisi, Almanya
HPLC kolonu C 18 (250x4,6mm)	Thermo Scientific - Aquasil, A.B.D.
Floresan dedektör (Agilent 1100 serisi)	Hewlett Packard, Birleşik Krallık
İn vivo görüntüleme sistemi	IVIS Spectrum, A.B.D.
İstatistik yazılımı SPSS™ v 22.0	IBM Corp., A.B.D.
Taramalı elektron mikroskobu	Zeiss evo LS-10, Almanya
Mikroplaka okuyucu	Molecular Devices, A.B.D.
Karbondioksit inkübatörü	Sanyo MCO-18AIC, Japonya
TEER ölçüm cihazı	WPI EVOM® 2, A.B.D.
Biyogüvenlik kabini (Sınıf 2)	BHG 2004 Faster, İtalya

Otomatize ışık mikroskobu doku takip cihazı	Leica TP1020, Almanya
Kızaklı mikrotom cihazı	Leica SM2000R, Almanya
Dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskobu	Leica DM6B, Almanya

3.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler

Madde/Malzeme	Marka
20-S-Kamptotesin (Saflık \geq %90)	Sigma-Aldrich, A.B.D.
6-O-CAPRO- β -CD (Mw: 1813 g/mol)	Sevilla Üniversitesi, İspanya
Poly- β -CD-C6 (Mw: 3178,15 g/mol)	Sevilla Üniversitesi, İspanya
Aseton (HPLC için, \geq %99,8)	Sigma-Aldrich, Almanya
Asetonitril (HPLC için, \geq %99,9)	Sigma-Aldrich, İsrail
Asetik asit (Saflık $>$ %99)	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Etanol (HPLC için, \geq %99,8)	Sigma-Aldrich, Almanya
Dimetil sülfoksit (HPLC için, \geq %99,7)	Sigma-Aldrich, Birleşik Krallık
Diklorometan (Ekstra saf)	Sigma-Aldrich, Fransa
Disodyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Kitosan (Protasan™ UP G-113, MW<200 kDa, deasetilasyon derecesi %75-90)	Novamatrix, Norveç
Potasyum dihidrojen fosfat (Saflık %99,5)	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Potasyum klorür (Saflık %99)	Merck, Türkiye
Sodyum klorür (Saflık %98)	Merck, Türkiye
Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) tabletleri	Sigma-Aldrich, ABD
Trietilamin (Saflık \geq %99,5)	Merck, Almanya
Nil Kırmızısı	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Dietilen triamin pentasetik asit (DTPA)	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya

Selüloz diyaliz membran (MW cut-off 14,000 Da)	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Monobazik potasyum fosfat	Sigma-Aldrich, Almanya
Jelatin Tip B (Sığır derisinden)	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Yumurta sarısı emülsiyonu	Sigma-Aldrich, İsviçre
Müsin Tip II (Domuz midesinde)	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Penisilin streptomisin (1000 U/1000 µg/mL)	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Fetal sığır serumu (FBS)	Biochrom, Almanya
Dulbecco's modifiye besiyeri (DMEM)	Biochrom, Almanya
RPMI-1640 besiyeri	BiochromAG, Almanya
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Tripsin/EDTA	Sigma-Aldrich, A.B.D.
Metiltiazol difenil tetrazolyum bromid (MTT)	Applichem, Almanya
WST1 (suda çözünür tetrazolyum tuzu)	Rocha, A.B.D.
L929 fare fibroblast hücre hattı	American Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD
HT-29 insan kolon kanser hücre hattı	American Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD
Caco-2 insan kolon karsinoma hücre hattı	American Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD
Ct-26 fare kolon kanseri hücre hattı	American Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD
Matrijel bazal membran (Matrigel® matrix)	Corning, A.B.D.
Polikarbonat membran filtre, (Thincerts™, por çapı 1 µm, alan 1,13 cm ²)	Corning, A.B.D.
Serolojik pipet (2, 5, 10, 25 mL'lik)	LP İtalyana, İtalya
Hücre kültürü flasksı (25, 75 cm ² 'lik)	Corning, A.B.D.
Hücre kültürü plakası (6, 24, 96 kuyucuklu)	Corning, A.B.D.

3.3. Analitik Yöntem Validasyonu

3.3.1. Kamptotesinin HPLC ile *in vitro* Miktar Tayini Yöntemi

Tez çalışması kapsamında etkin madde olarak kullanılacak olan kamptotesinin *in vitro* miktar tayini analizleri HP Agilent 1100 HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) cihazında gerçekleştirilmiştir. Kullanılacak yöntem ile CPT'nin aktif lakton formu ve inaktif karboksilat formunun eş zamanlı tayini gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla aşağıda kromatografik koşulları belirtilen metot ile ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) gerçekleştirilmiştir (215).

Kolon	: C18 kolon (25 cm x 4,6 mm), Thermoaquasil
Mobil Faz	: Trietilamin asetat tamponu (pH 5,5): Asetonitril (70:30)
Enjeksiyon hacmi:	20 µL
Akış hızı	: 1 mL/dk
Dedektör	: Floresans
Dalga boyu	: Eksitasyon: 370 nm, Emisyon: 435 nm
Sıcaklık	: 25 °C

3.3.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Bir analitik yöntemin validasyonunun temel amacı, seçilen analitik yöntemin tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar vermesini ve çalışmanın ilerleyen aşamalarında gerçekleştirilecek her ölçümde tayin edilmek istenen analit miktarının gerçek değere yeterince yakın olmasını sağlayabilmektedir. Bu nedenle analitik validasyon bir laboratuvar ortamında gerçekleştirilen ölçümlerden güvenilir veriler elde edebilmenin ön koşuludur. Bu nedenle, rutin kullanıma girmeden önce yöntemin validasyonunun gerçekleştirildiği koşullarda herhangi bir değişiklik olması durumunda veya yöntemin kendi parametrelerinde herhangi bir değişiklik olması durumunda yeniden validasyon ve doğrulama gerekir (216).

Tez çalışması kapsamında, CPT etkin maddesinin aktif lakton ve inaktif karboksilat formlarının miktar tayininde kullanılan yöntemin validasyonu amacıyla; doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, özgünlük parametreleri değerlendirilmiştir.

Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

CPT'nin HPLC ile *in vitro* miktar tayini amacıyla öncelikle kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Bu amaçla, 1 mg CPT 10 mL Dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek 100 µg/mL konsantrasyonda bir stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözülden hareketle 2-40 µg/mL (2, 5, 10, 15, 20 ve 40 µg) aralığında 6 farklı konsantrasyonda seyreltmeler yapılmıştır. Kullanılacak yöntem CPT'nin hem lakton (asidik pH) hemde karboksilat formunu (bazik pH) tayin etmek üzere tasarlandığından dolayı, kalibrasyon doğrusu ve bütün validasyon parametreleri her iki form için de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, ana stok çözülden gerçekleştirilen seyreltmeler lakton formunu elde etmek için pH 3 fosfat tamponunda (PBS), karboksilat formu için ise pH 10,5 fosfat tamponunda (PBS) gerçekleştirilmiştir. Gerekli pH değerindeki tamponlarda seyreltmeler gerçekleştirildikten sonra, CPT'nin ilgili lakton veya karboksilat formuna geçişinin geri dönüşlü bir kimyasal reaksiyon olması sebebiyle ilgili formun dönüşümünün tamamlanması amacıyla, çözeltiler karanlık ortamda ve oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı ile 400 rpm'de 3 saat karıştırılmıştır (215). Hazırlanan farklı konsantrasyonlar, Bölüm 3.3.1.'de belirtilen miktar tayini yöntemi ile tayin edilmiş ve her bir konsantrasyona karşılık gelen pik altı alanlarına karşı kalibrasyon doğrusu çizilmiştir (n=6). Çizilen kalibrasyon doğrularının denklemleri, regresyon analizleri, varyasyon analizleri ve determinasyon katsayısı analizleri gerçekleştirilmiştir.

Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, bilinen bir konsantrasyon aralığında hazırlanan numunede bulunan analit konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak sinyal sonuçlarını elde etme etkinliğidir. CPT'nin lakton ve karboksilat formları için Bölüm 3.3.2.1.'de açıklanan şekilde seyreltilen farklı konsantrasyonlardaki örneklerle gerçekleştirilen analiz sonucunda elde edilen pik alanlarının fonksiyonu olarak çizilen kalibrasyon doğrularından elde edilen kalibrasyon denklemlerinin regresyon katsayıları hesaplanarak yöntemin doğrusallığı değerlendirilmiştir.

Doğruluk

Doğruluk, deneysel olarak elde edilen değerin gerçek değere ne kadar yakın olduğunun ölçüsüdür. Bir analitik yöntemin doğruluğu tayin edilirken, bilinen miktarda bir analitin tayini gerçekleştirilir ve hesaplanan geri kazanımın değeri ile gerçek değer arasındaki fark olarak hesaplanır. Tez çalışmamız kapsamında kullanılacak analitik yöntem için çizilen kalibrasyon doğrusu aralığında hem lakton formu hem de karboksilat formu için üç farklı konsantrasyon (2, 10 ve 20 µg/mL) değerinde hazırlanan analitlerin 6 tekrar olmak üzere analizleri gerçekleştirilmiş ve hesaplanan geri kazanım değerlerinin ortalama, standart sapma (SS) ve % varyasyon katsayıları (VK) hesaplanmıştır.

Kesinlik

Kesinlik, normal deney koşullarında tekrarlanan ölçümler sonunda aynı numunedan alınan sonuçların değişkenliğidir. Kullanılan analitik yöntemin kesinliği üç farklı parametre ile değerlendirilebilir. Bunlar; tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve günler arası farklılıktır. Bütün parametreler için seçilen konsantrasyonda (5µg/mL) 6 tekrarlı ölçüm gerçekleştirilmiştir ve ortalama, standart sapma (SS) ve varyasyon katsayıları hesaplanarak yöntemin kesinliği değerlendirilmiştir.

Tekrar Edilebilirlik

Bu amaçla 5 µg/mL konsantrasyonda örnek içeren (ayrı ayrı lakton ve karboksilat için) çözeltilerin bir örneği için HPLC ile art arda 6 tekrarlı ölçüm yapılmış ve sonuçların ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanmıştır.

Tekrar Elde Edilebilirlik

Bu amaçla CPT'nin lakton ve karboksilat formları için hazırlanan stok çözeltilerden her bir form için ayrı ayrı 6'şar adet 5 µg/mL konsantrasyonda örnek içeren çözelti hazırlanmış ve her bir numune için HPLC ile ölçüm yapılmıştır. Elde edilen sonuçların ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanmıştır.

Günler Arası Farklılık

Günler arası farklılık analizi laboratuvar içi farklılıkların (farklı günler, farklı ekipman vb.) analiz sonuçlarına olan etkisini değerlendirmek üzere gerçekleştirilir. Bu amaçla CPT'nin lakton ve karboksilat formları için ayrı ayrı hazırlanan stok çözeltilerinden 3 gün arayla her gün yeni çözelti hazırlanacak şekilde 5 µg/mL konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmış ve HPLC ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçların, ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanarak yöntemin günler arası farklılık parametresi değerlendirilmiştir.

Bir HPLC metotunda kesinlik parametrelerinin kabul edilebilir sınırlarda olması için % varyasyon değerlerinin 2'den küçük olması beklenmektedir.

Duyarlılık

Yöntemin duyarlılığı iki farklı parametre hesaplanarak değerlendirilmiştir. Bunlar; gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve tayin sınırıdır (LOQ). Gözlenebilirlik sınırı (LOD); bir analitik metotta analitin tespit edilebildiği ancak kantitatif olmayan, bir numunedeki sinyal alınabilen en düşük analit konsantrasyonunu ifade etmektedir. Tayin sınırı (LOQ); bir analitik metotta analitin kantitatif olarak hassasiyetle tespit edilebildiği en düşük konsantrasyondur. Kullandığımız analitik yöntemin duyarlılığını tespit etmek amacıyla, kalibrasyon doğrusunda en düşük konsantrasyon olan 2 µg/mL'lik numune çözeltilerinin HPLC spektrumundaki sinyal/gürültü oranları belirlenmiştir. Sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon gözlenebilirlik sınırı (LOD), 10 olduğu konsantrasyon ise tayin sınırı (LOQ) olarak tespit edilmiştir.

Özgüllük

Bir analitik metotun özgüllüğü, deneysel süreçlerde numune içeriklerinde bulunması muhtemel herhangi bir bileşenin varlığında da analit sinyalinin herhangi bir girişime uğramadan doğru olarak ölçülebilmesinin ifadesidir. Analitik yöntemlerin özgüllüğü, çalışma kapsamında kullanılması muhtemel diğer bileşenlerin de analitik metot ile tespit ve ölçümünün yapılarak analit piki ile herhangi bir girişim yapıp yapmadığının değerlendirilmesi ile gerçekleştirilir.

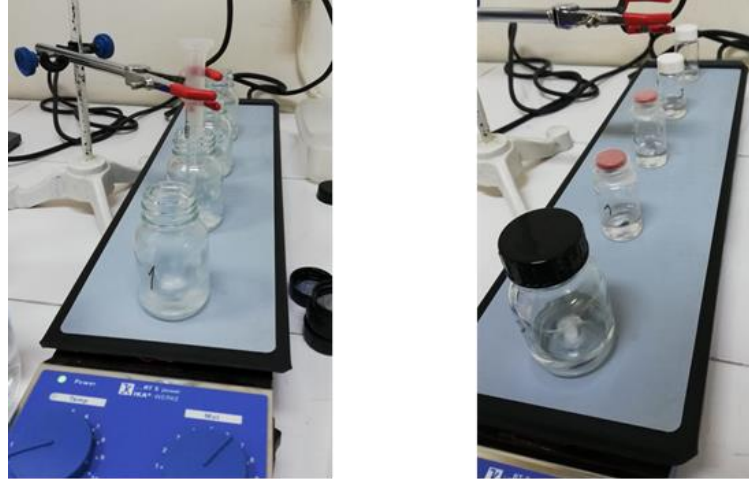
Bu amaçla, tez çalışmamızda kullanılacak olan; Dimetilsülfoksit (DMSO), Kitosan (CS), Polietilenimin (PEI) ve nanopartikül materyalimiz olan iki farklı CD türeviden oluşan (6-O-CAPRO- β -CD) ve (Poly- β -CD-C6) için analitik metot ile analizler gerçekleştirilmiş ve her biri için pik zamanları tayin edilerek CPT'nin lakton ve karboksilat formlarının pikleri ile herhangi bir girişim olup olmadığı değerlendirilmiştir.

3.4. Önformülasyon Çalışmaları ve Nanopartiküllerin Hazırlanması

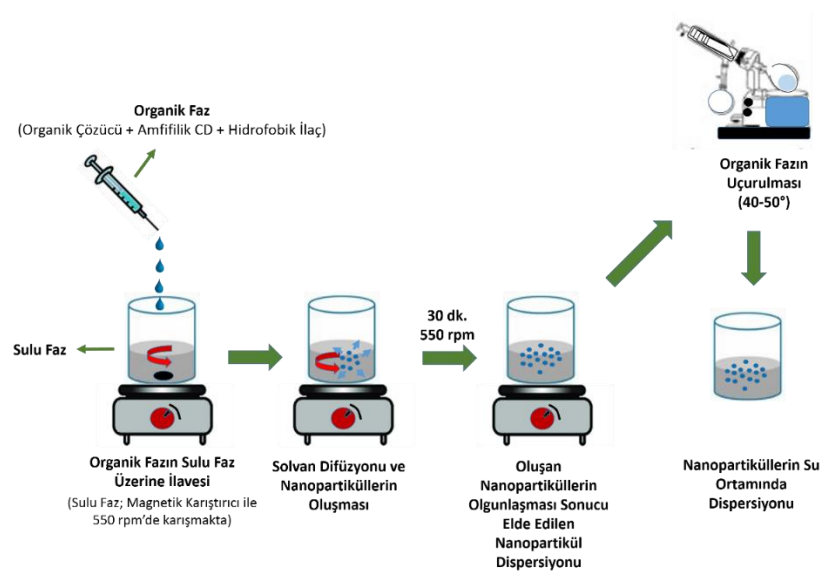
Önformülasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesinin amacı nanopartikül oluşturma yöntemi olarak seçilen nanoçöktürme metodunda kullanılan formülasyon parametrelerinin, elde edilecek nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü dağılımı, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelleri üzerindeki etkilerini belirleyerek optimum yöntem parametrelerinin tespit edilmesini sağlamaktır. Bu amaçla, ilaç yüklü olmayan boş amfifilik siklodekstrin ((6-O-CAPRO- β -CD) ve (Poly- β -CD-C6)) nanopartikülleri hazırlanmış ve nanoçöktürme metodunda kullanılan organik faz (aseton, etanol), amfifilik CD konsantrasyonu (%0,05, %0,1, %0,5 (a/h)), non-iyonik yapı ve negatif yüzey yüküne sahip (6-O-CAPRO- β -CD) ile elde edilen nanopartiküllere pozitif yüzey yükü kazandırmak amacıyla kullanılan kaplama materyali olan polimerlerin türü (Kitosan ve Polietilenimin) ve konsantrasyonları (Kitosan; %0,01, %0,025, %0,05 (a/h), Polietilenimin; %2,5, %5, %10 (a/h)) formülasyon değişkenleri olarak belirlenmiştir. Belirlenen parametrelere ilişkin değişken değerleri önceki çalışmalardan elde verilerden hareketle tespit edilmiştir (1, 45, 147, 217-219).

Nanopartiküller nanoçöktürme yöntemi ile elde edilmiştir (220, 221). Nanopartiküllerin hazırlanmasında temel alınan yöntemin esasını, amfifilik CD türevinin ve etkin maddenin organik çözücü içerisinde çözünmesinin ardından elde edilen organik fazın oda sıcaklığında, damla damla, magnetik karıştırıcı ile karıştırmaya olan sulu faz üzerine ilavesi edilmesi oluşturmaktadır (Şekil 3.1.) . Bu esnada, solvan difüzyonu prensibiyle Marangoni etkisi ile spontan olarak oluşan nanopartiküllerin olgunlaşması için magnetik karıştırmanın 30 dk. sürecinde devam etmesi ve

sonrasında organik çözücünün uçurularak, nanopartiküllerin sulu bir dispersiyonu elde edilmektedir (222, 223). Kullanılan nanoçöktürme metoduna ilişkin aşamalar Şekil 3.2.'de özetlenmiştir. Formülasyon parametreleri ve değişkenleri topluca Tablo 3.1.'de açıklanmıştır.



Şekil 3.1. Nanoçöktürme yöntemi ile organik fazın sulu faza ilave edilerek nanopartiküllerin oluşması işlemi (Organik faz; aseton veya etanol, Sulu faz; ultrasaf su, katyonik kaplı formülasyonlar için ise kaplama polimerinin sulu çözeltisi).



Şekil 3.2. Nanoçöktürme yöntemine ilişkin sürecin özeti.

Tablo 3.1. Önformülasyon çalışmaları kapsamında değerlendirilen değişkenler.

Formülasyon Parametresi		Değişkenler
Siklodekstrin Türü		(6-O-Capro β -CD) (Poly- β -CDC6)
Siklodekstrin Konsantrasyonu	(6-O-Capro β -CD)	%0,05, %0,1, %0,5 (a/h)
	(Poly- β -CD-C6)	%0,05, %0,1, %0,5 (a/h)
Organik Faz		Aseton, Etanol
Kaplama Materyali Polimer	Kitosan	%0,01, %0,025, %0,05 (a/h)
	Polietilenimin	%2,5, %5, %10 (a/h)

Nanopartikül eldesi amacıyla Tablo 3.1.'de açıklanan her bir formülasyon parametresi ve değişkeni çalışılırken ilgili parametre ve değişkenin farklı değerleri için temel formülasyon parametreleri olarak; organik faz:sulu faz oranı 1:2, CD konsantrasyonu %0,1 (a/h), kitosan konsantrasyonu %0,025 % (a/h), polietilenimin konsantrasyonu %5 (a/h) olarak çalışılmıştır.

Nanoçöktürme yöntemiyle nanoküre eldesi için, organik faz, 1 mg amfifilik CD'nin ((6-O-CAPRO- β -CD) veya (Poly- β -CD-C6)) 1 mL organik faz içerisinde (aseton veya etanol) magnetik karıştırıcı ile 600 rpm'de 30 dk. karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Bu çözelti, magnetik karıştırıcıda 600 rpm'de karışmakta olan 2 mL ultrasaf sudan (katyonik kaplama materyali olarak kitosan veya polietilenimin içeren veya içermeyen) oluşan su faz üzerine ependorf enjektörü yardımıyla damla damla ilave edilmiş ve nanopartiküllerin oluşması sağlanmıştır. Oluşan nanopartiküllerin olgunlaşması için bu karışım 30 dk. daha karıştırılmaya devam edilmiştir. Daha sonra organik faz rotavapor yardımıyla (40-50°C) uzaklaştırılarak, sulu nanopartikül dispersiyonu elde edilmiştir. Non-iyonik özellikteki ve sulu çözeltileri negatif yüzey

yüküne sahip (6-O-CAPRO- β -CD) türevlerinden elde edilen nanopartiküllerden pozitif yüzey yüküne sahip formülasyonların elde edilmesi amacıyla kullanılan kitosan ve polietilenimin polimerleri de, belirlenen miktarda sulu faza ilave edilmek suretiyle formülasyona dahil edilmişlerdir.

Önformülasyon çalışmaları kapsamında, farklı formülasyon parametreleri ve değişkenleri çalışılmak suretiyle Tablo 3.2.'de belirtilen dört farklı nanopartikül formülasyonu elde edilerek, her bir parametre değişkeni kapsamında elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2. Tez çalışması kapsamında elde edilen amfifilik siklodekstrin nanopartikül formülasyonları.

Elde Edilen Nanoküre Formülasyonları		
Yüzey Yükü	Kaplama Polimeri	Nanopartikül
Anyonik	-	(6-O-Capro β -CD)
Katyonik	Kitosan (CS)	CS-(6-O-Capro β -CD)
Katyonik	Polietilenimin (PEI)	PEI-(6-O-Capro β -CD)
Katyonik	-	(Poly- β -CD-C6)

3.4.1. Kamptotesin Yüklü Amfifilik Siklodekstrin Nanopartiküllerinin Eldesi

Model ilaç CPT yüklü amfifilik CD nanopartiküllerinin eldesi Bölüm 3.4.'de açıklanan boş nanopartiküllerin elde edilmesi için uygulanan nanoçöktürme yönteminde formülasyona organik fazda CPT'nin çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. Bu amaçla; nanoçöktürme yöntemiyle CPT yüklü amfifilik CD nanopartiküllerinin eldesinde, organik faz; 1 mg amfifilik CD ((6-O-CAPRO- β -CD) veya (Poly- β -CD-C6)) ve 0,1 mg CPT'nin 1 mL organik faz içinde magnetik karıştırıcı ile 600 rpm'de 30 dk.

karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Bu çözelti, magnetik karıştırıcıda 600 rpm'de karışmakta olan 2 mL ultrasaf sudan (katyonik kaplama materyali olarak kitosan veya polietilenimin içeren veya içermeyen) oluşan su fazı üzerine ependorf enjektörü yardımıyla damla damla ilave edilmiş ve nanopartiküllerin oluşması sağlanmıştır. Oluşan nanopartiküllerin olgunlaşması için bu karışım 30.dk süresince daha karıştırılmaya devam edilmiştir. Daha sonra organik faz rotavapor yardımıyla (40-50°C) uzaklaştırılarak, etkin madde CPT yüklü amfifilik CD nanopartiküllerinin 1 mL sulu dispersiyonu elde edilmiştir.

3.5. Nanopartiküllerin in vitro Karakterizasyonu

3.5.1. Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı Tayini

Elde edilen amfifilik CD nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü (OPB) ve polidispersite indeksleri (PDI) tayini için Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılmıştır. Ölçümler, cihazın çalışma prensibi olan dinamik ışık saçılımı esasına dayanarak nanopartikül dispersiyonundaki Brown hareketlerinin analizine göre 173° açı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi ölçümleri her bir formülasyon için 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. Zeta Potansiyeli Tayini

Nanopartiküllerin yüzey yükünün bir göstergesi olan ve hem stabilitelerini hem de fizyolojik ortamda nanopartiküllerin davranışları ve hücresel etkileşimleri üzerinde önemli etkileri olduğu bilinen zeta potansiyel (ZP) ölçümleri Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile gerçekleştirilmiştir (108). Ölçümler oda sıcaklığında, 12,8° açı ile ve her bir formülasyon için 3 tekrarlı olacak şekilde tek kullanımlık kapiller hücreler kullanılarak ölçülmüştür.

3.5.3. Nanopartiküllerin Morfolojilerinin İncelenmesi

Elde edilen nanopartiküllerin yüzey özellikleri ve morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) yöntemi ile incelenmiştir. Liyofilize toz haldeki örnekler incelemenin hemen öncesinde 100 Å kalınlığında altın-palladyum alaşımı ile

kaplanarak yüzey yükünün görüntüleme esnasında engel teşkil etmeyecek seviyelere indirilmesi amaçlanmıştır ve hazırlanan örneklerin ZEISS LS-10 Life Science Taramalı Elektron Mikroskobu cihazı ile EHT=25.00 kV (elektron yüksek gerilimi) değerinde görüntülemeleri gerçekleştirilmiştir.

3.5.4. Enkapsülasyonun Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Amfifilik CD nanopartikülleri için etkin madde CPT'nin yükleme etkinliği valide edilmiş HPLC metodu ile direkt yöntemle tayin edilmiştir. Bu amaçla, nanopartiküller elde edildikten sonra, nanopartikül oluşturmayan fazla amfifilik CD ve enkapsüle edilmeyen fazla ilaç, 3500 rpm'de 15 dk santrifüjleme sonucu ortamdaki uzaklaştırılmış ve ilaç yüklü nanopartikülleri içeren süpernatant ayrılarak sulu nanopartikül dispersiyonu elde edilmiştir. Süpernatant dondurulmuş ve sonrasında 24 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon sonrası elde edilen kuru toz haldeki nanopartiküller 4 mL diklorometan:dimetilsülfoksit (DCM:DMSO) (1:1) karışımında çözülerek serbest hale geçen CPT miktarı Bölüm 3.3.1.'de açıklanan valide edilmiş HPLC metodu ile direkt olarak tayin edilmiştir. Her bir nanopartikül formülasyonu için % Yükleme Etkinliğinin hesaplanmasında Eşitlik 3.1., % Yükleme Kapasitesinin hesaplanmasında Eşitlik 3.2. kullanılmıştır (217).

$$\% \text{ *Enkapsülasyon Etkinliği* } = \frac{\text{Enkapsüle ilaç miktarı } (\mu\text{g})}{\text{Kullanılan toplam ilaç miktarı } (\mu\text{g})} \times 100 \quad (3.1.)$$

$$\% \text{ *Yükleme Kapasitesi* } = \frac{\text{Enkapsüle ilaç miktarı } (\mu\text{g})}{\text{Kullanılan polimer miktarı } (\mu\text{g})} \times 100 \quad (3.2.)$$

Eşitlikte belirtilen; "*Enkapsüle ilaç miktarı* (μg)" ifadesi, liyofilizasyon sonrası elde edilen kuru toz haldeki nanopartiküllerin çözünmesi sonucu serbest hale gelen enkapsüle haldeki CPT'nin HPLC ile analiz edilmesiyle bulunan miktarı, "*Kullanılan toplam ilaç miktarı* (μg)" ifadesi, nanopartikül eldesinde formülasyona başlangıçta ilave edilen toplam CPT miktarını, "*Kullanılan polimer miktarı* (μg)" ifadesi ise nanopartikül eldesinde kullanılan toplam polimer miktarını ifade etmektedir.

3.5.5. *In vitro* Salım Çalışmaları

Elde edilen CPT yüklü amfifilik CD nanopartiküllerinden etkin madde CPT'nin salım profilinin tayini amacıyla *in vitro* salım deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler 37°C'de, yatay çalkalayıcı su banyosunda (100 rpm) diyaliz membran (MwCO:14.000 Da) kullanılarak CPT için sink koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

Fizyolojik koşulları taklit edebilmek amacıyla belirlenen salım ortamları, oral olarak uygulanan nanopartiküllerin kolon bölgesine ulaşana kadar karşılaacağı fizyolojik koşulları temsil etmesi amacıyla; sırasıyla simüle gastrik sıvı (pH=1,2), simüle intestinal sıvı (pH=4,5) ve simüle kolonik sıvı (pH=7,4) olarak tasarlanmıştır. Bu amaçla, üç farklı salım ortamı her bir formülasyon için ayrı ayrı hazırlanmıştır. Fizyolojik koşulları yeterince taklit edebilmek amacıyla, nanopartiküller her bir simüle sıvıda geçireceği tahmini zamana uygun olarak ilgili salım ortamında bulundurulmuş ve süresinin dolmasının ardından diyaliz membranlar sıradaki simüle sıvıya taşınarak deney devam ettirilmiştir. Salım deneyleri süresince diyaliz membran içerisindeki nanopartiküllerin salım profilleri, simüle gastrik sıvıda (pH=1,2) 2. saate, simüle intestinal sıvıda (pH=4,5) 5. saate, simüle kolonik sıvıda (pH=7,4) ise 24. saate kadar tayin edilmiştir. Bu amaçla; 3 mL nanopartikül dispersiyonu salım ortamını teşkil eden 20 mL simüle sıvı içine tatbik edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0,5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 24. saat) 500µL örnek alınmış ve salım ortamına aynı miktarda taze salım ortamı eklenmiştir. Örnek alınan her bir zaman noktası için salınan kümülatif % CPT miktarı Bölüm 3.1.'de açıklanan valide HPLC metodu ile tayin edilmiş ve CPT'nin nanopartiküllerden salım profilleri tespit edilmiştir (224).

3.5.6. Gastrointestinal Simüle Sıvılarda Stabilitate Çalışmaları

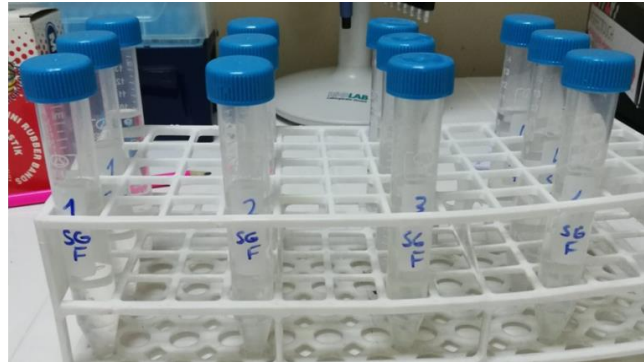
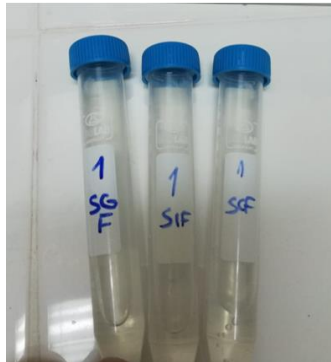
Oral yoldan uygulanmak üzere ve kolona ulaşması hedeflenen nanopartiküllerin stabilitelerine ilişkin karşılaşılabilecekleri en önemli engellerin başında gastrointestinal kanal kaynaklı fizikokimyasal ortam gelmektedir. Bu çerçevede, oral yolla uygulanmak amacıyla tasarlanan nanopartiküllerin temas edecekleri biyolojik ortamları taklit eden simüle gastrointestinal sıvılarda fiziksel stabilitelerinin değerlendirilmesi ve nanopartiküllerin kritik karakteristik özellikleri üzerindeki

etkilerinin tayin edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla, nanopartiküllerin gastrointestinal kanalın farklı segmentlerinde geçirecekleri sürelerde göz önüne alınarak ilgili fizyolojik koşulları taklit eden simüle ortamlarda (simüle mide sıvısı, simüle intestinal sıvı ve simüle kolon sıvısı) inkübe edilip partikül büyüklükleri, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyel değerleri üzerindeki etkisi incelenmiştir (225, 226).

Çalışma kapsamında, elde edilen ilaç yüklü nanopartikül dispersiyonları simüle gastrik sıvı (SGF) pH 1,2'de 2 saat, simüle intestinal sıvı (SIF) pH 4,5'de 3 saat, simüle kolon sıvısı (SCF) pH 7,4'de 8 saat inkübe edilmiştir. Simüle sıvılarda stabilite çalışmaları gerçekleştirilirken, 1 mL nanopartikül dispersiyonu 9 mL simüle sıvı içerisinde belirtilen sürelerde ve ortamlarda inkübe edilmiştir (Şekil 3.3.). İnkübasyon öncesi ve sonrası nanopartiküllere ait OPB, PDI ve ZP değerleri incelenmiştir.

Simüle sıvı bileşimleri aşağıda açıklanmıştır;

- Simüle gastrik sıvı (SGF) pH 1,2 (1000 mL) için; 2000 mg NaCl ve 7 mL HCl,
- Simüle intestinal sıvı (SIF) pH 4,5 (1000 mL) için; 6800 mg monobazik potasyum fosfat ve 869 mg NaOH,
- Simüle kolon sıvısı (SCF) pH 7,4 (1000 mL) için ise; 200 mg Potasyum klorür, 8000 mg sodyum klorür, 240 mg monobazik potasyum fosfat ve 144 mg dibazik sodyum fosfat içerek şekilde hazırlanmıştır (147, 227, 228).



Şekil 3.3. Hazırlanan nanopartiküllerin gastrointestinal simüle sıvılarda stabilite değerlendirmesi amacıyla inkübe edilmeleri işlemi.

3.5.7. İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Zamana Bağlı Fiziksel Stabilité Çalışmaları

CPT yüklü amfifilik CD nanopartiküllerinin zamana bağı kısa süreli fiziksel stabilite çalışması kapsamında, hazırlanan nanopartikül formülasyonları sulu dispersiyon olarak saklanmış ve belirli zaman aralıklarında (0., 1., 7., 14. ve 30. günlerde) örnekler alınmıştır. Alınan örneklerden nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri Bölüm 3.4.'te açıklandığı şekilde tayin edilmiştir. Kısa süreli stabilite çalışmaları süresince örnekler +4°C'de ve ışıktan etkilenmeyecek şekilde saklanmıştır.

3.6. Mukus ile Etkileşim Çalışmaları

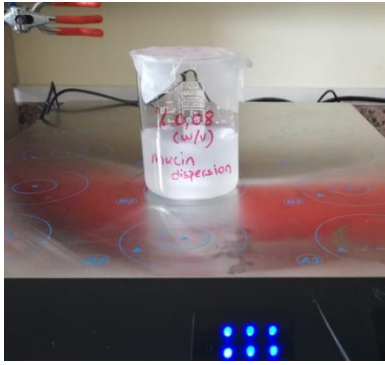
Oral yoldan uygulanan ve fiziksel olarak intestinal lümene kadar ulaşabilen nanopartiküllerin etki gösterebilmesi için bu noktadan sonra müsün tabakası ile etkileşebilmesi, müsün varlığında kritik kalite parametrelerini koruyabilmesi ve ardından mukus tabakasına penetre olabilmesi gerekmektedir (78, 229). Bu amaçla, tez çalışması kapsamında elde edilen nanopartiküllerin müsünle etkileşimleri ve mukus tabakasına penetrasyonları değerlendirilmiştir. Müsünle etkileşim çalışmaları kapsamında öncelikle türbidimetrik analiz ile nanopartikül-müsün sıvısı etkileşimi değerlendirilmiştir. Sonrasında ise müsün varlığında nanopartiküllerin kritik kalite parametreleri parametleri değerlendirilmiştir.

3.6.1 Türbidimetrik Tayin

Müsün ile CPT yüklü amfifilik CD nanopartiküllerinin etkileşimleri ve nanopartiküllerin mukoadezif özelliklerinin değerlendirilmesi, spektrofotometrik olarak 650 nm'de gerçekleştirilen türbidite ölçümü yöntemiyle değerlendirilmiştir (230). Deneyin esasını müsün çözeltisinin 650 nm'de verdiği absorbansın referans kabul edilerek, nanopartiküllerin sulu dispersiyonu ile müsün çözeltisine karıştırılmış dispersionunun verdiği absorbansın tayin edilmesi oluşturmaktadır (231).

Öncelikle müsün çözeltisi (%0,08 a/h) hazırlanmıştır. Bu amaçla 80 mg müsün 100 mL ultrasaf su ile çözelti oluşturmak üzere 12 saat süresince manyetik karıştırıcı

ile karıştırılmıştır. Ardından, 7500 rpm'de 20 dk. santrifüjlenerek müsinin fazlası uzaklaştırılmış ve müsin içeren çözelti elde edilmiştir. Müsin çözeltisi ile hazırlanmış olan CPT içeren amfifilik CD nanopartikül dispersiyonları, 1:4 (müsin çözeltisi:nanopartikül dispersiyonu) oranında karıştırılmış ve 1 dk. vortekslenmiştir (Şekil 3.4.). Elde edilen müsin-nanopartikül karışımları ve nanopartiküllerin sulu dispersiyonları 37°C'de inkübe edilerek belirli zaman noktalarında (0., 30., 60. ve 120. dk.) 650 nm'de turbidimetrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5.). Bütün ölçümler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.



Şekil 3.4. Müsinle etkileşim çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen turbidimetrik tayin analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla müsin dispersiyonu hazırlanması işlemi.



Şekil 3.5. Müsinle etkileşim çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen turbidimetrik tayin analizlerinin spektrofotometre cihazı ile gerçekleştirilmesi süreci.

3.6.2. Nanopartiküllerin Mukus Varlığında in vitro Karakterizasyonu

Elde edilen nanopartiküllerin mukoadezif özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla türbidimetrik olarak gerçekleştirilen müsin çözeltisi-nanopartikül dispersiyonu etkileşim çalışmalarının ardından, mukus varlığında nanopartiküllerin fiziksel stabilitesinin değerlendirilebilmesi çalışması gerçekleştirilmiştir.

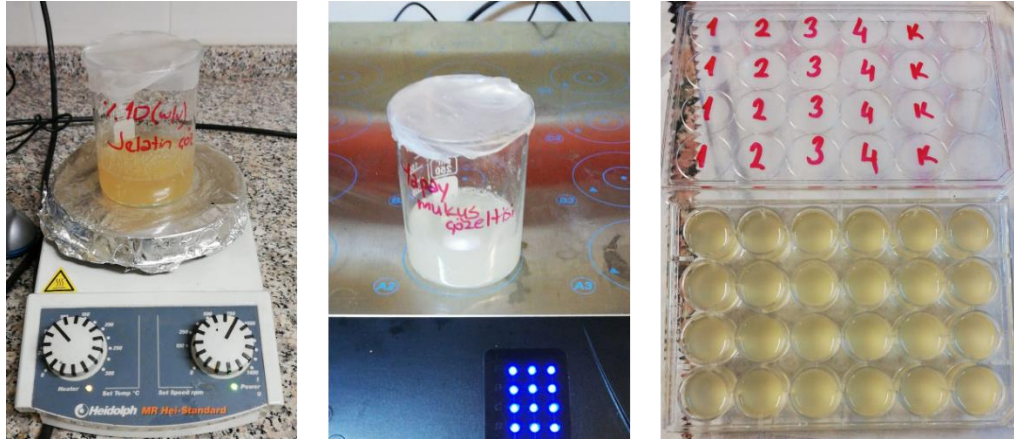
Bu amaçla Bölüm 3.4.1.'de açıklandığı şekilde hazırlanan CPT yüklü amfifilik CD nanopartikül dispersiyonları ile Bölüm 3.6.1.'de açıklandığı şekilde hazırlanan müsin çözeltisi, 1:4 (müsin çözeltisi:nanopartikül dispersiyonu) oranında karıştırılmış ve 1 dk. vortekslenmiştir. Ardından belirli zaman noktalarında elde edilen karışımların; ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri Bölüm 3.5.1. ve Bölüm 3.5.2'de açıklanan şekilde Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile ölçülmüştür. Elde edilen veriler ile nanopartiküllerin sulu dispersiyon halindeki karakterizasyon parametreleri ile müsin çözeltisi karışımındaki parametreleri ve zamana göre değişimleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bütün ölçümler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.7. Yapay Mukus Tabakasına Penetrasyon Çalışmaları

CPT yüklü amfifilik CD nanopartiküllerinin intestinal lümendeki mukus tabakasına penetrasyon özelliklerini değerlendirebilmek amacıyla yapay mukus tabakası modelinden yararlanılmıştır (230). Deneyin esasını teşkil eden jelatin tabakası ve bu tabakanın üzerindeki yapay mukus karışımının hazırlanmasına ilişkin detaylar aşağıda verilmiştir.

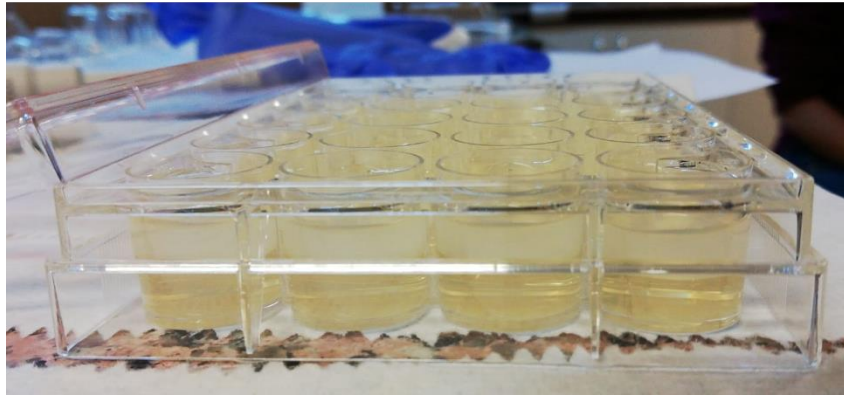
Bu amaçla öncelikle, 50 mL ultrasaf su içerisinde 60°C'de ısıtıcı manyetik karıştırıcı ile %10 (a/h) oranında jelatin çözeltisi hazırlanarak, deney modelindeki jelatin tabakasını oluşturmak üzere 24'lü hücre plaklarına her bir kuyucuğa 1 mL olacak şekilde konulmuş ve oda sıcaklığında jelatin çözeltisinin soğuyarak sertleşmesi sağlanmıştır (Şekil 3.6.). Yapay mukus çözeltisi ise 50 mL ultrasaf su içerisine; 250 mg müsin, 0,295 mg dietilentriaminpentaasetik asit (DTPA), 250 mg NaCl, 110 mg KCl, 250 µL steril yumurta sarısı emülsiyonu ve 1 mL RPMI besi yeri ilavesiyle ve oda sıcaklığında manyetik karıştırma ile hazırlanmıştır. Hazırlanan yapay mukus çözeltisi,

daha önceden 24'lü hücre plaklarına konulan ve oda sıcaklığında sertleşmeye bırakılan jelatin tabakası üzerine her bir kuyucağa 1 mL olacak şekilde ilave edilmiştir. Yapay mukus çözeltisinin, jelatin tabakası üzerine ilave edilmesiyle deneyin gerçekleştirileceği yapay mukus tabakası modelinin hazırlanması tamamlanmıştır.



Şekil 3.6. Yapay mukus tabakasına penetrasyon çalışması aşamaları.

CPT yüklü amfifilik CD nanopartikülü dispersiyonlarından her bir formülasyon için 500 μ L ve 3 tekrarlı olacak şekilde 24'lü hücre plakasındaki yapay mukus tabakası modelinde kuyucuklara eklenmiştir ve 24 saat süresince oda sıcaklığı koşullarında inkübe edilmiştir (Şekil 3.7.). 24 saatin sonunda, her bir kuyucuktaki yapay mukus karışımı ortamdan uzaklaştırılmıştır. Altta jelatin tabakası ultrasaf su ile yıkanmış (2 mL x 6 kez) ve ardından 60°C'ye ısıtılarak katı haldeki jelatinin tekrar daha az viskoz akışkan bir hale gelmesi sağlanmıştır. Ardından 6000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant alınmıştır. Süpernatant içindeki CPT miktarı Bölüm 3.3.1.'de açıklanan valide HPLC yöntemi ile aktif lakton, inaktif karboksilat formu ve toplam CPT miktarı da hesaplanacak şekilde analiz gerçekleştirilmiştir. Böylece, gerçekleştirilen yapay mukus tabakası modeli deneyi ile jelatin tabakası üzerinde bulunan mukus karışımına ilave edilmiş nanopartikül dispersiyonlarının, öncelikle mukus tabakasını aşip ardından da jelatin tabakasına ulaşarak penetre olabilme yetenekleri, jelatin tabakası içine taşınabilen total ve stabil CPT miktarının tayini ile değerlendirilmiştir.



Şekil 3.7. Yapay mukus tabakasına penetrasyon çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin uygulanmasının ardından inkübasyon süreci.

3.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

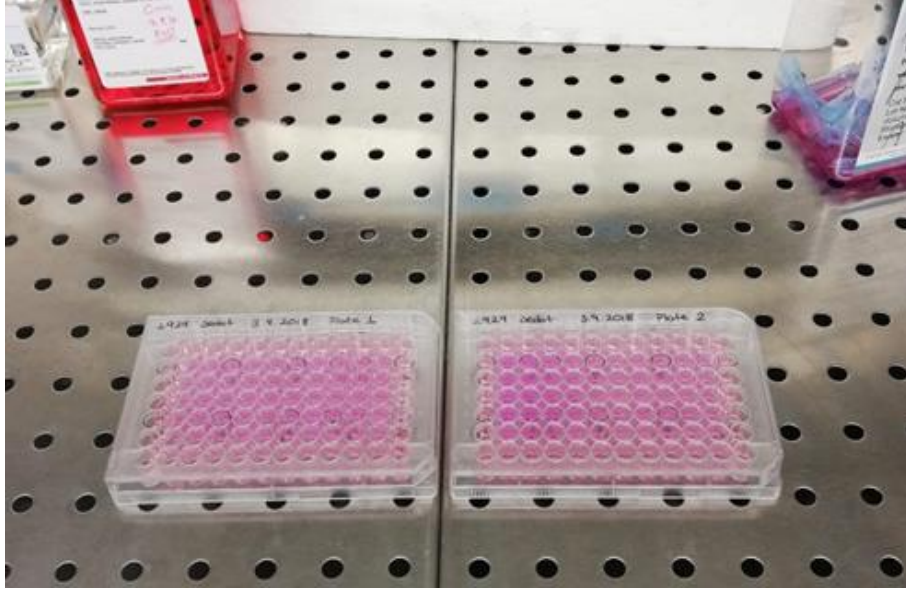
Tez çalışması kapsamında hazırlanan, etkin madde CPT enkapsüle ve boş amfifilik CD nanopartiküllerinin çeşitli sağlıklı ve kanser hücre hatları üzerinde etkileri *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Bu kapsamda; sağlıklı fare fibroblast hücre hattında (L929) güvenlilik, insan kolon karsinoma hücre hattında (HT-29) antikanser etkinlik, insan kolon karsinoma hücre hattı olan ve intestinal permeabilite değerlendirme çalışmalarında sıklıkla kullanılan (CaCo-2) hücre hattında permeabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. Güvenlilik Çalışmaları: Boş Nanopartiküllerin L929 Hücreleri Üzerinde Sitotoksitesinin Araştırılması

İlaç yüklü olmayan boş nanokürelerin sitotoksitesileri L929 fare fibroblast hücre hattında değerlendirilmiştir. Bu yöntem, insana uygulanmak üzere tasarlanan polimerik maddelerin biyolojik aktivitesini, güvenliğini ve sağlıklı hücreler üzerinde olumsuz etkisi olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla Amerikan Farmakopesinde (USP-29) önerilen standart tayin yöntemi olarak boş nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksitesini tayin etmek amacıyla sıklıkla kullanılan bir metottur.

L929 hücreleri %10 fetal bovine serum (FBS) , penisilin (100 unite/mL) ve streptomisin (100 µg/mL) içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ortamında 25 cm²'lik flasklarda çoğaltılmıştır. Ardından 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 100 µL DMEM içinde 5000 hücre ekilmiştir. 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda, kuyucuklardaki ortamlar farklı seyreltme oranlarında (1:16, 1:32, 1:64 ve 1:128) boş nanoküre içeren taze ortamlar ile değiştirilmiştir. 48 saat inkübasyonun ardından her bir kuyucuğa, PBS ortamındaki (5 mg/mL) 25µL MTT ilave edilmiş ve 4 saat inkübe edilmiştir. 4 saatin sonunda oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için her bir kuyucuğa 200 µL DMSO ilave edilmiştir. Optik dansite 450 nm'de plaka okuyucu ile okunmuştur. Kontrol grubu olarak yalnızca hücre ortamı olan DMEM ile inkübe edilmiş olan kuyucuklar değerlendirilmiş ve nanopartiküllerin uygulandığı hücrelerde % hücre canlılığı Eşitlik 3.3'de belirtildiği şekilde hesaplanmıştır (45);

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Nanopartikül uygulanan hücrelerin optik dansitesi}}{\text{Nanopartikül uygulanmayan (kontrol) hücrelerin optik dansitesi}} \times 100 \quad (3.3.)$$



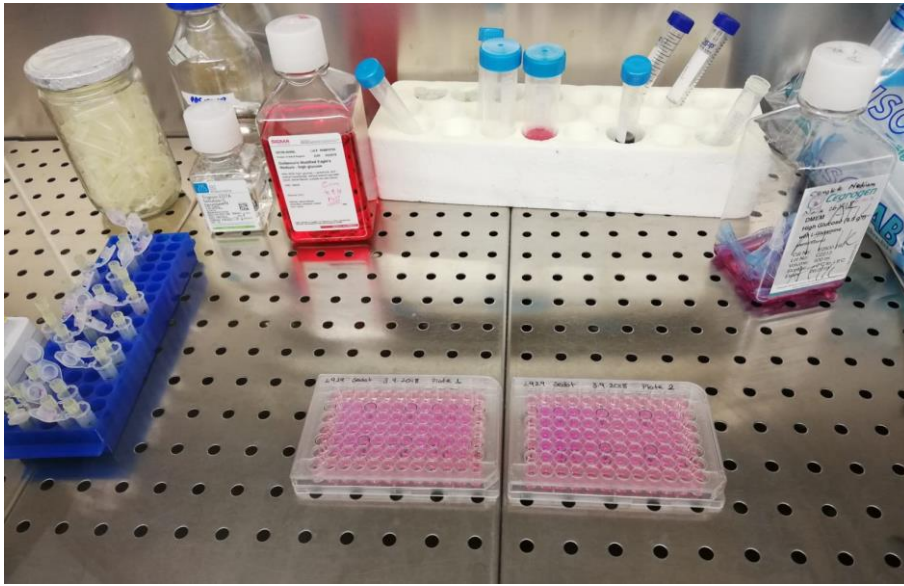
Şekil 3.8. L929 Hücrelerinin 96 kuyucuklu hücre plağında kuyucuklara tutunmaları amacıyla 24 saatlik inkübasyona bırakılmaları öncesi hücrelerin ekim işlemi.



Şekil 3.9. Deney kapsamında kullanılacak nanopartikül dispersiyonlarının seyreltme işlemlerinin gerçekleştirilmesi.



Şekil 3.10. Nanopartiküllerin hücelere uygulanması işlemi.



Şekil 3.11. Seyreltilmiş olan nanopartiküllerin hücelere uygulandıktan sonra 48 saat inkübasyon öncesi son hali.

3.8.2. Antikanser Etkinlik Çalışmaları; Kamptotesin Yüklü Nanopartiküllerin HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksitenin Araştırılması

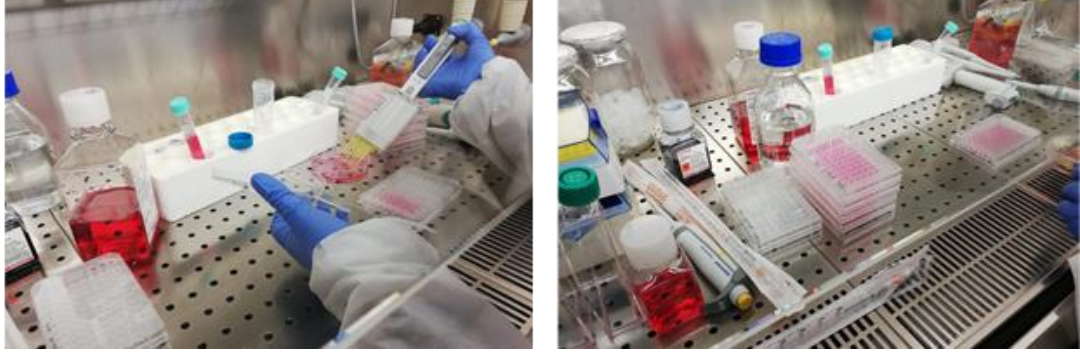
CPT yüklü ve boş amfifilik CD nanopartiküllerinin *in vitro* etkinlik testi HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı üzerinde, ilaç yüklü nanopartiküllerin etkinliğinin eşdeğer miktarlardaki ilaç çözeltisi ile 4 farklı konsantrasyonda ve 2 farklı inkübasyon süresi sonunda karşılaştırılmasını amaçlayan bir hücre kültürü çalışma tasarımı ile WST-1 boyama yöntemiyle belirlenmiştir (232).

HT-29 hücreleri üremeleri için 25 cm²'lik flasklar içinde DMEM besiyeri varlığında 37°C'de % 5 CO₂'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Yeterli sayıda hücre ürettiğinde flask içindeki besiyeri uzaklaştırılarak, PBS ile yıkanmıştır. Ardından tripsinizasyon işlemi uygulanmıştır. Flask içine 3 ml tripsin-EDTA ilave edildikten sonra hücreler 2-3 dakika inkübe edilmiştir. Ardından yüzeyden ayrılan hücelere besiyeri ilave edilerek 2000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası besiyeri ortamdaki uzaklaştırılmıştır ve hücrelerin tripan mavisi ile sayımı gerçekleştirilmiştir. HT-29 hücrelerinin, 96 kuyucuklu doku kültür plaklarına her bir kuyuya 1x10⁴ hücre/100µL olacak şekilde ekimi yapılmış ve hücrelerin kuyucuklara tutunması amacıyla 24 saat inkübe edilmiştir.

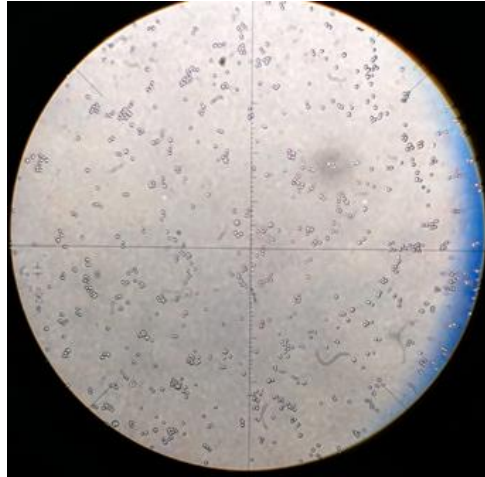
Hazırlanan ilaç yüklü ve boş nanoküre formülasyonları besiyeri ile 4 farklı konsantrasyonda (0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1 µg/mL) CPT'ne eşdeğer miktarda olacak şekilde seyreltilerek her bir kuyucuğa 100 µL eklenmiştir. Deney tasarımı iki tekrar şeklinde planlanarak; iki farklı inkübasyon süresi (48 saat-72 saat) için çalışılmıştır. Aynı şartlarda sadece kültür ortamı ile ve %1 DMSO içeren kültür ortamı ile inkübe edilen HT-29 hücreleri kontrol olarak kullanılmıştır.

48 saatlik ve 72 inkübasyon sonrası her bir kuyucuğa 10 µL WST-1 (suda çözünabilir tetrazolyum tuzu) eklenmiştir. Boyama işlemi sonrası hücreler yaklaşık 3-4 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra hücre plaka okuyucu ile kolorimetrik olarak 450 nm'de absorbans değerleri okunmuş ve kontrol grubuna karşı % hücre yaşayabilirlikleri hesaplanmıştır. Deney prosedürü ve hesaplamalar sonunda bulunan % hücre canlılıkları ışığında, eşdeğer miktarlarda CPT taşıyan nanopartiküller gerek kendi içlerinde gerekse aynı miktar CPT çözeltisi ile karşılaştırılmıştır.

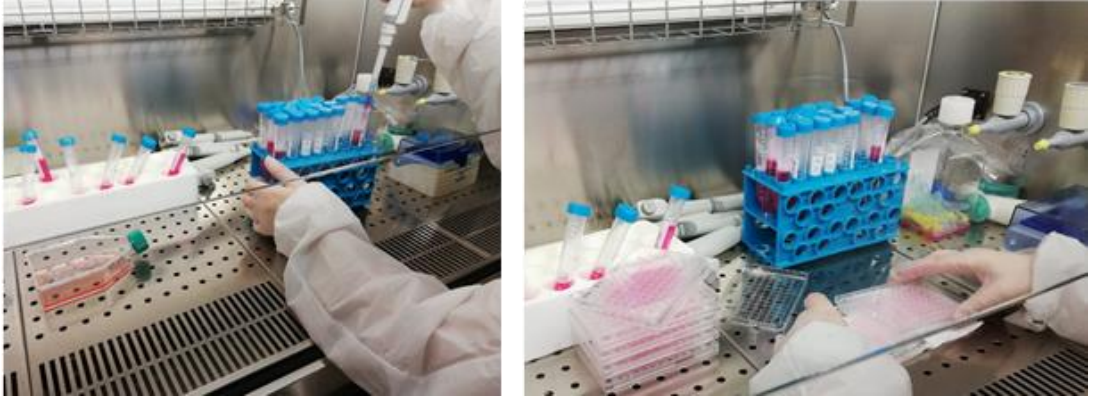
Deney kapsamında, 4 farklı konsantrasyonda (0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve 2 farklı inkübasyon süresi (48 saat-72 saat) sonunda formülasyonların ilaç çözeltisine karşı % hücre yaşayabilirliği üzerine etkileri hem zamanın, hem de konsantrasyonun etkileri de gözlemlenerek farklı nanopartikül formülasyonları için değerlendirilmiştir.



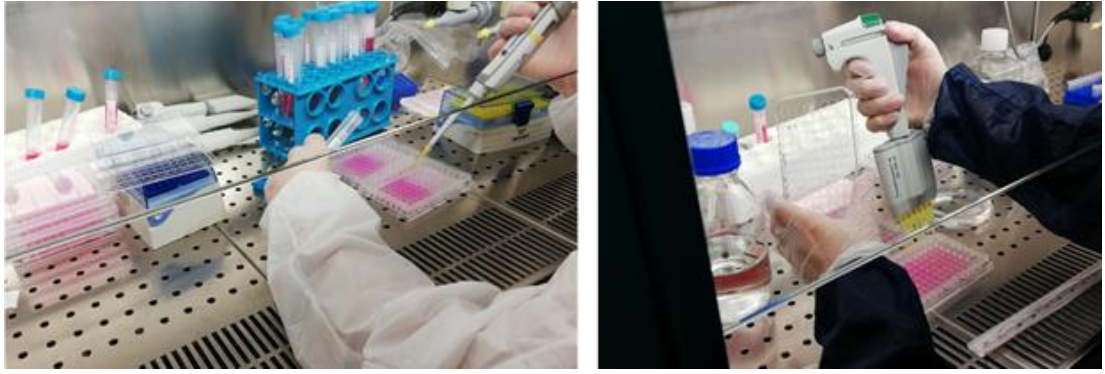
Şekil 3.12. HT-29 hücrelerinin her bir kuyucuğa ekilmesi ve tutunmaları için inkübasyona bırakılması işlemi.



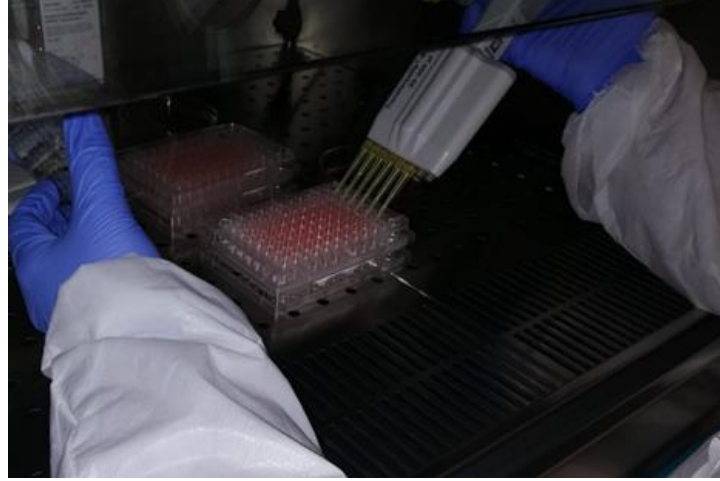
Şekil 3.13. HT-29 hücrelerinin mikroskop altında görüntüleri.



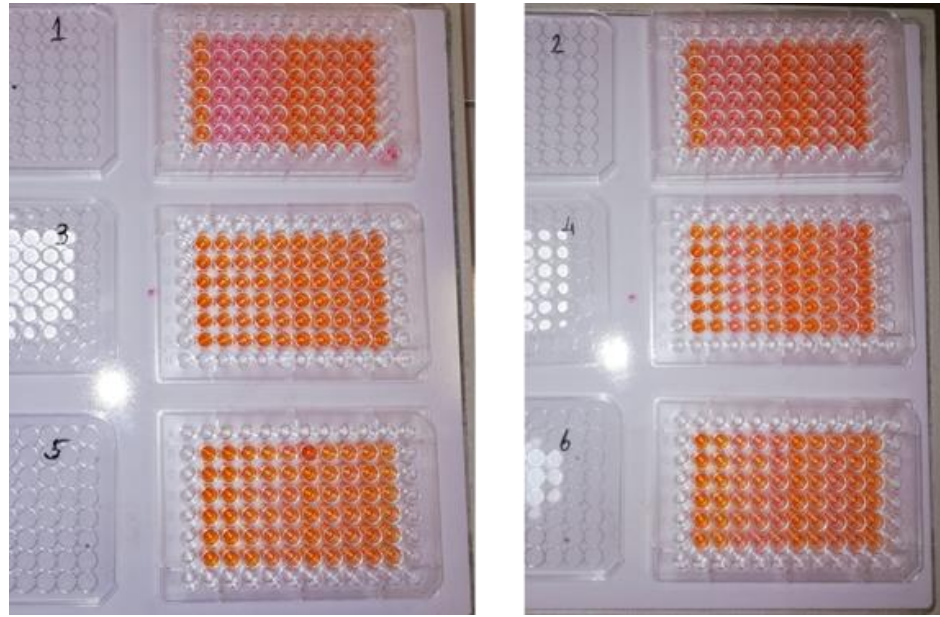
Şekil 3.14. Kamptotesin çözeltisinin ve eşdeğer miktarda kamptotesin içeren nanopartikül formülasyonlarının DMEM ile seyreltilmesi ve 96 kuyucuklu hücre plaklarının formülasyonların uygulanması öncesi hazırlanması.



Şekil 3.15. Hazırlanan ilaç çözeltisi ve nanopartikül dispersiyonlarının hücrelere uygulanması ve sonrasında etkinliklerinin değerlendirilmesi amacıyla 48 ve 72 saat süresince inkübasyona bırakılmaları.



Şekil 3.16. İnkübasyon süresi sonunda hücre canlılığının ölçülebilmesi amacıyla kuyucuklara WST boyasının eklenmesi ve ölçüm öncesi boya ile 4 saat inkübasyona bırakılması işlemi.



Şekil 3.17. 48 saat (plak 1-3-5) ve 72 saat (plak 2-4-6) inkübasyon sonrası hücre canlılığının ölçülmesi öncesi plakların hazırlanması



Şekil 3.18. Hücre canlılığının tayin edilebilmesi amacıyla plak okuyucu ile her bir kuyucuktaki absorbansın ölçümü işlemi.

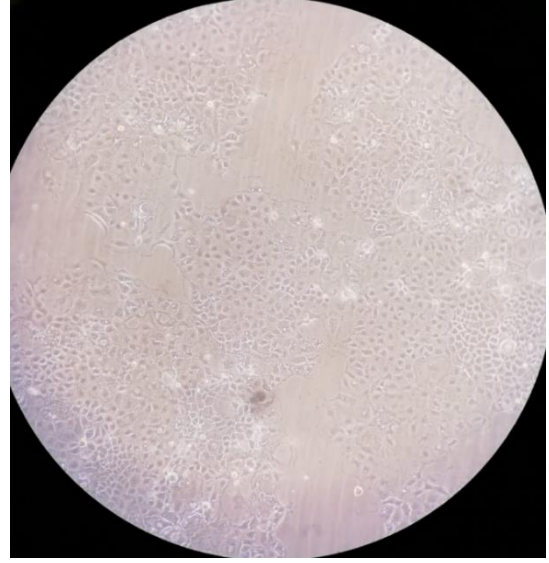
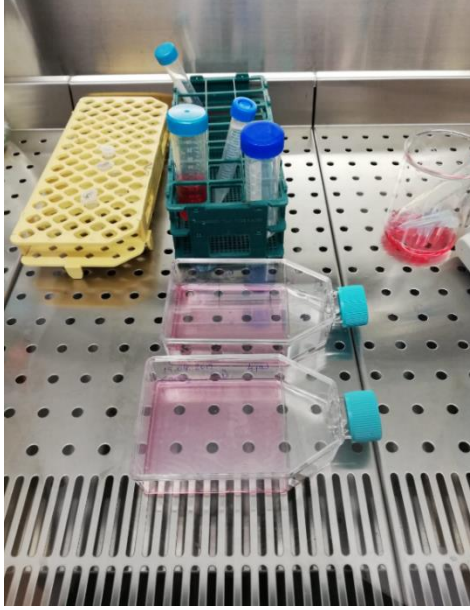
3.8.3. Permeabilite Çalışmaları; Kamptotesin Yüklü Nanopartiküllerin CaCo-2 Hücrelerinden Geçişlerinin Araştırılması

Oral yoldan uygulanmak üzere hazırlanan formülasyonlar veya yeni etkin maddelerin intestinal lümene ulaşmalarının ardından epitelyal hücre bariyerinden geçişinin ve permeasyon derecesinin tayini amacıyla, CaCo-2 tek tabakalı hücre modeli yapay membran sistemlere göre daha güvenli sonuç verebilen ve *in vivo* modellere göre daha az maliyetli bir model olması sebebiyle permeabilite çalışmalarında standart bir prosedür olarak uygulanabilmektedir (233). İnsan kolon adenokarsinoma hücre hattı olan CaCo-2 hücrelerinin *in vitro* ortamda çoğaltılmasıyla oluşturdukları tek tabakalı hücre yapısının intestinal hücre bariyerini taklit edebilmesi *in vitro* transport çalışmalarında kullanılabilirliğinin temel nedenidir (234).

CaCo-2 Hücrelerinin Çözülmesi ve Pasajlanması

1 mL'lik vialde -80°C 'de dondurularak saklanmakta olan ATCC (American Type Culture Collection) kaynaklı CaCo-2 (kolonik adenokarsinoma hücreleri) hücreleri, $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de su banyosunda çözündürülmüştür. Ardından, çözünmüş hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Çöken hücreler, taze besiyerinde yeniden süspand edilerek 75 cm²'lik hücre kültür kabına (flask) aktarılmıştır. Flasklar, hücrelerin üremesi için $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de %5 karbondioksit içeren etüvde, iki günde bir besiyeri değiştirilmek suretiyle inkübasyona bırakılmıştır.

48 saatte bir besiyeri değiştirilen hücreler mikroskobik olarak incelendi. Konfluent hale ulaşmalarının ardından hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulanarak, flask tabanına yapışarak üremiş hücreler kaldırılmış ve ardından başka kaplara bölünerek pasajlanması işlemi gerçekleştirilerek, yeni flaslara ekilen hücrelere benzer prosedür uygulanmaya devam etmiştir.



Şekil 3.19. Caco-2 hücrelerinin flaslarda çoğaltılması süreci ve çoğalarak konflüente ulaşan hücrelerin flask tabanında oluşturduğu yapının mikroskobik görüntüsü.

Hücrelerin sayılması

Bir dizi hücre pasajlama işleminin ardından yeniden konfluent hale ulaşan flaslardaki hücreler, tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmıştır.

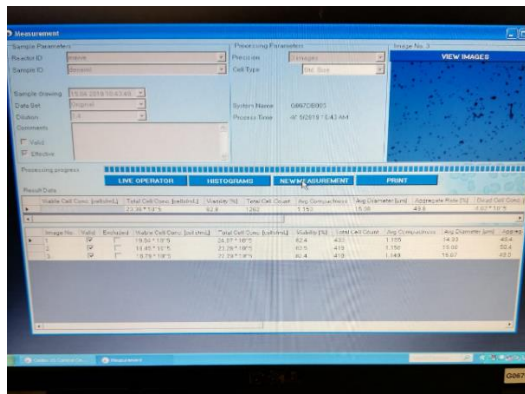
Tripsinizasyon işleminin esası şu şekildedir; hücre yoğunluğunun konflüente ulaşmasının ardından, laminar akımlı kabinde flask içerisindeki besiyeri ortamı uzaklaştırılır. Flask tabanında yapışmış halde üremiş olan hücreler PBS ile yıkanır ve ardından PBS tekrar ortamdan uzaklaştırılır. Son olarak hücrelerin üzerine tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilerek etüvde 5 dakika inkübe edilerek, flask tabanına tutunmuş haldeki hücrelerin flask tabanından ayrılması sağlanır. Hemen ardından flastaki hücre süspansiyonu üzerine taze besiyeri ortamı ilave edilerek son süspansiyonun tamamı

alınarak santrifüjlenir, santrifüj sonunda üstteki sıvı kısım (süpernatant) atılır. Çökelti halinde kalan hücreler, tekrar taze besiyerinde disperse edilerek istenirse yeniden flasklara ekilerek pasajlama sürecine devam edilir veya son dispersiyondan gerekli seyreltme işlemleri yapılarak tripan mavisi yardımıyla sayım işlemi gerçekleştirilebilir.

Tripsinizasyon sonrası kaldırılan ve santrifüjleme sonucu elde edilen hücre çökeltisinin taze besiyeri ile tekrar disperse edilmesinin ardından tripan mavisi de kullanılarak 1:4 oranında seyreltilen hücre süspansiyonu 8 kanallı hücre sayım apareyinin (Cedex Smart Slides®) bir kanalına tatbik edilerek hücre sayım cihazında (Cedex XS Cell Analyzer®) elde edilmiş olan toplam hücre sayısı tespit edilmiştir (Şekil 3.20.).



Şekil 3.20. Hücre sayım işleminin gerçekleştirildiği cihaz (Cedex XS Cell Analyzer) ve 1:4 oranında seyreltilerek tripan mavisi ile boyanan hücrelerin sayım apareyine uygulanması işlemi.



Şekil 3.21. Hücre sayım analizi sonucu cihaz yazılımından elde edilen görüntü ve hücre sayımına ilişkin verilerin sunum şekli.

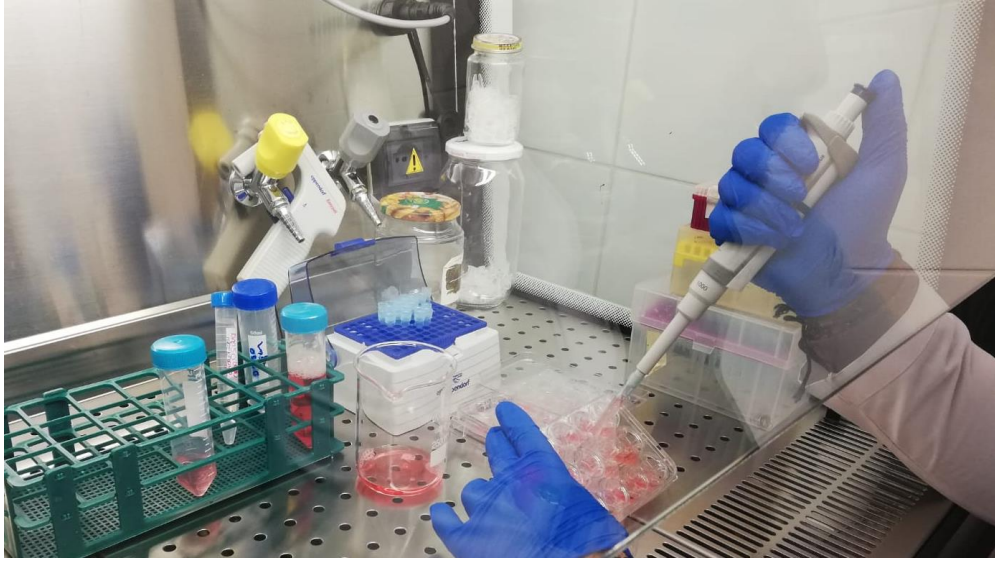
Caco-2 hücrelerinin insertlere ekilmesi

Çözülen, pasajlanan ve sayım işlemi gerçekleştirilen Caco-2 hücrelerinin 5. pasajı, permeabilite çalışmalarının gerçekleştirileceği 12 kuyucuklu polikarbonat membran filtreler (Thincerts™, por çapı 1 µm, alan 1,13 cm²), 60.000 hücre/insert olacak şekilde ekilmiştir. Kuyucukların apikal kısmına 500 µL ve bazolateral kısmına 1 mL besiyeri konulmuştur (Şekil 3.22.).

Plaklar 18-21 gün süresince, 48 saatte bir apikal ve bazolateral kısımlardaki besiyeri değiştirilerek inkübatörde 37°C ve %5 CO₂ ortamında bekletilmiştir (Şekil 3.23.).



Şekil 3.22. Caco-2 hücrelerinin, permeabilite çalışmalarının gerçekleştirileceği hücre plaklarına ekimi ve sonrasında 48 saatte bir besiyeri değiştirilmesi suretiyle 18-21 gün süresince inkübasyona bırakılması



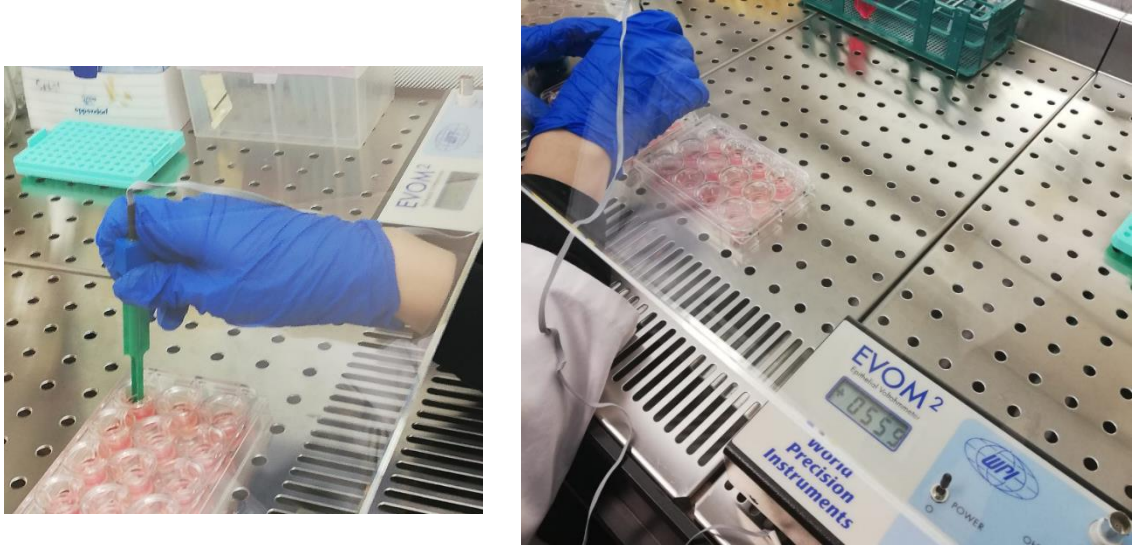
Şekil 3.23. Apikal (0,5 mL) ve bazolateral (1 mL) ortamların 48 saatte bir taze besiyeri ile besiyerlerinin değiştirilmesi işlemi

Caco-2 Hücrelerinin Tek Tabaka Bütünlüğünün Değerlendirilmesi; TEER Ölçümü

İnsertlerde filtre tabakası üzerinde konflüente ulaşması için gün aşırı besiyeri değiştirilerek bekletilen CaCo-2 hücrelerinin 18. günden itibaren transepitelyal elektriksel direnç (TEER) değerleri ölçülerek, konflüente ulaşma durumları takip edilmiştir. TEER değerlerinin $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ değerinin altında olmaması, başlangıçta deney tasarımı için kritik parametre olarak belirlenmiştir.

Bu amaçla; permeabilite çalışmalarına başlamak üzere polikarbonat membran filtreler üzerindeki hücre bütünlüğünü ve membran potansiyelini değerlendirmek amacıyla 18. günde TEER ölçümü gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.24).

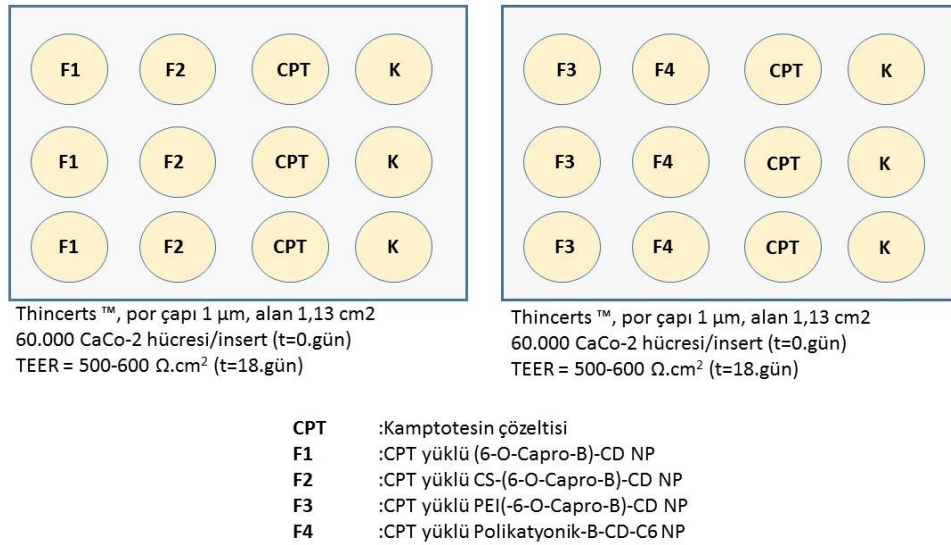
EVOM2® Epithelial Voltohmmeter cihazı ile gerçekleştirilen ölçüm sonucu, insertlerdeki hücrelerin TEER değerlerin $500-600 \Omega \cdot \text{cm}^2$ aralığında olduğu tespit edilmiştir. Böylece, polikarbonat membran filtreler üzerinde hücre konfluensinin ulaştığı değer permeabilite çalışmaları için uygun hale geldiği TEER ölçümü ile teyit edilerek permeabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.24. Caco-2 hücrelerinin insertlerde filtreler üzerinde çoğalarak farklılaştığının ve tek tabakalı bir hücre yapısı oluşturduğunun kontrol göstergesi olan transepitelyal elektriksel direnç (TEER) değerinin EVOM² cihazı ile ölçümü işlemi.

Formülasyonların Uygulanması ve Permeabilite Çalışmalarının Gerçekleştirilmesi

CPT çözeltisi ve enkapsüle halde CPT içeren amfifilik CD nanopartikül formülasyonlarının CaCo-2 hücre tabakasından apikal yüzeyden bazolateral yüzeye permeabiliteleri araştırılmıştır.



Şekil 3.25. Permeabilite çalışmalarının gerçekleştirilmesi amacıyla tasarlanan deney planı özeti.

Bütün örnek grupları 20 µg/mL CPT içerecek şekilde çalışmaya dahil edilmiştir. Bu kapsamda CPT çözeltisi ve nanopartikül formülasyonları 20 µg/mL CPT'ne eşdeğer miktarda olacak şekilde seyreltilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce apikal ve bazolateral yüzey bölgelerine Hank's balanced salt solution (HBSS) ortamı konulmuş ve yaklaşık 30 dk bekletilmiştir. Ardından CPT çözeltisi ve nanopartikül formülasyonları 0,5 mL HBSS içerisinde hazırlanmış şekilde apikal bölgeye uygulanmıştır, bazolateral bölgeye ise sadece 1 mL HBSS ilave edilmiştir.

Hücreler 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda bazolateral kısımdan örnekler alınmıştır ve valide HPLC metodu ile analiz edilmiştir. Bütün deney grupları n=3 üzerinden çalışılmıştır. Analiz sonunda her bir deney grubu için görünür permeabilite katsayıları (Paap, cm/s) eşitlik 3.4'de belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

$$Paap = dC/dt \cdot 1 / (A \cdot C_0) \quad (3.4.)$$

dC/dt : ilacın permeasyon oranı (µg/s)

A : insertlerin yüzey alanı (cell monolayer) (1,13 cm²)

C₀ : apikal bölgedeki başlangıç konsantrasyonu (µg/mL)

3.9. *In vivo* Etkinlik Çalışmaları

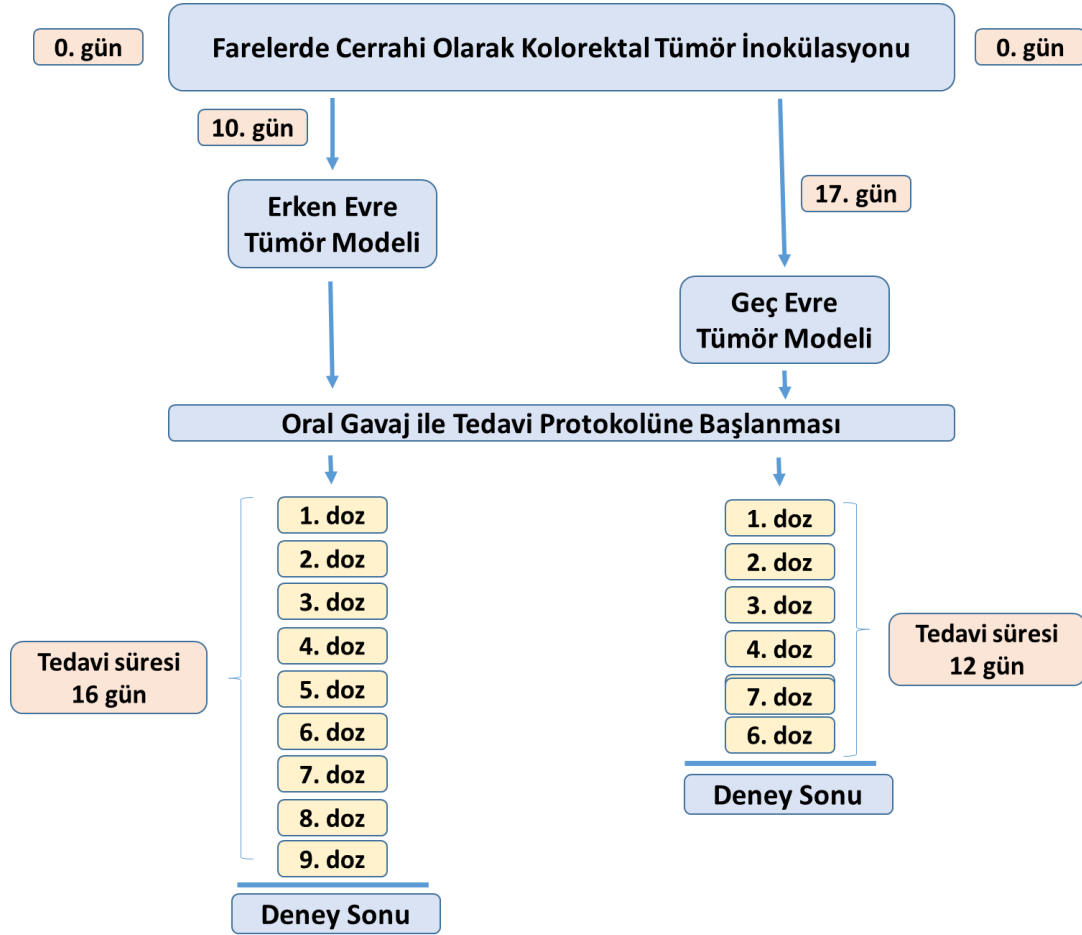
Tez çalışması kapsamında hazırlanan, *in vitro* karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirilen formülasyonlardan bütün sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde en iyi sonuçları veren nanopartikül formülasyonu Poly- β -CD-C6 ile *in vivo* etkinlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *In vivo* deneyler Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan 2019/02-11 karar numaralı ve 52338575-29 sayılı etik kurul iznine istinaden gerçekleştirilmiştir (EK-1). Hayvan deneyleri 6-8 haftalık Balb/c ırkı erkek fareler kullanılmıştır. Hayvanların 25°C sabit sıcaklık, %50 nem, steril talaş, su ve filtreli hava verilen koşullarda bakımı sağlanmıştır (Şekil 3.26.).



Şekil 3.26. *In vivo* deneyler süresince farelerin barındırıldıkları yaşam alanları.

Deneyler antitümöral etkinlik ve görüntüleme aşamalarından oluşan 2 farklı alt çalışma tasarlanarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca antitümöral etnlinlik deneylerinin planlanmasında kolorektal kanser hücre hattı olan CT-26'nın cerrahi olarak oluşturulan sinjenit fare modelinde, tümörlerin büyümesi için geçen sürenin hem

erken evresinde hem de geç evresinde olmak üzere 2 farklı tedavi başlama zamanı seçilmiş ve hayvan grupları hazırlanmıştır (Şekil 3. 27.).



Şekil 3.27. In vivo deney süreci akış şeması.

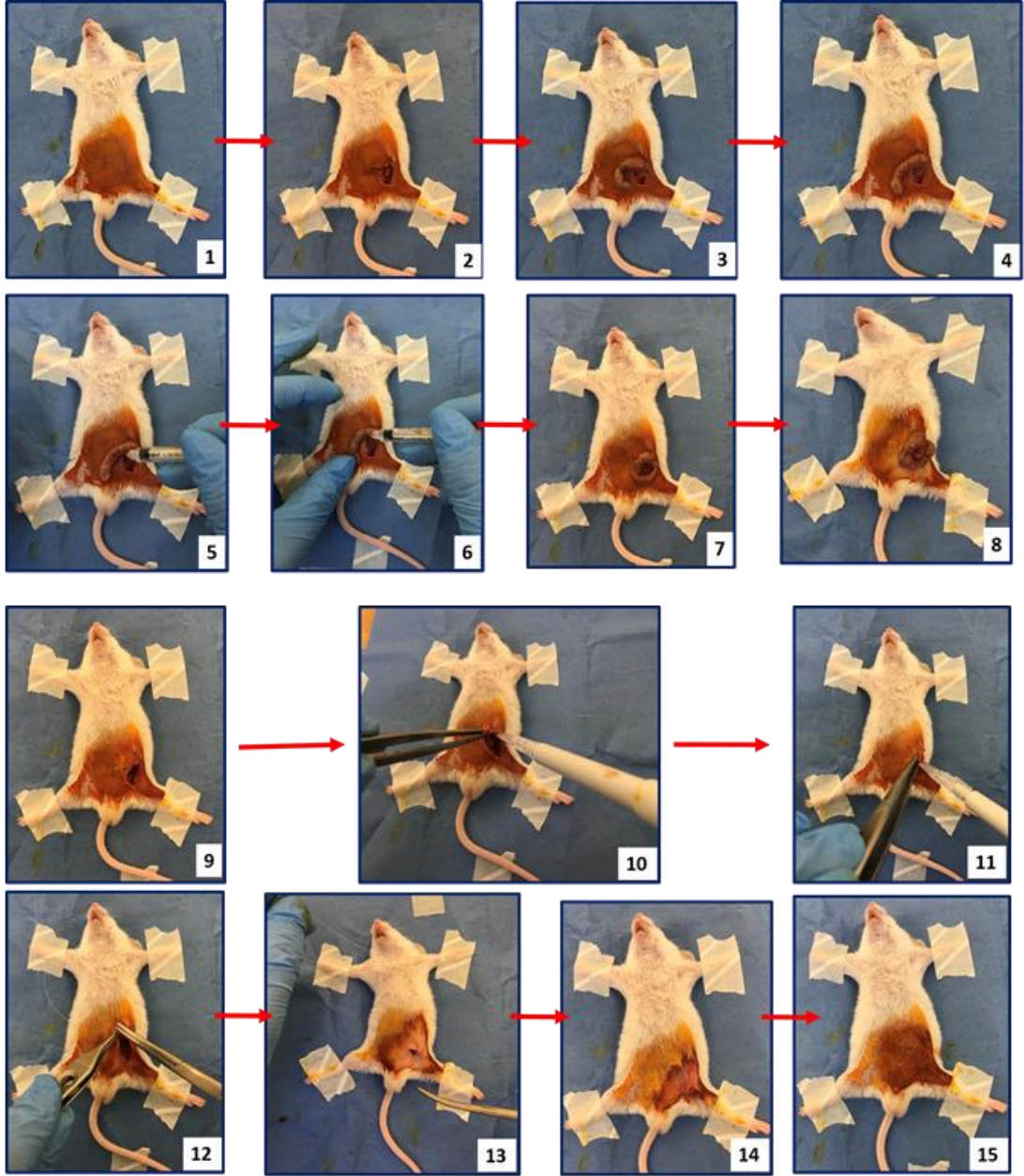
3.9.1. Farelerde Cerrahi Olarak Kolorektal Tümör İnokülasyonu

Hazırlanan ilaç yüklü amfifilik CD nanopartikülünün tümöre karşı etkinliğinin belirlenmesi amacıyla, ilk olarak farelerde kolon tümörü oluşturulmuştur.

Bu amaçla ortotopik model tercih edilmiş olup, modelin temelini, CT-26 hücrelerinin cerrahi olarak çekum submukozasına inoküle edilmesi oluşturmaktadır (235-237).

Tümör oluşturulması amacıyla kullanılacak olan CT-26 kolon karsinoma hücreleri, hücre flaskında, RPMI besiyerinde (%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin) %70 hücre yoğunluğuna ulaşana kadar 37°C ve %5 CO₂'li etüvde çoğaltılmıştır. Çoğalan hücreler, tripsinizasyon işleminin ardından PBS ile yıkanmış ve santrifüjlenerek (400 g'de 5 dk.) toplanmıştır. Hücreler (2x10⁶ hücre/100µL), cerrahi işlem ile fare çekum submukozasına matrigel®:PBS (1:10) ortamında inokülasyon için hazırlanmıştır.

Steril koşullarda, intraperitoneal ketamin (100 mg/kg) + ksilazin (10 mg/kg) uygulaması sonucu anestezisi altına alınan farelere laparotomi uygulanmıştır. Bu amaçla, cerrahi olarak farelerin abdominal bölgesinde gerçekleştirilen 0,5 cm boyutunda bir kesi ile çekuma ulaşılmış ve yüzeye çıkarılan çekum üzerine 28G boyutunda iğne ile insizyon gerçekleştirilerek yüzeyde çizikler oluşturulmuştur. Bu işlemin ardından çekum tekrar abdominal boşluktaki bölgesine yerleştirilmiştir. Öncesinde hazırlanmış olan CT-26 hücre dispersiyonundan 2x10⁶ hücre olacak şekilde 100 µL steril pipet ile alınmış ve çekum üzerinde oluşturulan insizyonel çiziklerin olduğu bölgeye inoküle edilmiştir. Daha sonra, abdominal insizyon bölgesi 5/0 monofilament cerrahi suture kullanılarak kapatılmıştır. Cerrahi operasyon sonrasında farelerde oluşabilecek dehidratasyonu önlemek amacıyla 0,5 mL steril %0,9 NaCl deri altına enjekte edilmiştir (Şekil 3.28.). Erken evre tümörlerde operasyondan sonraki 10.gün, geç evre tümörlerde gerçekleştirilen çalışmada ise 17.günde yüksek doz anestesi ile ötenazi gerçekleştirilmiş ve seçilen farelerde kolon ve çekum bölgesine spesifik tümörlerin varlığı gözlenerek tümörler kayıt altına alınmıştır.



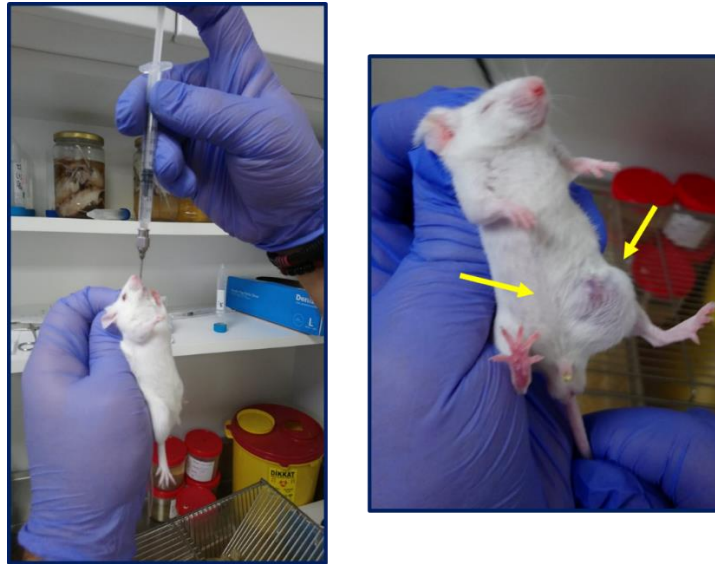
Şekil 3.28. Farelerde kolorektal tümör oluşturmak amacıyla gerçekleştirilen cerrahi yöneme ilişkin işlem basamakları.

3.9.2. Kolorektal Kanser Modeli Geliştirilmiş Farelere Uygulanan Tedavi Protokolü

Kolon ve çekum bölgesinde tümörlerin varlığı, her grup için sakrifiye edilen bir farede cerrahi olarak teyit edilmiştir. Her bir formülasyon uygulaması 21 G gavaj enjektörü ile 200 μ L hacimde (5 mg/kg CPT) olacak şekilde farelere oral gavaj yoluyla aşağıdaki deney grupları şeklinde uygulanmıştır (Şekil 3. 29.).

Gruplar;

1. Poly- β -CD-C6 nanopartikülleri (boş)
 2. Poly- β -CD-C6 nanopartikülleri (ilaç yüklü) (5 mg/kg CPT içeren)
 3. Antikanser ilaç CPT'nin salin solüsyonu içerisinde (%1 DMSO) süspansiyonu (5 mg/kg CPT)
 4. Negatif kontrol (tümör indüklenmiş ve tedavi uygulanmayan grup)
- Tedavi uygulaması oral gavaj (0,2 mL salin solüsyonu içerisinde dispersiyonu) ile 2 günde 1 doz olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 29. In vivo deneyler süresince formülasyonların uygulama yolu olan oral gavaj uygulaması ve tümör indüklenmiş farelerde deneysel süreç içerisinde makroskopik olarak gözlemlenebilen tümör kitlelerine bağlı şişlik.

Deney süresince farelerin hayatta kalma ve ağırlık değişimleri takip edilmiştir. Deney sonunda ise primer tümör ağırlıkları ve primer tümör çapları kayıt altına alınmıştır. Ayrıca hayvanların primer tümörleri ve hayvanlardaki metastaz durumlarının karşılaştırılması için karaciğerleri %10 formalin çözeltisinde fikse edilip histolojik değerlendirmeye alınmıştır. Tedavinin etkinliği deney grupları arasında istatistiksel olarak karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

3.10. *In vivo* Görüntüleme Çalışmaları

Görüntüleme çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen deneylerin esasını oral yoldan uygulanan Poly- β -CD-C6 nanopartikülünde enkapsüle halde olan Nil Kırmızı (NR) floresan boyasının gastrointestinal kanal boyunca görüntülenmesi oluşturmaktadır. NR hidrofobik yapıda bir boya olması sebebiyle çalışma kapsamında yine hidrofobik yapıda bir etkin madde olan ve nanopartiküllere enkapsüle edilen model etkin maddemiz olan CPT'ni temsil etmektedir. Bu amaçla hazırlanan NR yüklü nanopartiküller ve NR çözeltisi, bir gece süresince açlık durumunda beklemiş olan sağlıklı ve kolorektal tümör indüklenmiş farelere ayrı ayrı olmak üzere oral gavaj yoluyla uygulanmış ve her iki grupta 24 saat süresince bekletilmiştir. Bu süreçte oral gavaj yoluyla uygulanan NR yüklü nanopartiküllerin ve NR çözeltisinin gastrointestinal kanalda dağılımlarının görüntülenmesi amaçlanmış ve elde edilen nanopartiküllerin taşıdığı NR'yi gastrointestinal kanalın hangi bölgesine kadar ne oranda taşıyabildiği NR çözeltisi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

NR yüklü nanopartiküllerin hazırlanması amacıyla Bölüm 3.4.'de açıklanan nanopartikül hazırlama metodu kullanılmıştır. Buna göre, 1 mg NR 10 mL etanolde çözülerek bir stok çözeltisi hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden, 100 μ L alınmış ve 1 mg CD içeren 900 μ L hacimdeki organik faza ilave edilerek organik fazın 1 mL'ye tamamlanması sağlanmıştır. Süreç, organik fazın manyetik karıştırıcı ile 600 rpm'de karışmakta olan 2 mL sulu faz üzerine ependorf enjektörü yardımıyla damla damla ilave edilerek ve sonrasında karıştırma işleminin 30 dk. süresince devam ettirilmesiyle sonlandırılmıştır. Bu işlem sonunda NR enkapsüle amfifilik CD nanopartikülleri spontan olarak oluşmaktadır. Hazırlanan karışımdaki organik çözücü, rotary

evaporator yardımı ile vakum altında 40-50''de uzaklaştırılmış ve nanopartikül oluşturmayan artık CD ortamdan uzaklaştırılmasıyla amacıyla dispersiyon, 3500 rpm'de oda sıcaklığında 15 dk santrifüj edilerek süpernatant ayrılarak alınmış ve 2 mL NR enkapsüle amfifilik CD nanopartikül dispersiyonu elde edilmiştir (147).

Hazırlanan NR yüklü amfifilik CD nanopartiküllerinin ve NR çözeltisinin farelere yukarıda açıklanan şekilde oral gavaj ile uygulanması ve 24 saat bekletilmesi sonunda, fareler yüksek doz anestezi ile ötenazi edilmişlerdir. Ötenazi edilen farelerin bu işlemin ardından hızla cerrahi olarak gastrointestinal kanalları bir bütün halinde çıkarılmış ve Newton 7.0® (Canlı Görüntüleme Sistemi) (Vilber, Fransa) sisteminde görüntülenmek üzere organın segmentleri belli olacak şekilde yerleştirilmiştir. Görüntüleme işlemlerinin ardından, örnekler segmentler halinde incelenmiş ve segmentlere ulaşabilen NR miktarı elde edilen görüntülerdeki piksel değerlerini ve renk yoğunluklarını sayısal olarak hesaplama esasına dayanan Fiji® yazılımı kullanılarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Bu işlemin ardından ortalama floresans yoğunluğu (Mean Fluorescent Intensity; MFI) değerleri elde edilerek gastrointestinal segmentlere ulaşabilen NR miktarları hakkında yorum yapılmıştır.

3.11. Histolojik Değerlendirme

Deneylerin sonlandırılmasını takiben, sakrifiye edilmiş hayvanlara ait karaciğer ve kolon örnekleri % 10 tamponlu formalin solüsyonu içinde histolojik inceleme yapılmak üzere Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na transfer edilmiş ve ortak çalışma gerçekleştirilmiştir. Organlardan elde edilen doku örneklerine ait tümör odaklarının ve invazyonun değerlendirilmesinde Prof. Dr. Petek Korkusuz ve Dr. Elif Bilgiç tarafından çalışmamıza bilimsel katkı sağlanmıştır.

Öncelikle tamponlu formalini tazelenen dokular, tümör lokasyonu makroskobik olarak incelendikten ve yön tayininden sonra rutin parafin doku takibine alınmıştır. Buna göre, otomatize ışık mikroskobu doku takip cihazında (Leica TP1020, Almanya) sırası ile formalin, dereceli alkoller (%70-80-90-96-100), ksilol ve parafin istasyonlarından geçen doku örnekleri saf parafine gömülmeye hazır hale gelmiştir. Parafine gömülen ve soğutucu istasyonda (Leica, Almanya) blok haline getirilen

dokular kesit almak üzere -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir. Kızaklı mikrotom cihazı (Leica SM2000R, Almanya) ile yaklaşık 3-5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındıktan sonra örnekler, deparafinizasyon için etüvde bir gece boyunca bekletilmiştir. Histolojik değerlendirme için rutin Heamatoksilen&Eozin boyaması yapılmıştır. Tümöre ait kolon ve karaciğerdeki odaklar tespit edilerek kolondaki tabakaların tutulumu açısından seri kesitler dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskopunda (Leica DM6B, Almanya) değerlendirilmiştir.

Her kesitte toplam mikroskopik tümör odağı sayısı hesaplandıktan sonra her odağın en (a) ve boyu (b) um cinsinden LASX programı ile ölçülmüştür. Yapılan en ve boy ölçümlerinden $p=a/2 \times b/2$ formülü ile her örnek için karaciğerdeki toplam odak alanı hesaplanmıştır (238-242).

Kolondaki tümör alanı kolonun Tunika mukoza, Tunika muskularis ve Tunika adventisya tabakalarını içerip içermemesine göre 3 kategoride değerlendirilmiştir. Elde edilen makroskopik ve mikroskopik verilerin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildikten sonra parametrik dağılım göstermediği anlaşılan veriler sırası ile Kruskal Wallis ve Bonferroni testi uygulanarak çoklu ve ikili gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Tanımsal istatistiksel veriler ortanca minimum ve maksimum değerleri ile kutu çizgi grafiklerinde gösterilmiştir. % 95 güven aralığında çalışılmıştır.

3.12. İstatistiksel Analiz

Aksi belirtilmedikçe tüm deneyler üçer kez tekrarlanmış ve istatistiksel olarak aşağıda tarif edildiği gibi değerlendirilmiştir. \pm ifadesi standart sapmayı yansıtmaktadır. İki grubun karşılaştırılmasında t testi, ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında ANOVA'yı takiben Tukey's post hoc testi gerçekleştirilmiş ve istatistiksel analizler SPSS™ v 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) programı ile gerçekleştirilmiştir. P değerinin 0.05 den düşük olduğu sonuçlar anlamlı olarak kabul edilmiştir. İn vivo deneyler kapsamındaki yaşam süreleri karşılaştırması ise Kaplan-Meyer metodu ile değerlendirilmiştir. Kaplan Meyer yöntemi, yaşam sürelerini göstermekte kullanılan bir methodur. Bu yöntemle, tedavi sonrasında deneklerin

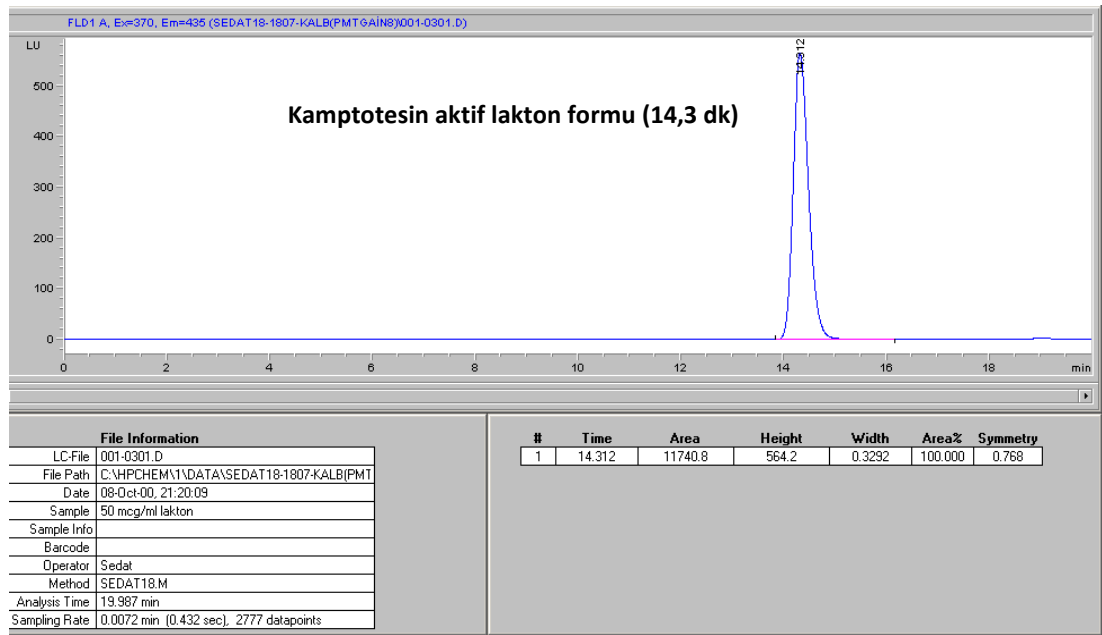
yaşam süreleri horizontal basamaklarla belirtilmekte ve tedavi edilen grupların yaşam süreleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak yaşam süresinin uzatılıp uzatılmadığı tespit edilmektedir. İn vivo deneyler kapsamında elde edilen hayatta kalım grafiklerine ait istatistiksel analizler bu esasa göre gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

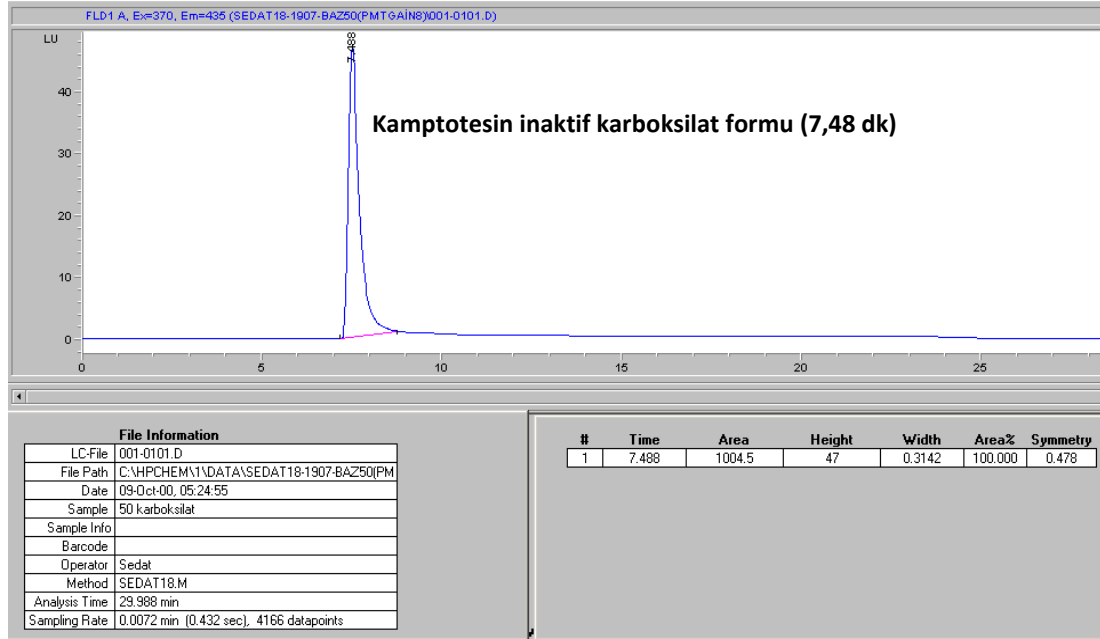
4.1. Analitik Yöntem Validasyonu

4.1.1. Kamptotesinin HPLC ile *in vitro* Miktar Tayini Yöntemi

Etkin madde CPT için Bölüm 3.3.1.'de açıklanan *in vitro* miktar tayini yöntemi gerçekleştirilmiş olup, analiz sonucunda CPT'nin stabilite ve antikanser etkinlik açısından iki farklı formunu ifade eden aktif lakton ve inaktif karboksilat formlarına ilişkin elde edilen kromatogramlar Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'da gösterilmiştir. Açıklanan miktar tayini yöntemi koşullarında gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre CPT'ye ait lakton ve karboksilat formlarının alıkonma süreleri sırasıyla 14,3 dk. ve 7,4 dk. olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Kamptotesinin aktif lakton formunun 50 µg/mL çözeltisine ait HPLC kromatogramı.



Şekil 4.2. Kamptotesinin inaktif karboksilat formunun 50 µg/mL çözeltisine ait HPLC kromatogramı.

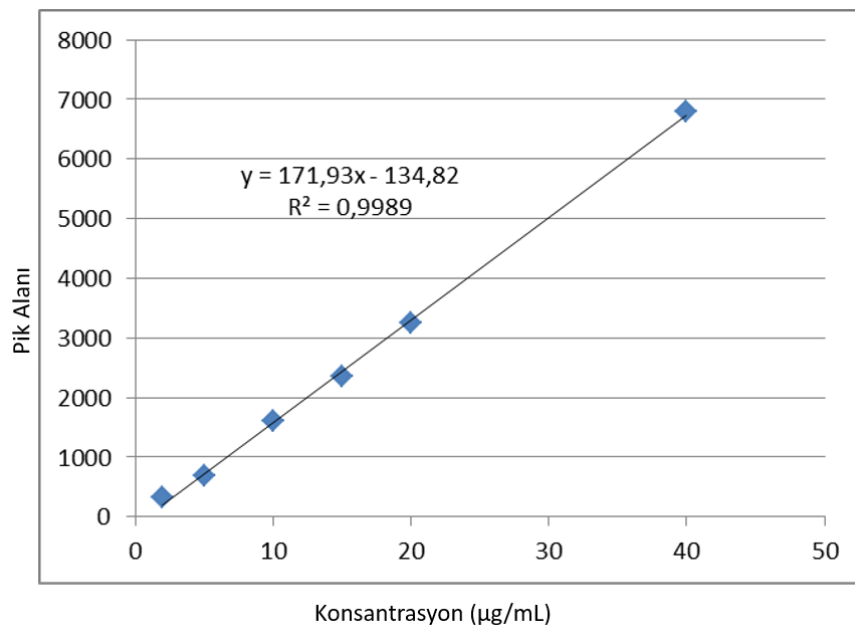
4.1.2. Analitik Yöntem Validasyonu

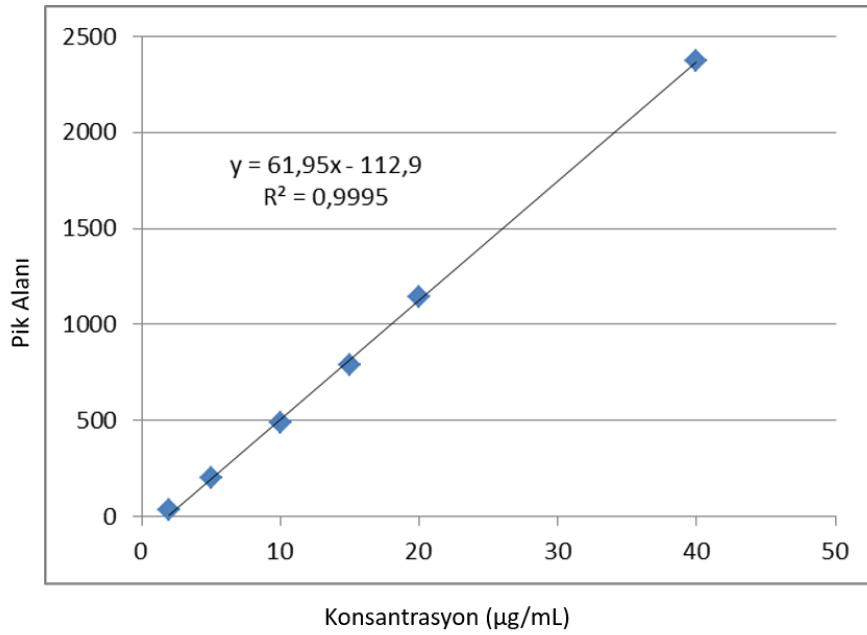
Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi Analitik Yöntem Validasyonu

CPT'ye ait kalibrasyon doğrusu çizimi Bölüm 3.3.2.1.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş olup aktif lakton formu ve inaktif karboksilat formu için kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Çalışmalar 6 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sinyal değerleri hazırlanan konsantrasyonlara karşı grafiğe geçirilmiş ve kalibrasyon doğrusuna ait denklem lineer regresyon ile hesaplanmıştır. Kalibrasyon doğruları ve denklemleri Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.'de yer almakta olup, lakton ve karboksilat formlarına ait lineer regresyon verileri ise Tablo 4.1.'de belirtilmektedir.

Tablo 4.1. Kamptotesinin lakton ve karboksilat formuna ait HPLC analizi verileri.

Parametre	Aktif Lakton Formu	İnaktif Karboksilat Formu
Konsantrasyon Aralığı	2-40 µg/mL	2-40 µg/mL
Eğim	171.93	61.95
Kesim Noktası	-134.82	-112.9
Korelasyon Katsayısı	0.9989	0.9995

**Şekil 4.3.** Kamptotesinin lakton formuna ait kalibrasyon doğrusu.



Şekil 4.4. Kamptotesinin karboksilat formuna ait kalibrasyon doğrusu.

Doğrusallık

Kullanılan HPLC metodunun doğrusallığı, lakton ve karboksilat formlarının her ikisi içinde kalibrasyon doğrularının çizildiği konsantrasyon aralığı olan 2-40 µg/mL aralığında değerlendirilmiştir. Analiz edilen konsantrasyonlar ve elde edilen sinyallerin (Pik alanı) grafiğe geçirilmesi ve regresyon analizi gerçekleştirilmesi sonucu elde edilen linearite doğrusallığın önemli bir göstergesidir (243). Bu amaçla gerçekleştirilen doğrusallık tayini çalışması sonucunda, CPT'nin aktif lakton formuna ait çizilen doğrunun tanımlayıcılık katsayısı $r^2=0,9989$, inaktif karboksilat formuna ait çizilen doğrunun tanımlayıcılık katsayısı $r^2=0,9995$ olarak bulunmuş ve denklemlerin doğrusallığı gösterilmiştir.

Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu analiz sonucu hesaplanan konsantrasyon değeri ile gerçek değer arasındaki uyumun ifadesidir (244). Bu amaçla Bölüm 3.3.2.3.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen analitik yöntemin doğruluğu çalışmaları,

kalibrasyon doğrusu içinde alt, orta ve üst değerleri temsil etmesi amacıyla hazırlanan 3 konsantrasyon değerinde (2, 10 ve 20 µg/mL) lakton ve karboksilat formları için 6 tekrarlı ölçüm olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Lakton formu için gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre ortalama geri kazanım değerleri %99-101 aralığındayken, karboksilat formu için %97-103 aralığıda tespit edilmiş olup varyasyon katsayıları ise %2'nin altında bulunmuştur. Kullanılan analitik metotun validasyonu açısından doğruluk parametrelerinin uygun değerler aralığında olduğu görülmüştür. Analiz sonunda elde edilen sinyal değerlerinden hesaplanan değerler ile bilinen konsantrasyon değerleri ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı olarak lakton formu için Tablo 4.2.'de, karboksilat formu için Tablo 4.3.'te belirtilmiştir.

Tablo 4.2. Kamptotesinin lakton formu için doğruluk validasyonu verileri.

ÖRNEK	2 µg/mL Geri Kazanım (%)	10 µg/mL Geri Kazanım (%)	20 µg/mL Geri Kazanım (%)
1	98,20	98,46	101,40
2	100,50	101,20	102,30
3	99,45	99,35	98,12
4	99,55	98,26	100,50
5	99,48	99,14	102,12
6	99,63	101,10	101,52
ORTALAMA	99,30	99,41	100,99
SS	0,82	1,41	1,54
CV	0,83	1,42	1,53

Tablo 4.3. Kamptotesinin karboksilat formu için doğruluk verileri.

ÖRNEK	2 µg/mL Geri Kazanım (%)	10 µg/mL Geri Kazanım (%)	20 µg/mL Geri Kazanım (%)
1	103,21	98,21	97,90
2	102,45	101,60	100,41
3	101,32	102,02	99,79
4	104,63	99,03	98,48
5	102,47	99,79	98,36
6	105,16	98,29	98,29
ORTALAMA	103,21	99,82	98,87
SS	1,45	1,65	0,99
CV	1,41	1,65	1,00

Kesinlik

Bölüm 3.3.2.4.'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilen kesinlik çalışmaları kapsamında kalibrasyon doğrusu üzerinde orta büyüklükte bir konsantrasyon değeri olan 5 µg/mL seçilmiş olup tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve günler arası farklılık olmak üzere 3 farklı kesinlik parametresi çalışılmıştır. Analizler 6 tekrar üzerinden gerçekleştirilmiş olup lakton ve karboksilat formları için ayrı ayrı olmak üzere analiz edilmiştir.

Tekrar Edilebilirlik

Tekrar edilebilirlik çalışmaları kapsamında CPT'nin 5 µg/mL konsantrasyonda ayrı ayrı hazırlanmış lakton ve karboksilat formları için ardışık olarak tek seferde aynı örnek üzerinden 6 ölçüm yapılmıştır. Analiz edilen sonuçlar ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı olarak hesaplanmış, varyasyon katsayılarının %2'den küçük oldukları tespit edilmiştir. Sonuçlar, lakton formu için Tablo 4.4.'de, karboksilat formu için ise Tablo 4.5.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.4. Kamptotesinin lakton formu için tekrar edilebilirlik verileri.

ÖLÇÜM	Hesaplanan Konsantrasyon (5µg/mL)
1	5,01
2	4,99
3	4,95
4	5,00
5	4,94
6	4,97
ORTALAMA	4,98
SS	0,03
CV	0,55

Tablo 4.5. Kamptotesinin karboksilat formu için tekrar edilebilirlik verileri.

ÖLÇÜM	Hesaplanan Konsantrasyon (5µg/mL)
1	5,23
2	5,32
3	5,33
4	5,36
5	5,34
6	5,31
ORTALAMA	5,31
SS	0,04
CV	0,84

Tekrar Elde Edilebilirlik

Bölüm 3.3.2.4.3.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen tekrar elde edilebilirlik çalışması kapsamında, 5 µg/mL konsantrasyonda 6 farklı örnek hazırlanmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Bütün analizler lakton ve karboksilat formu için ayrı ayrı hazırlanmış numuneler üzerinden gerçekleştirilmiş olup elde edilen sonuçların ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanmıştır. Her iki form içinde varyasyon katsayıları %2'den küçük bulunmuştur. Lakton formu için tekrar elde edilebilirlik çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 4.6.'da, karboksilat formu için ise Tablo 4.7.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.6. Kamptotesinin lakton formu için tekrar elde edilebilirlik verileri.

ÖRNEK	Hesaplanan Konsantrasyon (5µg/mL)
1	4,97
2	5,09
3	5,11
4	4,92
5	5,16
6	4,99
ORTALAMA	5,04
SS	0,09
CV	1,85

Tablo 4.7. Kamptotesinin karboksilat formu için tekrar elde edilebilirlik verileri.

ÖRNEK	Hesaplanan Konsantrasyon (5µg/mL)
1	4,92
2	4,98
3	5,08
4	4,92
5	5,11
6	4,96
ORTALAMA	5,00
SS	0,08
CV	1,63

Günler Arası Farklılık

Analitik metotun validasyonu kapsamında, günler arası farklılık değerlendirmesi Bölüm 3.3.2.4.3.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 5 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan CPT çözeltilerinin üç farklı günde analizi gerçekleştirilmiştir. Analizler lakton ve karboksilat formları için ayrı ayrı gerçekleştirilmiş olup, analiz sonuçlarının ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Her iki CPT formuna ait analiz sonuçlarında varyasyon katsayıları %2'den küçük bulunmuştur. Lakton formuna ait analiz sonuçları Tablo 4.8.'de, karboksilat formuna ait analiz sonuçları ise Tablo 4.9.'da belirtilmiştir.

Tablo 4.8. Kamptotesinin lakton formu için günler arası farklılık verileri.

GÜN	Hesaplanan Konsantrasyon (5µg/mL)
1	5,14
2	4,96
3	4,99
ORTALAMA	5,03
SS	0,10
CV	1,92

Tablo 4.9. Kamptotesinin karboksilat formu için günler arası farklılık verileri.

GÜN	Hesaplanan Konsantrasyon (5µg/mL)
1	5,22
2	5,38
3	5,35
ORTALAMA	5,32
SS	0,09
CV	1,60

Duyarlılık

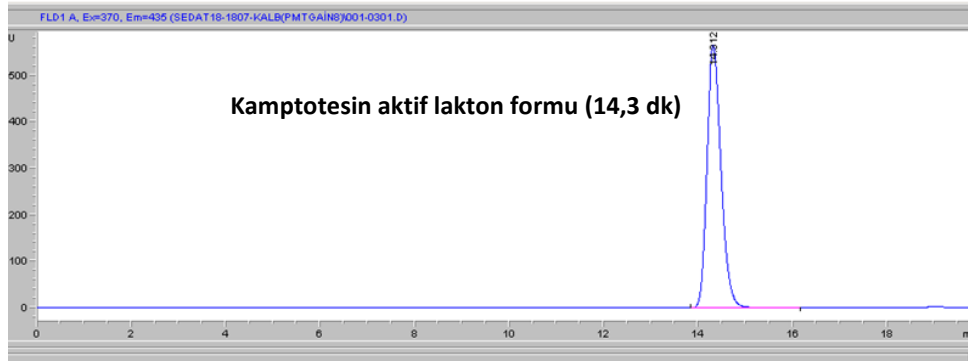
Analitik metodun duyarlılık tayini çalışmaları, Bölüm 3.3.2.5.'de açıklandığı şekilde, metodun gözlenebilirlik sınırı (Limit of Detection; LOD) ve tayin sınırı (Limit of Quantification; LOQ) değerleri hesaplanarak gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalar CPT'nin lakton ve karboksilat formuna ait analizler için ayrı ayrı her iki form için yapılmıştır. Bu kapsamda, sinyal gürültü oranının 3:1 olduğu ve gözlenebilirlik sınırı kabul edilen değer lakton formu için 0,053 µg/mL, karboksilat formu için ise 0,087 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Sinyal gürültü oranının 10:1 olduğu ve tayin sınırı kabul edilen değer ise lakton formu için 0,174 µg/mL, karboksilat formu için 0,195 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Gerek lakton gerekse karboksilat formları için hesaplanan gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerlerinin çalışma amacımız ve çalışmanın planladığı konsantrasyon aralıkları açısından uygun olduğu ve metodun çalışmanın amacına yeterli duyarlılıkta olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.10.).

Tablo 4.10. HPLC ile miktar tayini yönteminin, lakton ve karboksilat formlarına ait duyarlılık parametreleri sonuçları.

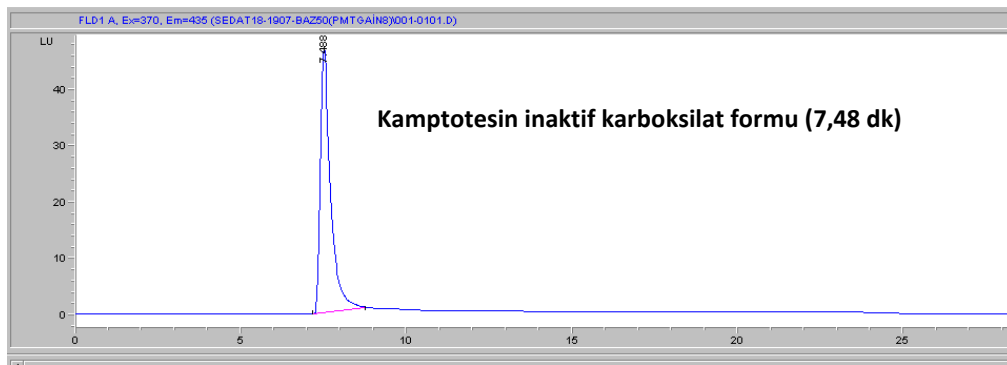
DUYARLILIK PARAMETRESİ	AKTİF LAKTON FORMU (µg/mL)	İNAKTİF KARBOKSİLAT FORMU (µg/mL)
GÖZLENEBİLİRLİK SINIRI (LOD)	0.053	0.087
TAYİN SINIRI (LOQ)	0.174	0.195

Özgünlük

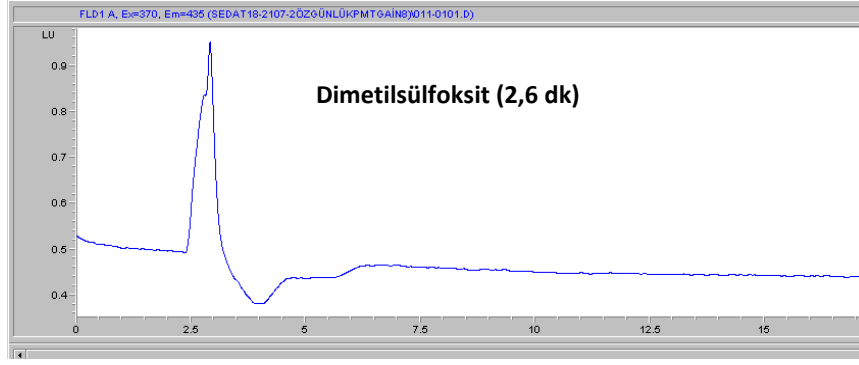
Analitik metotun özgünlüğü Bölüm 3.3.2.6.'da açıklandığı şekilde, çalışma kapsamında formülasyon sürecinde kullanılması planlanan polimer ve yardımcı maddelerin kromatogramları ile CPT'nin lakton ve karboksilat formlarına ait kromatogram piklerinin karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, dimetilsülfoksit (DMSO), Kitosan (CS), Polietilenimin (PEI), Poly- β -CD-C6 ve 6-O-CAPRO- β -CD ayrı ayrı HPLC analizleri gerçekleştirilerek, kullanılan analitik metot koşullarında verdikleri kromatogramlar ve alıkönma zamanları tespit edilmiştir. CPT'nin lakton ve karboksilat formları da dahil olmak üzere bahsedilen yardımcı maddelere ait kromatogramlar Şekil 4.5. ile Şekil 4.11. arasında belirtilmiştir.



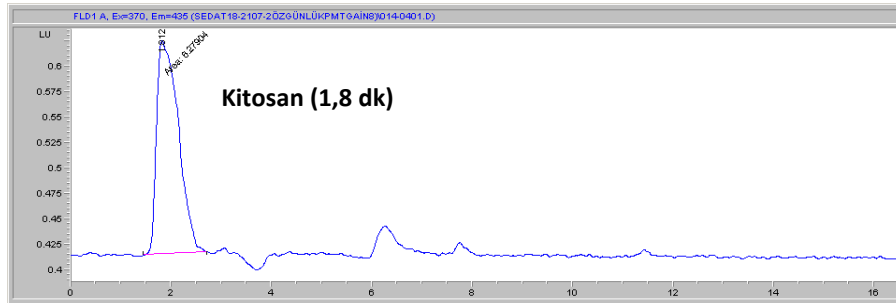
Şekil 4.5. HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında lakton formuna ait elde edilen kromatogram.



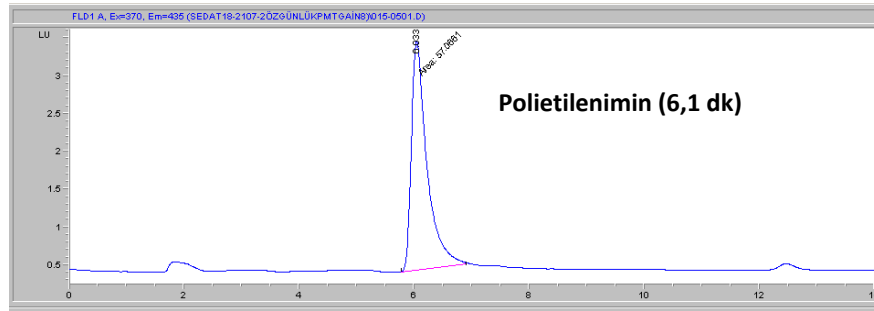
Şekil 4.6. HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında karboksilat formuna ait elde edilen kromatogram.



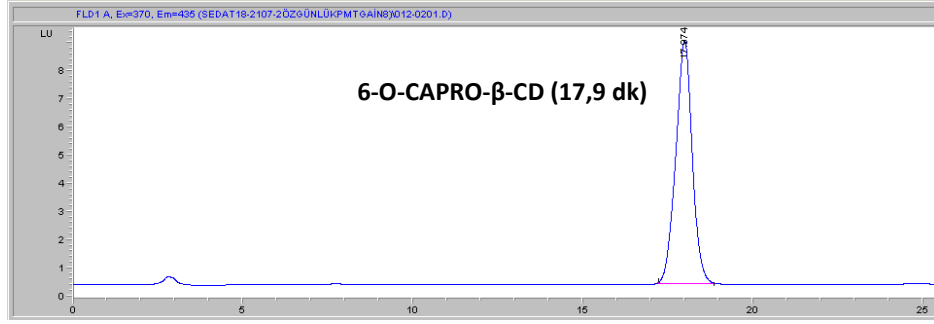
Şekil 4.7. HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında DMSO'ya ait elde edilen kromatogram.



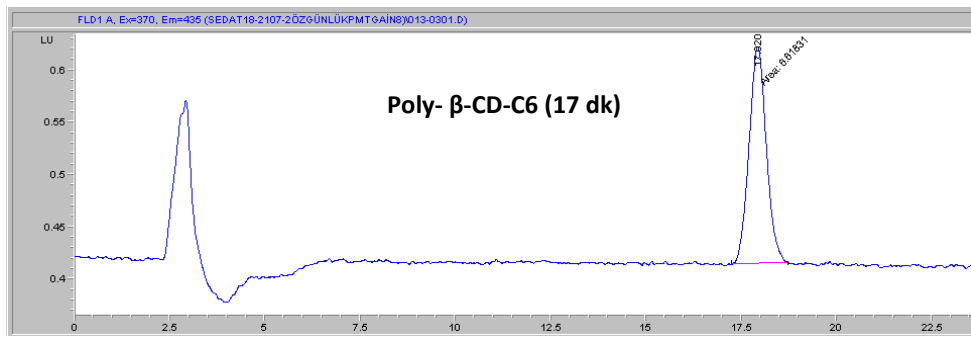
Şekil 4.8. HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında kitosana ait elde edilen kromatogram.



Şekil 4.9. HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında PEI'e ait elde edilen kromatogram.



Şekil 4.10. HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında 6-O-CAPRO-β-CD ait elde edilen kromatogram.



Şekil 4.11. HPLC yönteminin özgünlük validasyonu kapsamında Poly-β-CD-C6 ait elde edilen kromatogram.

4.2. Önformülasyon Çalışmaları ve Nanopartiküllerin Hazırlanması

4.2.1. Önformülasyon Çalışmaları Sonunda Elde Edilen Nanopartiküllerin Karakterizasyonları

Önformülasyon çalışmalarının temelini; nanoçöktürme yöntemiyle nanopartiküllerin eldesinde formülasyon parametlerinin elde edilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyelleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek oluşturmaktadır. Bu amaçla 6-O-CAPRO-β-CD ve Poly-β-CD-C6 amfifilik CD türevleri için nanoçöktürme yöntemiyle nanopartikül eldesinde; kullanılan CD konsantrasyonu (a/h), organik fazın türü (aseton veya etanol) ve kaplama materyali konsantrasyonu (kitosan ve polietilenimin) (a/h) için farklı değerlerde formülasyon parametreleri çalışılmıştır. Literatürde yapılmış olan çalışmalarda, söz konusu parametrelerde yapılacak değişikliklerin elde

edilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel üzerinde etkisi olduğu açıkça belirtilmektedir. Değerlendirilen ön formülasyon parametrelerinde, amfifilik CD nanopartikül eldesi amacıyla çalışma grubumuz tarafından gerçekleştirilen önceki çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar da dikkate alınmıştır (45, 72, 108, 147, 156, 157, 245-247). Bu kapsamda tasarlanan ön formülasyon çalışmalarında değerlendirilen parametreler ve çalışılan oranlar Tablo 3.1.'de belirtilmiştir. Oral yoldan uygulanmak üzere tasarlamayı hedeflediğimiz nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için, nanopartiküllerin taşınması istenen kritik kalite parametreleri ve karakteristik özellikleri gerek uygulama yolunun oral olması gerekse nanopartiküllerin fiziksel olarak stabil kalabilmesi amacıyla önceki bölümlerde açıklanan bilgiler ışığında belirlenmiştir. Bu amaçla, ortalama partikül büyüklüğü 300 nm'den küçük, polidispersite indeksi 0,3'den küçük ve zeta potansiyeli ise net pozitif olan katyonik nanopartiküller elde edilebilmesi amacıyla ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş olup formülasyon parametreleri ve ilgili değişkenlerin nanopartiküllerin karakteristik özellikleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Tez çalışması kapsamında kullanılan ve birer amfifilik CD türevi olan 6-O-CAPRO- β -CD ve Poly- β -CD-C6 kullanılarak Bölüm 3.4.'de açıklanan şekilde nanoöktürme metoduyla elde edilen nanopartiküller üzerinde formülasyon parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Optimum nanopartikül formülasyonu değişkenlerinin belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilen önformülasyon çalışmaları sonucu elde edilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri tayin edilmiştir. Farklı değişkenler ile elde edilen nanopartiküllere ait karakterizasyon verileri Tablo 4.11. ile Tablo 4.18. arasında belirtilmiştir.

Tablo 4.11. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın anyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi (n=3).

	<i>Polimer</i>	<i>(6-O-CAPRO-β-CD)</i>	
	<i>Polimer Konsantrasyonu</i>	<i>0.1% (a/h) (1 mg/1mL)</i>	
	<i>Organik faz:Sulu faz oranı</i>	<i>1:2</i>	
	<i>Karıştırma Hızı</i>	<i>600 rpm</i>	
Organik Faz	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyel (mV)
Etanol	329 ± 86	0,392	-21 ± 1
Aseton	194 ± 2	0,109	-24 ± 1

(6-O-CAPRO-β-CD) türevi amfifilik CD ile elde edilen nanopartiküllerde organik fazın etanol veya aseton oluşunun ortalama partikül büyüklüğü üzerine etkisi Tablo 4.11'de görülmekte olup, organik fazın aseton olduğu durumda anlamlı olarak (p<0,05) daha küçük partikül boyutuna sahip nanopartiküller elde edilmiştir.

Tablo 4.12. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın aseton olması durumunda polimer konsantrasyonunun anyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi (n=3).

	<i>Polimer</i>	<i>(6-O-CAPRO-β-CD)</i>	
	<i>Organik faz:Sulu faz oranı</i>	<i>1:2</i>	
	<i>Organik faz</i>	ASETON	
	<i>Karıştırma Hızı</i>	<i>600 rpm</i>	
Polimer Konsantrasyonu (%a/h)	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyel (mV)
0.05	189 ± 1	0,107	-20 ± 1
0.1	194 ± 2	0,109	-24 ± 2
0.5	302 ± 5	0,215	-17 ± 1

Organik fazın aseton olduğu durumda, (6-O-CAPRO-β-CD) konsantrasyonunun değişen oranlarında nanopartiküllerin eldesinde, %0,05 ve %0,1 (a/h) konsantrasyonlarda kullanılmasıyla elde edilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüklerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05). Diğer yandan, (6-O-CAPRO-β-CD) konsantrasyonunun %0,5 (a/h) olması durumunda, %0,05 ve %0,1 (a/h)

konsantrasyonlarında elde edilenlere göre daha büyük nanopartiküller elde edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.13. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın etanol olması durumunda polimer konsantrasyonunun anyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi ($n=3$).

	<i>Polimer</i>	<i>(6-O-CAPRO-β-CD)</i>	
	<i>Organik faz:Sulu faz oranı</i>	<i>1:2</i>	
	<i>Organik faz</i>	ETANOL	
	<i>Karıştırma Hızı</i>	<i>600 rpm</i>	
Polimer Konsantrasyonu (%a/h)	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyel (mV)
0.05	288 \pm 8	0,305	-17 \pm 1
0.1	329 \pm 86	0,392	-21 \pm 1
0.5	388 \pm 83	0,417	- 26 \pm 1

Organik fazın etanol olması durumunda ise (6-O-CAPRO- β -CD) konsantrasyonunun değişmesiyle elde edilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklükleri arasında anlamlı fark bulunmamış ($p > 0,05$), ancak bütün konsantrasyonlarda organik fazın aseton olması durumunda elde edilen nanopartiküllere göre daha yüksek ortalama partikül boyutuna sahip nanopartiküller elde edilmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.14. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, kaplama materyali olan kitosan polimeri konsantrasyonunun anyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi (n=3).

	<i>Polimer</i>	<i>(6-O-Capro β-CD)</i>	
	<i>Polimer Konsantrasyonu</i>	<i>0.1% (a/h) (1 mg/1mL)</i>	
	<i>Organik faz:Sulu faz oranı</i>	<i>1:2</i>	
	<i>Organik faz</i>	<i>Aseton</i>	
	<i>Karıştırma Hızı</i>	<i>600 rpm</i>	
Kaplama Materyali Konsantrasyonu (%a/h) Kitosan (Protasan™ UP G-113)	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyel (mV)
0.01	218 ± 5	0,257	+16 ± 1
0.025	284 ± 14	0,228	+18 ± 2
0.05	395 ± 2	0,213	+25 ± 1

Sulu çözeltilerinde negatif yüzey yüküne sahip bir amfifilik CD olan (6-O-CAPRO-β-CD) nanopartiküllerine pozitif yüzey yükü kazandırmak amacıyla kaplama materyali olarak kullanılan kitosan polimerinin farklı konsantrasyonlarında elde edilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklükleri arasında bütün konsantrasyonlar için anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p<0,05). Protasan UP G-113 konsantrasyonu arttıkça kaplama tabakasının genişlemesi nedeniyle nanopartiküllerin çapının da arttığı gözlenmiştir.

Tablo 4.15. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, kaplama materyali olan polietilenimin polimeri konsantrasyonunun anyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi (n=3).

	Polimer	(6-O-Capro β -CD)	
	Polimer Konsantrasyonu	0.1% (a/h) (1 mg/1mL)	
	Organik faz:Sulu faz oranı	1:2	
	Organik faz	Aseton	
	Karıştırma Hızı	600 rpm	
Kaplama Materyali Konsantrasyonu (%a/h) Polietilenimin	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyel (mV)
2,5	205 \pm 6	0,296	+22 \pm 1
5	238 \pm 9	0,311	+38 \pm 2
10	312 \pm 13	0,354	+ 46 \pm 1

Benzer şekilde, (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerine pozitif yüzey yükü kazandırmak amacıyla kaplama materyali olarak kullanılan polietilenimin polimerinin farklı konsantrasyonlarında elde edilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklükleri arasında da bütün konsantrasyonlar için anlamlı farklılık tespit edilmiş ($p < 0,05$) olup en küçük ortalama partikül büyüklüğü değeri % 2,5 (a/h) oranında elde edilmiştir. PEI kaplı nanopartiküllerde, nanopartikül çapının kaplama polimerinin yüzdesindeki artışla kaplama tabakasının artmasına bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.

Tablo 4.16. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın polikasyonik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi (n=3).

	Polimer	(Poly- β -CD-C6)	
	Polimer Konsantrasyonu	0.1% (a/h) (1 mg/1mL)	
	Organik faz:Sulu faz oranı	1:2	
	Karıştırma Hızı	600 rpm	
Organik Faz	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyel (mV)
Etanol	211 \pm 6	0,291	+45 \pm 9
Aseton	117 \pm 9	0,344	+42 \pm 3

(Poly- β -CD-C6) amfifilik CD ile organik fazın etanol olması durumunda 211,6 nm, aseton olması durumunda ise 117,4 nm boyutunda nanopartiküller elde edilmiş olup nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklükleri arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 4.17. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın aseton olması durumunda polimer konsantrasyonunun polikationik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi (n=3).

		<i>Polimer</i>	<i>(Poly-β-CD-C6)</i>
		<i>Organik faz:Sulu faz oranı</i>	1:2
		<i>Organik faz</i>	ASETON
		<i>Karıştırma Hızı</i>	600 rpm
Polimer Konsantrasyonu (%a/h)	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyel (mV)
0.05	82 \pm 5	0,368	+40,2 \pm 1
0.1	117 \pm 9	0,344	+41,9 \pm 3
0.5	157 \pm 3	0,577	+68,2 \pm 2

(Poly- β -CD-C6) amfifilik CD nanopartiküllerinin eldesinde kullanılan CD konsantrasyonunun değişen oranlarında bütün konsantrasyon değerleri için elde edilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklükleri arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 4.18. Önformülasyon çalışmaları kapsamında, organik fazın etanol olması durumunda polimer konsantrasyonunun polikationik nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerine etkisinin değerlendirilmesi (n=3).

		<i>Polimer</i>	<i>(Poly-β-CD-C6)</i>
		<i>Organik faz:Sulu faz oranı</i>	1:2
		<i>Organik faz</i>	ETANOL
		<i>Karıştırma Hızı</i>	600 rpm
Polimer Konsantrasyonu (%a/h)	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyel (mV)
0.05	206 \pm 13	0,340	+10,1 \pm 1
0.1	211 \pm 6	0,291	+41,9 \pm 3
0.5	283 \pm 10	0,372	+48,9 \pm 1

(Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerin eldesinde organik fazın etanol olması durumunda değişen CD konsantrasyonlarında elde edilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklükleri arasında %0,05 ve %0,1 (a/h) için anlamlı fark bulunmamış olup ($p>0,05$), konsantrasyonun %0,5 (a/h) olması durumunda anlamlı farklı ($p<0,05$) ortalama partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküller elde edilmiştir. Her üç konsantrasyon için de organik fazın etanol olması durumunda elde edilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüklerinin organik fazın aseton olması durumuna göre daha fazla oldukları tespit edilmiştir ($p<0,05$).

4.3. Optimum Nanopartikül Parametrelerinin Belirlenmesi ve İlaç Yüklü Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Optimum nanopartikül parametrelerinin belirlenmesi amacıyla Bölüm 3.4.'te açıklanan şekilde hazırlanan ve Bölüm 3.5.'de açıklandığı şekilde karakterizasyonları gerçekleştirilen nanopartiküllere ilişkin optimum karakterizasyon özelliklerine sahip olduğuna karar verilen formülasyonların elde edildiği parametreler uygulanarak ilaç yüklü formülasyonlar hazırlanmış ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Önformülasyon çalışmaları sonunda, tez çalışması kapsamında nanopartiküllerin hazırlanmasında optimum formülasyon parametreleri olarak belirlenen değişkenler ve değişkenlere ilişkin değerler Tablo 4.19.'da görülmektedir. Optimum formülasyon parametreleri ile hazırlanan boş ve CPT yüklü nanopartiküllere ait parametreler ve karakterizasyon verileri Tablo 4.20.'de sunulmuştur.

Tablo 4.19. Önformülasyon çalışmaları sonucunda tespit edilen optimum formülasyon parametrelerine ilişkin veriler.

Değişken / Nanopartikül Materyali		6-O-Capro-β-CD	Poly-β-CD-C6
Organik Faz		Aseton	
Siklodekstrin Konsantrasyonu		% 0,1 (a/h)	
Organik Faz : Sulu Faz Oranı		1:2 (h/h)	
Karıştırma Hızı		600 rpm	
Kaplama Materyali Konsantrasyonu	Kitosan	% 0,025 (a/h)	--
	Polietilenimin	% 2,5 (a/h)	--

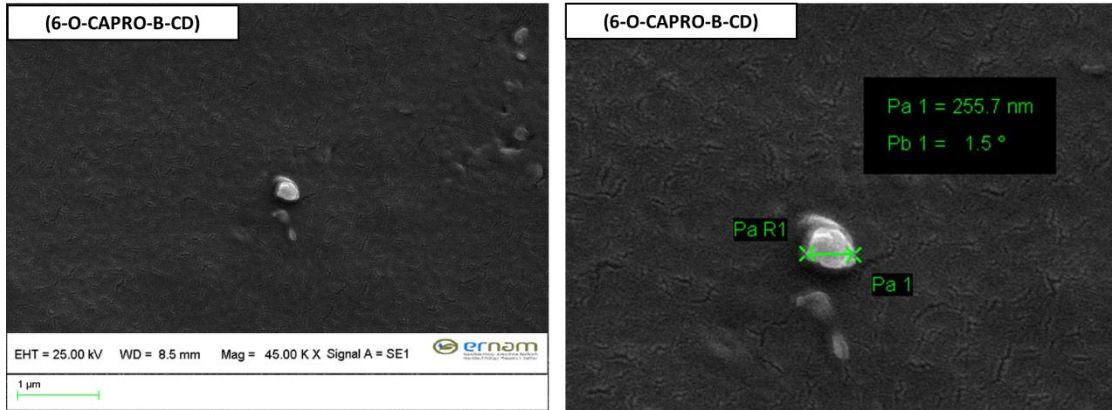
Tablo 4.20. Optimum formülasyon parametrelerine göre hazırlanan boş ve kamptotesin yüklü nanopartiküllere ait karakterizasyon verileri.

Polimer (%0,1 a/h) (Organik Faz; Aseton) (Organik Faz:Sulu Faz 1:2) (CS oranı %0,025 a/h) (PEI oranı %2,5 a/h)	Ortalama Partikül Büyükülüğü (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyel (mV)
(6-O-CAPRO-β-CD)	194 ± 3	0,11	-24 ± 2
CPT/(6-O-CAPRO-β-CD)	252 ± 12	0,27	-22 ± 2
CS-(6-O-CAPRO-β-CD)	284 ± 13	0,23	+18 ± 1
CPT/CS-(6-O-CAPRO-β-CD)	298 ± 23	0,29	+19 ± 1
PEI-(6-O-CAPRO-β-CD)	205 ± 6	0,30	+22 ± 1
CPT/PEI-(6-O-CAPRO-β-CD)	273 ± 42	0,39	+22 ± 1
(Poly-β-CD-C6)	117 ± 9	0,34	+ 42 ± 3
CPT/(Poly-β-CD-C6)	135 ± 19	0,27	+40 ± 1

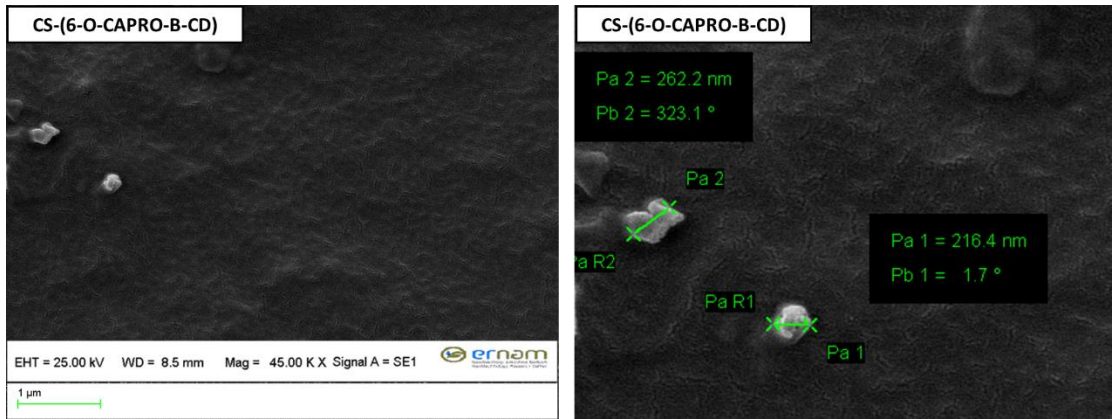
4.3.1. Nanopartiküllerin Morfolojilerinin İncelenmesi

CPT enkapsüle nanopartiküllerin morfolojik analizleri Bölüm 3.5.3.'de açıklandığı şekilde, ZEISS LS-10 Life Science Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları kapsamında Malvern Zetasizer Nano ZS ile ortalama partikül büyüklüğü tayini gerçekleştirilen formülasyonların taramalı

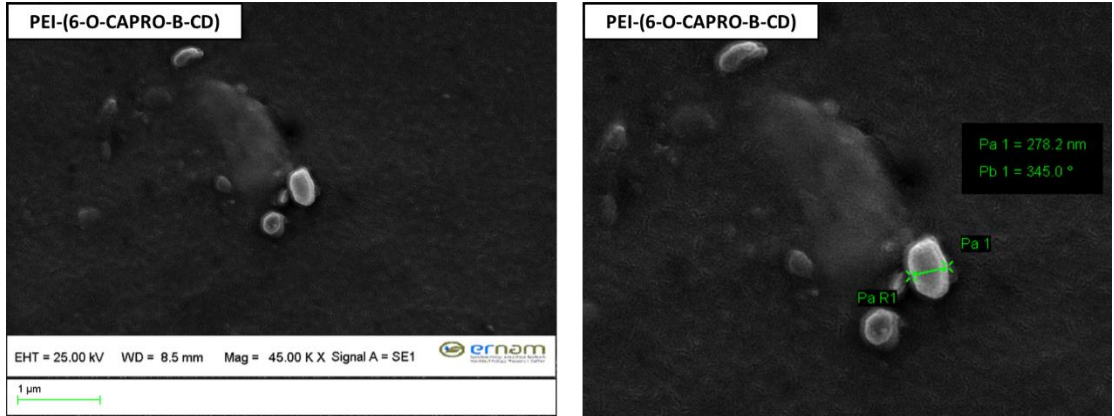
elektron mikroskobu ile görüntülenmesi ile morfolojik özelliklerinin incelenmesi yanında partikül büyüklüğü değerlerini teyit etme imkanı bulunmaktadır. Nanopartikül formülasyonlarının taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen görüntüler Şekil 4.12 ile Şekil 4.15. arasında sunulmuştur.



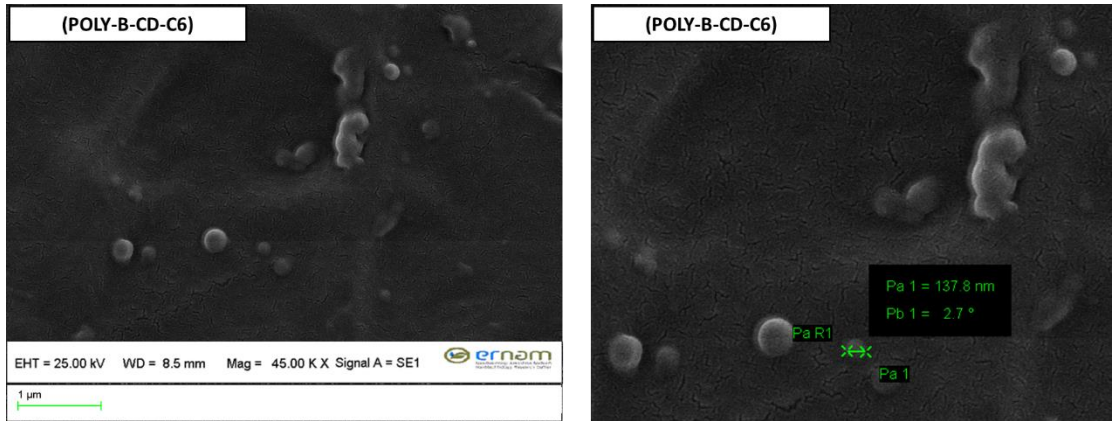
Şekil 4.12. (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.



Şekil 4.13. Kitosan kaplı (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.



Şekil 4.14. Polietilenimin kaplı (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.



Şekil 4.15. (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerine ait SEM görüntüleri.

4.3.2. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

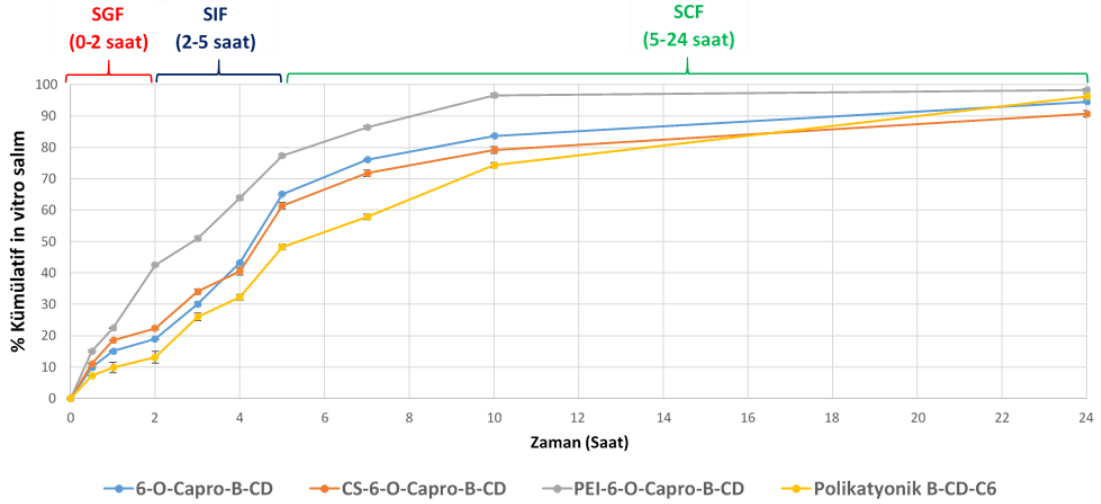
CPT yüklü formülasyonların hazırlanması sürecinde amfifilik CD miktarının %10 (a/h)'u oranında organik faza ilave edilen CPT'nin elde edilen nanopartiküllerde enkapsülasyon etkinliği Bölüm 3.5.4.'de açıklanan şekilde direkt yöntemle valide HPLC analizi yapılarak değerlendirilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliklerine ilişkin veriler Tablo 4.21.'de sunulmuştur.

Tablo 4.21. Amfifilik siklodekstrin nanopartiküllerin kamptotesin enkapsülasyon etkinlikleri.

Nanopartikül Formülasyonu	% Enkapsülasyon Etkinliği \pm SS	% Yükleme Kapasitesi \pm SS
6-O-CAPRO- β -CD	32,13 \pm 2,8	3,21 \pm 0,3
CS-(6-O-CAPRO- β -CD)	36,56 \pm 2,4	3,46 \pm 0,6
PEI-(6-O-CAPRO- β -CD)	21,04 \pm 3,3	1,68 \pm 0,4
(Poly- β -CD-C6)	35,11 \pm 3,2	3,51 \pm 0,6

4.3.3. *In vitro* Salım Çalışmaları

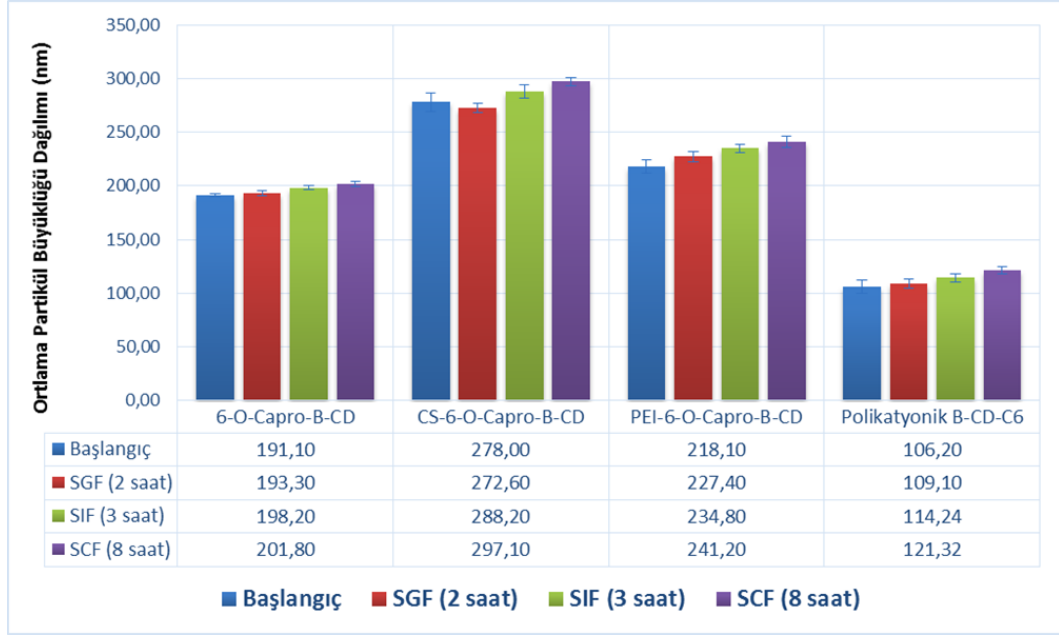
Hazırlanan CPT yüklü nanopartikül formülasyonlarından, etkin maddenin salım profili Bölüm 3.5.5.'de açıklanan yöntemle gerçekleştirilmiştir. *In vitro* salım çalışmaları 24 saat olacak şekilde kendi içinde iki tekrarlı gerçekleştirilerek 24 saatin sonunda devam ettirilen salım profili ile çalışma kendi içinde kontrollü olarak ilerletilmiştir. Gastrointestinal kanal koşullarını gerek pH gerekse geçiş zamanı açısından simüle edebilmek amacıyla, simüle mide sıvısında 0-2 saat, simüle bağırsak sıvısında 2-5 saat ve ardından deney sonuna kadar simüle kolonik sıvı koşullarında devam ettirilen salım çalışmalarında, mide ve bağırsak segmentlerinde diğer formülasyonlara göre mümkün olduğunca az miktarda ilaç salın ve yapısında bulunan enkapsüle haldeki ilacı büyük ölçüde kolonik bölgeye taşıyabilen nanopartikül formülasyonlarını değerlendirerek tespit etmek hedeflenmiştir. Çalışma kapsamında yapılan analizler sonucunda, nanopartikül formülasyonlarının simüle mide sıvısı (SGF) ve simüle bağırsak sıvısında (SIF) geçirmeleri gereken salım sürelerinin tamamlanması itibariyle, simüle kolon sıvısı ortamına (SCF) geçmeden hemen önce (5. saat sonunda) salınan kümülatif CPT miktarları; (6-O-CAPRO- β -CD) için %65,1, CS-(6-O-CAPRO- β -CD) için % 61,34, PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) için % 77,3 ve (Poly- β -CD-C6) için ise %48,2 olarak bulunmuştur. İlk 5 saatlik salımın büyük kısmının SIF yani ince bağırsak sıvısında gerçekleştiği gözlenmiştir. Salım profilleri incelendiğinde en yavaş salım profilinin (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerine ait olduğu gözlenmiştir. Nanopartiküllerin 24 Saat süreli *in vitro* salım profilleri Şekil 4.16'da sunulmuştur.



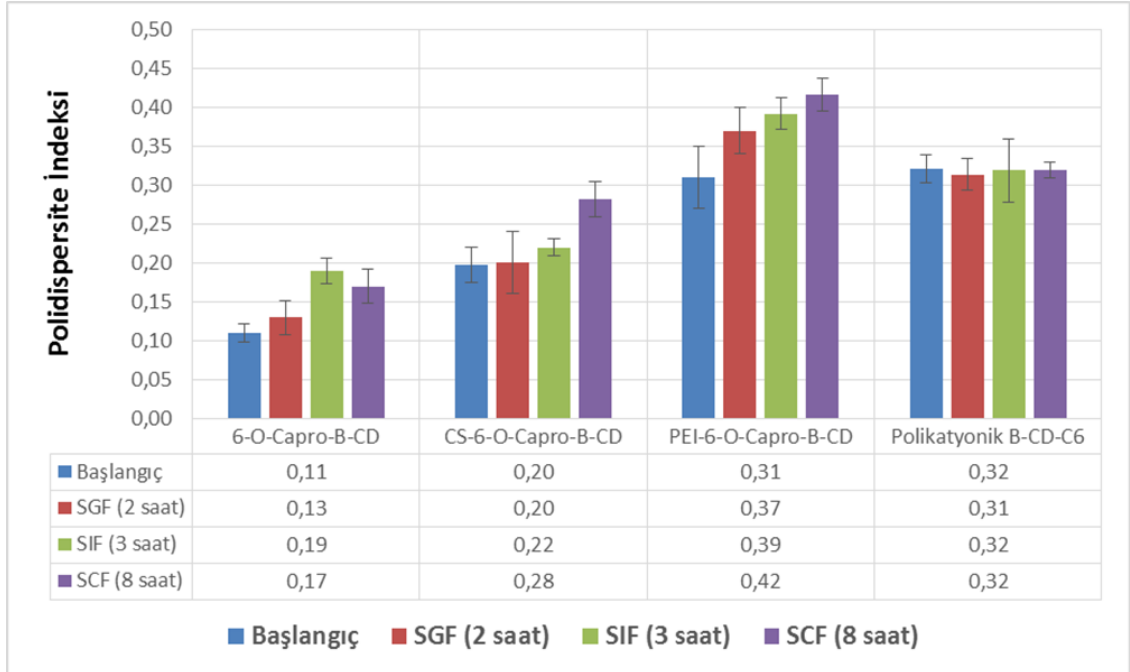
Şekil 4.16. Nanopartiküllerden kamptotesinin 24 saat süreli in vitro salım grafiği.

4.3.4. Gastrointestinal Simüle Sıvılarda Nanopartiküllerin Fiziksel Stabiliteleri Çalışmaları

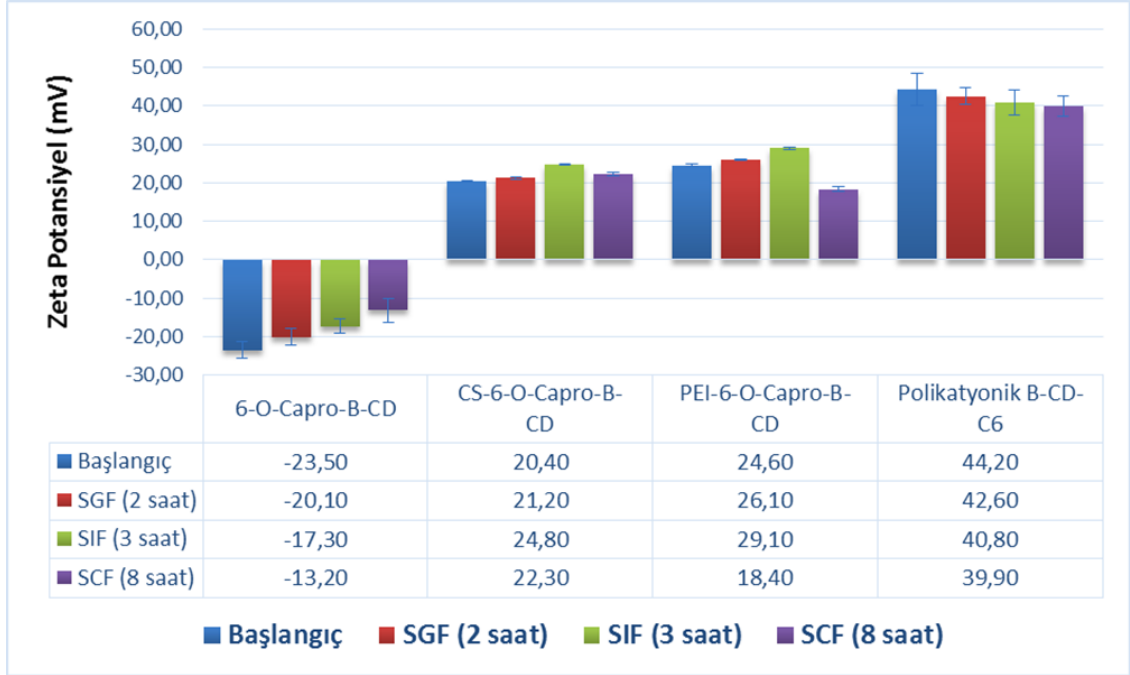
Oral yolla uygulanmak üzere hazırlanan CPT yüklü amfifilik CD nanopartiküllerinin hedef bölge olan kolona ulaşana kadar gastrointestinal kanalın farklı bölgelerinde ilgili bölgelerin fizyolojik koşulları altında stabil kalabilmesi oral yolla uygulanması planlanan formülasyonlar için öncelikli gerekliliklerin başında gelmektedir (75). Bu amaçla, Bölüm 3.5.6.'da açıklandığı şekilde, CPT yüklü nanopartiküller gastrointestinal kanalı temsil etmesi amacıyla farklı simüle sıvılarda (SGF, SIF, SCF) ve bu ortamlarda geçirecekleri sürelerde göz önüne alınarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon öncesi ve sonrası partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri tayin edilmek suretiyle nanopartiküllerin simüle gastrointestinal sıvılarda fiziksel stabiliteleri değerlendirilmiş olup, sonuçlar Şekil 4.17. ile Şekil 4.19. arasında sunulmuştur.



Şekil 4.17. Gastrointestinal simüle sıvılarda gerçekleştirilen stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğündeki değişimleri (n=3, ±SS).



Şekil 4.18. Gastrointestinal simüle sıvılarda gerçekleştirilen stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin polidispersite indekslerindeki değişimler (n=3, ±SS).



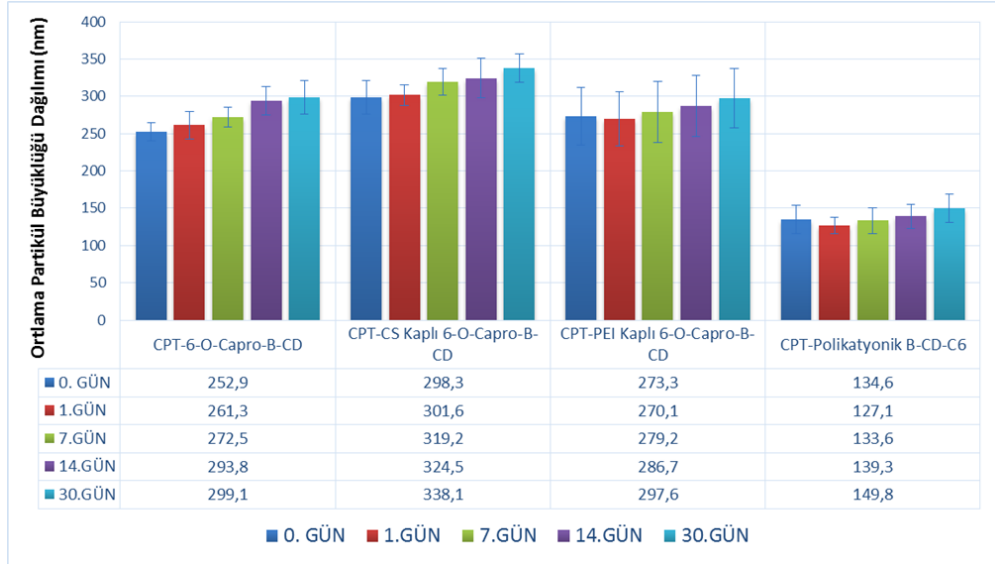
Şekil 4.19. Gastrointestinal simüle sıvılarda gerçekleştirilen stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerindeki değişimler (n=3, ±SS).

Hazırlanan amfifilik CD nanopartiküllerinin gastrointestinal simüle sıvılarda yukarıda belirtilen sürelerde inkübasyonlarının ardından, başlangıç değerlerine göre karakterizasyon parametrelerinde; (6-O-CAPRO- β -CD) ve polietilenimin kaplı (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerde simüle intestinal sıvı ve simüle kolonik sıvıda istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p < 0,05$) tespit edilmiştir. Kitosan kaplı (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerde ise yalnızca simüle kolonik sıvıda istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($p < 0,05$) tespit edilmişken, (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin karakterizasyon parametrelerinde ise bütün ortamlarda anlamlı bir farklılık meydana gelmediği tespit edilmiştir.

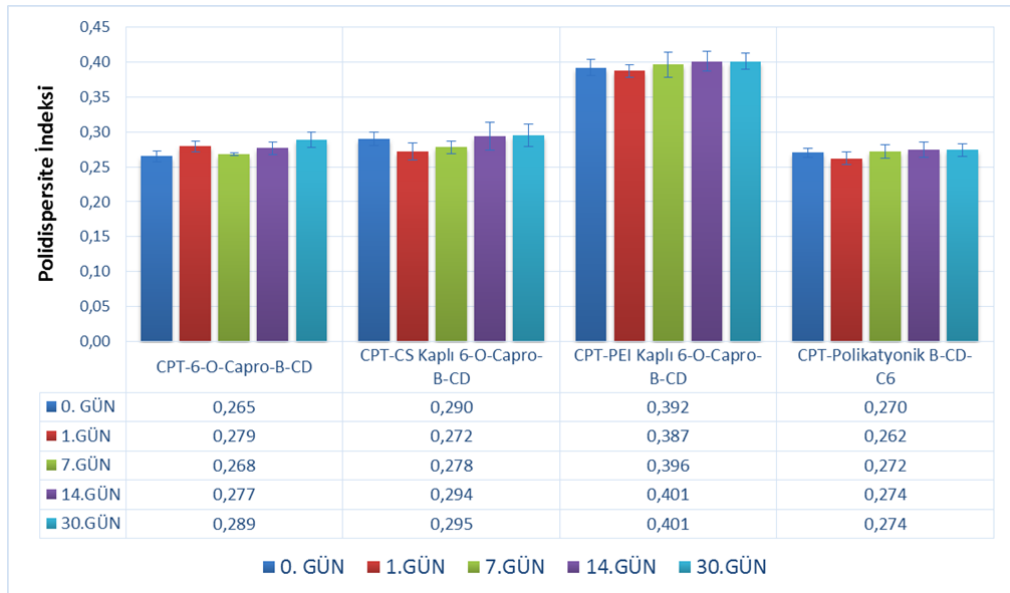
4.3.5. Fiziksel Stabilite Çalışmaları

CPT yüklü anyonik ve katyonik amfifilik CD nanopartiküllerinin sulu dispersiyon halinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de ışıktan korunarak 1 ay süresince gerçekleştirilen ve Bölüm 3.5.7.'de açıklanan kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları kapsamında, belirli günlerde (0., 1., 7.,

14. ve 30.) örnekler alınarak nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerlerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Ölçümlere ilişkin sonuçları Şekil 4.20. ile Şekil 4.22. arasında sunulmuştur.



Şekil 4.20. Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüklerindeki değişimler (n=3, ±SS).



Şekil 4.21. Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin polidispersite indekslerindeki değişimler (n=3, ±SS).



Şekil 4.22. Kısa süreli stabilite çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin zeta potansiyel değerlerindeki değişimler (n=3, ±SS).

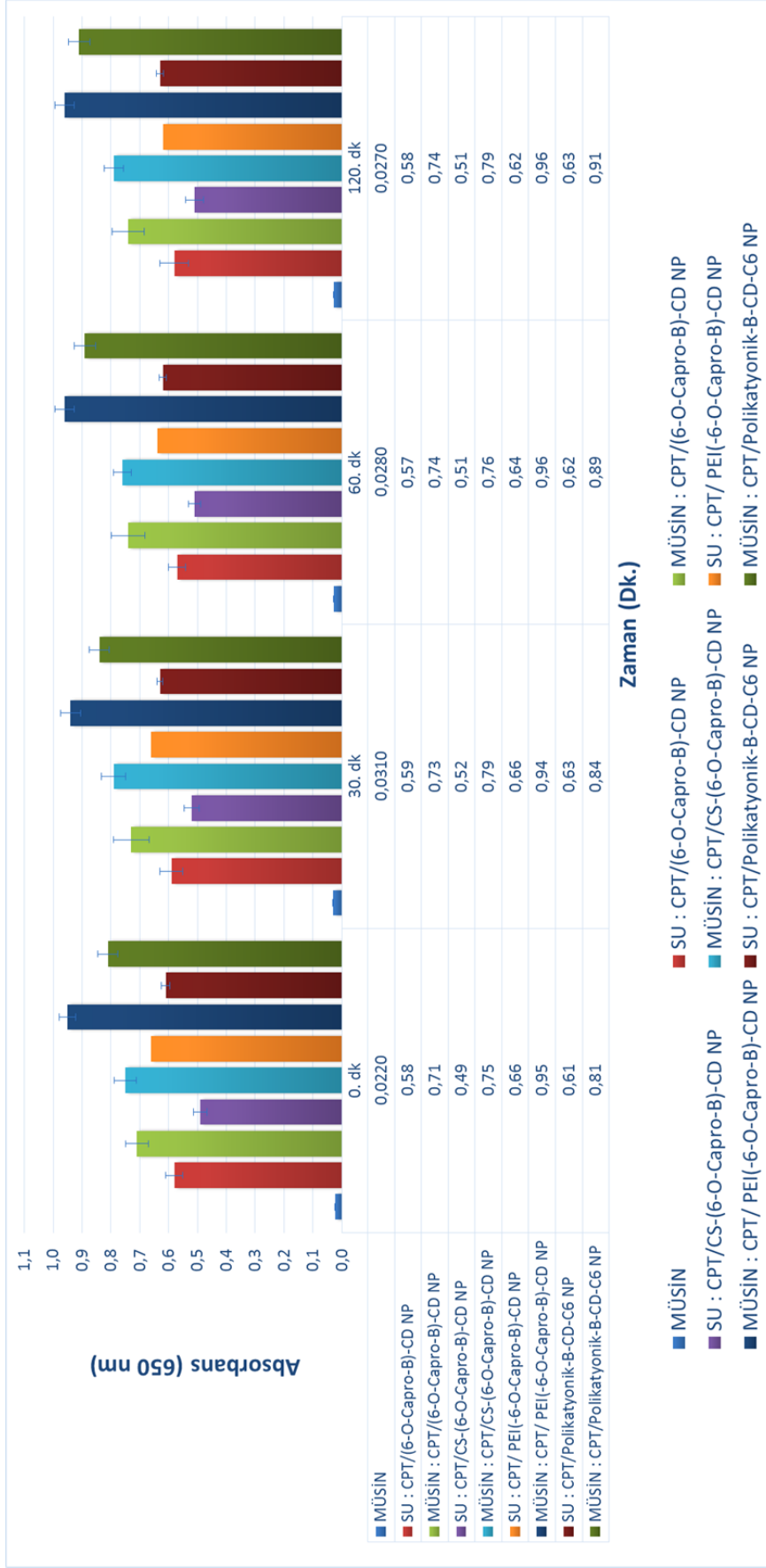
Hazırlanan amfifilik CD nanopartiküllerinin sulu dispersiyonları halinde saklanarak belirli günlerde ölçülen karakterizasyon parametrelerinde, başlangıç değerlerine göre; (6-O-CAPRO- β -CD), kitosan kaplı (6-O-CAPRO- β -CD) ve (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinde 1., 7. ve 14. günlerde anlamlı bir fark yokken 30. günde anlamlı farklılık ($p < 0,05$) tespit edilmiştir. Polietilenimin kaplı (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinde ise hiçbir zaman noktasında kendi içinde anlamlı bir fark tespit edilememiş olmasına rağmen ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi diğer formülasyonlara göre anlamlı ölçüde yüksek kalmaya devam etmiştir ($p < 0,05$).

4.4. Mukus ile Etkileşim Çalışmaları

4.4.1. Türbidimetrik Tayin

Bölüm 3.6. ve Bölüm 3.6.1.'de açıklandığı üzere oral yoldan uygulanan ilaç taşıyıcı sistemlerin beklenen etkiyi gösterebilmeleri için gastrointestinal bölgenin mekanik klirensi karşısında mukus ile yeterince etkileşebilmesi ve nanopartikülün hedeflenen bölgede yeterince kalabilmesine imkan vererek taşıdığı ilacı hedef bölgeye ulaştırabilmesi gerekmektedir. Bu noktada epitelyal hücre tabakası üzerinde intestinal kanalın primer ortamını oluşturan mukus ile nanopartiküllerin etkileşiminin

önemli bir parametre olması sebebiyle ilaç taşıyıcı sistemlerin mukoadezif özellikleri tayin edilmektedir. Tez çalışması kapsamında hazırlanan nanopartiküllerin mukoadezif özelliklerinin tayini amacıyla gerçekleştirilen türbidimetrik analizlere ilişkin veriler Şekil 4.23.'de görülmektedir.

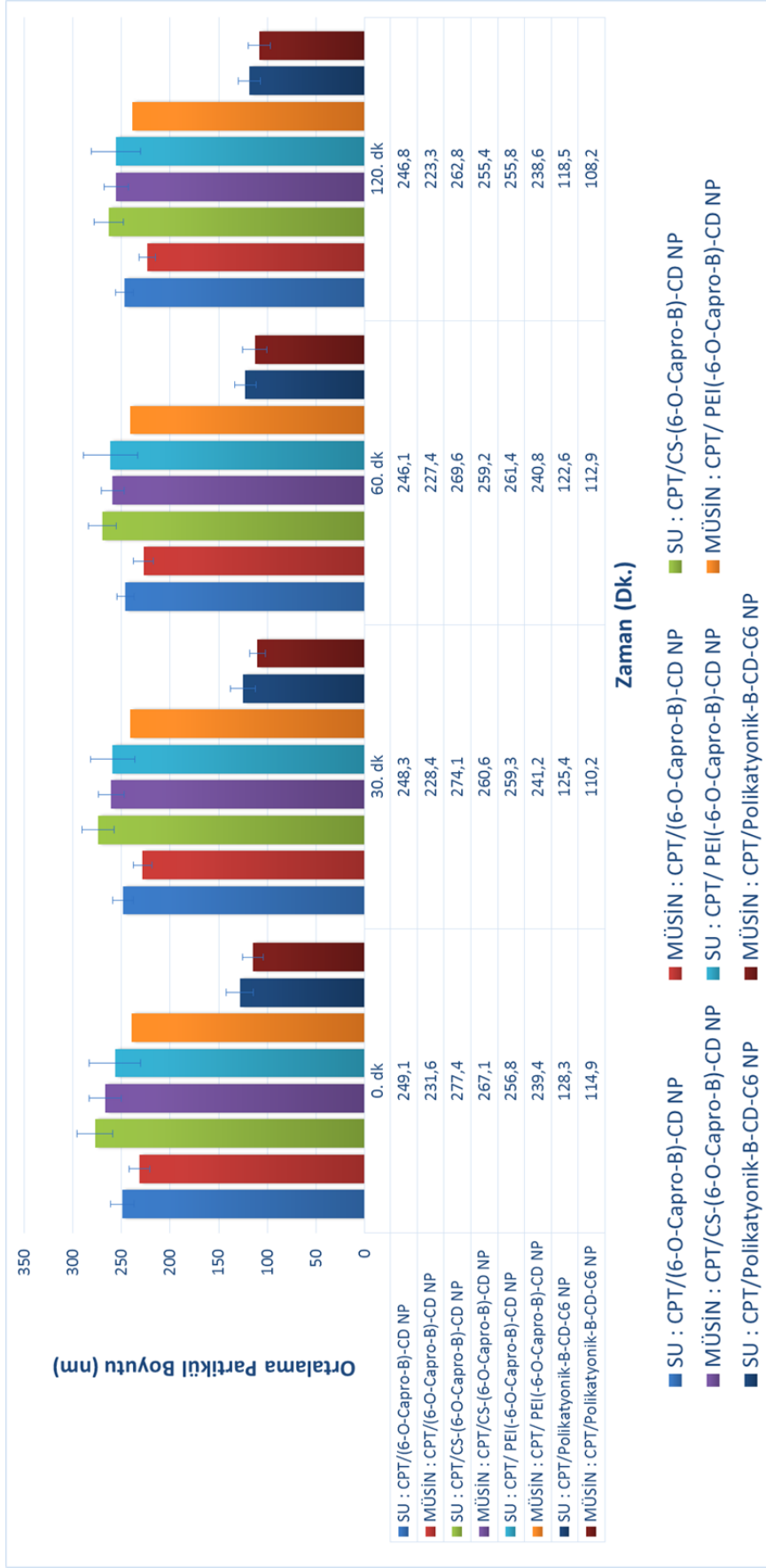


Şekil 4.23. Müsinele etkileşim çalışmaları kapsamında nanopartiküllerin 120. dk süresince gerçekleştirilen türbidimetrik ölçüm sonuçları ($n=3, \pm SS$).

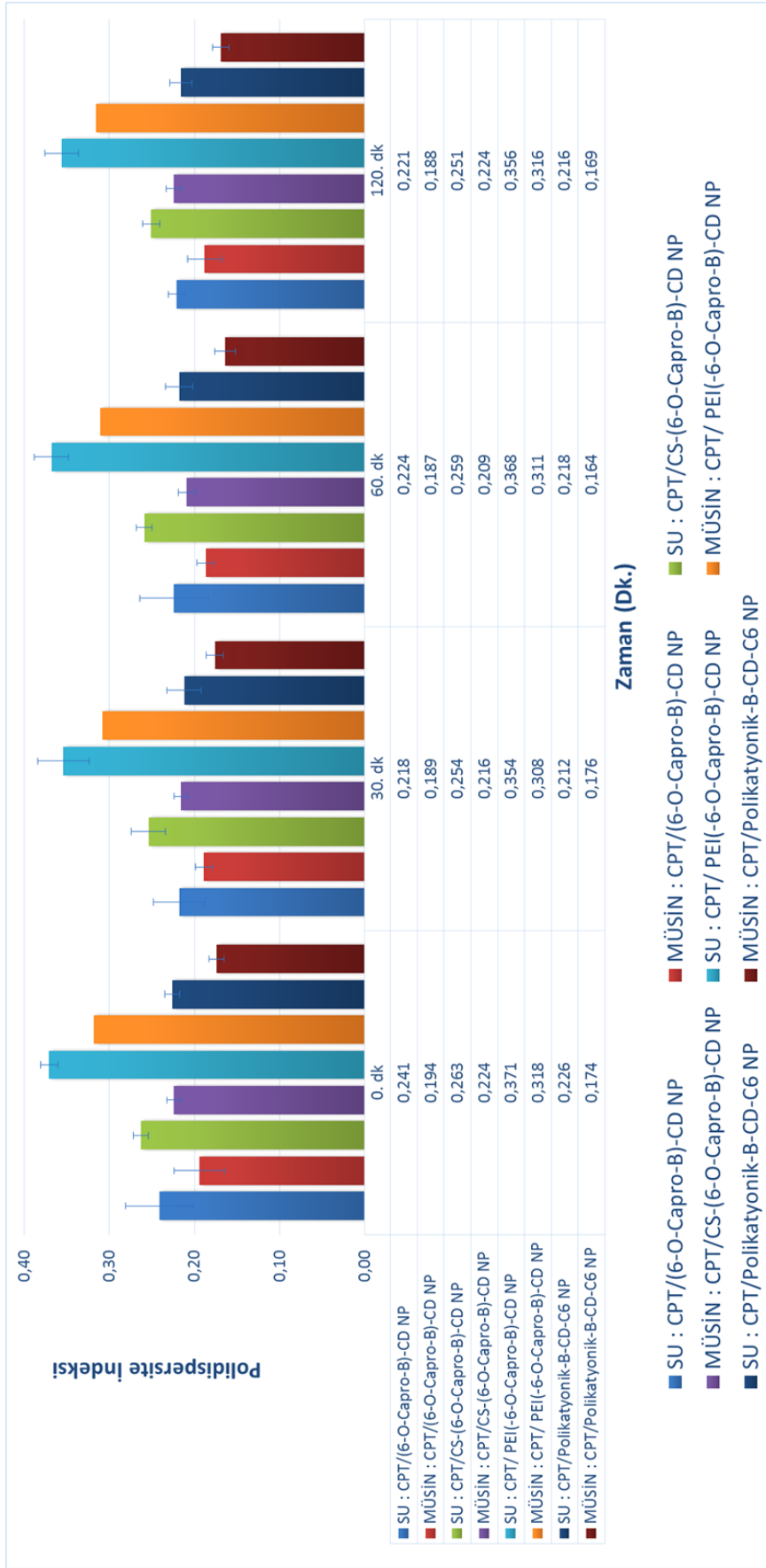
Şekil 4.23.'te sonuçları verilen müsinle etkileşimin türbidimetrik olarak değerlendirilmesi çalışmasında, bütün nanopartikül formülasyonlarının her zaman noktası için (0., 30., 60. ve 120. dk) müsin ortamında verdikleri absorbasın su ortamında verdikleri absorbandsan anlamlı farklı ($p<0,05$) olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.4.2. Nanopartiküllerin Mukus Varlığında Karakterizasyonu

Mucus ile etkileşimlerinin türbidimetrik değerlendirilmesinin ardından nanopartiküllerin mucus varlığında karakterizasyon parametrelerindeki değişimin değerlendirilmesi çalışması Bölüm 3.6.2.'de açıklandığı şekilde 120 dk süresince gerçekleştirilmiş olup, belirli zaman noktalarında (0., 30., 60. ve 120. dk) alınan örnekler üzerinde gerçekleştirilen ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi analizlerine ilişkin veriler sırasıyla Şekil 4.24. ve Şekil 4.25.'de görülmektedir. Müsin varlığında ve yokluğunda nanopartikül dispersiyonlarının zeta potansiyel değişimlerine ilişkin analiz sonuçları ise Tablo 4.22.'de görülmektedir.



Şekil 4.24. Nanopartiküllerin müsin varlığında 120. dk süresince gerçekleştirilen karakterizasyon parametrelerinin değerlendirilmesi kapsamında ortalama partikül büyüklüğü bulguları (n=3, ±SS).



Şekil 4.25. Nanopartiküllerin müsin varlığında 120. dk süresince gerçekleştirilen karakterizasyon parametrelerinin değerlendirilmesi kapsamında polidispersite indeksi bulguları (n=3, ±SS).

Şekil 4.24. ve Şekil4.25.'de sonuçları sunulan müsin ortamında karakterizasyon parametrelerinin değerlendirilmesi çalışmalarında, bütün nanopartikül formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indekslerinin 60. dk'ya kadar anlamlı bir farklılık göstermediği ($p>0,05$) ancak 120. dk'da ortalama partikül büyüklükleri ve polidispersite indekslerinde anlamlı bir değişiklik olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.22. Nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen müsin varlığında ve yokluğunda zeta potansiyel değeri bulguları.

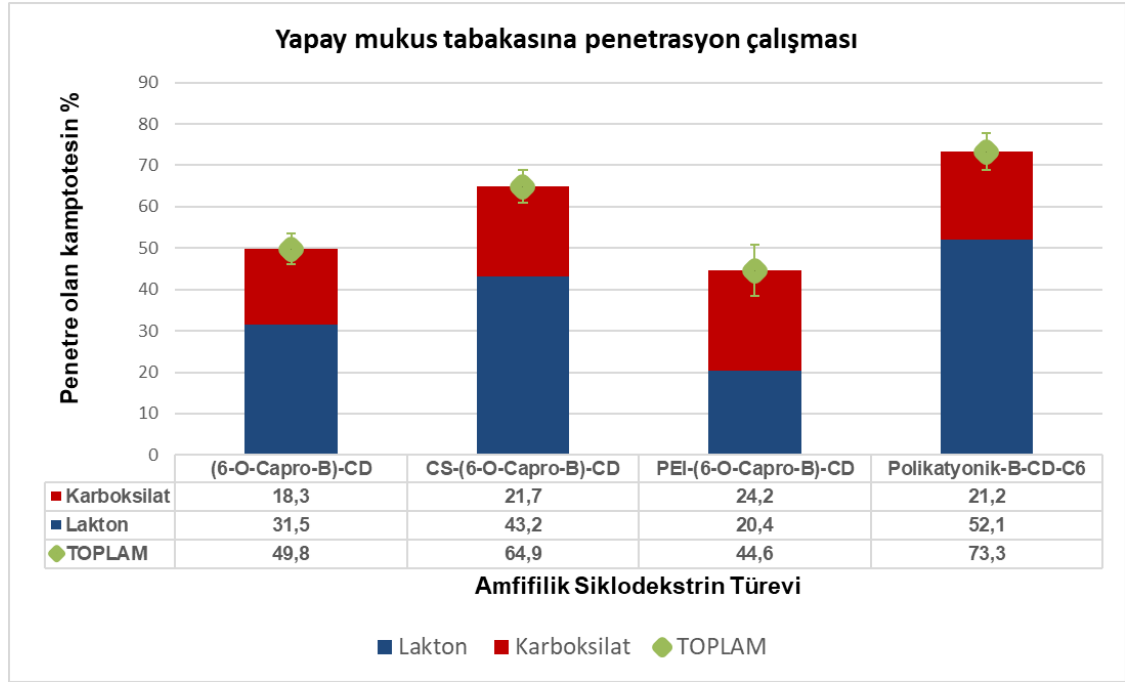
Formülasyon \ Parametre	Zeta Potansiyel (mV)	Zeta Potansiyel (mV) Müsin varlığında (Müsin:NP 1:4)
Müsin	- 8,57	
CPT/(6-O-Capro-B)-CD NP	-21,3	-25,8
CPT/CS-(6-O-Capro-B)-CD NP	+18,9	+13,7
CPT/ PEI-(6-O-Capro-B)-CD NP	+28,3	+22,4
CPT/Polikatyonik-B-CD-C6 NP	+43,2	+37,8

Elde edilen nanopartiküllerin müsin çözeltisinde (Müsin:NP 1:4) seyreltilmesiyle müsinin negatif yüzey yükünden etkilenerek ($p<0,05$) zeta potansiyellerinin orantılı şekilde düştüğü ancak (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin yine de en yüksek zeta potansiyele (37,8 Mv) sahip formülasyon olarak kalabildikleri tespit edilmiştir.

4.5. Yapay Mukus Tabakasına Penetrasyon Çalışmaları

Oral yoldan uygulanarak intestinal bölgeye ulaşan nanopartiküllerin etki bölgesine ulaşarak enkapsüle haldeki ilacı hedef bölgeye taşıyabilmesi için öncelikle bölgede var olan müsin ile yeterince etkileşerek ortamda kalış süresini artırması ve ardından da mukus tabakasına penetre olabilmesi gerekmektedir. Nanopartiküllerin mukus tabakasına penetrasyonlarının değerlendirilebilmesi amacıyla, CPT yüklü farklı

amfifilik CD nanopartikül formülasyonlarının yapay mukus tabakası modelinde penetrasyon çalışmaları Bölüm 3.7.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Yapay mukus tabakasına penetre olabilen toplam CPT miktarı valide HPLC metodu ile lakton ve karboksilat formlarının da ayrı ayrı tayin edilmesiyle hesaplanarak belirlenmiştir. Analize ilişkin sonuçlar Şekil 4.26.'da görülmektedir.



Şekil 4.26. Yapay mukus tabakasına penetrasyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen analiz sonuçlarına göre mukus tabakasına penetre olabilen kamptotesinin % miktarları (n=3, ±SS).

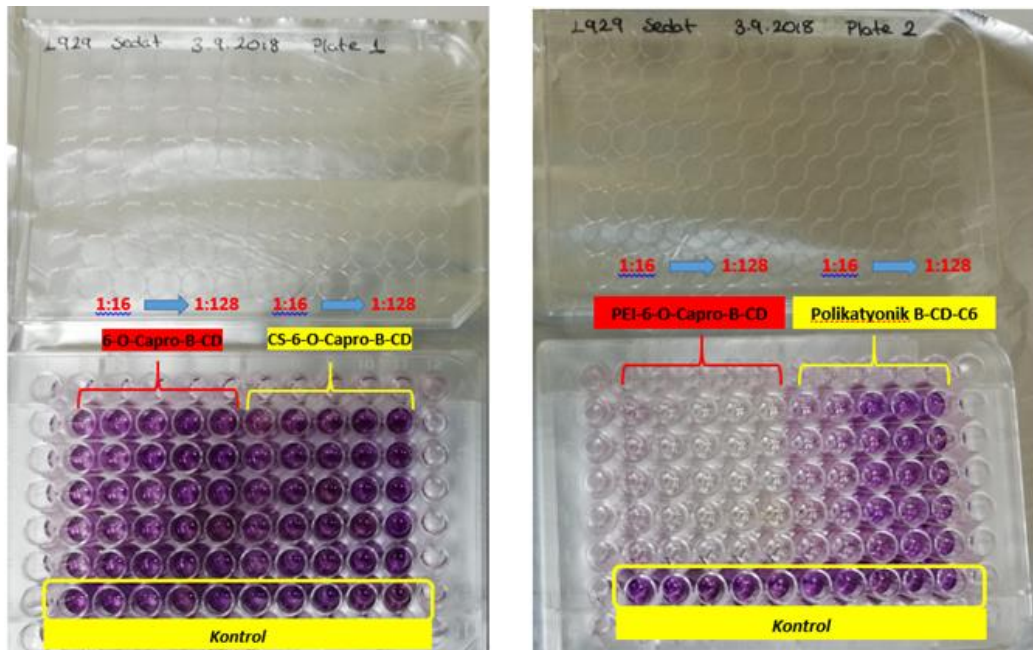
Şekil 4.26'de sonuçları verilen yapay mukus tabakasına penetrasyon çalışmalarına göre en yüksek penetrasyon oranı (%73,3) (Poly- β -CD-C6) nanopartikülleri ile elde edilmiş olup, aralarında anlamlı bir farklılık olmamakla beraber ($p>0,05$) CS-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinin penetrasyon oranından (%64,9) da fazladır. (6-O-CAPRO- β -CD) ve PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikülleri ise en az penetrasyon oranı sağlayan iki formülasyon olmakla beraber kendi aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($p>0,05$). Genel olarak bakıldığında (Poly- β -

CD-C6) nanopartikülleri söz konusu formülasyonlardan anlamlı olarak yüksek oranda penetrasyon göstermiştir ($p < 0,05$).

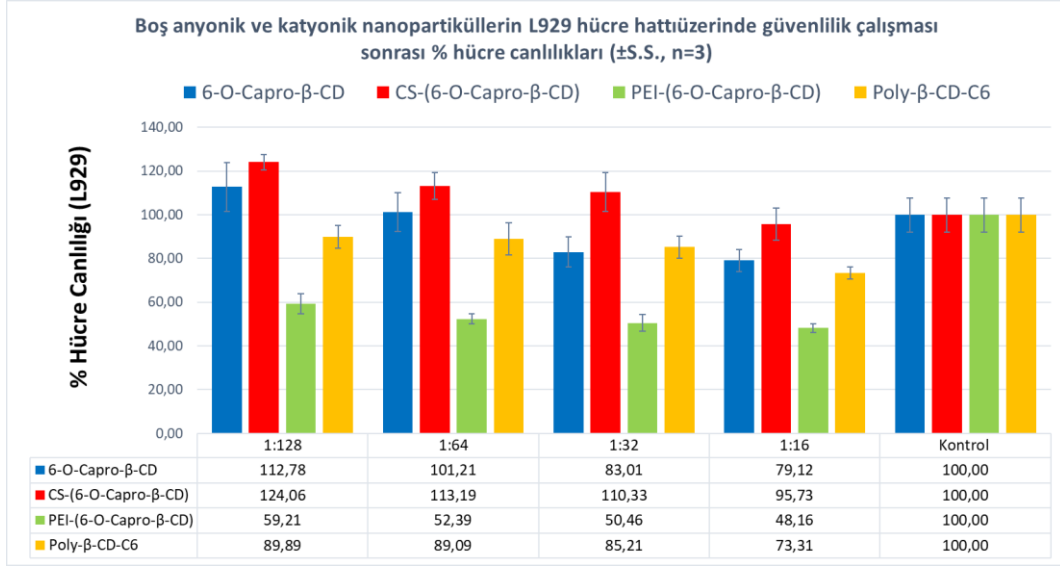
4.6. İn vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

4.6.1. Güvenlilik Çalışmaları; Boş Nanopartiküllerin L929 Hücreleri Üzerinde Sitotoksitesinin Araştırılması

İlaç yüklü olmayan amfifilik CD nanopartiküllerinin sağlıklı hücrelerdeki etkileri Bölüm 3.8.1.'de açıklandığı gibi MTT testi ile değerlendirilmiştir. İlaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanan nanopartiküllerin sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etkilerinin incelenmesi ve sistemin güvenliliğin değerlendirilmesi amacıyla USP tarafından önerilen L929 fare fibroblast hücre hattı yaygın olarak kullanılabilir (248). Bu amaçla, ilaç yüklü olmayan 4 farklı amfifilik CD nanopartikül formülasyonunun, 4 farklı oranda (1:16, 1:32, 1:64 ve 1:128) seyreltilmiş süspansiyonlarının 24 saat sonunda L929 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkilerine ilişkin MTT uygulaması sonrası plakların görüntüsü Şekil 4.27.'de, % hücre canlılığı sonuçları ise her nanopartikül formülasyonu için ayrı ayrı olmak üzere Şekil 4.28.'de sunulmuştur.



Şekil 4.27. MTT uygulaması sonrasında DMSO ilavesi ile çözünerek hücre canlılığını gösteren formazan kristallerinin verdiği renk yoğunlukları.



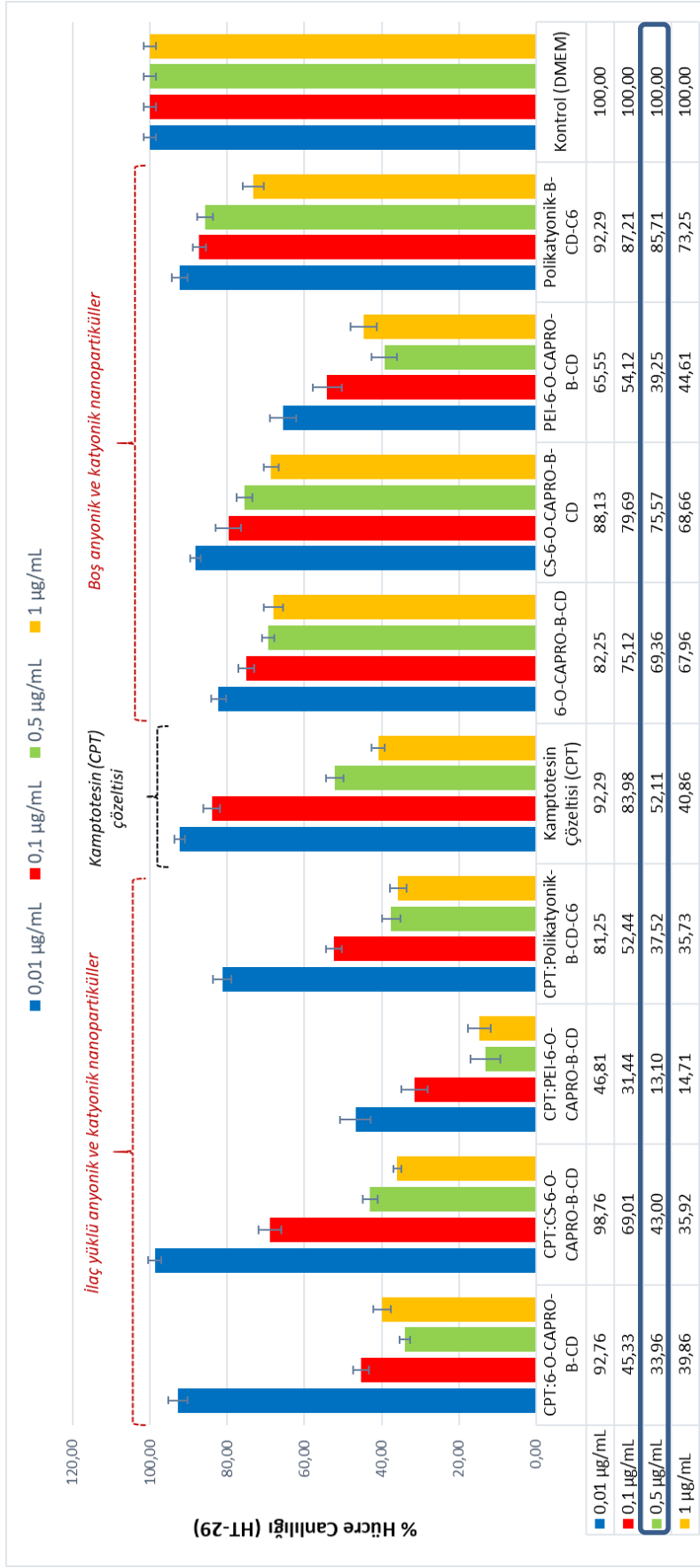
Şekil 4.28. Boş anyonik ve katyonik nanopartiküllerin L929 hücre hattı üzerinde sitotoksosite çalışması sonucu elde edilen % hücre canlılığı değerleri (\pm S.S., n=3).

İlaç yüklü olmayan amfifilik CD nanopartiküllerinin güvenliliklerinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmaların sonucuna göre; (6-O-CAPRO-β-CD) ve (Poly-β-CD-C6) nanopartikülleri sadece 1:16 seyreltme oranında kontrole göre anlamlı derecede ($p < 0,05$) hücre ölümüne sebep olmuştur. Diğer konsantrasyonlar için söz konusu iki formülasyon ve CS-(6-O-CAPRO-β-CD)'un sebep olduğu hücre ölümü kontrol grubuna göre anlamlı değildir ($p > 0,05$) ve bu konsantrasyonlardan itibaren %83 ve üzeri hücre canlılığı mevcuttur. Diğer yandan PEI-(6-O-CAPRO-β-CD) nanopartiküllerinde ise bütün konsantrasyonlarda diğer nanopartiküllerden anlamlı olarak ($p < 0,05$) fazla hücre ölümüne sebep olmuştur. Ayrıca PEI-(6-O-CAPRO-β-CD) nanopartiküller bütün konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre hücre canlılığını anlamlı ölçüde ($p < 0,05$) azaltarak, %48-%59 aralığında hücre canlılığı ile ciddi toksisite göstermiştir. Amerikan Farmakopesi (USP) 29 tarafından yayınlanan (87) "Biyolojik Reaktivite Testi: in vitro" da hastaya doğrudan veya dolaylı olarak temas edecek polimerik malzemelerin güvenliliğinin değerlendirilmesi amacıyla tavsiye edilen L929 hücre hattı üzerinde; CS-(6-O-CAPRO-β-CD) nanopartiküllerinde 1:16 seyreltme oranından itibaren, (Poly-β-CD-C6) ve (6-O-CAPRO-β-CD) nanopartiküllerinde ise 1:32 seyreltme oranından itibaren %80 ve

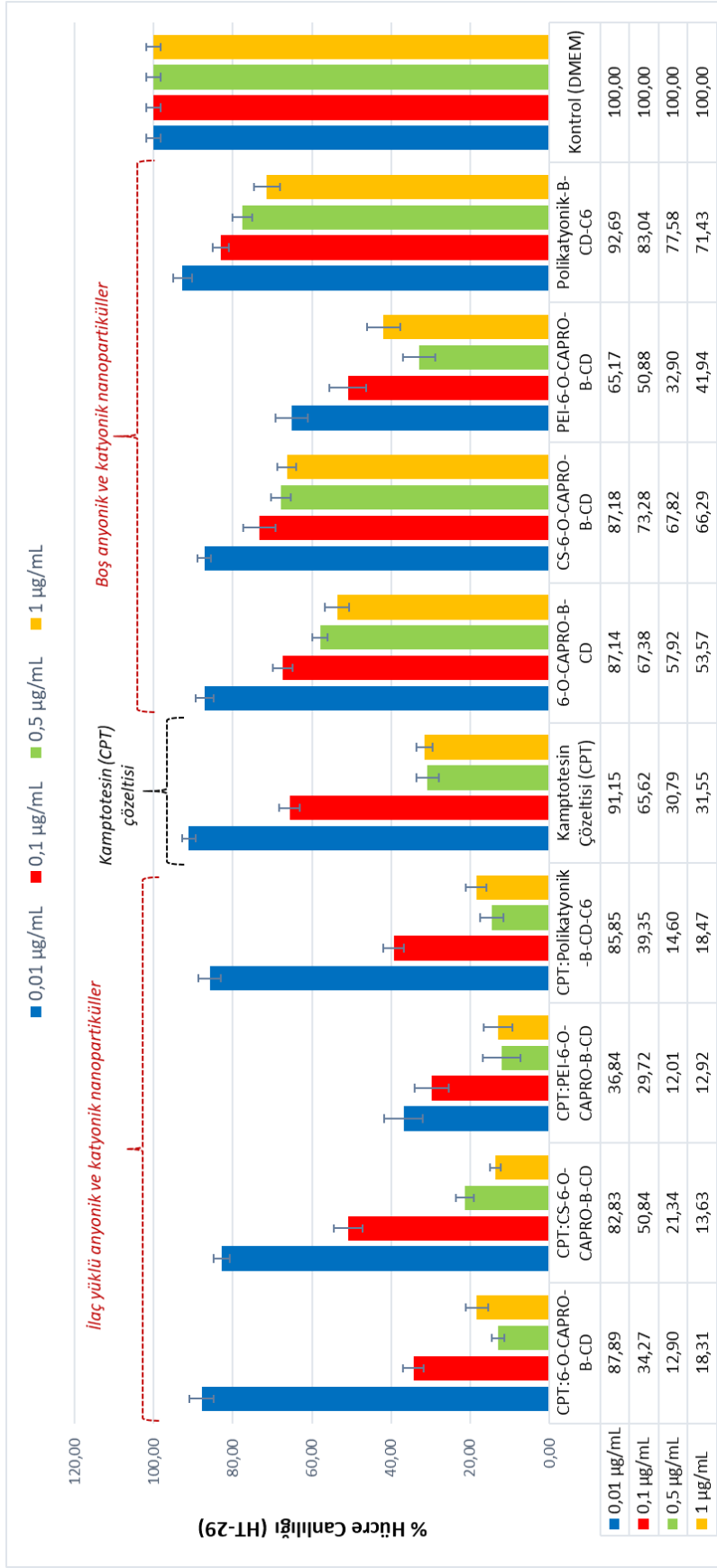
üzerinde L929 hücre canlılığı gözlenmiş olup sistemlerin güvenli olduğu değerlendirilmiştir. Öte yandan PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikülleri ile bütün seyreltme oranlarında %80'in altında hücre canlılığı gözlenmiş olup, PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) ile hazırlanacak ilaç taşıyıcı sistemin güvenli olmadığı değerlendirilmiştir (249).

4.6.2. Antikanser Etkinlik Çalışmaları; Kamptotesin Yüklü Nanopartiküllerin HT-29 Hücreleri Üzerinde Sitotoksitesinin Araştırılması

Antikanser model etkin maddemiz olan CPT enkapsüle halde ve etkin madde taşımayan amfifilik CD nanopartiküllerinin HT-29 insan kolon kanseri hücre hattı üzerinde antikanser aktivitesi, eşdeğer konsantrasyonda CPT çözeltileri ile karşılaştırmalı olarak Bölüm 3.8.2.'de açıklandığı şekilde, 4 farklı nanopartikül formülasyonu, 4 farklı konsantrasyon ve iki farklı inkübasyon süresi sonunda (48 saat ve 72 saat) % hücre canlılığı değerlendirilmek suretiyle gerçekleştirilmiştir. 48 saat sonundaki % hücre canlılığına ilişkin sonuçlar Şekil 4.29'da, 72 saat sonundaki % hücre canlılığına ilişkin sonuçlar ise Şekil 4.30'da sunulmuştur.



Şekil 4.29. İlaç yüklü ve boş anyonik ve katyonik nanopartiküllerin ilaç çözeltisi ile karşılaştırılması olarak HT-29 hücreleri üzerinde 48 saatlik sitotoksikite çalışması sonrası % hücre canlılıkları (\pm S.S., n=3).

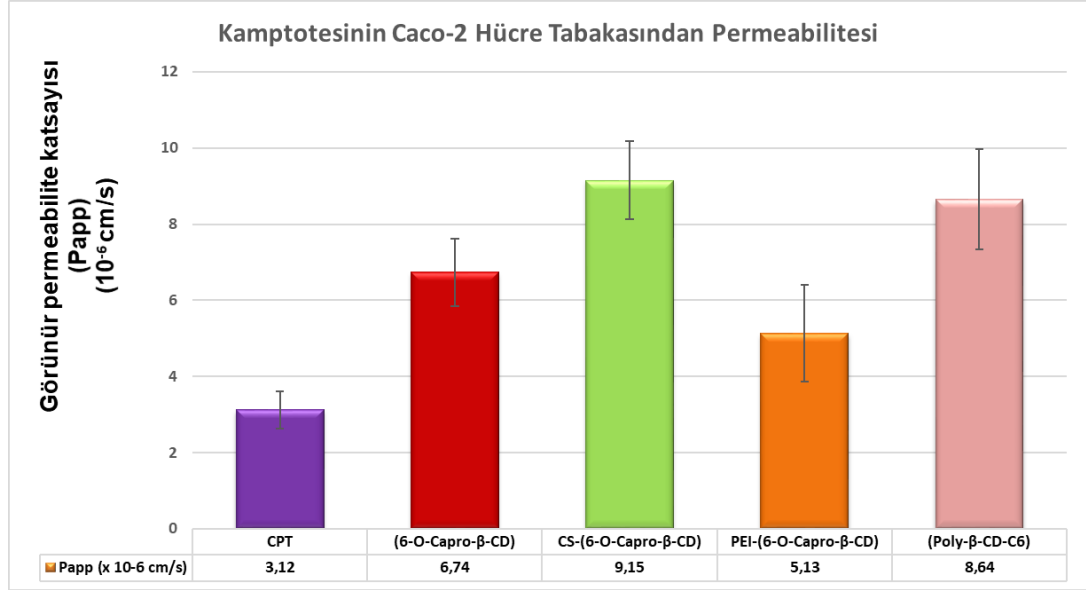


Şekil 4.30. İlaç yüklü ve boş anyonik ve katyonik nanopartiküllerin ilaç çözeltisi ile karşılaştırılması olarak HT-29 hücreleri üzerinde 72 saatlik sitotoksitesite çalışması sonrası % hücre canlılıkları (\pm S.S., n=3).

İlaç yüklü amfifilik CD nanopartikül formülasyonlarının HT-29 insan kolon karsinoma hücre hattında antikanser etkinliklerinin ilaç çözeltisi ve kontrol ile karşılaştırılarak değerlendirilebilmesi amacıyla 4 farklı konsantrasyon ve 2 farklı inkübasyon süresince gerçekleştirilen çalışmaların sonuçlarına göre; 48 saat ve 72 saat sonunda bütün nanopartikül formülasyonları (48 saat, 0,01 µg/mL konsantrasyonda CS-(6-O-CAPRO-β-CD) hariç) kontrol grubuna göre anlamlı olarak antikanser etkinlik göstermiştir ($p < 0,05$). İlaç çözeltisi ile kıyaslandığında ise, 48 saat inkübasyon sonrası verilere göre; 0,01 µg/mL konsantrasyonda sadece (Poly-β-CD-C6) ve PEI-(6-O-CAPRO-β-CD) nanopartikülleri, 0,1 µg/mL ve 0,5 µg/mL konsantrasyonda ise bütün nanopartikül formülasyonları anlamlı derecede ($p < 0,05$) daha yüksek antikanser etkinlik göstermiştir. İlaç çözeltisi ile kıyaslandığında, 72 saat verilerine göre ise; bütün nanopartiküller 4 konsantrasyonda da artan etki süresine paralel olarak anlamlı derece ($p < 0,05$) daha yüksek antikanser aktivite göstermiştir. Ayrıca % hücre canlılığı değerleri göz önüne alındığında doza ve zamana bağlı en uygun profili (Poly-β-CD-C6) nanopartiküllerinin gösterdiği ve çalışılan bütün konsantrasyon ve zaman noktalarında ilaç çözeltisine göre de anlamlı olarak daha yüksek antikanser aktivite gösterdiği görülmektedir ($p < 0,05$).

4.6.3. Permeabilite Çalışmaları; Etkin Madde İçeren Nanopartiküllerin CaCo-2 Hücrelerinden Geçişlerinin Araştırılması

Etkin madde enkapsüle amfifilik CD nanopartiküllerinin CaCo-2 insan kolon adenokarsinoma hücre hattından permeabilite çalışmaları, CPT çözeltisi ile karşılaştırmalı olarak Bölüm 3.8.3.'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan dört farklı amfifilik CD nanopartikülü ile gerçekleştirilen çalışma sonunda her bir formülasyon için CPT'nin görünür permeabilite katsayıları (P_{app}) hesaplanmış olup sonuçlara ilişkin değerler Şekil 4.31'de sunulmuştur.



Şekil 4.31. Kamptotesin yüklü nanopartikül formülasyonları ve kamptotesin çözeltisi için görünür permeabilite katsayıları (P_{app}), (n=3, ± S.S.)

(6 x 10⁴ hücre/insert) (Sonuçlar; ortalama P_{app} ± S.S. şeklinde ifade edilmiştir.)

Hazırlanan nanopartikül formülasyonları ve CPT için hesaplanan görünür permeabilite katsayıları (P_{app}) değerlerine göre, bütün nanopartikül formülasyonlarının görünür permeabilite katsayıları CPT çözeltisine ve birbirlerine göre anlamlı olarak farklı ve CPT çözeltisinden de anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p<0,05). En yüksek (P_{app}) değeri CS-(6-O-CAPRO-β-CD) nanopartiküllerinde, ardından ise (Poly-β-CD-C6) nanopartiküllerinde hesaplanmıştır.

4.7. İn vivo Etkinlik Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında geliştirilen dört farklı amfifilik CD nanopartikülü arasında *in vitro* karakterizasyon ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları sonuçları göz önüne alınarak en iyi sonuçları gösteren formülasyon olduğuna karar verilen (Poly-β-CD-C6) nanopartiküller ile ilaç çözeltisi ile karşılaştırmalı olarak *in vivo* etkinlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneyleri temel olarak; farelerde cerrahi olarak kolorektal tümör inokülasyonu, erken evre tümörlerde tedavi etkinliği ve geç evre tümörlerde tedavi etkinliği olmak üzere 3 farklı alt başlık altında organize edilmiştir.

4.7.1. Farelerde Cerrahi Olarak Kolorektal Tümör İnokülasyonu

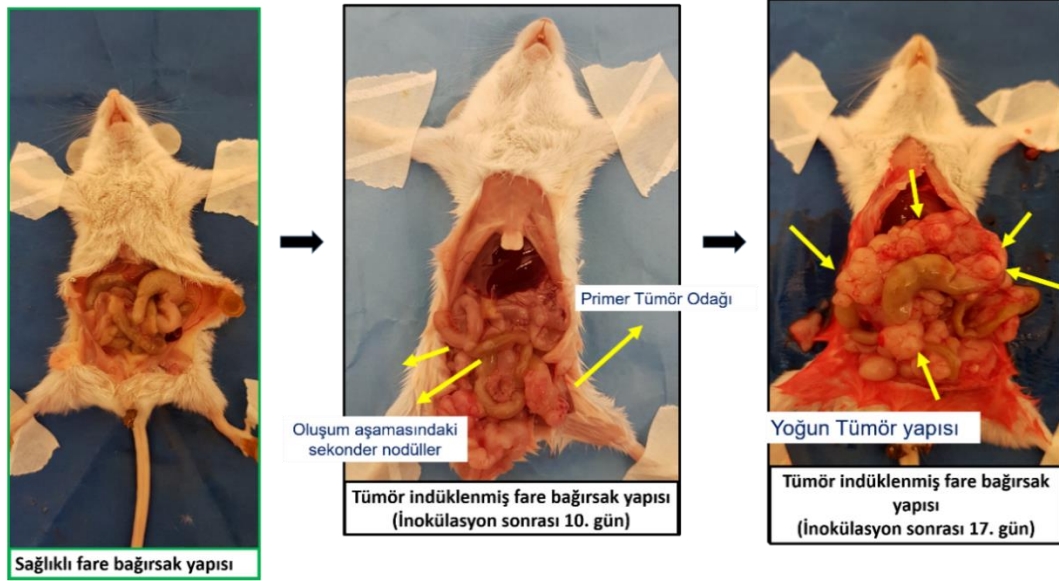
İn vivo deneylerin gerçekleştirileceği 6-8 haftalık balb/c ırkı erkek farelerde, ilk aşama kolorektal kanserleri temsil etmesi amacıyla bölgeye spesifik tümör oluşturulması yönteminin uygulanmasıdır. Yönteme ilişkin deneysel tasarım ve detaylar Bölüm 3.9.1.'de açıklanmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilen ön çalışmalar sonucunda, tümör inokülasyonu sonrası farelerde primer inokülasyon noktası olan çekumdan başlayarak kolon öncelikli olmak üzere sadece bağırsak bölgesine spesifik tümörler elde edilerek kanser modelinin geliştirilmesi işlemi teyit edilmiştir.

Oluşan tümörlerin zamanın fonksiyonu olarak çoğalması ve farelerin gerek genel durumlarını gerekse yaşamsal fonksiyonlarını etkilemesi sebebiyle deneysel çalışmalar erken evre ve geç evre tümörlerde tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi şeklinde tasarlanmıştır. Bu amaçla, hazırlanan CPT yüklü (Poly- β -CD-C6) nanopartiküller, kolorektal kanserli farelere 2 günde 1 olacak şekilde oral gavaj ile uygulanmıştır. Tedavinin etkinliğinin erken evre ve geç evre kolorektal kanser modelinin her ikisinde de değerlendirilebilmesi amacıyla, tedaviye başlama noktası cerrahi olarak tümör inokülasyonu sonrası 10.gün (erken evre) ve 17.gün (geç evre) olmak üzere iki farklı fare grubunda tasarlanmıştır. Bölüm 3.9.1.'de açıklandığı şekilde cerrahi olarak gerçekleştirilen tümör inokülasyonu modelinden sonra takibe alınan farelerde 8.gün sonunda palpe edilebilir ve makroskobik olarak gözlenebilir kitlelerin oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 4.32.).



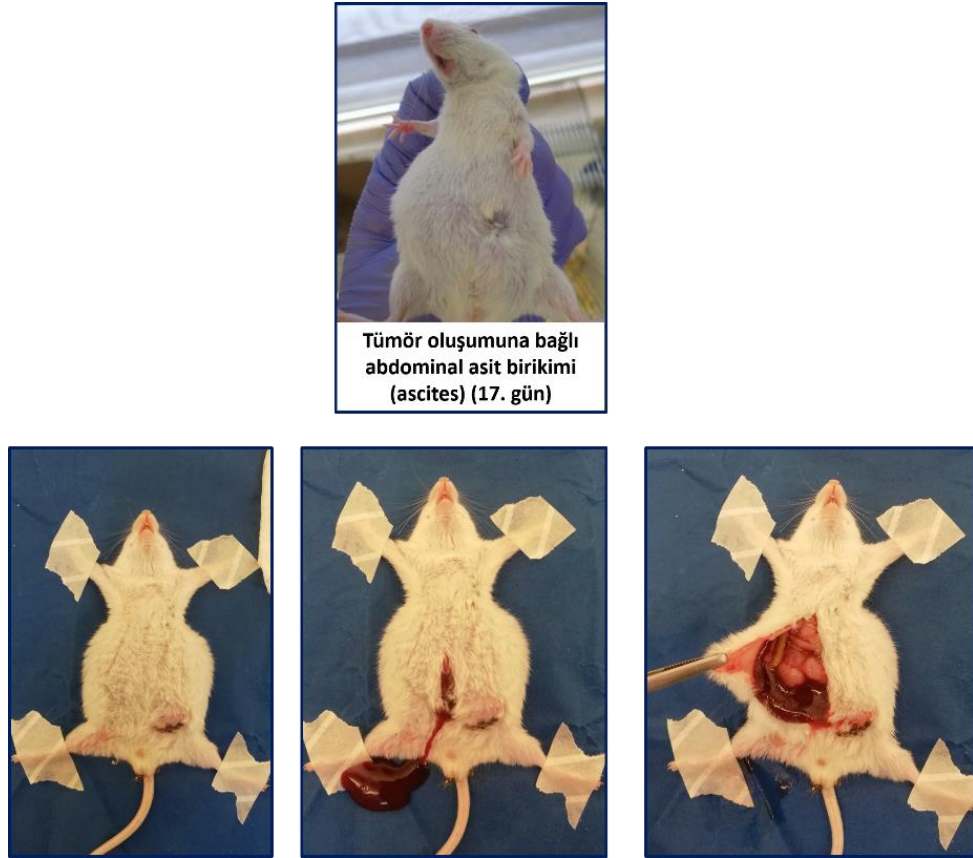
Şekil 4.32. Deney sürecinde (8.gün) farelerde primer tümör kitlesinin makroskopik gözlemlenmesi.

Erken evreyi temsil eden, tümör inokülasyonu sonrası 10.gün ve geç evreyi temsil eden tümör inokülasyonu sonrası 17.günde teyit amacıyla, tümör oluşumları gözlemlenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalara ilişkin sonuçlar Şekil 4.33.'de sağlıklı fare bağırsak yapısı ve kolorektal tümör oluşturulmuş fare (erken evre 10.gün ve geç evre 17.gün) olarak sunulmaktadır.

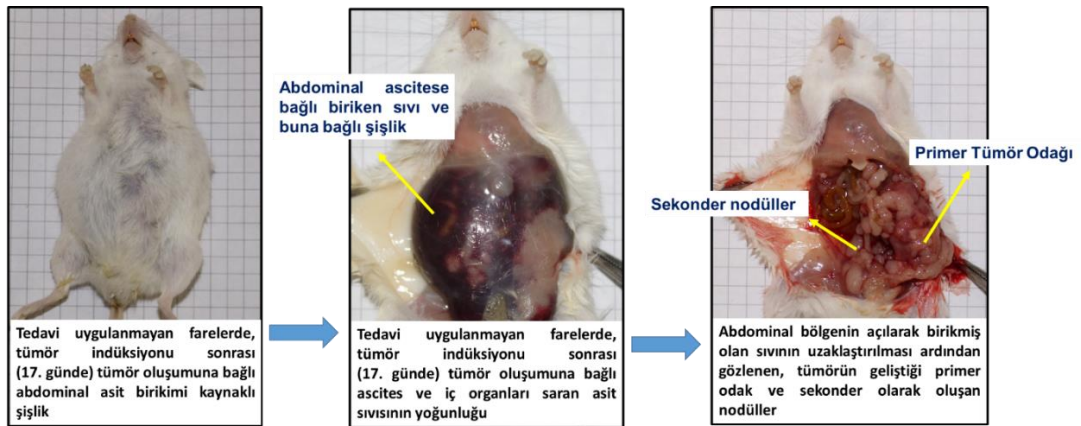


Şekil 4.33. Tümör oluşumunun doğrulanabilmesi amacıyla farelerin bağırsak yapılarının incelenmesi işlemi. Sağlıklı bağırsak yapısıyla karşılaştırılarak erken evre ve geç evre tümörlerin gözlemlenmesi.

Geç evre tümör modelinde, farelerde tümör inoküle edilen bölgede kanser gelişmesine bağlı olarak assit sıvısı birikimi (ascites) ve buna bağlı olarak abdominal şişlik, dışkılama güçlüğü ve genel sağlık tablosunda kötüleşme tespit edilmiştir. Bu durumun temelinde abdominal bölgede gelişen tümörlerin ve ascites tablosunun fizyolojik fonksiyonları bozması olduğu düşünülmektedir. Cerrahi tümör inokülasyonu sonrası 17.gününde olan farenin makroskopik olarak durumu ötanazi sonrası abdominal bölgenin açılmasıyla teyit edilen tümör kitleleri varlığı ve kanser oluşumuna bağlı ascites tablosunun nedeni olan sıvı birikimi Şekil 4.34. ve Şekil 4.35.'da görülmektedir.



Şekil 4.34. Kolorektal tümör indüklenen farelerde, geç evre tümör modelini temsil eden 17.günde ascites tablosunun oluşumu.



Şekil 4.35. Kolorektal tümör indüklenen farelerde tümör oluşumunun makroskobik olarak gözlenebilmesi.

4.7.2. Kolorektal Kanser Modeli Geliştirilmiş Farelere Uygulanan Tedavinin Etkinliği

Kolorektal kanser modeli oluşturulmuş farelerde, CPT yüklü (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerin erken evre ve geç evre kanser modelinde aynı dozda oral CPT süspansiyonu (%1 DMSO salin çözeltisi içerisinde) ile karşılaştırmalı olarak tedavideki etkinliğinin değerlendirilmesi, formülasyonların gün aşırı olarak oral gavajla uygulanmasıyla Bölüm 3.9.2.'de açıklanan ve detayları belirtilen tedavi protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Bu kapsamda; tedavilerin etkinliği gruplar karşılaştırılmak suretiyle, deney sonrası % sağ kalım bulguları, çıkarılan tümör kitlelerinin ağırlıkları ve deney süresince farelerin ağırlık değişimleri değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir.

Planlanan ilk deney prosedüründe, geç evre tümörler için 4 farklı deney grubu tasarlanmıştır.

Bu gruplar;

1. CPT yüklü nanopartikül grubu,
2. Boş nanopartikül grubu,
3. CPT süspansiyonu grubu
4. Tümör indüklenen ve tedavi uygulanmayan negatif kontrol grubudur.

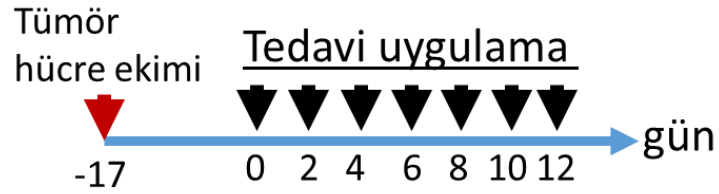
Geç evre tümörlerde tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi sonucunda elde edilen verilerin ışığında, erken evre tümörlerde tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar 2 deney grubu üzerinden tasarlanmıştır.

Bu gruplar;

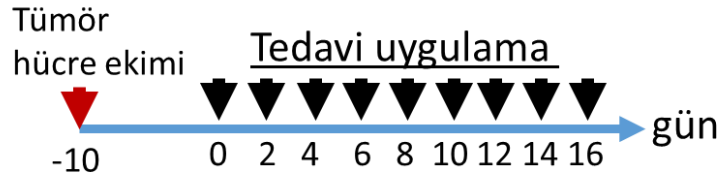
1. CPT yüklü nanopartikül grubu,
2. CPT süspansiyonu grubudur.

Böylece geç evre tümörlerde tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi çalışmasından elde edilen sonuçlara göre tasarlanan ikinci çalışmada gereksiz fare kullanımının önüne geçilmiş ve ilk çalışmanın sonuçlarının daha detaylı değerlendirilebilmesi amacıyla iki deney grubu tasarlanarak ileri bir deney gerçekleştirilmiştir.

Geç evre kanser modelinde gerçekleştirilen tedavi protokolü Şekil 4.36.'da, erken evre kanser modelinde gerçekleştirilen tedavi protokolü Şekil 4.37.'de belirtilmiştir.

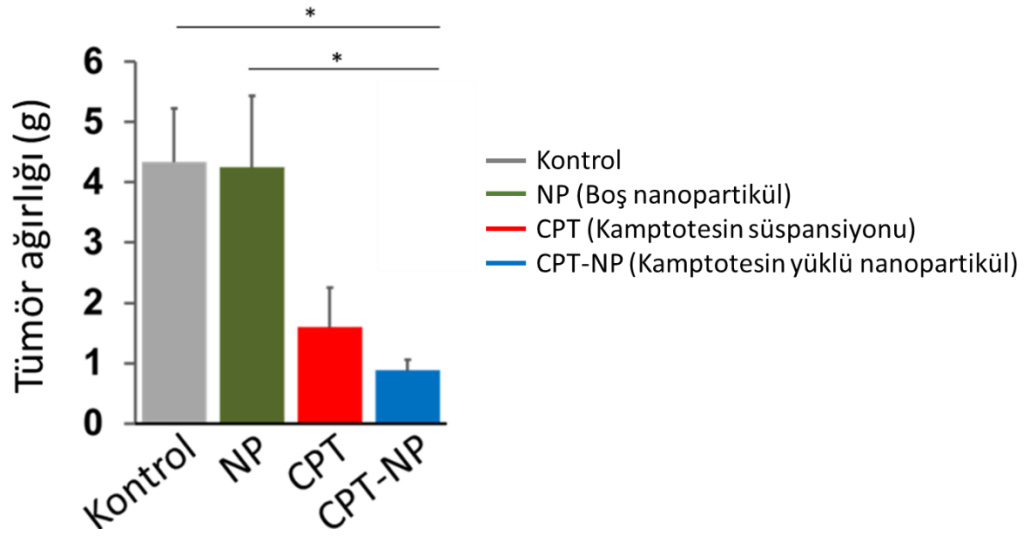


Şekil 4.36. Kolorektal kanser indüklenmiş farelerde geç evre tedavi protokolü şeması.

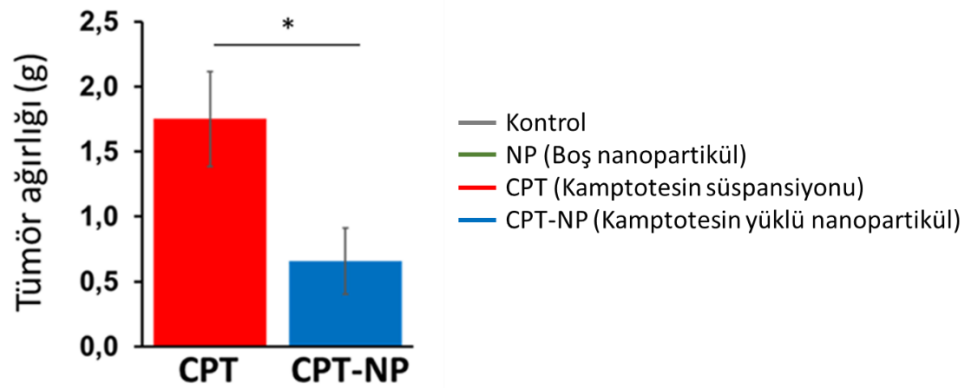


Şekil 4.37. Kolorektal kanser indüklenmiş farelerde erken evre tedavi protokolü şeması.

Deney sonrasında, farelerden çıkarılan kolorektal tümörlerin ağırlık grafikleri geç evre kanser modelinde tedavi edilen gruplar için Şekil 4.38.'da, erken evre kanser modelinde tedavi edilen gruplar için ise Şekil 4.39.'da belirtilmiştir.



Şekil 4.38. Geç evre tedavi protokolü uygulanan farelerde, tedavi süresi sonunda çıkarılan tümör kitlelerinin ağırlıkları (*; $p < 0,05$), ($n=6$, $\pm SH$).

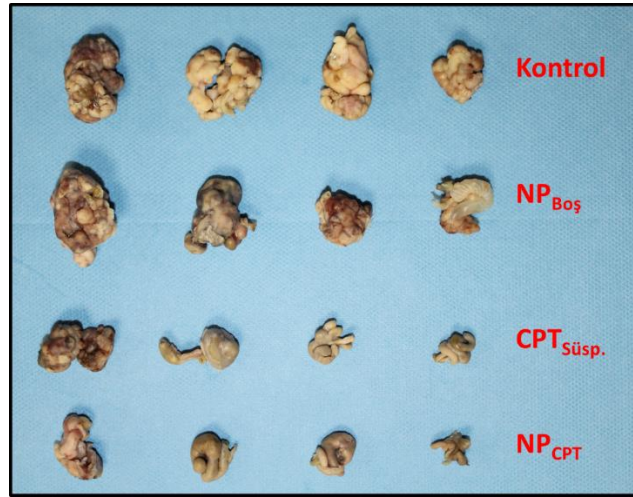


Şekil 4.39. Erken evre tedavi protokolü uygulanan farelerde, tedavi süresi sonunda çıkarılan tümör kitlelerinin ağırlıkları (*; $p < 0,05$), ($n=6$, $\pm SH$).

Şekil 4.38.'da sunulan sonuçlara göre, geç evre tedavi protokolü uygulanan kolorektal kanserli farelerden deney sonunda çıkarılan tümörlerin ağırlıkları arasındaki farklar değerlendirildiğinde; kontrol grubu ile CPT yüklü olmayan boş nanopartikül grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Kontrol grubu ile CPT yüklü nanopartikül ve CPT süspansiyonu grupları arasında ise anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0,05$). Ayrıca, CPT yüklü olmayan boş nanopartikül grubu ile CPT yüklü nanopartikül grubu ve CPT süspansiyonu grupları da anlamlı farklılık tespit

edilmiştir ($p<0,05$). Şekil 4.39.'da sunulan sonuçlara göre, erken evre tedavi protokolü uygulanan deneyde ise CPT yüklü nanopartikül grubu ile CPT süspansiyonu grubu arasında anlamlı farklılık tespit edilmiş olup ($p=0,014$), CPT yüklü nanopartikül uygulanan gruptaki farelerde tümör ağırlıkları anlamlı olarak daha düşük çıkmıştır ($p<0,05$).

Deney sonrasında, farelerden çıkarılan kolorektal tümör kitlelerinin gruplar halinde düzenlenen görüntüleri, geç evre kanser modelinde gerçekleştirilen tedavi için Şekil 4.40.'de, erken evre kanser modelinde gerçekleştirilen için ise Şekil 4.41.'de sunulmuştur.

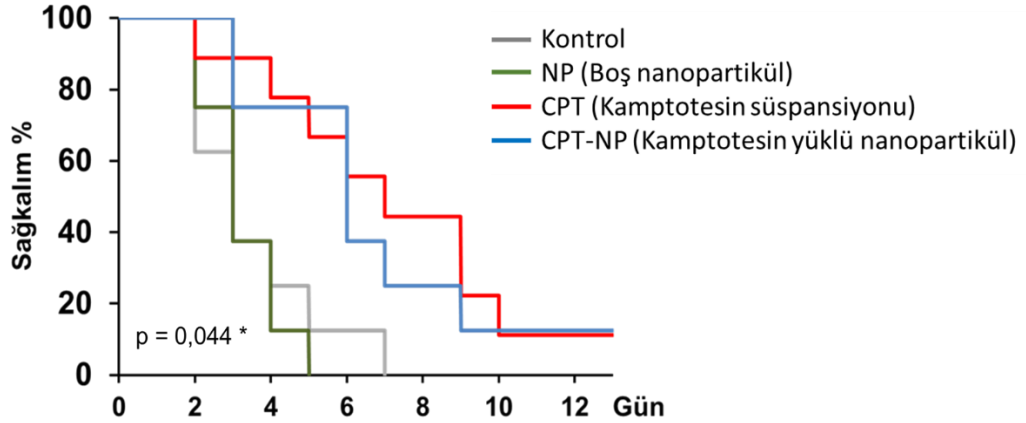


Şekil 4.40. Kolorektal tümörlü farelerde geç evre tedavi protokolü uygulanması sonunda farelerden çıkarılan tümör kitlelerinin makroskobik görüntüleri.

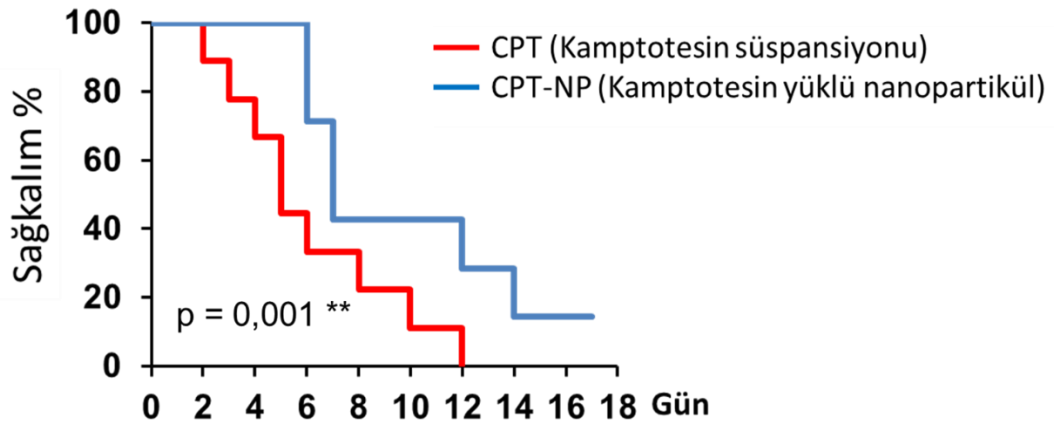


Şekil 4.41. Kolorektal tümörlü farelerde erken evre tedavi protokolü uygulanması sonunda farelerden çıkarılan tümör kitlelerinin makroskobik görüntüleri.

Deney süresince takibi yapılarak prosedür sonu itibariyle elde edilen, geç evre kanser modelinde gerçekleştirilen tedavi için % sağ kalım grafiği Şekil 4.42.'de, erken evre kanser modelinde gerçekleştirilen tedavi için % sağ kalım grafiği ise Şekil 4.43.'de sunulmuştur.



Şekil 4.42. Geç evre tedavi protokolü uygulanan kolorektal kanserli farelerde % sağ kalım verileri.

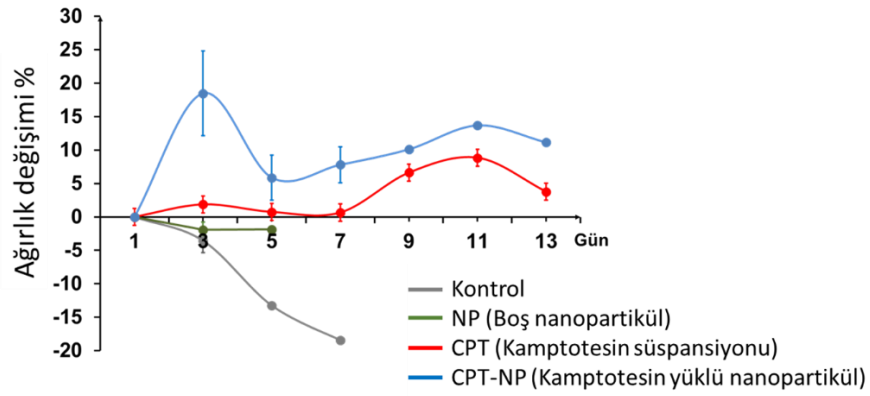


Şekil 4.43. Erken evre tedavi protokolü uygulanan kolorektal kanserli farelerde % sağ kalım verileri.

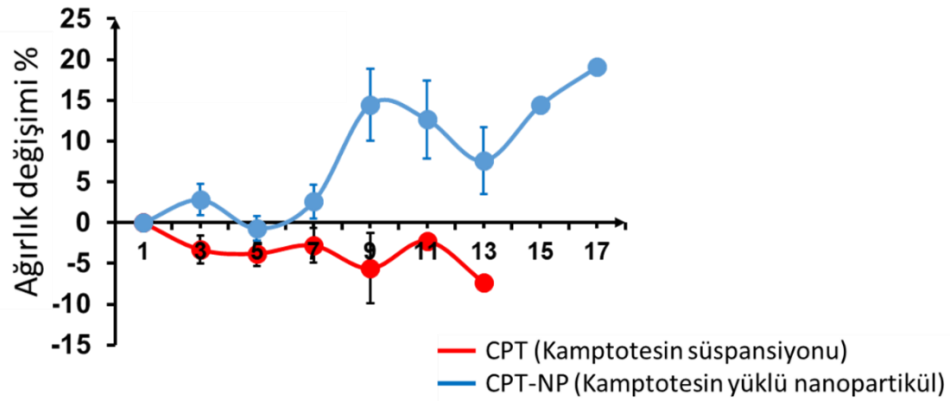
Şekil 4.42.'da sunulan geç evre tedavi protokolünde grupların sağ kalım eğrilerine göre, CPT yüklü nanopartikül grubunun sağ kalımı ile diğer gruplar arasında deney sonu itibariyle anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Şekil 4.43.'de sunulan erken evre tedavi protokolünün uygulandığı deneyde ise, CPT yüklü nanopartikül

grubu ile CPT süspansiyonu gruplarının deney sonu itibariyle sağ kalımları karşılaştırılmış olup ($p=0,001$), CPT yüklü nanopartikül grubunun sağ kalım eğrisi ile CPT süspansiyonu grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir.

Deney süresince takip edilen deney gruplarındaki farelerin gün aşırı gerçekleştirilen ağırlık ölçümleri sonucunda elde edilen ağırlık değişimleri grafikleri, geç evre kanser modelinde gerçekleştirilen tedavi için Şekil 4.44.'de, erken evre kanser modelinde gerçekleştirilen tedavi modeli için ise Şekil 4.45.'de görülmektedir.



Şekil 4.44. Kolorektal kanserli farelerde geç evre tümörlere yönelik gerçekleştirilen tedavi sürecinde farelerin ağırlık değişimleri.



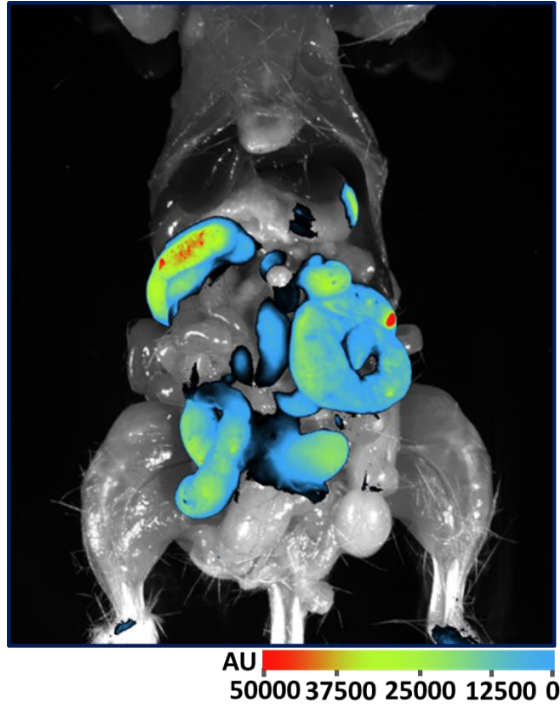
Şekil 4.45. Kolorektal kanserli farelerde erken evre tümörlere yönelik gerçekleştirilen tedavi sürecinde farelerin ağırlık değişimleri.

Şekil 4.44.'de görülen sonuçlara göre, erken evre tedavi protokolü uygulanan kolorektal kanserli farelerin deney süresince ağırlık değişimleri değerlendirildiğinde, CPT yüklü nanopartikül grubundaki farelerin deney süresince ağırlıklarında CPT süspansiyonu grubundaki farelere kıyasla ciddi bir azalma meydana gelmediği görülmüş ve bu durum tedavi uygulanan farelerin genel sağlık durumlarının iyiye gittiğinin bir göstergesi olarak yorumlanmıştır. Gruplar karşılaştırıldığında, ağırlık değişimleri arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p=0,001$), CPT süspansiyonu grubundaki farelerin ağırlıklarında CPT yüklü nanopartikül ile tedavi edilen gruptaki farelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir kilo kaybı meydana geldiği tespit edilmiştir ($p<0,05$).

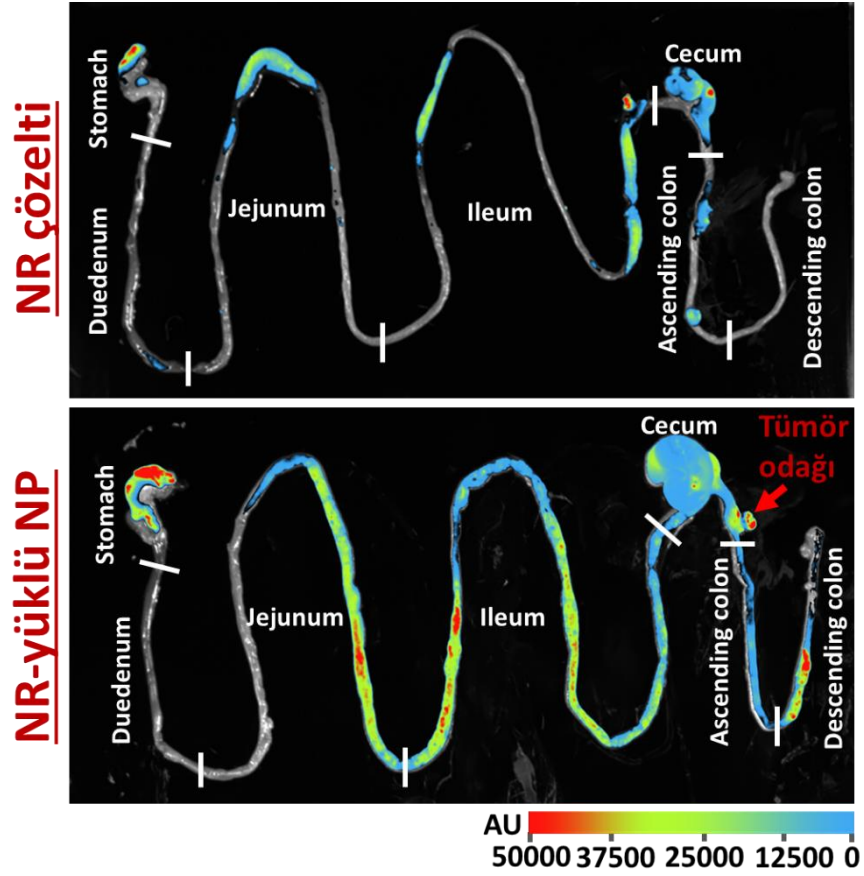
4.8. *In vivo* Görüntüleme Çalışmaları

In vivo deneylerle tedavideki etkinliği değerlendirilen CPT yüklü amfifilik CD nanopartikülünün CPT-(Poly- β -CD-C6), oral uygulama sonrası gastrointestinal kanaldaki lokalizasyonun değerlendirilebilmesi amacıyla Newton 7.0® canlı görüntüleme sistemi ile Bölüm 3.10.'da açıklanan şekilde görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Model ilaç CPT'yi temsil etmesi amacıyla nanopartiküllere görüntüleme çalışmalarında kullanılabilen hidrofobik yapıda bir boya olan NR enkapsüle edilmiştir. Görüntüleme çalışmaları kapsamında ilk olarak fareler abdominal bölgelerinde açılan bir kesi ile görüntülenmişlerdir. Fakat bağırsak yapısının fiziksel olarak diğer organlara kıyasla daha karmaşık bir şekilde yerleşmiş olması sebebiyle, hangi segmentte ne kadar model enkapsüle boya olan NR'nin lokalize olduğunu tespit etmek gastrointestinal kanalı çıkarmadan mümkün olamamaktadır (Şekil 4.46.). Bu sebeple, oral gavaj yoluyla farelere uygulanan NR çözeltisi ve NR yüklü nanopartiküllerin gastrointestinal dağılımları uygulama sonrası 24. saatte ötenazi edilerek gastrointestinal kanalları çıkarılan farelerin görüntülenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Kolorektal kanser modeli geliştirilmiş farede, oral gavaj uygulamasıyla verilen NR çözeltisi ve NR yüklü nanopartiküllerin 24.saat sonunda gastrointestinal kanalda lokalizasyonlarına ilişkin görsel, floresans ışımaya şiddetlerine ilişkin renk-şiddet cetveli ile bir arada olarak Şekil 4.47.'de sunulmuştur. Fiji® yazılımı

kullanılarak Bölüm 3.10.'da açıklandığı şekilde analiz edilen gastrointestinal kanal segmentlerindeki ortalama floresans yoğunluğu (Mean fluorescent intensity; MFI) değerlerine ilişkin sonuçlar görsel olarak Şekil 4.48.'da, grafik olarak ise Şekil 4.49.'de görülmektedir.

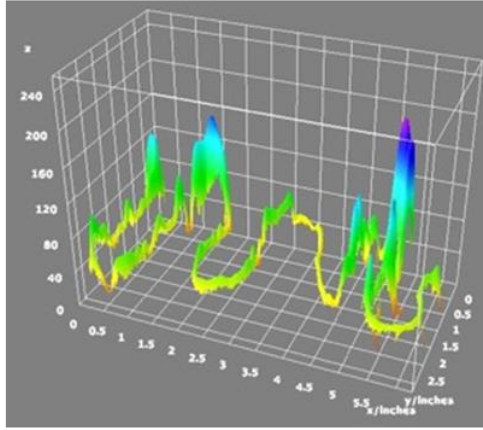


Şekil 4.46 Nil kırmızısı enkapsüle nanopartiküllerin kolorektal tümörlü fareye oral gavaj yoluyla uygulama sonrası 24.saatte gastrointestinal dağılımının gastrointestinal kanal yapısı bozulmadan incelenmesi amacıyla *in vivo* görüntüleme sistemiyle elde edilen görüntü.

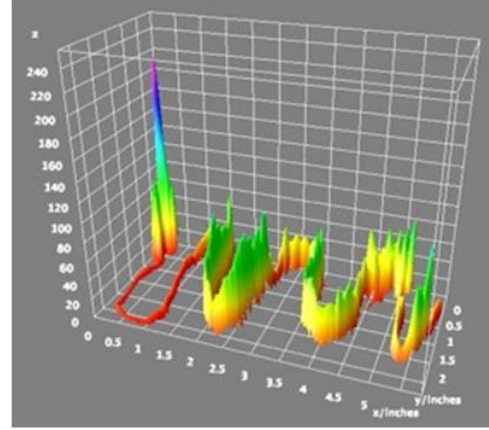


Şekil 4.47. Kolorektal tümörlü farelerde nil kırmızı çözeltisi ve nil kırmızısı enkapsüle nanopartiküllerin oral gavaj yoluyla uygulanması sonrası 24. saat sonunda farelerden çıkarılan gastrointestinal kanal dokularında in vivo görüntüleme sistemi ile edilen görüntü.

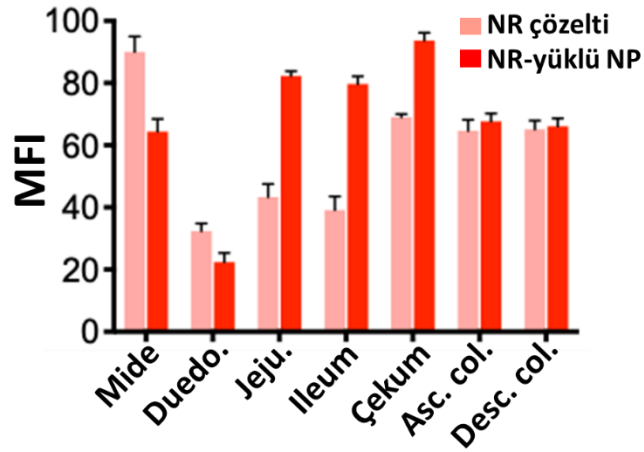
NR çözelti



NR-yüklü NP



Şekil 4.48. Kolorektal tümürlü farelerde nil kırmızı çözeltisi ve nil kırmızısı enkapsüle nanopartiküllerin oral gavaj yoluyla uygulanması sonrası 24. saat sonunda farelerden çıkarılan gastrointestinal kanal segmentlerinde tespit edilen nil kırmızısı miktarına bağlı elde edilen absorbans değerleri.



Şekil 4.49. Kolorektal tümürlü farelerde nil kırmızı çözeltisi ve nil kırmızısı enkapsüle nanopartiküllerin oral gavaj yoluyla uygulanması sonrası 24. saat sonunda farelerden çıkarılan gastrointestinal kanalın farklı segmentlerinde tespit edilen ortalama floresans şiddeti (MFI) ilişkin grafik.

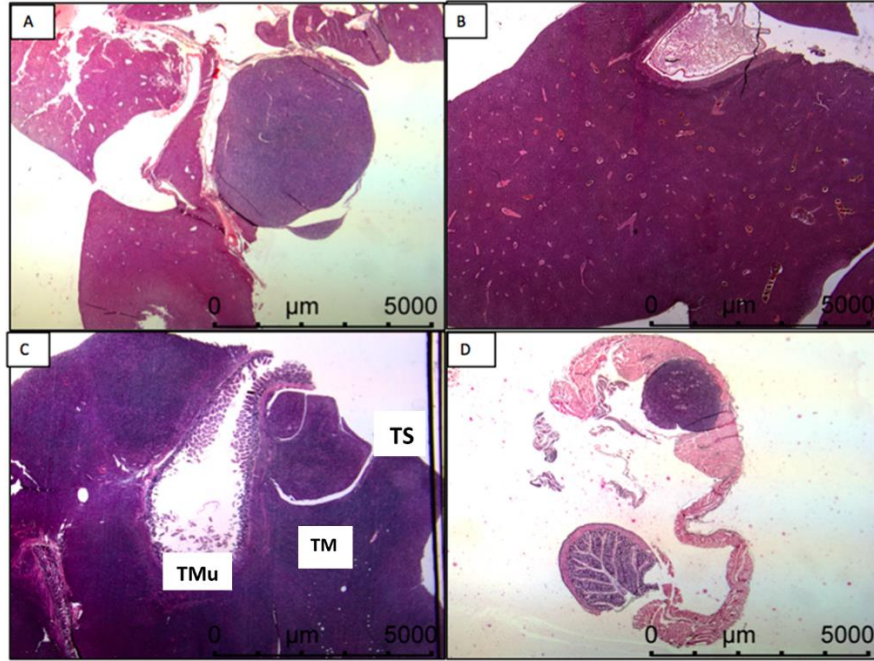
4.9. Histolojik Değerlendirme

Bölüm 3.11'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen histolojik analizler kapsamında; Erken evre tümör modelinde CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül formülasyonu, geç evre tümör modelinde ise kontrol, boş nanopartikül, CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül formülasyonu uygulanan gruplardan elde edilen karaciğer ve kolon örnekleri değerlendirilmiştir.

Erken evre tümör modelinde tedavi uygulanan gruplarda;

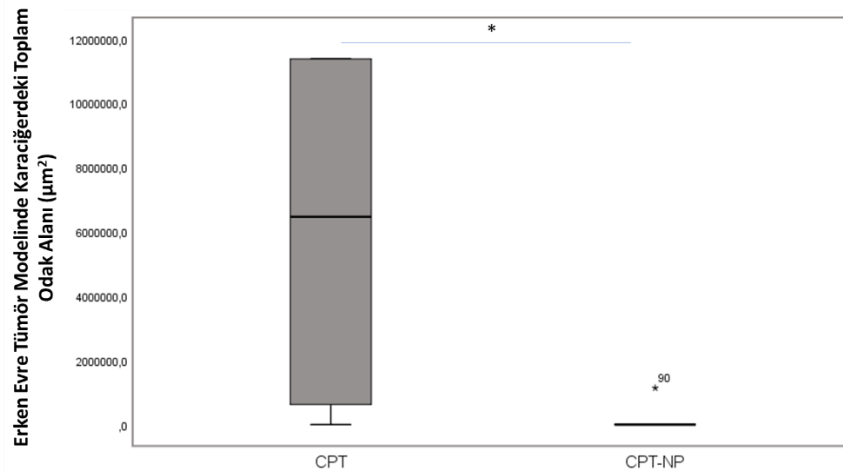
İncelenen her iki grupta karaciğerin klasik lobül yapısının tümöre ait metastatik odaklar nedeni ile yer yer bozulduğu saptanmıştır. Tüm gruplarda değişen büyüklük ve sayıda metastatik tümör odaklarının varlığı dikkati çekmiştir (Şekil 4.50. A, B). Histolojik kesitlerde metastatik odaklarda tümör mikroçevresine ait atipik hücreler gözlenmiştir (Şekil 4.50. A, B). CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül formülasyonu grupları karaciğerdeki toplam metastatik odak alanı açısından karşılaştırıldığında ise; CPT yüklü nanopartikül formülasyonu grubunda toplam odak alanının belirgin olarak azaldığı saptanmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 4.51.).

Kolona ait değerlendirmede CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül formülasyonu uygulanan her iki grupta da tümöre ait Tunika mukoza tutulumuna ek olarak çoğu olguda Tunika muskularis ve Tunika serozanın da tutulduğu dikkati çekmiştir (Şekil 4.50. C,D).



Şekil 4.50. Erken evre tümör modelinde tedavi uygulanan gruplara ait mikrograflar. CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül formülasyonu gruplarına ait karaciğer (A,B) ve kolona ait (C,D) mikrograflar.

(A) ve (B) de karaciğerde metastatik odaklar görülmektedir. (C)'de tümörün tunika mukozayı ve tunika muskularis ile serozayı tutmuştur. TMu: Tunika mukoza, TM: Tunika muskularis, TS: tunika seroza (X125 H&E).

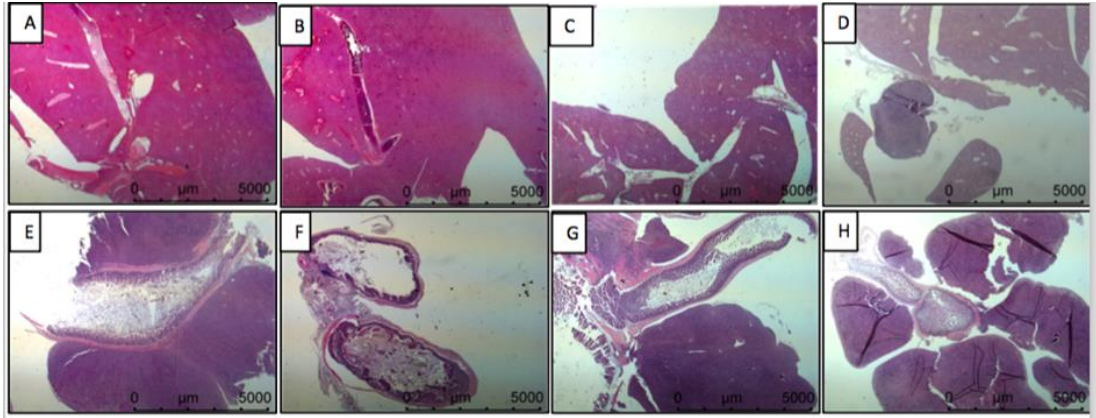


Şekil 4.51. Erken evre tümör modelinde tedavi uygulanan gruplarda karaciğerdeki toplam odak alanı (µm²).

Geç evre tümör modelinde tedavi uygulanan gruplarda ise;

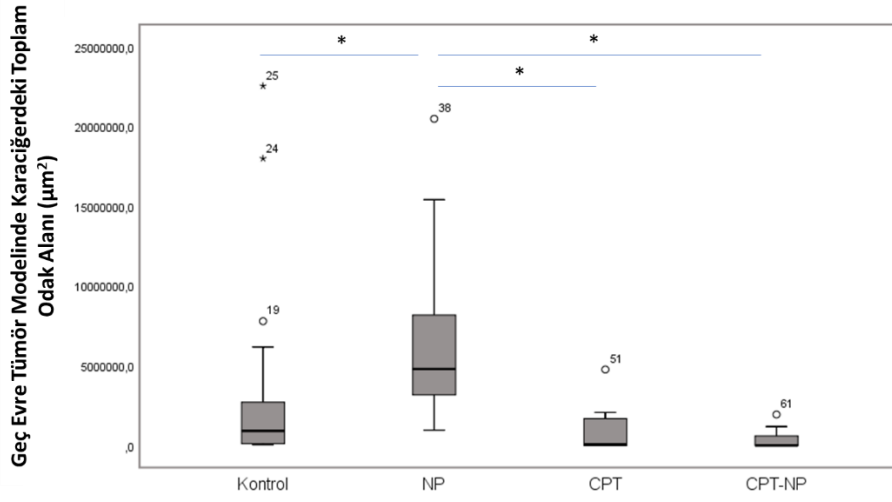
Karaciğerin klasik lobül yapısının tümöre ait metastatik odaklar nedeni ile yer yer bozulduğu saptanmıştır (Şekil 4.52. A,B,C,D). Karaciğerdeki toplam odak alanı hesaplandığında CPT yüklü nanopartikül formülasyonu ve CPT süspansiyonu gruplarının kontrol grubu ile benzer olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.53.). CPT yüklü nanopartikül formülasyonu ve CPT süspansiyonu uygulanan gruplarda ise karaciğerdeki toplam metastatik odak alanının boş nanopartikül uygulanan gruba göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.53.).

Kolon değerlendirmesinde kontrol grubunda lümende obstrüksiyona giden ve bağırsağın tüm tabakalarını tutan belirgin tümörlerin varlığı saptanmıştır (Şekil 4.52. H).



Şekil 4.52. Geç evre tümör modelinde tedavi uygulanan gruplara ait mikrograflar. CPT süspansiyonu (A,E), CPT yüklü nanopartikül formülasyonu (B,F), boş nanopartikül (C,G), kontrol (D,H) gruplarına ait sırasıyla karaciğer ve kolona ait mikrograflar.

(A), (B), (C) ve (D) de karaciğerde metastatik odaklar görülmektedir. (E), (F), (G), (H)'de tümörün Tunika mukoza ve Tunika muskularis ile serozayı tuttuğu görülmektedir. (X125 H&E).



Şekil 4.53. Geç evre tümör modelinde tedavi uygulanan gruplarda karaciğerdeki toplam odak alanı (μm^2).

5. TARTIŞMA

5.1. Analitik Yöntem Validasyonu

Tez çalışması kapsamında kullanılan antikanser ajan olan CPT'nin *in vitro* miktar tayini amacıyla Warner ve ark. (215) tarafından önerilen yöntem Bölüm 3.3.1.'de belirtildiği şekilde modifiye edilerek kullanılmış ve yöntemin validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Temel amaç, çalışmanın farklı aşamalarında ve farklı koşullar altında etkinlik ve güvenliği birbirinden farklı lakton ve karboksilat formlarında bulunması muhtemel olan CPT için her iki formun da tayin edilebildiği, valide bir yöntem geliştirilmesi olmuştur. Lakton formu için 14,3 dk., karboksilat formu için 7,4 dk. olarak tespit edilen alıkonma süresi ile gerek her iki pikin birbirinden yeterince uzak olması gerekse pik simetrisi, pik yükseliği ve pik alanı bakımından çalışmanın amacına yönelik olarak uygun bir kromatogram elde edilmiştir (250).

Her iki form için çizilen kalibrasyon doğrusunun eldesinde kullanılan konsantrasyon aralığı olan 2-40 µg/mL aralığı deneysel çalışmalarımızın gerçekleştirildiği konsantrasyon aralığına *in vitro* miktar tayini amacıyla uygun bir değerdir. Kalibrasyon doğru denkleminin korelasyon katsayısı (r^2), sinyal ile analit konsantrasyonu arasındaki korelasyon kuvvetinin bir göstergesidir. Regresyon analizindeki değişkenler arasında güçlü bir doğrusal korelasyon olduğunda korelasyon katsayısının değeri "1" e daha yakındır (215). Bu kapsamda değerlendirildiğinde; lakton formu için $r^2=0,9989$, karboksilat formu için ise $r^2=0,9995$ olan korelasyon katsayıları elde edilen kalibrasyon denkleminin doğrusal olduğunu göstermiştir (251).

Validasyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen doğruluk ve kesinlik analizleri ise ilgili bölümlerde açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş olup bütün analizler için sonuçların varyasyon katsayılarının %2'den küçük olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonucun, analitik yöntemin doğruluk ve kesinliğinin değerlendirilmesine ilişkin olarak FDA, "Uluslararası Harmonizasyon Komitesi (ICH)" ve USP validasyon rehberlerinde belirtildiği gibi varyasyon katsayısının %2'den küçük olması kriterine uygun olduğu bulunmuştur (251, 252).

Analitik yöntemin duyarlılığı ise iki farklı parametre ile değerlendirilmiş olup, bu değerler aktif lakton ve inaktif karboksilat formu için sırasıyla; saptama sınırı (LOD) 0,053 µg/mL ve 0,087 µg/mL, tayin sınırı (LOQ) ise 0,174 µg/mL ve 0,195 µg/mL olarak bulunmuştur. Yöntemin duyarlılığının da çalışmanın amacına ve deneysel aşamalarına uygun ve yeterli olduğu gösterilmiştir.

Belirlenen analitik yöntem ile formülasyon bileşenleri olan dimetil sülfoksit (DMSO), kitosan (CS), polietilenimin (PEI), (Poly-β-C-C6) ve (6-O-CAPRO-β-CD) maddelerinin kromatogramları alınmış ve birbirleri ile ve CPT'nin formları ile herhangi bir girişim yapmadığı tespit edilerek yöntemin CPT'nin lakton ve karboksilat formları için özgün olduğu gösterilmiştir. Analitik yöntem validasyonu kapsamında gerçekleştirilen bütün analizler ve değerlendirilen parametreler ile tez çalışması kapsamında planlanan farklı deneylerde, CPT'nin *in vitro* miktar tayininde kullanılacak yöntemin güvenilir, tekrarlanabilir bir yöntem olduğu ve duyarlılık ve özgünlük bakımından çalışmanın amaçlarına ve kapsamına uygun olduğu görülmüştür.

5.2. Önformülasyon Çalışmaları ve Nanopartiküllerin Hazırlanması

Tez çalışmamız kapsamında, partikül büyüklüğü 300 nm'den küçük, polidispersite indeksi ise 0.3'ün altında ve yüzey yükü katyonik olan, fiziksel olarak gastrointestinal kanal koşullarında stabilitesini koruyabilen ve yüksek oranda ilaç yüklenebilen, taşıdığı ilacı en az 24 saatlik bir profilde serbestleştirebilen, mukozal penetrasyonu yüksek, taşıdığı ilacı bağırsak dokusuna en az %50 oranında ulaştırabilen ve antitümöral ve antimetastatik etkinlik açısından ilacın çözelti formundan istatistiksel olarak anlamlı derecede ($p < 0,05$) üstünlük gösteren oral uygulanabilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, belirtilen nihai parametreleri taşıyan nanopartiküllerin elde edilebilmesi amacına yönelik olarak ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Nanopartikül eldesi amacıyla literatürde mevcut birçok yöntem olmasının yanında diğer yöntemlere kıyasla daha hızlı, rahat uygulanabilir ve tek basamaklı bir prosedür olması nedeniyle nanoçöktürme yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır (63, 253-255).

Amfifilik siklodekstrin türevleri ile nanopartikül eldesinde, nanoçöktürme yöntemi etkin şekilde uygulanabilmiş ve amfifilik CD türevlerinin özelliklerinden dolayı yöntem uygulanırken herhangi bir sürfaktan ilavesine de gerek duyulmamıştır (44, 45, 147, 217, 247, 256, 257). Dolayısıyla tez çalışması kapsamında da nanopartikül eldesi amacıyla nanoçöktürme yöntemi kullanılmıştır.

Özellikle hidrofobik ilaçların nanopartiküllere enkapsüle edilebilmesi amacıyla uygulanan nanoçöktürme yöntemi ilk olarak 1989 yılında Fessi ve ark. (258) tarafından geliştirilmiş ve patentlenmiştir.

Rivas ve ark. (259) tarafından nanoçöktürme yönteminde kullanılan yöntem parametrelerinin etkilerinin derlendiği bir çalışmada, nanoçöktürme yönteminde organik çözücü türü, organik faz:sulu faz oranı, polimer konsantrasyonu, ilaç konsantrasyonu ve karıştırma hızı gibi yöntem parametrelerindeki değişikliklerin elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklükleri, enkapsülasyon etkinlikleri, zeta potansiyelleri, *in vitro* salım profilleri ve *in vivo* davranışları üzerinde kritik etkileri olduğu bildirilmiş ve önformülasyon çalışmalarının önemi vurgulanmıştır.

Galindo-Rodriguez ve ark. (260) tarafından gerçekleştirilen ve farklı çözücü tiplerinin nanoçöktürme yönteminde elde edilen nanopartiküller üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, farklı organik çözücülerin sulu faz ile polarite farkları ve ilaçla olan etkileşimlerindeki farklılıktan dolayı nanoçöktürme yönteminde organik çözücü tipinin elde edilen nanopartiküllerin büyüklüğü başta olmak üzere polidispersite indeksi ve morfolojileri üzerinde etkisi olduğu bildirilmiştir. Buna göre organik çözücü ile çözünen ilaç ve nanopartikül materyali arasındaki afinitenin artmasıyla veya organik çözücü ile sulu faz arasındaki polarite farkının düşmesiyle daha küçük partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküllerin elde edildiği gösterilmiştir.

Literatürde nanoçöktürme yöntem parametrelerinin değerlendirildiği ve bu parametrelerdeki değişikliklerin önemini vurgulayan birçok çalışma mevcuttur. Tez çalışmamız kapsamında da amfifilik CD türevleriyle CPT taşıyan nanopartiküllerimizin eldesine yönelik olarak açıklanan literatür bilgileri ışığında ön formülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen önformülasyon deneylerinin temelini, nanopartiküllerin stabilite, ilaç salımı, enkapsülasyon etkinliği gibi gerek *in vitro* profilleri gerekse *in vivo* ortamda beklenen hücresel etkileşim ve hücre içine alım, absorpsiyon derecesi, biyoyararlanımı ve dolayısıyla ilaç taşıyıcı sistemin nihai etkinliği üzerinde kritik öneme sahip olduğu bilinen parametreler olan partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve yüzey yükünün değerlendirilmesi ve amfilik CD nanopartiküllerinin hazırlanmasında nanoçöktürme yöntemindeki değişkenlerin sonuç parametreler üzerine etkisinin incelenmesi oluşturmaktadır.

Literatürde, nanopartiküller ilaç taşıyıcı sistemlerin fizyolojik olarak stabilitelelerini koruyabilmeleri, opsonizasyondan korunabilmeleri ve tümörlü bölgede birikebilmeleri amacıyla partikül büyüklüklerinin düşük olacak şekilde tasarlanmalarının olumlu bir yaklaşım olacağı bildirilmektedir (104). Örneğin; He ve ark. (261) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, 300 nm ve daha küçük partikül büyüklüğüne sahip nanopartiküllerin gastrointestinal kanalda enterositler ve M hücrelerince alımlarının daha yüksek olması sebebiyle oral uygulama amacıyla daha uygun oldukları bildirilmiştir. Banerjee ve ark. (262) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise partikül büyüklüğünün oral uygulanan nanopartiküller için kritik parametrelerden biri olduğu belirtilmiş olup, çalışma kapsamında partikül büyüklüğünün artmasıyla nanopartiküllerin intestinal hücrelerce alımının azaldığı ve buna bağlı olarak ilaç taşıyıcı sistemin biyoyararlanım ve terapötik etkinliğinin düştüğü gösterilmiştir.

Bu bağlamda literatürdeki mevcut bilgiler de göz önüne alınmış ve çalışmamız kapsamında spesifik bir değerlendirme yapılarak, tasarladığımız nanopartiküllerin, oral yolla uygulanacak olması ve hedef bölge olan kolona ulaşana kadar çeşitli fizyolojik engellerle karşılaşabileceği de öngörüldüğünden, monodispers nanopartiküllerin 300 nm'den küçük olarak elde edilmesi amaçlanmıştır.

Partikül büyüklüğünün yanısıra bir diğer önemli parametre ise polidispersite indeksidir. Polidispersite indeksi bir dağılımın heterojenliğini tanımlamak için kullanılan bir terimdir ve nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımının belirlendiği dinamik ışık saçılımı yönteminde 0-1 aralığında bir değerdir. Bu değer 0'a yakın

olması sistemin monodispersliğini ve homojenliğini ifade ederken, 1'e yaklaştıkça dağılımın heterojenliğini ve ortalamadan uzaklığını ifade etmektedir.

Danaei ve ark. (263) tarafından partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksinin nanopartiküler sistemlerin etkinliği üzerindeki öneminin değerlendirildiği bir çalışmada, polidispersite indeksinin 0.3'den küçük olmasının sistemin homojenliğinin kabul edilebilir düzeyde olduğunu ifade ettiği belirtilmiştir.

Tez çalışmamız kapsamında da elde edilen nanopartiküllerin homojen dağılımının ölçüsü olan polidispersite indeksinin düşük olması, elde edilen nanopartiküllerin monodispersliğinin yeterli seviyede olduğunun göstergesi olarak yorumlanmış ve $PDI < 0,3$ olan nanopartiküller uygun olarak değerlendirilmiştir (264, 265).

Nanopartiküller için bir diğer karakterizasyon parametresi ise sulu ortamda sahip oldukları yükür. Zeta potansiyel, partiküllerin sahip oldukları yüzey yükü ile partikülü çevreleyen iyon bulutu dışındaki nötral alan arasındaki potansiyel farkını ifade etmektedir. Bu değer, nanopartiküllerin fiziksel stabilite ve fizyolojik ortamda hücrelerle ve kan proteinleri ile etkileşimleri açısından da önemli bir parametredir (265).

Net pozitif ($>+30$ mV) veya net negatif (<-30 mV) zeta potansiyele sahip nanopartiküller birbirlerini yeterli düzeyde ittiklerinden partiküler düzeyde fiziksel etkileşimleri stabil kalabilmelerini sağlayacak düzeyde olabilmektedir. Bu sebeple -30 mV'dan küçük ve $+30$ mV'dan büyük veya bu değerlere mümkün olan en yakın zeta potansiyel değerine sahip nanopartiküller fiziksel olarak stabil olarak kabul edilmektedir (266). Gerek fiziksel stabilite gerekse *in vivo* etkinlik ve hücresel etkileşim bakımından nanopartiküllerin karakteristikleri üzerinde etkili olan zeta potansiyel değerinin negatif veya pozitif oluşu da etkili bir değişkendir.

Son yıllarda nanopartiküllerin sahip oldukları yüzey yükünün yalnızca fiziksel stabilite açısından değil, ayrıca *in vivo* ortamda davranışları, ilaç salım profilleri, hücresel etkileşimleri, hücre içine alımları ve biyodağılımları bakımından da etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (111, 267).

Du ve ark. (268) oral yolla uygulanması amaçlanan Poli-etilenglikol (PEG) nanopartiküllerini farklı yüzey yükleri ve aynı partikül büyüklüğüne sahip olacak şekilde hazırlamışlardır. Katyonik olarak tasarlanmış nanopartiküllerin *in vitro* olarak Caco-2 hücrelerinden geçişinin, *in vivo* olarak ise intestinal hücrelerce alımının negatif yüklü olan nanopartiküllere göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir.

He ve ark. (269) tarafından gerçekleştirilen ve HT-22 fare hipokampal hücre hattıyla tümör indüklenmiş farelerde, nanopartiküllerin yüzey yüklerinin tümörlü bölgedeki biyodağılımları üzerinde etkisinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, negatif yüklü nanopartiküllerin tümörlü bölgede birikme oranlarının negatif yüklerinin nötrale yaklaşmasıyla arttığı, pozitif yüklü nanopartiküller için ise zeta potansiyelin artışıyla tümörlü bölgede daha fazla nanopartikül birikebildiği gösterilmiştir.

Hücresel düzeyde gerçekleştirilen çalışmalarla, nanopartiküllerin hücre içine alımının zeta potansiyeli pozitif olan nanopartiküllerde zeta potansiyeli negatif olanlara göre daha kolay ve hızlı olduğu tespit edilmiştir (270, 271). Katyonik nanopartiküllerin hücresel etkileşimleri ve hücre içine alımlarının daha iyi olmasının temel sebebinin, çift katlı fosfolipit yapılı hücre membranlarının negatif yükünden dolayı pozitif yüzey yüklü katyonik nanopartiküller ile daha yüksek elektrostatik etkileşim göstermesi olarak açıklanmaktadır (272).

Zeta potansiyelin opsonizasyon ve serum proteinlerine bağlanma açısından etkisi de önemlidir. Sistemik dolaşımda daha uzun süre kalabilmesi için nanopartiküllerin mümkün olduğu kadar nötrale yakın olması tercih edilmektedir. Pozitif yüzey yükü ise negatif yüklü serum proteinlerince opsonizasyonu hızlandırmaktadır. Bu nedenle karaciğer, akciğer, dalak ve kemik iliği gibi RES organlara yönelik bir ilaç taşıma amacı söz konusu ise pozitif yüzey yükü avantajlı olabilese de, kan dolaşımında kalma ve EPR etkisinden faydalanma açısından yüzey yükünün nötrale yakın olması daha çok tercih edilen bir durumdur. Tekrarlanan ve uzun süreli uygulamada itrah organlarında birikim ve potansiyel toksisite açısından da pozitif yük olumsuz etkilere yol açabilmektedir. Biyolojik membranlarla etkileşimi yüksek olduğu için çok küçük partiküller (<50 nm) ve katyonik nanopartiküller böbrekler ve akciğer

gibi itrah organlarında birikebilmektedir.. Bütün bu bilgiler ışığında, pozitif yüzey yükü oral uygulama açısından avantajlı görünmektedir.

5.3. Önformülasyon Çalışmaları Sonunda Hazırlanan Nanopartiküllerin Değerlendirilmesi

5.3.1. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu Çalışmaları

Farklı amfifilik CD türevleri kullanılarak nanoçöktürme yöntemiyle anyonik ve katyonik nanopartiküllerin elde edilebildiği ve karakterizasyon parametrelerinin değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur (147, 273).

Bir önceki bölümde açıklanan literatür bilgileri ışığında tasarlanan önformülasyon çalışmaları kapsamında; (6-O-CAPRO- β -CD), CS-(6-O-CAPRO- β -CD), PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) ve (Poly- β -CD-C6) amfifilik CD türevleri ile nanoçöktürme yöntemi kullanılarak hazırlanan nanopartiküller için Bölüm 4.2.'de açıklanan formülasyon değişkenlerinin elde edilen nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Partikül büyüklüğü 300 nm'den küçük, polidispersite indeksi 0,3'den küçük, zeta potansiyeli ise negatif yüzey yüklü partiküller için -30 mV'dan küçük veya bu değere mümkün olduğunca yakın, pozitif yüzey yüklü partiküller için ise +30 mV'dan büyük veya bu değere mümkün olduğunca yakın nanopartiküllerin elde edilebildiği parametreler tespit edilmiştir. Bölüm 4.2.'de her bir parametrenin değişkenliği durumunda elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyon sonuçlarına ilişkin veriler ve aralarındaki istatistiksel farklar detaylı olarak açıklanmıştır.

Yapılan deneysel çalışmalarda organik çözücünün aseton, CD konsantrasyonunun %0,1 (a/h), organik faz:sulu faz oranının 1:2 (h/h), karıştırma hızının 600 rpm olduğu ve (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikülleri için partiküllere pozitif yüzey yükü kazandırmak amacıyla kaplama materyali olan kitosan için konsantrasyonun %0,025 (a/h), polietilenimin için ise %2,5 (a/h) oranlarında olması durumunda her dört formülasyon içinde optimum özellikleri gösteren nanopartiküller

elde edilebilmiştir. Sonuç olarak seçilen formülasyonlar ve bu formülasyonlara ilişkin teknolojik parametreler aşağıda belirtilmiştir.

CPT yüklü olarak hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyon parametreleri göz önüne alındığında; en düşük partikül büyüklüğü ($134,6 \pm 19,3$) ve polidispersite indeksi ($0,27 \pm 0,03$) ile en yüksek pozitif zeta potansiyel değeri ($+40,2 \pm 0,32$) (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinde elde edilmiştir. Benzer CD formülasyonları ile gerçekleştirilen önceki çalışmalarda da farklı amfifilik CD nanopartikül formülasyonları arasında en düşük partikül büyüklüğünün benzer şekilde (Poly- β -CD-C6) nanopartikülleri ile elde edilebildiğine dair sonuçlar belirtilmiştir (156, 273). (6-O-CAPRO- β -CD), CS-(6-O-CAPRO- β -CD) ve PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) türevleri ile elde edilen nanopartiküllerde ise karakterizasyon parametreleri açısından kabul edilebilir aralıklarda özellikler gösteren partiküller elde edilmiş olmasının yanında Tablo 4.20.'de de görüldüğü ve açıklandığı üzere (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerine kıyasla daha yüksek partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi ve daha düşük zeta potansiyel değerlerine sahip olarak elde edilebilmişlerdir.

Memişoğlu ve ark. (274) tarafından gerçekleştirilen ve primer yüzü modifiye edilmiş amfifilik siklodekstrinlerle nanopartikül eldesinin gerçekleştirildiği çalışmada, amfifilik siklodekstrinlerle herhangi bir yüzey etkin maddeye ihtiyaç duyulmaksızın nanopartikül hazırlanmasında elde edilen nanopartiküllerin karakteristik parametreleri üzerinde amfifilik siklodekstrinin hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değerinin önemi vurgulanmıştır. HLB, Griffin (275) tarafından amfifilik moleküllerin hidrofilik ve lipofilik kısımları arasındaki denge olarak belirtilmiş olup, amfifilik molekülün hidrofilik kısmının yüzde ağırlığının beşe bölünmesiyle hesaplanmaktadır. Bu kapsamda, tez çalışmamızda kullanılan ve yalnızca primer yüzü 7 adet hekzanoil grubuyla modifiye edilmiş olan (6-O-CAPRO- β -CD) amfifilik siklodekstrin ve hem primer yüzü 7 adet katyonik amin zinciriyle hem de sekonder yüzü 14 hekzanoil grubuyla modifiye edilmiş olan (Poly- β -CD-C6) amfifilik siklodekstrininin Griffin tarafından belirtilen eşitliğe göre HLB değerleri hesaplanmış ve sırasıyla 10,1 ve 15,8 olarak bulunmuştur. Bu bağlamda yorumlandığında, her iki yüzü de modifiye haldeki (Poly- β -CD-C6) amfifilik siklodekstrini ile nanopartikül eldesinde nanopartikül

oluşumunun gerçekleştiği yüzeyler arası gerilimin (6-O-CAPRO- β -CD)'ye göre daha etkin şekilde düşüyor oluşu, nanoçöktürme sürecinde daha küçük partiküllerin daha dar bir partikül büyüklüğü dağılımında oluşmasıyla sonuçlanmış olduğu şeklinde düşünülmüştür.

Elde edilen nanopartikül formülasyonları arasında yalnızca (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikülleri sulu ortamda negatif yüzey yüküne sahiptir. Söz konusu formülasyona katyonik özellik kazandırmak amacıyla pozitif yüklü polimerler olan CS veya PEI ile kaplama yoluna gidilmiştir. Ancak; PEI'in fiziksel özelliklerinden dolayı nanoçöktürme yöntemi etkin olarak uygulanamamış ve daha büyük ve daha heterojen partikül büyüklüğü dağılımına sahip dispersiyonlar elde edilebilmiştir.

Bu durumun temelinde, PEI polimerinin viskoz bir sıvı olması ve karıştığı sulu fazın da viskozitesini artırması sonucunda, nanoçöktürme yönteminin uygulanışında yöntemin etkinliği üzerinde olumsuz etkisi olduğu değerlendirilmiştir. PEI'nin yüksek viskozitesi sebebiyle nanoçöktürme yönteminde çözücü difüzyonu mekanizmasında istenmeyen bir türbülansa sebep olmasının partikül büyüklüğünün ve polidispersite indeksinin artışıyla sonuçlanması şeklinde yorumlanmıştır.

Benzer sonuçlar Salatin ve ark. (276) tarafından nanoçöktürme yöntemiyle Eudragit RL nanopartiküllerinin eldesi ve yöntem optimizasyonu amacıyla gerçekleştirilen çalışmada da bildirilmiştir. Çalışmada, viskozite artışının karıştırma sırasında türbülansa sebep olduğu ve nanoçöktürme yönteminin temelini oluşturan solvan difüzyonuna engel olarak büyük partiküllerin oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu durumun sebebi, nanoçöktürme yöntemiyle ilgili olarak literatürde mevcut bilgiler göz önüne alınarak değerlendirilmiş ve bu yöntemle nanopartiküllerin oluşmasının dayandığı esas olan "Marangoni etkisi" yani, solvanların manyetik karıştırma altında birbirleriyle karışması ve solvan difüzyonunda fiziksel olarak istenmeyen bir türbülansa sebep olması ile ara yüzeyde ilaç ve polimerin nano boyutta çökmesi olayının etkin şekilde gerçekleşmemesi olarak düşünülmüştür.

(6-O-CAPRO- β -CD)'nin çalışma kapsamında belirlediğimiz yöntem ve değişkenler altında hazırlanan nanopartiküllerinin PEI ile kaplanabildiği fakat son durumda nanopartiküllerin karakterizasyon parametrelerinin hedeflenen değerlerde

elde edilemediği ayrıca tekrarlanabilirliği açısından da sorun teşkil edebileceği değerlendirilmiştir (276-280).

5.3.2. Nanopartiküllerin Morfolojilerinin İncelenmesi

Nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin yani şekil ve yüzey karakteristiklerinin *in vitro* ilaç salımı, fizyolojik ortamda davranışları ve biyodağılımları üzerinde de etkisi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (281, 282). Nanopartiküller, küresel ve küresel olmayan yapılarıyla farklı şekillerde elde edilebilmekte ve küresel olmayan nanopartiküller de literatürde eliptik, oval, nanorod, nanodisk, filament benzeri yapılar olarak isimlendirilmektedir (282).

Partikülün morfolojik yapısının küresel veya küresel olmayan formda oluşunun nanopartikülün *in vitro-in vivo* olarak nihai karakteristik özellikleri ve davranışları üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur (283). Bu kapsamda, Decuzzi ve ark. (284) tarafından gerçekleştirilen ve nanopartikülün morfolojik şeklinin tümörlü bölgedeki biyodağılımı üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, farklı morfolojik özelliklerde hazırlanan ve tümörlü farelere intravezikal olarak uygulanan nanopartiküllerden silindirik nanopartiküllerin diğer formlara kıyasla tümörlü bölgede daha fazla birikebildiği gösterilmiştir.

Banerjee ve ark. (262) tarafından oral yolla uygulanmak amacıyla tasarlanan nanopartiküllerin morfolojik özelliklerinin küresel veya küresel olmayan yapıda oluşunun intestinal absorpsiyonları üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışma sonucunda oral yolla uygulanması hedeflenen nanopartiküler sistemler için morfolojik özelliklerin nihai etkinlik bakımından kritik önemi olduğu ve daha fazla araştırılması gerektiği belirtilmiştir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen dört farklı nanopartikül formülasyonunun taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile incelenmesi sonucunda nanopartiküllerin görüntülenebilmesi gerçekleştirilmiştir ve elde edilen SEM görüntülerindeki partikül büyüklüklerinin dinamik ışık saçılımı yöntemi ile elde edilen ortalama partikül büyüklüğü dağılımına uygun aralıklarda bulunduğu da tespit edilerek veriler kendi içinde teyit edilebilmiştir (Şekil 4.12. - Şekil 4.15.). Ayrıca,

nanopartiküllerin küresel ve düzgün yapıda elde edilebildikleri gözlemlenmiştir. PEI kaplı nanopartiküllerin, PEI'in viskozitesine bağlı olarak ortaya çıkan ve bir önceki bölümde açıklanan, nanopartikül eldesinde yöntemin uygulanabilirliği üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle, şekil olarak daha düzensiz ve agregat oluşturma eğiliminde, daha büyük ve heterojen dağılımlı partiküllerin varlığı gözlenmiştir. Ayrıca, hiçbir nanopartikül formülasyonuna ait SEM görüntülerinde serbest halde CPT kristallerine rastlanmamış olup, CPT'nin nanopartiküllere amorf halde enkapsüle edilebildiği ve nanopartikül eldesinde yöntem sonunda serbest kristal CPT'nin ise uzaklaştırılabilmiş olduğu elde edilen SEM görüntülerinde teyit edilebilmiştir.

5.3.3. Enkapsülasyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

İlaç taşıyıcı sistemler için en önemli *in vitro* kalite parametrelerinden biri de enkapsülasyon etkinliği (EE)'dir. Nanopartikülde birim polimer başına yüklenen ilaç miktarı ve/veya en başta kullanılan ilacın ne kadarının nanopartikülde hapsediğinin ifadesidir. Enkapsülasyon etkinliği, uygulanan nanopartiküle bağlı olarak ilacın doz-cevap ilişkisini kurmada ve *in vitro* salım profili çalışmalarında hesaplamaların yapılabilmesinde önemlidir. Gerek yöntemin etkinliğinin değerlendirilebilmesi gerekse yöntem sonunda elde edilen nanopartiküllerin taşıdıkları ilaç miktarının tayin edilebilmesi ve *in vivo* çalışmalarda gruplar arasında doz eşitlemesinin yapılabilmesi amacıyla enkapsülasyon etkinliğinin güvenilir şekilde tespit edilmesi gerekmektedir (33, 285).

Amfifilik CD nanopartiküllerinde ilaç yükleme etkinliği üzerinde;

- CD türevinin kimyasal yapısı ve hangi yüzünün modifiye edilmiş olduğu,
- Nanopartikül hazırlama yöntemi,
- İlacın siklodekstrin kavitesine olan afinitesi,
- İlacın hidrofilik/lipofilik oluşu,
- İlacın fizikokimyasal özellikleri (Molekül ağırlığı, pKa vb.) gibi parametrelerin etkili olduğu bilinmektedir (257).

Tez çalışması kapsamında elde edilen nanopartiküllere ait enkapsülasyon etkinlikleri Tablo 4.21.'de sunulmuştur. Başlangıçta kullanılan ilaç miktarının

nanopartikülde hapsolma yüzdesine göre; en yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip iki formülasyon CS-(6-O-CAPRO- β -CD) (%36) ve ardından (Poly- β -CD-C6) (%35) olarak bulunmuştur. Diğer iki formülasyon ise; PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) (%21) ve (6-O-CAPRO- β -CD) (%32) olarak tespit edilmiştir. PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinde diğer formülasyonlara göre enkapsülasyon etkinliğinin düşük olması ($p < 0,05$) nanoçöktürme yönteminin etkin olarak uygulanamaması ile ilişkilendirilmiştir.

(6-O-CAPRO- β -CD) ve (Poly- β -CD-C6) nanopartikülleri arasında enkapsülasyon etkinlikleri arasındaki farkın her iki amfifilik CD'nin moleküler yapısındaki farklılıklardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. (6-O-CAPRO- β -CD), primer yüzü 7 hekzanoil grubuyla modifiye edilmiş bir amfifilik CD türevidir iken, (Poly- β -CD-C6)'nin primer yüzünde 7 katyonik amin grubu ve sekonder yüzünde ise 14 hekzanoil grubuyla modifiye edilmiş olması enkapsülasyon etkinlikleri arasındaki farkın sebeplerinden biri olarak yorumlanmıştır (218). (Poly- β -CD-C6), (6-O-CAPRO- β -CD)'ye göre 2 kat daha fazla alifatik zincir taşımasından dolayı daha hidrofobik yapıdadır. (Poly- β -CD-C6) ile (6-O-CAPRO- β -CD)'ye göre daha yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilmesi hidrofobik özellikteki CPT ile hem daha yüksek oranda hem de daha fazla bölgede (hidrofobik kavite ve alifatik zincirler) etkileşime girme olasılığıyla açıklanmaktadır (246).

En yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip formülasyon olan CS-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinde yüzey kaplama materyali olarak kullanılan CS polimerinin etkisi ile yüzeye adsorbe halde ikinci bir ilaç tabakası tutunabildiği ve bu sebeple daha yüksek oranda ilacın nanopartiküllerde enkapsüle/adsorbe halde bulunabildiği yorumlanmıştır.

Varan ve ark. (273) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, (Poly- β -CD-C6), CS-(6-O-CAPRO- β -CD), (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikül formülasyonlarının paklitaksel enkapsülasyon etkinlikleri incelenmiş ve enkapsülasyon etkinliği sırasıyla (Poly- β -CD-C6), CS-(6-O-CAPRO- β -CD), (6-O-CAPRO- β -CD) olarak sıralanmıştır. Çalışma sonunda, CS kaplama ile nanopartikül yüzeyinde ilaç hapsedilebilmesi için ek bir kaplama alanı oluşması nedeniyle ilaç yükleme etkinliğinin artmış olduğu bildirilmiş olup, (Poly- β -CD-C6) nanopartikül formülasyonunda ise uzun alifatik zincirleri nedeniyle artan

hidrofobik karakterinin ilaç yükleme etkinliğinin artışı üzerinde olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, açıklanan çalışmalarda sunulan sonuçlarla uyumlu ve paralel olarak yorumlanmıştır.

Bu kapsamda değerlendirildiğinde, herhangi bir kaplama materyali polimer kullanılmaksızın hazırlanan (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinde diğer formülasyonlara kıyasla yüksek oranda CPT enkapsüle edilebilmiş olduğu ve bu nanopartiküllere ait diğer karakterizasyon parametreleri de (ortalama partikül büyüklüğü, zeta potansiyel) göz önüne alındığında umut vadeden bir formülasyon olduğu değerlendirilmiştir.

5.3.4. *In vitro* Salım Çalışmaları

Nanopartiküllerin enkapsüle halde taşıdıkları CPT'yi, oral yolla uygulanmalarının ardından gastrointestinal kanalda geçirecekleri süre ve karşılaştıkları pH aralığını da temsil edecek şekilde fizyolojik koşulları taklit etmesi amaçlanan bir deney tasarımı kullanarak diyaliz membran yöntemi ile gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmaları sonucunda dört farklı nanopartikül formülasyonunun 24 saatlik salım profilleri belirlenmiştir. Oral yolla uygulanan dozaj şeklinin kolona yaklaşık 5 saatlik bir sürede ulaştığı ve bu sürenin yaklaşık ilk 2 saatinin midede, sonraki 3 saatinin ise ince bağırsak segmentlerinde geçtiği bilinmektedir (286, 287).

İlaç taşıyıcı sistemler, mideden itibaren kolona doğru (mide pH 1,2, ince bağırsak pH 4,5, kolon pH 7,4) artış gösterme eğilimindeki bir pH aralığına maruz kalmaktadır (224, 288). Belirtilen literatür çalışmaları ve fizyolojik koşullar göz önüne alınarak tasarlanan ve gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmalarında, kolona ulaşması öngörülerek hazırlanan nanopartikül formülasyonları için 5. saatin sonunda yani kolon bölgesine ulaşmayı temsil eden sürede, mümkün olan en az miktarda CPT salmış olan ve yüksek oranda CPT'yi kolona ulaştırabilen nanopartiküller elde edebilmek amaçlanmıştır.

Gerçekleştirilen *in vitro* salım çalışmaları sonucunda, nanopartikül formülasyonlarının simüle mide sıvısı (SGF) ve simüle bağırsak sıvısında (SIF) geçirmeleri gereken salım sürelerinin tamamlanması itibarıyla, simüle kolon sıvısı ortamına (SCF) geçmeden hemen önce (5. saat sonunda) salınan kümülatif CPT

miktarları; PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) % 77, (6-O-CAPRO- β -CD) için %65, CS-(6-O-CAPRO- β -CD) için % 61 ve (Poly- β -CD-C6) için ise %48 olarak bulunmuştur. 5. saat sonu itibariyle (6-O-CAPRO- β -CD) ve CS-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikülleri yaklaşık olarak benzer salım profilleri göstermektedir ($p>0,05$). Bununla beraber, ilk 3 saat sonuna kadar CS-(6-O-CAPRO- β -CD) formülasyonu (6-O-CAPRO- β -CD) formülasyonundan daha hızlı bir salım profili göstermektedir. Bu durumun, CS-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerde yüzey kaplama materyali polimeri olan kitosana da adsorbe haldeki CPT'den ileri geldiği ve öncelikle yüzeye adsorbe haldeki CPT'nin salınması sebebiyle olduğu düşünülmektedir (289).

PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikülleri ise kolona ulaşana kadarki süreyi temsil eden 5 saatte enkapsüle haldeki CPT'yi %77 gibi yüksek bir oranda salmış ve enkapsülasyon etkinliğinin de diğer formülasyonlara kıyasla düşük olduğu göz önünde bulundurulduğunda çalışmanın hedefine uygun bir salım profili gösteremediği değerlendirilmiştir.

(Poly- β -CD-C6) nanopartikülleri ise kolona ulaşana kadarki süreyi temsil eden 5. saatte diğer üç formülasyona kıyasla daha düşük oranda (%48) salım göstermiştir ($p<0,05$) ve daha yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu da değerlendirildiğinde, kolona en fazla miktarda CPT ulaştırabilecek nanopartikül formülasyonu olarak *in vitro* salım profili açısından çalışmanın hedeflenen kriterlerine en uygun formülasyon olduğu gözlenmiştir.

Literatürde nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün artmasıyla salımın yavaşladığı, partikül büyüklüğünün azalmasıyla ise spesifik yüzey alanının artışına bağlı olarak salımın hızlandığı bildiren çalışmalar mevcuttur (290, 291). Ancak bu çalışmada, elde edilen nanopartikül formülasyonları arasında en küçük partikül büyüklüğüne sahip olan katyonik yapıdaki (Poly- β -CD-C6) ile diğer üç formülasyona göre daha yavaş bir salım profili gözlenmiştir. Bu durumun partikül büyüklüğü dışında salım profili üzerinde etkili olan diğer parametrelerle ilgili olduğu düşünülmüştür. Nanopartiküllerden ilaç salım süreci, öncelikle yüzeye adsorbe haldeki ilacın, ardından nanopartikül matriksinde çözülmüş ve difüzyonla salınan ilacın ve son olarak matriks

parçalanması sonucu enkapsüle haldeki ilacın serbestleşmesiyle son bulmaktadır (292).

(Poly- β -CD-C6)'in primer ve sekonder yüzleri olmak üzere her iki yüzeyi de alifatik zincirlerle modifiye edilmiş ve katyonik özellik gösteren bir amfifilik CD olması küçük partikül büyüklüğüne rağmen en yavaş salım gösteren türev olması ile ilişkilendirilmiştir. Bu bağlamda, CPT'in gerek CD kavitesi, gerekse modifiye edici gruplarla etkileşmesi sonucu molekülün siklodekstrine yüksek afinite göstermiş olması elde edilen yavaş salım profilinin nedeni olarak yorumlanmıştır. Varan ve ark. (273) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, polikasyonik yapıdaki amfifilik CD nanopartikül formülasyonu ile negatif yüzey yüküne sahip amfifilik CD nanopartikül formülasyonlarından ilaç salım profilleri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda, daha küçük partikül büyüklüğüne sahip nanopartikülün ilaç ve CD arasındaki afinite ve elektriksel etkileşim sonucunda daha yavaş salım gösterdiği belirtilmiştir ve bu bulgular, tez çalışmasındaki salım bulgularımızı ve yorumumuzu destekler niteliktedir.

5.3.5. Gastrointestinal Simüle Sıvılarda Stabilite

Oral yoldan ilaç uygulamasında etkili bir sistem geliştirilebilmesinin birincil koşulu ilaç taşıyıcı sistemlerin karşılaçıkları fizyolojik koşullarda hem enkapsüle haldeki ilacı, hem de kendi fiziksel stabilitesini koruyor olmasıdır. Bu sebeple, oral yoldan uygulanması hedeflenen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin uygulama sonrası, gastrointestinal kanalın çeşitli koşullarında fiziksel olarak stabilitesini koruyabiliyor olması gerekmektedir (75).

Bölüm 2.4.'de açıklandığı üzere, oral yoldan ilaç uygulamasının önündeki en önemli engellerin başında gastrointestinal kanalın karmaşık fizyolojik yapısı ve buna bağlı olarak sunduğu engeller gelmektedir. Gastrointestinal sıvıları temsil eden farklı simüle sıvı ortamlarında, ilaç taşıyıcı sistemin geçireceği süreler de göz önüne alınarak Bölüm 3.5.6.'da açıklandığı şekilde gerçekleştirilen ve Bölüm 4.3.4.'te bulguları sunulan gastrointestinal simüle sıvı ortamlarında fiziksel stabilite çalışmaları sonuçlarına göre nanopartiküler sistemlerin karakterizasyon parametreleri açısından; (6-O-CAPRO- β -CD) ve PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinde SIF ve SCF

ortamlarında anlamlı farklılık ($p < 0,05$) gözlenmiştir. CS-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerde ise yalnızca SCF ortamında anlamlı farklılık ($p < 0,05$) gözlenmiştir. (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin karakterizasyon parametrelerinde ise hiçbir simüle gastrointestinal sıvı ortamında kritik kalite parametrelerinde anlamlı bir farklılık meydana gelmediği tespit edilmiştir.

Bütün formülasyonlar için ortalama partikül büyüklükleri ve polidispersite indekslerinde artış eğilimi gözlemlendiği, bu durumun simüle gastrointestinal sıvıların oluşturduğu zorlayıcı çevresel koşullarından (pH değişimi, iyon etkisi, tuz etkisi vb.) ve (Poly- β -CD-C6) dışındaki formülasyonların ± 30 mV'den düşük zeta potansiyelleri sonucu agregasyon eğiliminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (110).

Lazzari ve ark. (226) tarafından gerçekleştirilen ve polimerik nanopartiküllerin gastrointestinal sıvılarda stabilitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada, Poli-laktik asit (PLA) (-18 mV) nanopartiküllerinin gastrik sıvıda 24 saat inkübasyon sonrasında partikül büyüklüklerinde agregasyona bağlı olarak %20'lik bir artış tespit edildiği ancak poli-metilmetakrilat (PMMA) (-38 mV) nanopartiküllerinde ise istatistiksel bir artış olmadığı ve bu durumun PMMA nanopartiküllerinin PLA nanopartiküllerine kıyasla daha yüksek olan zeta potansiyellerinden ileri geldiği gösterilmiştir.

Zeta potansiyel değerleri göz önüne alındığında bütün formülasyonlar için başlangıç değerlerine göre zeta potansiyellerin düşüş ve nötrale yaklaşma eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Ancak; (Poly- β -CD-C6) nanopartikülleri için +44,2 mV olan başlangıç zeta potansiyel değeri, 8.saat sonunda simüle kolon sıvısında +39,9 mV olarak gözlenmiş ve stabil bir koloidal sistem için halen yeterli düzeyde yüksek kalabildiği görülmüştür.

Plapied ve ark. (75) nanotaşıyıcıların oral uygulama sonrası gastrointestinal kanal pH'sı ve enzimler gibi değişkenler dolayısıyla degrade olabileceğini, bu sebeple nanotaşıyıcının gastrointestinal davranışının ve fiziksel stabilitesinin değerlendirilerek taşıdığı ilacı gastrointestinal kanalda hangi segmente kadar koruyabileceğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesinin gerekliliğini vurgulamışlardır.

(Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerleri açısından simüle gastrointestinal sıvıların

tamamında stabilitesini koruyabilir oluşu nanopartiküler sistemde fiziksel olarak stabil kalabildiğine ve buna bağlı olarak enkapsüle halde taşıdığı CPT'yi de gastrointestinal kanalın değişken pH ve çevresel koşullarından koruyabileceği yönünde yorumlanmıştır (225). Buna bağlı olarak da gastrointestinal kanalda kimyasal yapısı bozulmadan enkapsüle halde daha uzun süre kalabilen CPT'nin kalış süresine ve kimyasal stabilitesinin korunabiliyor oluşuna bağlı olarak ilaç taşıyıcı sistemin CPT'nin fizyolojik olarak etkinliği üzerinde de olumlu yönde etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (293, 294).

5.3.6. Fiziksel Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan amfifilik CD nanopartiküllerinin kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları Bölüm 3.5.7.'de açıklanan şekilde sulu dispersiyon halinde +4°C'de ışıktan korunarak saklanan ve 1 ay süresince belirli günlerde (0., 1., 7., 14. ve 30.) örnekler alınarak nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel değerlerinin ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir.

(6-O-CAPRO-β-CD), CS-(6-O-CAPRO-β-CD) ve (Poly-β-CD-C6) nanopartiküllerinde 1., 7. ve 14. günlerde anlamlı bir fark yokken, bu fark 30. günde anlamlı hale gelmiştir ($p < 0,05$). PEI-(6-O-CAPRO-β-CD) nanopartiküllerinde ise hiçbir zaman noktasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiş olmasına rağmen ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi diğer formülasyonlara göre anlamlı ölçüde yüksek kalmaya devam etmiştir. Ayrıca PEI-(6-O-CAPRO-β-CD) nanopartiküllerin 30. gün sonunda ölçülen düşük zeta potansiyeline (+13,4) bağlı olarak partiküllerin zaman içerisinde agregasyon eğilimi göstermiş olabildikleri ve bununla ilişkili olarak polidispersite indeksi değerinin yine 30. gün sonunda 0,41 olarak ölçülmesi partikül büyüklüğü dağılımının geniş bir aralıkta olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

(Poly-β-CD-C6) nanopartiküllerinde 30. gün sonunda ortalama partikül büyüklüğü 150 nm ve polidispersite indeksi 0,274 olarak, diğer üç formülasyondan daha küçük partikül büyüklüğü ve dar polidispersite indeksini koruyabildiği gözlenmiştir. Zeta potansiyel değerleri açısından değerlendirildiğinde (Poly-β-CD-C6)

nanopartikülleri +40,2 mV başlangıç değeri ve +37,9 mV 30. gün değeriyle diğer 3 formülasyondan daha yüksek zeta potansiyele sahip olarak kalabilmiştir. Bu durum, zaman içerisinde partiküllerin agregasyonuna bağlı olarak gösterebileceği stabilite sorunu riskinin daha düşük olduğu yönünde değerlendirilmiştir (108, 295).

5.4. Mukus ile Etkileşim ve Yapay Mukus Tabakasına Penetrasyon Çalışmaları

5.4.1. Türbidimetrik Tayin

Oral yolla uygulanması planlanan formülasyonlar için gastrointestinal kanal sıvılarında stabilite kadar önemli diğer bir husus ise gastrointestinal kanalda kalış süresinin uzatılabilmesidir. Böylece nanopartiküler sistemin gastrointestinal epitelyal hücrelerle ve biyolojik membranlarla etkileşim süresi ve intestinal permeabiliteleri artırılabilir ve/veya taşıyıcı sistemde enkapsüle halde bulunan ilacın etkili bölgede salımı için yeterli süre sağlanabilir. Oral olarak uygulanan birçok ilaç taşıyıcı sistemin biyoyararlanımını kısıtlayan en önemli faktörlerden birisi gastrointestinal motilite sonucu sistemden hızla fiziksel olarak uzaklaştırılmasıdır (120).

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin gastrointestinal kanalda müsin sıvısı ile etkileşmesi ilaç taşıyıcı sistemin bölgede kalış süresinin uzamasını sağlayabilmektedir. İntestinal kalış süresinin uzaması sonucu mukus tabakasına penetre olarak epitelyal hücre tabakasına ulaşması gerekmektedir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzey modifikasyonları ve/veya yüzey yüklerinin değiştirilmesiyle müsin sıvısı ile etkileşimlerinin değiştirilebileceği ve mukoadezif özelliklerinin artırılacağı bilinmektedir. Literatürde, pozitif yüzey yüküne sahip nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin veya pozitif yüklü bir polimerle kaplama yapılan sistemlerin müsin sıvısı ve mukus tabakasıyla daha yüksek oranda etkileştiği ve bunun sonucunda da intestinal lümende daha uzun süre kalabildiği belirtilmektedir (293, 296).

Tez çalışması kapsamında hazırlanan dört farklı nanopartikül formülasyonunun tamamı için mukusla etkileşim ve yapay mukus tabakasına penetrasyon çalışmaları Bölüm 3.6. ve Bölüm 3.6.1.'de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş olup sonuçlara ilişkin bulgular ise Bölüm 4.4. ve Bölüm 4.5.'te

sunulmuştur. Sonuçlara göre, bütün nanopartiküllerin tüm zaman noktaları için (0., 30., 60. ve 120. dk) mûsin ortamında verdikleri absorbandsın su ortamında verdikleri absorbandan yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Birbirleri ile karşılaştırıldıklarında ise pozitif yüzey yüküne sahip (Poly- β -CD-C6), CS-(6-O-CAPRO- β -CD) ve PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) formülasyonlarının her bir zaman noktasında negatif yüzey yüklü olan (6-O-CAPRO- β -CD) formülasyonundan daha yüksek absorbands verdiği dolayısıyla mûsin çözeltisi ile daha yüksek oranda etkileştiği gözlemlenmiş olup yüzey yükünün katyonik olmasının mûsinle etkileşim üzerindeki etkisine ilişkin literatürde sunulan çalışmalara uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Ünal ve ark. (45) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada da nanopartikül formülasyonlarının yüzey yükünün pozitif olmasının mûsinle etkileşimi arttırdığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, Luo ve ark. (120) tarafından oral kemoterapi amacıyla gerçekleştirilen bir başka çalışmada mûsin sıvısının içerdiği sülfidril gruplarından dolayı negatif yüklü (yaklaşık -50 mV) olduğunu ve oral formülasyonların hazırlanmasında biyoadezyon amacıyla katyonik partiküller sayesinde mûsinle etkileşimin artırılabilceği bildirilmiştir.

Dört formülasyon arasında en yüksek etkileşim PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) ve (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinde gözlenmiştir. (Poly- β -CD-C6) formülasyonu için gözlenen bu durumun güçlü katyonik etkiden ileri geldiği yorumlanmıştır. PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikülleri mûsinle kuvvetli etkileşse de, gerek partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, enkapsülasyon etkinliği, *in vitro* salım verileri gerekse stabilite verileri göz önüne alındığında istenen özellikleri taşıyamayan bir formülasyon olması sebebiyle, mûsinle etkileşimleri kapsamında değerlendirilen formülasyonlar arasında (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin daha umut veren bir formülasyon olduğu değerlendirilmiştir.

Nanopartiküllerin mukus varlığında karakterizasyon parametrelerinin değerlendirilmesi çalışmalarına ilişkin sonuçlar Bölüm 4.4.2.'de sunulmuştur. 120 dk. süresince gerçekleştirilen ve belirli zaman noktalarında karakterizasyon parametrelerin değerlendirilmesi esasına göre devam eden deney bulgularına göre, hiçbir nanopartikül formülasyonunda 60. dk.'ya kadar ortalama partikül büyüklüğü ve

polidispersite indeksi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiş olup ($p>0,05$), 120.dk sonunda elde edilen bulgularda ise bütün formülasyonlarda 0. dk verilerine göre anlamlı farklılık gözlenmiştir. Karakterizasyon parametrelerindeki bu değişikliğin ortam koşullarının zorlayıcı etkisinden dolayı olduğu düşünülmektedir. 120. dk sonunda (Poly- β -CD-C6) 108 nm ve 0,17 polidispersite indeksi değeriyle diğer 3 formülasyona kıyasla en düşük ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerlerine olan formülasyon olarak gözlenmiştir.

Nanopartiküllerin müsin varlığında ve yokluğunda zeta potansiyellerinin değerlendirildiği çalışma bulgularına göre bütün formülasyonların zeta potansiyel değerlerinde müsinin negatif yükünün etkisi gözlenmiştir. Negatif yüzey yüklü olan (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinde zeta potansiyel müsin yokluğunda -21,3 mV, müsin varlığında ise -25,8 mV olarak gözlenmiştir. Katyonik özellik gösteren diğer üç formülasyonda ise zeta potansiyel değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Bu durum müsinin negatif yüklü olmasıyla ilişkilendirilmiştir (297). Müsin varlığında zeta potansiyel değişimleri değerlendirilen nanopartiküllerden, stabil ve agregasyonun önenebileceği en umut veren formülasyonun +37,8 mV zeta potansiye değeri ile (Poly- β -CD-C6) nanopartikülleri olduğu tespit edilmiştir (111).

5.4.2. Yapay Mukus Tabakasına Penetrasyon

Oral yolla uygulanan ilaç yüklü nanopartiküllerin intestinal lümeneye ulaşmaları ve mukus tabakası ile yeterli düzeyde etkileşerek intestinal lümen bölgesinde kalış süresinin uzatılması ile bağırsak epitelyal hücre tabakasına ulaşabilmesi beklenmektedir. Bunun için nanopartiküllerin sulu mukus tabakasına penetre olması gereklidir. Müsin ile etkileşimin çok kuvvetli olması durumunda da müsin sıvısına hapsolan nanopartiküllerin bir alt tabaka olan mukus tabakasına penetre olması ve ardından intestinal hücre tabakasına ulaşabilmesi zorlaşmaktadır. Dolayısıyla müsin sıvısı ile yeterli etkileşim ve ardından mukus tabakasına penetrasyon aşamaları bir denge durumunda olması gereken, birbiriyle ilişkili ve sıralı iki süreçtir (230, 298, 299).

Tez çalışması kapsamında elde edilen nanopartiküllerin mukus tabakasına penetrasyonlarının değerlendirilebilmesi amacıyla yapay mukus tabakası modelinde

gerçekleştirilen deney sonunda en yüksek penetrasyon oranına sahip formülasyonun %73 penetrasyon oranı ile (Poly- β -CD-C6) nanopartikül formülasyonu olduğu tespit edilmiştir. CS-(6-O-CAPRO- β -CD) formülasyonu % 65 penetrasyon oranı ile ikinci en yüksek penetrasyon gösteren formülasyon olmuştur. (6-O-CAPRO- β -CD) ve PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) formülasyonları ise yapay mukus tabakasına sırasıyla %50 ve %45 oranında penetre olabilmıştır. (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin güçlü pozitif yüzey yüküne sahip olması, deney modelinde yapay mukus tabakası üzerinde bulunan müsin sıvısı ile daha fazla etkileşerek mukus tabakasına doğru daha fazla penetre olabileceği yönünde değerlendirilmiştir (78, 88). Aynı durumun, CS-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinde de yüzey yükünün bir sonucu olarak ikinci en yüksek penetrasyon gösteren formülasyon olmasına imkan verdiği düşünülmüştür.

Mukoza penetrasyon çalışmalarında ayrıca CPT'in aktif lakton ve inaktif karboksilat formlarının miktar tayinleri de gerçekleştirilmiş olup, mukusla etkileşimin fizyolojik koşullarda stabil olmayan CPT üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir. Mukusa penetre olabilen toplam CPT miktarı ve aktif lakton formunun oranları değerlendirildiğinde; (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin hem toplam CPT (%73) hem de aktif lakton formu (%52) açısından mukusa en fazla penetre olabilen formülasyon olduğu görülmüştür. Tez çalışmamızda elde edilen bulgular ile siklodekstrinlerin literatürde belirtilen intestinal permeabilite arttırıcı etkileri özellikleri uyumludur (300, 301).

Loftson (302), CD nanopartikülleri ile mukozal membranların oluşturduğu iki temel engelin aşılabileceğini ve böylece intestinal permeabilitenin artırılabilceğini belirtmiştir. Bu kapsamda açıkladığı ilk engel sulu müsin çözeltisidir. CD ile hidrofobik yapıdaki ilaçların suda çözünürlüğü artırılarak difüzyon bölgesinde ilaç konsantrasyonu ve pasif difüzyon artırılabilir. Karşılaşılan ikinci engel ise protein etkileşimidir ve CD nanopartiküllerinin hidrofilik dış yüzeyi sayesinde protein etkileşiminin en aza indirilmesiyle mukus tabakasına penetrasyonunun artırıldığı bildirilmiştir.

Mazzaferro ve ark. (303) tarafından CD'lerin intestinal permeabilite arttırıcı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, *ex vivo* olarak rat intestinal modelinde

dosetaksin intestinal permabilitesinin hazırlanan CD nanopartikülleri ile belirgin şekilde arttığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, Ünal ve ark. (45) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Polikaprolakton (PCL), (6-O-CAPRO- β -CD) ve CS-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikül formülasyonlarının mukozal penetrasyonları karşılaştırılmıştır. Yapay mukus modelinde gerçekleştirilen çalışma sonunda en yüksek mukozal penetrasyonun sırasıyla CS-(6-O-CAPRO- β -CD), (6-O-CAPRO- β -CD), PCL nanopartikül formülasyonlarında elde edildiği gösterilmiştir. Bu durum CD ile intestinal permeabilitenin artırılabilceği ve ayrıca CS kaplama ile pozitif yüzey yükü kazanan nanopartiküllerin münle etkileşiminin artarak daha yüksek mukozal penetrasyona da imkan sağlayacağını göstermiştir.

Elde edilen nanopartiküllerin mün sıvısı ile etkileşimleri ve mukus tabakasına penetrasyonlarında yüzey yükü ve CD materyali yanında nanopartikülün ortalama partikül büyüklüğünün küçük olmasının da etkili olduğu düşünülmektedir (304). Herhangi bir kaplama materyali olmaksızın hazırlanan (Poly- β -CD-C6) nanopartikül formülasyonunun, en küçük partikül büyüklüğü ve en yüksek pozitif zeta potansiyeline bağlı olarak yapay mukus tabakasına yüksek penetrasyon kabiliyeti literatürle de uyumludur (305, 306).

Oral uygulanabilir bir nanopartikül sistem geliştirilebilmesi için partikülün intestinal lümende münle etkileşimin yeterli seviyede olması, mukoadezif özellik gösterebilmesi ve ardından mukusa penetrasyonunun da bir denge içinde gerçekleşebilmesi gerektiği bilinmektedir (133). Gerek münle etkileşim, gerekse mukusa penetrasyon kabiliyeti açısından tüm formülasyonlar birlikte değerlendirildiğinde, karakterizasyon parametreleri de göz önüne alınarak (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin elde edilen diğer formülasyonlara kıyasla en uygun ve umut vaaden sonuçları sunabildiği gözlenmiştir.

5.5. *In vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında amfifilik CD türevlerinden elde edilen nanopartiküllerin *in vivo* deneyler öncesi güvenlik, antikanser etkinlik ve permeabiliteleri üç farklı *in vitro* hücre kültürü çalışması ile değerlendirilmiştir.

Karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları sonrasında optimum formülasyon ile kolon tümörü indüklenmiş farelerde *in vivo* hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir.

İlaç yüklü olmayan boş amfifilik CD nanopartiküllerinin güvenlik çalışmaları Bölüm 3.8.1.'de açıklanan şekilde gerçekleştirilmiş olup sonuçları ise Bölüm 4.6.1.'de sunulmuştur.

5.5.1. Güvenlilik Çalışmaları

Bu kapsamda, insanlara uygulanması planlanan polimerik sistemlerin güvenliliği USP 28'de standart olarak tavsiye edilen L929 hücre hattında *in vitro* olarak araştırılmıştır (249). Şekil 4.28.'de sunulan bulgulara göre PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinin çalışmanın gerçekleştirildiği bütün seyreltme oranlarında gerek kontrol grubuna gerekse diğer formülasyonlara kıyasla önemli oranda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Tez çalışmamız kapsamında, elde edilen nanopartiküllere katyonik özellik kazandırmak amacıyla yüzey kaplama polimeri olarak kullanılan PEI'in özellikle gen terapisi, nanotaşıyıcı sistemler gibi alanlarda kullanılmasının yanında önemli toksik etkilerinin bulunabildiği, bu etkilerin azaltılmasına yönelik çalışmaların ve yeni türevlerinin geliştirilme çalışmalarının varlığından literatürde bahsedilmektedir (307, 308).

Kafil ve ark. (309) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, lineer ve dallanmış olmak üzere farklı PEI türevleri ile hazırlanan nanopartiküllerin A431 hücreleri üzerine sitotoksiteleri araştırılmış ve PEI polimeri yapısının lineer veya dallanmış olmasının hazırlanan nanopartiküllerin sitotoksitelerinde etkisi incelenmiştir. Çalışma sonunda, dallanmış PEI türevlerinde daha yüksek sitotoksite gözlemlendiği ve söz konusu sitotoksitenin hücreler üzerinde DNA hasarı ve apoptozis mekanizmasını indüklemesi sebebiyle olduğu bildirilmiştir.

Benzer şekilde, Xia ve ark. (310) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, farklı PEI türevleri ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilen mezoporlu silika nanopartiküllerinin PEI kaynaklı sitotoksiteleri değerlendirilmiş ve PEI'in molekül ağırlığı arttıkça sitotoksitesinin de arttığı bildirilmiştir.

İlgili çalışmalar ışığında değerlendirildiğinde, PEI kaplı olmayan (6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinde benzer bir toksisitenin görülmemesi, söz konusu toksik etkinin PEI kaynaklı olduğunun değerlendirilmesine neden olmuştur. Bu sebeple, çalışma kapsamında kaplama materyali olarak kullandığımız PEI'in, elde edilen nanopartiküllerde kanser hücreleri üzerinde yüksek oranlarda öldürücü etkili olabilmesinin sebebinin gözlenen önemli sitotoksosite olduğu düşünülmüştür (291, 307-309).

(6-O-CAPRO- β -CD), CS-(6-O-CAPRO- β -CD) ve (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin ise L929 hücreleri üzerinde toksisite olarak değerlendirilecek bir hücre ölümüne sebep olmadığı, 1:32 seyreltmeden itibaren hücre canlılığının %80 üzerinde bulunduğu ve daha düşük konsantrasyonlara doğru hücre canlılığının daha da arttığı gözlenmiştir. CS-(6-O-CAPRO- β -CD) formülasyonunda hücre canlılığının kontrol grubuna göre daha yüksek çıkmış olması ise kitosanın hücrelerin yaşamsal ve beslenme faaliyetlerinde ihtiyaçlarını karşılayabiliyor oluşuyla ilişkilendirilmiştir (311).

L929 hücre hattı üzerinde 24 saat süreyle, farklı seyreltme oranlarıyla uygulanan ilaç yüklü olmayan boş nanopartikül formülasyonlarının güvenliliğinin değerlendirilmesi sonucunda, PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikülleri dışındaki üç formülasyonun güvenli olduğu görülmüştür. Ayrıca, *in vitro* koşullardaki sitotoksitesi seyreltme ile azalan nanopartiküllerin, *in vivo* koşullarda vücut sıvılarında daha fazla seyrelmeye uğrayacak olmaları nedeniyle de güvenli olduğu yorumlanmıştır (312).

Güvenlilik çalışmaları sonunda; antikanser ilaç yüklü (6-O-CAPRO- β -CD), CS-(6-O-CAPRO- β -CD) ve (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin, kanser tedavisinde kullanılması durumunda, ilaç taşıyıcı sistemin kendisinden kaynaklı olacak şekilde sağlıklı hücreler üzerinde toksisite göstermediği, dolayısıyla söz konusu üç ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistemin güvenli olarak değerlendirilebileceği düşünülmüştür.

5.5.2. Antikanser Etkinlik Çalışmaları

Hazırlanan CPT yüklü ve boş nanopartiküllerin antikanser etkinliklerinin incelenmesi amacıyla HT-29 insan kolon kanseri hücre hattında eşdeğer konsantrasyondaki CPT çözeltisiyle karşılaştırmalı olarak hücre kültürü çalışmaları

gerçekleştirilmiştir. Çalışma Bölüm 3.8.2.'de açıklanan şekilde; dört farklı nanopartikülün ilaç yüklü ve yüklü olmayan formülasyonlarının, 2 farklı inkübasyon süresi için (48 saat, 72 saat) eşdeğer konsantrasyondaki CPT'nin çözeltisi ile karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiş olup, bulgular Bölüm 4.6.2.'de sunulmuştur.

L929 hücre hattı üzerinde gerçekleştirilen güvenlik çalışmalarından elde edilen sonuçlarla bir arada değerlendirildiğinde, bütün konsantrasyonlarda ilaç yüklü olan ve olmayan PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinin kanser hücreleri üzerinde de belirgin toksisite gösterdiği ve söz konusu durumun kaplama materyali PEI kaynaklı olduğu bilinmektedir. Bu durumda, PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinin kanser hücreleri üzerinde de gözlenen sitotoksitesi olumlu olarak değerlendirilememiştir. Zira söz konusu nanopartikül formülasyonu aynı etkiyi boş nanopartiküllerle hem sağlıklı L929 hem de kanserli HT-29 hücreleri üzerinde göstermiştir ve seçici olmayan genel bir toksisiteyi işaret etmektedir. Diğer yandan PEI içermeyen nanopartikül formülasyonlarının kolon kanser hücreleri üzerine etkisi incelendiğinde ümit verici bulgular ortaya çıkmıştır.

(Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin, (6-O-CAPRO- β -CD) ve CS-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerine kıyasla benzer ve/veya daha yüksek antikanser etkinlik gösterdiği, hücre canlılıkları incelendiğinde görülmektedir. Bu durumun, güçlü katyonik özelliğinden dolayı hücre membranı ile etkileşiminin ve buna bağlı olarak hücre içine alımının artmasıyla gerçekleşebileceği düşünülmektedir (108).

Varan ve ark. (156) tarafından gerçekleştirilen ve farklı yüzey yüklerine sahip nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmada, negatif yüklü hücre membranı ile katyonik nanopartiküllerin etkileşiminin daha yüksek olduğu bildirilmiş ve bu durumun hücre membranındaki kolesterol ve fosfolipit gibi negatif yüklü moleküllerle etkileşimden ileri geldiği gösterilmiştir. Benzer şekilde, Verma ve ark. (313) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada, nanomateryallerin hücresel etkileşim ve hücre içine alım mekanizmalarında nanomateryalin yüzey özelliklerinin ve zeta potansiyelinin yorumlarımızla uyumlu olarak önemi vurgulanmıştır.

Nanopartikül formülasyonlarının antikanser aktivitelerinin değerlendirilmesinde inkübasyon süresi olarak seçilen 48 ve 72 saat, hücrelerin proliferasyon yetenek ve sürelerinin bir ifadesi olan "doubling time" süresi ve nanopartiküllerin in vitro salım profilleri göz önüne alınarak belirlenmiştir. Literatürde HT-29 hücreleri için "doubling time" 2-4 gün olarak belirtilmektedir (314). Bu süre hücre sayısının iki katına çıkabileceği proliferasyon süresini ifade etmektedir ve formülasyonların antikanser aktivitelerinin değerlendirilebilmesinde sonuçların gerçekliği bakımından önemlidir.

In vitro salım profilleri açısından değerlendirildiğinde ise amfifilik CD nanopartikül formülasyonları ile 24 saat süresince devam eden bir salım profilinin elde edilebilmiş olması, antikanser etkinlik değerlendirilmesinde 48 saat ve 72 saatlik inkübasyon süresi ile CPT'in nanopartiküllerden salımının tamamlanması ve hücrede birikerek aktivitesinin değerlendirilebilmesine literatür bilgileri ile uyumlu olarak imkan vermiştir. CPT'in topoizomerez I inhibitörü olarak hücre siklusunda DNA sentezinin gerçekleştiği S-fazında inhibitör aktivitesi ile sitotoksik etki gösterdiği bilinmektedir (315).

Laloo ve ark. (316) CPT'in DNA sentezi inhibisyonu ile antikanser aktivite gösterebildiği S-fazının hücre siklusunda kısa süren bir faz olması sebebiyle tekrarlı uygulama veya uzatılmış salımlı formülasyonlar ile ilgili fazda hücre ölümünün artırılabilceğini belirterek, CPT ve analoglarına artan maruziyet süresiyle birlikte tedavi etkinliğinin arttığını da göstermişlerdir.

Benzer şekilde, Ünal ve ark. (147) CPT yüklü CD nanokapsül formülasyonlarının MCF-7 hücre hattında antikanser aktivitesini değerlendirdikleri çalışmada, MCF-7 hücrelerinin "doubling time" süresinin 38 saat olmasını göz önünde bulundurarak nanokapsül formülasyonlarının antikanser aktivitelerini değerlendirebilmek amacıyla çalışmalarını 48 saatlik inkübasyon süresi olacak şekilde tasarladıklarını bildirmişlerdir.

(6-O-CAPRO- β -CD), CS-(6-O-CAPRO- β -CD) ve (Poly- β -CD-C6) formülasyonlarının, bütün zaman noktalarında ve konsantrasyonlarda, eşdeğer miktardaki CPT çözeltisine göre anlamlı derecede ($p < 0,05$) daha fazla hücre ölümüne

sebeup olabilmış olması, nano formülasyondan beklenen artmış terapötik etkinin sağlanabildiğini göstermektedir.

İlacın organik çözücü içindeki çözeltisi ile kıyaslandığında, 48 saat verilerine göre; 0,01 µg/mL konsantrasyonda sadece (Poly-β-CD-C6) ve PEI-(6-O-CAPRO-β-CD) nanopartikülleri, 0,1 µg/mL ve 0,5 µg/mL konsantrasyonda ise bütün nanopartiküller anlamlı derecede ($p < 0,05$) daha yüksek antikanser etkinlik göstermiştir. İlaç çözeltisi ile kıyaslanadığında, 72 saat verilerine göre ise; bütün nanopartiküller dört konsantrasyonda da artan etki süresine paralel olarak anlamlı derecede ($p < 0,05$) daha yüksek antikanser aktivite göstermiştir. Ayrıca; hücre canlılığı yüzdesi göz önüne alındığında doza ve zamana bağlı en uygun profili (Poly-β-CD-C6) nanopartiküllerinin gösterdiği ve çalışılan bütün konsantrasyon ve zaman noktalarında ilaç çözeltisine göre anlamlı olarak daha yüksek antikanser aktivite gösterdiği görülmektedir (316).

Elde edilen bulgular, CPT'nin amfifilik CD nanopartiküllerine enkapsüle edilmesiyle, çözeltisi halinde kullanılması durumuna göre daha yüksek antikanser etkinlik sağlandığını göstermektedir. Antikanser etkinin artması, tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemin, yüzey yükü ve partikül büyüklüğü gibi karakterizasyon parametrelerine bağlı olarak hücresel etkileşimi ve hücre içine alınımının derecesine göre değişebilmektedir. Bu kapsamda elde edilen bulguların açıklandığı üzere literatürle de uyumlu gözlenmiştir (269).

5.5.3. İntestinal Permeabilite Çalışmaları

Hazırlanan ilaç yüklü amfifilik CD nanopartiküllerinin intestinal permeabilitelerinin araştırılması amacıyla *in vitro* hücre kültürü çalışmaları kapsamında Caco-2 hücre hattından geçiş çalışmaları Bölüm 3.8.3'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiş olup, çalışmaya ilişkin sonuçlar Bölüm 4.6.3.'de sunulmuştur. Denev sonuçlarına göre hesaplanan görünür permeabilite katsayıları (P_{app}) arasındaki sıralama; CS-(6-O-CAPRO-β-CD) > (Poly-β-CD-C6) > (6-O-CAPRO-β-CD) > PEI-(6-O-CAPRO-β-CD) > CPT olarak tespit edilmiştir.

Oral yolla uygulanması planlanan formülasyonların intestinal lümende intestinal hücre tabakasına permeabilite kabiliyetleri dokulara penetre olabilmesi ve

etki gösterebilmesi açısından, daha da ileri aşamada sistemik dolaşıma geçebilmesi bakımından önemlidir (233).

Deney kapsamında model hücre hattı olarak kullanılan Caco-2 hücre hattının transwell tabakası üzerinde oluşturduğu tek tabakalı hücre yapısının intestinal lümende epitelyal hücre tabakasını taklit ederek nanopartikül formülasyonlarının ve/veya ilacın saf halinin intestinal bariyerleri aşabilme kabiliyetlerinin değerlendirilebilmesi, oluşan hücre tabakasının sağlamlığına ve transepitelyal elektriksel dirençlerine (TEER) bağlıdır (233).

Bulgular incelendiğinde, nanopartikül formülasyonları ile CPT'nin görünür permeabilite katsayısının çözelti formuna kıyasla; CS-(6-O-CAPRO- β -CD) formülasyonunda 2,9 kat, (Poly- β -CD-C6) formülasyonunda 2,76 kat, (6-O-CAPRO- β -CD) formülasyonunda 2,16 kat, PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) formülasyonunda ise 1,64 kat artış sağlandığı tespit edilmiştir. En yüksek görünür permeabilite katsayısının CS-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartiküllerinde elde edilmesinin, nanopartikül yüzeyinin CS ile modifikasyonu sonucu kazandığı pozitif yük sayesinde hücrel etkileşiminin artması ve CS sayesinde hücreye adhezyonunun ve hücre yüzeyinde kalış süresinin artmış olmasıyla ilgili olduğu değerlendirilmiştir. CS ayrıca bilinen bir penetrasyon artırıcı ekspiyan olup, bu formülasyonda intestinal permeabilitenin artışına olum etki yaptığı düşünülmüştür.

Ünal ve ark. (147) tarafından gerçekleştirilen, CPT yüklü anyonik ve katyonik nanopartiküllerin Caco-2 hücre tabakasından permeabilitelerinin araştırıldığı bir çalışma da benzer sonuçlar elde edilmiş ve CS kaplanarak katyonik özellik kazandırılan nanopartiküllerin anyonik formuna kıyasla Caco-2 hücre tabakasından permeabilitesinde %50 artış sağlandığı bildirilmiştir. Bu bağlamda değerlendirildiğinde, ikinci en yüksek permeabilite artışını sağlayabilen formülasyon olan (Poly- β -CD-C6) ile CPT çözeltisine kıyasla 2,76 katlık bir artış gözlenmiş olup bu durumun temelinde de katyonik yüzey yükünün etkisi düşünülmüştür.

Ayrıca, (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin diğer formülasyonlara kıyasla belirgin derecede daha düşük olan ortalama partikül büyüklüğünün, Caco-2 hücre tabakasından permeabilitesini kolaylaştırmış olabileceği düşünülmüştür.

Derakhshandeh ve ark. (317) partikül büyüklüğünün Caco-2 hücre tabakasından geçiş üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla, farklı partikül büyüklüklerinde CPT yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlamış ve permeabiliteleri araştırılmıştır. Sonuçlar partikül büyüklüğünün 100 nm'den 950 nm'ye kadar kademeli olarak artırılmasıyla CPT yüklü PLGA nanopartiküllerinin Caco-2 hücre tabakasından permeabilitelerinin azaldığını göstermiştir.

Ayrıca, çalışma kapsamında model etkin madde olan CPT'nin aktif lakton ve inaktif karboksilat formları arasında, fizyolojik ortamda nötral ve bazik pH'larda hızla aktif lakton formdan inaktif karboksilat forma geçişinin söz konusu olduğu ve inaktif formun biyolojik membranlardan difüzyonunun aktif lakton forma kıyasla daha yavaş ve düşük olduğu bilinmektedir (318).

Permeabilite çalışmalarının gerçekleştirildiği pH 7,4 koşulu ise serbest haldeki CPT'nin aktif lakton formundan inaktif karboksilat forma geçişini indükleyen bir etkendir. Bu bağlamda, *in vitro* salım profili açısından kısmen daha yavaş salım göstermiş olan ve partikül büyüklüğünün daha küçük olması sebebiyle diğer formülasyonlara göre intestinal hücre bariyerinden daha hızlı ve kolay difüze olabilen (Poly- β -CD-C6) nanopartiküllerinin, CPT'nin intestinal hücre tabakasından stabil formunda ve etkin şekilde permeasyonuna daha yüksek oranda imkan verebilmiş olduğu düşünülmektedir.

Tüm bilgiler ışığında, enkapsüle bir sistemde uygulanan CPT'nin ortamın fizyolojik koşullarından korunarak hidrolizinin ve inaktif karboksilat formuna dönüşümünün yavaşlatılarak ve/veya engellenerek etkin maddenin stabil halde korunmasının mümkün olabileceği, sonrasında ise aktif lakton formu halinde korunabilen CPT'nin intestinal hücre tabakasından inaktif formu olan karboksilat formuna kıyasla daha yüksek oranda difüze olabileceği bu çalışmada görülmüştür.

Bütün formülasyonlarda, CPT'nin çözelti formuna göre daha yüksek permeabilite katsayısının elde edilebilmesinde de açıklanan sebebin etkili olabileceği değerlendirilmiş olup, formülasyonlar arasında partikül büyüklüğü, yüzey yükü, nanopartiküler sistemin enkapsülasyon etkinliği, salım profili ve enkapsüle halde taşıdığı CPT'yi fizyolojik koşullardan koruyabilme derecelerinin farklılığına göre

görünür permeabilite katsayılarında farklı oranlarda artış sağlanabilmektedir (109, 319, 320).

In vitro deneyler sonunda, bütün bulgular göz önüne alındığında;

- Partikül büyüklüğü 135 ± 19 nm, polidispersite indeksi 0,27, zeta potansiyeli $+40\pm 1$ mV olan,

- CPT enkapsülasyon etkinliği %35 olan ve taşıdığı CPT'i en az %50 oranda kolon bölgesine ulaştırabildiği *in vitro* salım deneyleri ile tespit edilen,

- Gastrointestinal simüle sıvılarda ve kısa süreli stabilite sonuçlarında partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli açısından stabil kaldığı yorumlanan,

- Mukusla etkileşimi ve mukozal penetrasyonu yüksek,

- CPT yüklü olmayan boş nanopartikülleri L929 hücreleri üzerinde sitotoksik olmayan,

- CPT yüklü nanopartikülleri HT-29 hücreleri üzerinde CPT çözelti formuna göre daha yüksek antikanser etki gösteren,

- Caco-2 hücrelerinden CPT'in çözelti formuna göre 2,7 kat daha yüksek permeabilite gösteren,

Poly- β -CD-C6 nanopartikül formülasyonu umut vaadeden formülasyon olarak yorumlanmış ve söz konusu formülasyon ile *in vivo* deneylere devam edilmiştir.

5.6. *In vivo* Etkinlik ve Görüntüleme Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında geliştirilmiş olan dört farklı nanopartikül formülasyonu arasından *in vitro* karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmalarına ait bütün bulgular bir arada değerlendirildiğinde en iyi sonuçların elde edildiği ve *in vivo* deneyler için optimum formülasyon olacağına karar verilen Poly- β -CD-C6 nanopartikül formülasyonu ile *in vivo* etkinlik ve güvenlik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Gamboa ve ark. (321) oral nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinlik ve güvenliğinin değerlendirilmesi amacıyla için her ne kadar detaylı *in vitro* modeller mevcut olsa da nihayetinde *in vivo* deneylerin gerçekleştirilmesinin gerekli olduğunu vurgulamışlardır.

Bu kapsamda yürütülen *in vivo* çalışmalar 4 temel başlık altında yürütülmüştür.

Bunlar;

1. Farelerde cerrahi olarak kolorektal tümör oluşturulması,
2. Erken evre tümör modelinde tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi,
3. Geç evre tümör modelinde tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi,
4. Görüntüleme çalışmalarıdır.

5.6.1. Farelerde Cerrahi Olarak Tümör Modeli Geliştirilmesi

In vivo çalışmaların ilk aşamasını, farelerde cerrahi olarak kolorektal tümörlerin indüklenmesi süreci oluşturmaktadır. Bu amaçla, literatürde mevcut çalışma ve yöntemlerden yararlanılarak modifiye bir yöntem geliştirilmiştir. Literatürde, farelerde kolorektal karsinogenez geliştirmek amacıyla kimyasal indüksiyon ve ortotopik olarak hücre inokülasyonu olmak üzere farklı esaslara dayanan tümör modelleri mevcuttur (235-237, 322, 323).

Kimyasal indüksiyonla gerçekleştirilen modellerde, tümör gelişimi için gerekli sürenin uzun olması ve primer tümör gelişme bölgesinin değişkenlik göstermesi söz konusudur (324, 325). Ortotopik yöntemler ise hem zaman kontrolü hem de primer odağın ve tümör gelişim bölgesinin daha net belirlenebilir olması sebebiyle çalışmamızın amaçlarına daha uygun olarak yorumlanmıştır (237, 326, 327).

Tez kapsamında, cerrahi olarak çekum submukozasına inoküle edilen CT-26 fare kolon karsinoma hücreleri ile 8. günden itibaren palpe edilebilir bir primer tümör odağı ve sakrifiye edilen farelerin abdominal bölgesinin cerrahi olarak açılarak incelenmesi sonucunda inokülasyon bölgesi olan çekumdan başlayan ve başta kolon olmak üzere bağırsak bölgesine spesifik ve lokalize tümörler olduğu teyit edilebilmiştir. Primer tümör odağının çekum bölgesinde oluşu, yöntemde uygulanan inokülasyon bölgesinin çekum olmasından kaynaklanmış olup beklenen ve istenen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (235). CT-26 hücrelerinin inokülasyonu sonrası zamanın fonksiyonu olarak öncelikle primer tümör odağının ardından ise sekonder tümörlerin olduğu gözlenmiş olup bulguların literatürdeki önceki çalışmalarla uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Tümör indüklenen farelerde 7. günden itibaren abdominal şişlik oluştuğu ve tedavi edilmeyen grupta söz konusu şişliğin giderek artarak farelerin genel durumlarının kötüleştiği tespit edilmiştir. Bu durumun, CT-26 fare kolon karsinoma hücreleri inokülasyonu yapılan bölgede, hücrelerin çekum submukozasına penetre olarak çoğalması sonucu tümör oluşumuna bağlı asit sıvısı birikmesi sebebiyle olduğu ve literatürde tümör oluşum sürecinde gözlenen ascites tablosuyla uyumlu olduğu değerlendirilmiştir (328, 329).

Terracine ve ark. (235) benzer şekilde, farelerde metastatik kolon kanseri modeli geliştirmek amacıyla gerçekleştirdikleri çalışmada, CT-26 hücrelerinin cerrahi olarak çekum submukozasına inokülasyonu ile farelerde kolon kanser modeli oluşturabildiklerini ve modelin metastatik karakteri bakımından da kolon kanseri tablosuna benzer şekilde lenf nodları ve karaciğere metastaz eğilimde olduğunu bildirmişlerdir. Yöntemde, post-operatif olarak 20.gün sonunda farelerin %89'ının hayatta olduğunu göstererek, yöntemin deneysel araştırmalar amacıyla uygulanabilir bir olduğunu bildirmişlerdir.

Xu ve ark. (330) ise kolon kanseri tedavisine yönelik olarak hazırladıkları oral uygulanabilir nanopartiküler sistemin etkinliğini değerlendirmek üzere Terracine ve ark. (235) tarafından belirtilen yöntemle farelerde gerçekleştirdikleri kolon kanseri modeli üzerinde çalışmışlardır. Yöntemin, çalışmanın amacına uygun ve tekrarlanabilir olduğunu belirterek, hazırlanan oral nanopartiküler sistemin kolon tümörü modelinde etkinliğinin değerlendirilebildiği gösterilmiştir.

In vivo deneylerin iki farklı evresini oluşturan erken evre tümör modeli ve geç evre tümör modelinde farelerde oral nanopartiküler tedavinin etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmış olup, cerrahi olarak tümör oluşturulması sonrası 10. Gün erken evre tümör modelini temsil ederken, 17. gün geç evre tümör modelini temsil etmiştir.

Erken evre tümör modeli uygulanan farelerde, 10. günde primer tümör odağının çekum submukozasında olduğu, kolon ve bağırsağın diğer bölgelerinde ise sekonder oluşumlar şeklinde poliplerin varlığı gözlenmiştir. Geç evre tümör modelini temsil eden, 17. günde ise erken evre modele göre çok daha büyük bir primer tümör

odağı gözlenmiş olup, kolon ve bağırsak bölgesinin önemli ölçüde tümör kitleleri tarafından sarılmış olduğu gözlenmiştir. Bahsedilen bulgulardan hareketle, farelerde kolorektal tümör oluşturulması amacıyla geliştirilen ve uygulanan yöntemin başarılı bir model olduğu değerlendirilmiş olup, yöntem sonunda kolorektal tümör indüklenen farelerde tümör kitle büyüklüğü ve bölgesel dağılımının zamanın fonksiyonu olarak arttığı görülmüştür.

Gerek erken evre gerekse geç evre tümör modelinde teyit amacıyla sakrifiye edilerek kolon ve bağırsak yapıları ve çevre dokuları incelenen farelerde tümörlerin kolon ve bağırsak bölgesine spesifik ve lokalize olarak oluştuğu, çevre doku ve organlarda modele bağlı olarak farklı bir primer tümör oluşumu gözlenmediği tespit edilmiştir. Geç evre kolorektal kanser modelinde, tümörlerin karaciğerde metastaz yapabildiği, bu durumun uygulanan yöntemin olağan kanser tablosu sürecinde de gözlenebilecek fizyolojik ilerlemeyi temsil etmesi açısından uyumlu olarak düşünülmüştür (235).

5.6.2. Kolorektal Tümörlü Farelere Uygulanan Tedavinin Etkinliği

Kolorektal kanser modeli geliştirilen farelerde tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi sonucunda elde edilen ve Bölüm 4.7.2.'de sunulan bulgular yorumlandığında erken evre tümör modelinde ve geç evre tümör modelinde tedavi etkinliğinin farklı sonuçlar sunduğu gözlenmiştir.

İlk olarak geç evre kanser modelinde tedavi etkinliği değerlendirilmiş olup deney sonunda farelerden çıkarılan tümör kitlelerinin ağırlıkları ölçülmüştür. CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül formülasyonu gruplarının, herhangi bir tedavi uygulanmayan kontrol grubu ve boş nanopartikül grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derece daha düşük tümör ağırlığına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu durum literatür verileri ile uyumlu olarak yorumlanmıştır zira özellikle kolorektal kanserlerde CPT'in güçlü antikanser aktivitesi literatürde açıkça belirtilmektedir (318, 331-333). Tedavi uygulanmayan kontrol grubu ile boş nanopartikül grubu arasında herhangi bir farkın gözlenmemiş olması da tez çalışması kapsamındaki hücre kültürü çalışma bulgularını destekler niteliktedir ve ilaç taşıyıcı sistemin tek başına

farmakolojik olarak bir aktivitesinin olmadığı teyit edilebilmiştir. CPT süspansiyonu grubu ile CPT yüklü nanopartikül grubu arasında tümör ağırlığı açısından fark gözlemlenmiş olup CPT nanopartikül formülasyonu ile tümör kitlesi ağırlığının daha az olduğu tespit edilmiştir ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

Bu durum, geç evre kanser modelinde farelerin genel durumlarının kanser tablosunun ilerlemesine bağlı olarak kötüleşmesi sonucu tedavi süresinin kısıtlı olması ve ilerleyen kanser tablosundan ötürü ani fare ölümleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül formülasyonu ile tedavi etkinliklerinin ayırt edilmesi için yeterli sürenin olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Bu amaçla, geç evre kanser modelinde elde edilen bulgulardan hareketle CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül grupları için erken evre kanser modelinde de tedavi etkinliği değerlendirilmiştir. Deney sonunda farelerden çıkarılan tümör kitleleri yönünden CPT süspansiyonu grubu ile CPT yüklü nanopartikül grubu arasında anlamlı bir fark ($p < 0,05$) gözlenmiş olup, CPT yüklü nanopartikül grubu ile tedavi edilen gruptaki tümör kitlelerinin ağırlığının daha küçük olduğu tespit edilmiştir.

Bu durum, erken evre kanser modelinde farelerin oral yoldan uygulanan tedaviye cevap verebilmesine imkan verecek süre tedavi uygulanabilmesi, ilerlemiş kanser tablosundaki gibi ani fare ölümlerinin gözlenmemesi ve daha uzun süre dozlama yapılabilmesinin, gruplar arasında formülasyona bağlı olası farkın daha net gözlenebilmesine imkan vermesi olarak yorumlanmıştır (236, 322).

Benzer şekilde, Zhang ve ark. (27) kimyasal indüksiyon yöntemiyle kolit ilişkili kolorektal tümör modeli geliştirilmiş farelerde, reaktif oksijen türevi (ROS) duyarlı olarak kolona hedeflenebilmesi amaçlanan CPT yüklü nanopartiküllerin ve CPT süspansiyonunun oral tedavideki etkinliklerini araştırmışlardır. Çalışma sonunda 63.günde, CPT nanopartikül formülasyonu uygulanan grupta, tedavi uygulanmayan gruba göre kolon tümörü sayısı bakımından %50 oranında azalma olduğu bildirilmiştir. Çalışmada belirtilen sonuçlar, kolona hedefli nanopartiküler sistemler ile lokal olarak antitümöral tedavi etkinliğinin artırılabilirliğini göstermiş ve çalışmamızdaki sonuçlar ile uyumlu olarak yorumlanmıştır.

Her iki evre kanser modeli içinde deney süreci sonunda farelerden çıkarılan tümör kitlelerinin makroskopik olarak görüntülerinin sunulduğu Şekil 4.40. ve Şekil 4.41. incelendiğinde, özellikle geç evre kanser modelinde kontrol ve boş nanopartikül gruplarında tümör kitlelerinin farelerin bütün kolonlarını içine alacak şekilde büyüdüğü ve çok fazla ilerdiği, ayrıca tedavi uygulanan gruplarla arasında önemli fark olduğu gözlenmiştir. Erken evre kanser modelinde tedavi edilen farelerde CPT yüklü nanopartikül formülasyonu tümör kitlesinin çok daha küçük olduğu ve geç evre modelindeki gibi agresif şekilde büyümediği belirlenmiştir.

Manikandan ve ark. (334) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, oral uygulanan CPT yüklü PMMA nanopartikül formülasyonu ve CPT süspansiyonunun tedavi etkinliği, farelerde kimyasal indüksiyonla oluşturulan kolon tümörü modelinde karşılaştırılmıştır. Çalışma sonunda üçüncü ay itibariyle, nanopartikül formülasyonu uygulanan grupta %33 olan tümör insidansının CPT süspansiyonu uygulanan grupta %80 olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir.

In vivo hayvan deneyleri boyunca gruplar arasında takip edilen yüzde sağ kalım bulgularının da gerek geç evre gerekse erken evre kanser modelinde tümör ağırlıkları bulgularıyla uyumlu olduğu düşünülmüştür. Geç evre kanser modelinde tedavi uygulanmayan kontrol grubu ile boş nanopartikül grubundaki farelerin sağ kalım yüzdesinin hızla azaldığı gözlenmiştir. CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül formülasyonu ile tedavi edilen gruplar kontrol ve boş nanopartikül gruplarına göre daha uzun süre hayatta kalmıştır ($p < 0,05$). Ancak geç evre kanser modelinde yukarıda da açıklanan gerekçelerden ötürü CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül grubu arasında anlamlı farklılık tespit edilememiş ve deney süreci ani fare ölümlerinden dolayı beklenmedik şekilde sonlanmıştır. Söz konusu durumun ilerleyen kanser tablosundan dolayı farelerin genel durumlarının kötüleşmesine bağlı olarak gözlenen ani ölümler ve bunun sonucunda CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül gruplarının tedavi etkinliğinin değerlendirilmesine imkan verecek süre tedavi uygulanamamasıyla sonuçlanmış olması şeklinde yorumlanmıştır.

Erken evre kanser modelinde ise CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül grubunda yüzde sağ kalımlar arasında anlamlı farklılık gözlenmiş olup, CPT yüklü

nanopartikül ile tedavi edilen grupta farelerin hem CPT süspansiyonu grubuna hem de geç evre kanser modelindeki bütün gruplara göre daha uzun süre hayatta kaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun, erken evre kanser modelinde kolorektal tümörlü farelere tedavi için süre olmasına bağlı olarak gereken dozlama sayısına ulaşılabilmiş olması ve böylece gruplar arasında tedavi etkinliğinin ayırdedilebilmesine imkan vermesi ile ilişkilendirilmiştir (214).

Literatürde de belirtildiği üzere CPT gibi antikanser ilaçlarla tedavide, tedavi etkinliğinin önündeki en önemli engellerden birisi ilaca bağlı yan etkiler ve toksisitedir (78). CPT süspansiyonu ile tedavi uygulanan grupta sağ kalım yüzdesi bulgularındaki hızlı düşüşün hem gerekli tedavinin sağlanamamasına hem de ilaca bağlı yan etki ve toksisiteye bağlı olabileceği düşünülmüştür. CPT yüklü nanopartikül formülasyonunda ise enkapsüle haldeki ilaç kolona kadar kadar aktif formunda ulaşmış ve antitümöral etkisini göstermiştir. Buna ek olarak gözlenmesi muhtemel spesifik olmayan biyodağılıma bağlı toksisitenin önüne geçilmiştir (45, 195, 197, 334).

Hua ve ark. (335) kolona hedeflenen bir nanopartiküler sistem ile ilacın spesifik olmayan biyodağılımının ve buna bağlı olarak çevresel doku ve organlarda yan etki ve toksisitesinin azaltılabileceği belirtmişlerdir. Bu kapsamda elde edilen bulgularımızın literatürde belirtilen çalışmalarla uyumlu olduğu değerlendirilmiştir.

Geç evre ve erken evre kanser modellerinde farelerin deney süresince ağırlık değişimleri takip edilmiş ve CPT yüklü nanopartikül grubuyla tedavi edilen farelerde geç evre ve erken evre kanser modellerinin her ikisinde de farelerin ağırlıklarında önemli bir düşüş gözlenmediği ve ağırlık değişimlerinin pozitif yönde olduğu tespit edilmiştir. Tedavi uygulanmayan kontrol grubu, boş nanopartikül grubu ve CPT süspansiyonu grubunda vücut ağırlıklarının deney süresince azalma eğiliminde olduğu bu durumun nedeni farelerin genel sağlık durumlarının ilerleyen kanser tablosuna bağlı olarak kötüleşmesi ve zayıflama eğilimine girmesi olarak düşünülmüştür (27).

Erken evre kanser modelinde tedavi uygulanan farelerde CPT süspansiyonu grubundaki farelerin deneyin ilerlemesiyle ağırlık kaybı, CPT yüklü nanopartikül grubundaki farelerin ise deney ilerlemesiyle ağırlık artışının olması, nanopartikül grubunda tedavi uygulanan farelerin genel durumlarının düzelme eğiliminde oluşuyla

ilişkilendirilmiştir. CPT süspansiyonu grubundaki farelerin ise gerek kanser tablosunun ilerlemesine bağlı olarak gerekse serbest halde uygulanan CPT'nin yan etki ve toksisitesine bağlı olarak ağırlık kaybı yaşanmış olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (43, 334, 336).

Urbanska ve ark. (214) tarafından gerçekleştirilen ve kolorektal kanserlerin tedavisine yönelik olarak hazırlanan oral oksaliplatin nanopartiküllerinin tedavi etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, kolorektal tümörlü farelerin tedavi süresince ağırlıkları takip edilmiştir. Deney sürecinin erken evrelerinde her iki grupta da bir miktar ağırlık artışı görülmesinin oluşan tümörlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ancak tedavi etkinliğinde değerlendirmenin yapılabilmesi amacıyla deneyin ilerlemesi ve vücut ağırlığının daha uzun süre takip edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Buna göre kolorektal tümörlü olup oksaliplatin nanopartikül tedavisi uygulanmayan grupta farelerin vücut ağırlıklarının zamanla düşüş eğiliminin arttığı, oksaliplatin nanopartikülleri ile tedavi uygulanan grupta ise artış eğilimi olduğu gösterilmiştir. Bu durumun tedavi uygulanmayan grup için farelerin genel sağlık durumlarının kötüleşmesi ve beslenme alışkanlıklarının bozulması sebebiyle kilo kaybını ifade ettiği, tedavi uygulanan grupta ise zamanla farelerin genel durumlarının düzelmesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu kapsamda, çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların literatürde mevcut ve benzer diğer çalışmalarla da uyumlu olduğu görülmüştür (337, 338).

Erken evre ve geç evre tümör modellerinde tedavi etkinliğinin değerlendirildiği *in vivo* deney bulguları topluca yorumlandığında, oral uygulanabilir CPT yüklü nanopartikül formülasyonu ile kolorektal tümörlere yönelik olarak etkin ve güvenli bir tedavi sağlanabileceği ve tedavi etkinliğinin uygulanabilen tedavi süresi ile ilişkili olarak artabileceği düşünülmüştür.

5.6.3. Görüntüleme Çalışmaları

In vivo çalışmalar kapsamında gerçekleştirilen ve bulguları Bölüm 4.8.'de sunulmuş olan görüntüleme çalışmalarıyla, hazırlanan amfifilik CD nanopartikül formülasyonunun enkapsüle ilacı gastrointestinal kanal segmentlerinde ne oranda taşıyabildiği değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında hidrofobik yapıdaki CPT'yi temsil

etmesi amacıyla literatürde de *in vitro* ve *in vivo* görüntüleme çalışmalarında kullanılan hidrofobik yapıda floresan bir boya olan NR seçilmiştir (45, 339, 340).

Gamboa ve ark. (321) oral uygulanan ilaç taşıyıcı sistemlerin gastrointestinal dağılımının araştırılması ve görüntülenmesinde kullanılan *In vivo* görüntüleme sistemi (IVIS)'nin floresan boyanın ışımaya ölçümüne dayanması nedeniyle radyoaktif işaretleme gibi diğer görüntüleme yöntemlerine kıyasla radyasyon faktörünün ortadan kalkmasına imkan verdiğini belirtmişlerdir.

Çalışmaya başlarken öncelikle, oral gavaj yoluyla uygulanan NR çözeltisi ve NR yüklü nanopartiküllerin gastrointestinal kanalda floresan ışımaya görüntülenebildiği teyit edilmiştir. Bu amaçla tez çalışmamız kapsamında floresan boya olarak kullanılan NR'nin floresan ışımaya şiddetinin normal dokulardan fazla ve sinyal:gürültü oranının yüksek olmasıyla çalışmanın amacına uygun olduğu düşünülmüştür (321).

NR çözeltisinin oral gavaj ile uygulanmasından 24 saat sonra gerçekleştirilen görüntüleme çalışmalarında mide ve bağırsakta düşük floresans ışımaya, çekum sonrasında kolon bölgesinde ise anlamlı bir floresan ışımaya gözlemlenmediği tespit edilmiştir. Bu durum, NR çözelti halinde uygulanması durumunda kısmen midede, ilerleyen bölgeler için ise ince bağırsağa bir miktar ulaşabildiği, kolon bölgesine ise oldukça az ulaşabildiği şeklinde yorumlanmıştır (341, 342).

NR'nin kolona kadar yeterli miktarda ulaşamamış olması ise temsil ettiği CPT'in de çözelti halinde uygulanması durumunda kolona kadar etkili konsantrasyonda ulaşamayacağı ve bu bölgede antitümöral etki gösteremeyeceği şeklinde değerlendirilmiştir (13).

NR yüklü nanopartiküllerin oral gavajla uygulanması sonrası 24. saatte gerçekleştirilen görüntüleme çalışmaları bulguları yorumlandığında ise kolon bölgesinde yüksek bir floresan ışımaya gözlemlendiği ve bu durumun nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemde intakt kalarak kolona kadar ulaşan ve büyük oranda çekum ve kolon bölgesinde salınmış olan NR'den kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu durum, kolona hedefleme amacıyla tasarlanan amfifilik CD nanopartikül formülasyonunun taşıdığı etkin maddeyi büyük oranda çekum ve kolona kadar ulaştırabileceği yönünde yorumlanmıştır.

Diğer yandan NR yüklü nanopartikül formülasyonu ve NR çözeltisi uygulanması sonrası midede tespit edilen floresan ışımının şiddeti karşılaştırıldığında, nanopartikül formülasyonu için anlamlı derecede yüksek floresans şiddeti elde edilmiştir. Bu durumun mukozayla etkileşimi yüksek olan nanopartiküllerin mide mukozasına daha fazla adhezyon göstermesine bağlı olduğu düşünülmüştür.

Ma ve ark. (343) kolon kanserinin oral tedavisi için geliştirdikleri kolona spesifik Eudragit® nanopartikül formülasyonu ve nanopartikül yüklü mikropartikül formülasyonunun farelere oral uygulanmasından 24 saat sonra gastrointestinal kanal segmentlerinde dağılımlarını floresans görüntüleme çalışmaları ile incelemiştir. Bu çalışmada, formülasyonların amaçlandığı gibi kolona ulaşabildiği ancak midede de yüksek bir floresan ışımaya görüntülediğini bildirilmiştir. Böyle bir durumun, *in vitro* deneylerle öngörülmesinin mümkün olmadığı ve yalnızca *in vivo* görüntüleme çalışmalarının bu durumun tespit edilmesine imkan sağladığı belirtilmiştir. Bu durumunun nedeninin ise, kolona spesifik tasarlanan ve bağırsak mukozasında mukoadhezif özellik göstererek kalış süresinin uzatılması amaçlanan oral nanopartiküllerin, mide mukozasına da adezyonuna bağlı olarak bir miktarının bu bölgede kalması olduğu düşünülmüştür. Bu sebeple çalışma sonunda, kolorektal kanserlerin tedavisine yönelik tasarlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin *in vivo* gastrointestinal kanal dağılımlarının değerlendirilerek formülasyonların elde edilen bulgular ışığında hazırlanması gerekliliği vurgulanmıştır.

Şekil 4.47.'de sunulan bulgular yorumlandığında, primer tümör odağının yer aldığı çekum bölgesine NR yüklü nanopartikül formülasyonunun ulaşabildiği görülmektedir. Bu durum, tümör gelişen dokuda meydana gelen yapısal bozulma ve EPR (artmış geçirgenlik ve alıkonma) etkisi ile nanopartiküllerin partikül büyüklüklerinden dolayı tümör kitlesine yüksek penetrasyon gösterebilmiş olmasıyla ilişkilendirilmiştir (116). *In vivo* görüntüleme çalışmaları, geliştirilen CPT yüklü nanopartikül formülasyonunun kolon bölgesindeki tümörlere hedeflendirilebildiği şeklinde yorumlanmıştır.

Görüntüleme çalışmaları kapsamında elde edilen bütün bulgular bir arada değerlendirildiğinde, amfifilik CD nanopartikül formülasyonu ile kolorektal kanserlerin

lokal tedavisi amacıyla oral uygulama ile çekum ve kolon bölgesine ilaç hedeflendirilebileceği ve tez kapsamında hazırlanan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin gastrointestinal dağılım açısından kolorektal kanserlerin tedavisine yönelik uygun bir sistem olduğu yorumlanmıştır.

5.7. Histolojik Değerlendirme

Erken evre ve geç evre tümör modelinde tedavi uygulanan gruplarda deney sonunda kurban edilen farelerden çıkarılan karaciğer ve kolonlara ait histolojik değerlendirme ile karaciğer lobül yapısındaki değişiklikler, karaciğerde metastatik odaklara ait odak alanları ve kolon dokuları incelenmiş olup gerçekleştirilen *in vivo* deney bulguları ile ilişkilendirilmek suretiyle yorumlanmıştır.

Wanebo ve ark. (344) tarafından gerçekleştirilen çalışmada kolorektal kanser ilişkili metastazların kompleks bir moleküler süreç olduğu vurgulanmıştır. Buna göre, kolorektal kanser ilişkili metastaz sürecinin, ekstrasellüler matriks degradasyonu, hücre adhezyonunda değişim, tümör hücrelerinin çoğalması ve öncelikle primer bölgede yayılması, immün kaçış, vasküler embolizasyon ve sirkülasyon ardından son olarak ise hedef metastatik organ olan karaciğere tutunması şeklinde geliştiği bildirilmiştir.

Hong ve ark. (345) ise tümör metastazının kolorektal kanser ilişkili ölümlerin önemli bir nedeni olduğu ve karaciğerin ise kolorektal kanserlerde en yaygın metastaz bölgesi olduğu belirtilmiştir. Mevcut tedavilerin kolorektal kanser ilişkili karaciğer metastazlarına yönelik halen etkin bir tedavi imkanı sunamıyor oluşunun nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin artmış etkinlikleri ve hedefleme yaklaşımları ile aşılabileceği yönünde çalışmalar olduğu vurgulanmıştır.

Kotelevets ve ark. (346) oral yoldan kolorektal kanser tedavisi amacıyla geliştirdikleri sisplatin yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemin kimyasal indüksiyonla kolorektal tümör modeli geliştirilen farelerde antikanser etkinliğini ve karaciğer metastazları üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonunda, oral yolla uygulanan sisplatin yüklü nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem ile sisplatin çözeltisi uygulanmasına göre fare başına düşen kolorektal tümör sayısında ve tümör alanında

düşüş olduğu, karaciğer ve lenf metastazlarında ise anlamlı olarak azalma sağlandığı belirtilmiştir.

In vivo deney bulguları erken evre tümör modelinde, CPT yüklü nanopartikül grubu ile CPT süspansiyonu grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük tümör ağırlığı ve daha uzun hayatta kalma süresi sağlandığı gösterilmiştir. Gruplara ait kolon ve karaciğer dokularında gerçekleştirilen histolojik değerlendirme sonuçlarıyla, her iki grupta da karaciğerde değişik büyüklük ve sayıda metastatik odakların varlığı gözlenmiş olup buna bağlı olarak karaciğerin klasik lobül yapısında bozulma olduğu tespit edilmiştir. Ancak, karaciğerde gözlenen metastatik odakların değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen odak alanı ölçümleri sonunda elde edilen bulgular, CPT yüklü nanopartikül grubuyla tedavi uygulanan grupta metastatik odak alanının istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha küçük olduğunu göstermiştir. Bu durum erken evre tümör modelinde CPT yüklü nanopartikül grubuyla tedavi uygulanması durumunda daha etkin bir tedavi profili elde edilebilmesine bağlı olarak karaciğerde görülen metastatik odakların küçülmesi ve zamanla azalmasıyla sonuçlandığı şeklinde yorumlanmıştır.

Erken evre tümör modelinde her iki grupta da tümör mikroçevresine ait hücresel atipi gözlenmiş olup, CPT yüklü nanopartikül grubunda metastatik odak alanının azalmasıyla birlikte karaciğer hücrelerinde kısmi hemoraji gözlenmiştir. Bu durum güçlü katyonik özellikteki nanopartikül formülasyonunun oral uygulama sonrası ince bağırsaktan absorbe olan kısmının karaciğere ulaşmış olmasıyla ilişkilendirilmiştir (347).

Geç evre tümör modelinde değerlendirilen kontrol, boş nanopartikül, CPT yüklü nanopartikül ve CPT süspansiyonu gruplarına ilişkin olarak ise; karaciğerde toplam metastatik odak alanı açısından CPT süspansiyonu ve CPT yüklü nanopartikül gruplarının birbirleri ile ve kontrol grubuyla benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu durum *in vivo* deney sürecinde de gözlenen ve geç evre tümör modelinde kolorektal tümörlerin ve buna bağlı olarak kanser tablosunun çok ilerlemiş olması sebebiyle, tedavinin karaciğer metastazları üzerinde etkili olabilmesine imkan verecek süre

uygulanamamış olmasıyla ilişkilendirilmiştir (348). Elde edilen histolojik bulguların *in vivo* deney sonunda elde edilen bulgularla uyumlu olduğu da görülmüştür.

Geç evre tümör modelinde kolon değerlendirmesinde özellikle tedavi uygulanmayan kontrol grubunda obstrüksüyona giden ve bağırsağın tüm tabakalarını tutan belirgin tümörlerin varlığı ile tümör modelinin etkinliğini teyit etmiştir.

Bütün sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, erken evre tümör modelinde tedavi uygulanan farelerden elde edilen histolojik bulgular hem literatürle hem de aynı gruba ait *in vivo* bulgularla uyumlu olarak düşünülmüş olup, erken evre tümör modelinde CPT yüklü nanopartikül formülasyonunun oral uygulanması ile CPT süspansiyonu uygulanmasına göre herhangi bir parenteral ilaç uygulamasına gerek kalmadan hayatta kalma, tümör büyüklüğünde azalma ve metastaz sayısı ve alanında azalma kriterleri açısından daha etkili ve güvenli bir tedavi elde edilebildiği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular değerlendirildiğinde;

- Kolorektal kanserlerin lokal tedavisi amacıyla oral uygulanabilen, taşıdığı etkin maddeyi kolona kadar intakt olarak koruyabilen ve büyük oranda çekum ve kolonda salması beklenen CPT yüklü amfifilik CD nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem ile yeni ve özgün bir tedavi yaklaşımı geliştirilmesi üzerinde çalışılmıştır.
- Bu amaçla; amfifilik CD türevleri (6-O-CAPRO- β -CD ve Poly- β -CD-C6) ile nanoçöktürme yöntemi kullanılarak nanopartiküllerin başarıyla edilebileceği,
- 6-O-CAPRO- β -CD ve Poly- β -CD-C6 türevleri ile nanoçöktürme yöntemiyle nanopartikül eldesinde organik fazın etanol olması durumunda elde edilen nanopartiküllerin daha büyük partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi gösterdiği, organik fazın aseton olması durumunda daha küçük partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi gösterdiği,
- Poly- β -CD-C6 nanopartiküllerinin net pozitif yüzey yüküne sahip katyonik nanopartiküller olduğu,
- Negatif yüzey yüküne sahip 6-O-CAPRO- β -CD nanopartiküllerine kitosan (CS) veya polietilenimin (PEI) ile pozitif yüzey yükü kazandırılabilceği,
- Optimum parametreler belirlenerek hazırlanan amfifilik CD nanopartiküllerinin, 117 nm ile 284 nm arasında ortalama çapa ve 0,3'den küçük polidispersite indeksine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu kapsamda optimum nanopartikül formülasyonu olarak belirlenen Poly- β -CD-C6 nanopartiküllerinin 135 \pm 19 nm partikül büyüklüğü, 0,27 polidispersite indeksi ve +40 \pm 1 mV zeta potansiyele sahip olduğu,
- Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan 6-O-CAPRO- β -CD ve Poly- β -CD-C6 nanopartiküllerine model etkin madde CPT'nin etkin şekilde enkapsüle edilebileceği gözlenmiştir. Bu kapsamda optimum nanopartikül formülasyonu olarak belirlenen Poly- β -CD-C6 nanopartiküllerine enkapsülasyon etkinliğinin %35 oranında olduğu,

- CPT yüklü Poly- β -CD-C6 nanopartikül formülasyonun simüle gastrointestinal sıvılarda gerçekleştirilen salım çalışmalarında taşıdığı etkin maddenin yaklaşık %52'sini kolona kadar ulaştırabileceği ve kolon bölgesinde salabileceği belirlenmiştir. Bu oranın; (6-O-CAPRO- β -CD), CS-(6-O-CAPRO- β -CD) ve PEI-(6-O-CAPRO- β -CD) nanopartikülleri için sırasıyla %35, %39, %23 olarak Poly- β -CD-C6 nanopartikül formülasyonuna kıyasla daha düşük olduğu,
- Gastrointestinal simüle sıvılarda stabilite, kısa süreli stabilite, mukus ile etkileşimleri, yapay mukus tabakasına penetrasyon çalışmaları ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları bulguları bir arada değerlendirildiğinde, *in vivo* etkinlik çalışmalarına devam edilmesine karar verilen en uygun sonuçları gösteren Poly- β -CD-C6 nanopartikül formülasyonunun olduğu,
- Nanopartikül formülasyonlarının simüle biyolojik sıvılarda stabilite, mukusla etkileşim, mukozal penetrasyon ve intestinal hücrelerden permeabilitelerinin partikül büyüklükleri ve zeta potansiyelleri ile doğrudan ilişkili olduğu, daha küçük partiküllerin ve daha yüksek katyonik zeta potansiyele sahip formülasyonların hem stabilite hem de mukozal penetrasyon ve intestinal permeabilite açısından daha uygun sonuçlar sunduğu,
- Farelerde kolorektal kanser modeli geliştirilmesi amacıyla cerrahi olarak çekum bölgesine fare kolon karsinoma hücre hattı CT-26 inokülasyonu ile kolorektal tümörlerin oluşabildiği ve zamanın fonksiyonu olarak erken evre tümör modeli ve geç evre tümör modeli elde edilebildiği,
- *In vivo* etkinlik çalışmaları bulgularına göre CPT yüklü oral uygulanabilir Poly- β -CD-C6 nanopartikül formülasyonu ile tedavi edilen kolorektal kanser modeli geliştirilmiş farelerde, özellikle erken evre kanser modelinde tedavi uygulanması durumunda hayatta kalma oranlarının artırılacağı, tümör büyüklüğü ve tümör ağırlığının azaltılabileceği,
- Histolojik değerlendirme ile kolorektal kanser ilişkili karaciğer metastazları üzerinde özellikle erken evre kanser modelinde CPT yüklü Poly- β -CD-C6

nanopartikül formülasyonu ile tedavi uygulanmasıyla metastatik odak alanının belirgin derecede azaldığı gözlenmiş olup elde edilen histolojik bulguların *in vivo* deney bulgularıyla uyumlu olduğu,

- CPT yüklü Poly- β -CD-C6 nanopartikül formülasyonunun kolorektal kanserlerin lokal tedavisinde oral yolla uygulanabilir nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistem olarak umut vaad edici bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir.

In vitro ve *in vivo* sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde, amfifilik CD nanopartikül formülasyonlarının oral uygulama ile taşıdıkları etkin maddeyi kolona ulaştırabilme imkanı sunmalarından dolayı kolona ilaç hedefleme amacıyla uygun olduğu değerlendirilmiş olup, bu amaca yönelik tasarlanmış yeni amfifilik CD türevlerinin sentezlenmesi durumunda söz konusu amfifilik CD'lerden hazırlanacak nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerle daha etkin ve güvenli tedavi imkanları sunulabileceği düşünülmektedir.

In vivo etkinlik çalışmaları değerlendirildiğinde, geç evre kanser modelinde farelerin ilerlemiş kanser tablosuna bağlı olarak genel durumlarının kötüleşmesinin tedavi etkinliğini kısıtlayan en önemli faktör olduğu, erken evrede başlanabilen tedavi ile çok daha umut vaad eden sonuçlar elde edilebiliyorken ilerlemiş kanser tablolarında bu durumun mümkün olmadığı gözlenmiştir.

Kolonik mikroflora tarafından parçalanarak taşıdığı etkin maddeyi kolonda salması amacıyla pasif hedeflendirme stratejisiyle gerçekleştirilen tez çalışmamızın bulguları değerlendirilerek, gelecekte, kolona hedefleme amacıyla aktif hedefleyici kısımlar da taşıyabilen amfifilik CD nanopartikül formülasyonları ile kolona kadar pasif hedefleme yaklaşımıyla ulaşabilen, kolona ulaştıktan sonra aktif hedefleme yaklaşımıyla tümöre odaklı olarak daha spesifik bir tedavi yaklaşımı geliştirilebileceği değerlendirilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Bilensoy E. Cationic nanoparticles for cancer therapy. Expert opinion on drug delivery. 2010;7(7):795-809.
2. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. Cell. 2009;136(5):823-37.
3. Loncaster J. Cancer Principles & Practice of Oncology Review, DeVita, Hellman, Rosenberg, GovindanRamaswamy Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA (2005), (542 pp.), ISBN: 0-7817-5278-7. Surgical Oncology-oxford - SURG ONCOL. 2005;14:149-.
4. Hahn WC, Weinberg RA. Cancer: A Genetic Disorder. The Molecular Basis of Cancer: Fourth Edition. 2014:3-18.e1.
5. Brizel DM, Albers ME, Fisher SR, Scher RL, Richtsmeier WJ, Hars V, ve ark. Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. New England Journal of Medicine. 1998;338(25):1798-804.
6. Estanqueiro M, Amaral MH, Conceicao J, Lobo JMS. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 2015;126:631-48.
7. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. Cell. 2007;128(4):683-92.
8. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. Advanced drug delivery reviews. 2004;56(11):1649-59.
9. Cunningham D, Atkin W, Lenz H, Lynch H, Minsky B, Nordlinger BS. N.(2010). Colorectal cancer. Lancet.375:1030-47.
10. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, ve ark. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. New England journal of medicine. 2004;350(23):2335-42.
11. Garza-Trevino EN, Said-Fernandez SL, Martínez-Rodríguez HG. Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment. Cancer cell international. 2015;15(1):2.
12. Siegel R, Santis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014. CA: a cancer journal for clinicians. 2014;64(2):104-17.
13. You X, Kang Y, Hollett G, Chen X, Zhao W, Gu Z, ve ark. Polymeric nanoparticles for colon cancer therapy: overview and perspectives. Journal of Materials Chemistry B. 2016;4(48):7779-92.
14. Cisterna BA, Kamaly N, Choi WI, Tavakkoli A, Farokhzad OC, Vilos C. Targeted nanoparticles for colorectal cancer. Nanomedicine. 2016;11(18):2443-56.
15. Edge SB. AJCC cancer staging manual. Springer. 2010;7:97-100.

16. Gulbake A, Jain A, Jain A, Jain A, Jain SK. Insight to drug delivery aspects for colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(2):582.
17. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *The Lancet Oncology*. 2014;15(11):e493-e503.
18. Liu C, Zhao G, Liu J, Ma N, Chivukula P, Perelman L, ve ark. Novel biodegradable lipid nano complex for siRNA delivery significantly improving the chemosensitivity of human colon cancer stem cells to paclitaxel. *Journal of controlled release*. 2009;140(3):277-83.
19. Zaniboni A, Labianca R. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: an elephant in the living room? *Annals of oncology*. 2004;15(9):1310-8.
20. Schrag D, Rifas-Shiman S, Saltz L, Bach PB, Begg CB. Adjuvant chemotherapy use for Medicare beneficiaries with stage II colon cancer. *Journal of clinical oncology*. 2002;20(19):3999-4005.
21. Noordhuis P, Holwerda U, Van der Wilt C, Van Groeningen C, Smid K, Meijer S, ve ark. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals of oncology*. 2004;15(7):1025-32.
22. Fraile RJ, Baker LH, Buroker TR, Horwitz J, Vaitkevicius V. Pharmacokinetics of 5-fluorouracil administered orally, by rapid intravenous and by slow infusion. *Cancer Research*. 1980;40(7):2223-8.
23. Lamont EB, Schilsky RL. The oral fluoropyrimidines in cancer chemotherapy. *Clinical cancer research*. 1999;5(9):2289-96.
24. Anitha A, Maya S, Sivaram AJ, Mony U, Jayakumar R. Combinatorial nanomedicines for colon cancer therapy. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2016;8(1):151-9.
25. Woynarowski JM, Chapman WG, Napier C, Herzig MC, Juniewicz P. Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Molecular pharmacology*. 1998;54(5):770-7.
26. Viswanath B, Kim S, Lee K. Recent insights into nanotechnology development for detection and treatment of colorectal cancer. *International journal of nanomedicine*. 2016;11:2491.
27. Zhang Q, Zhang F, Li S, Liu R, Jin T, Dou Y, ve ark. A Multifunctional Nanotherapy for Targeted Treatment of Colon Cancer by Simultaneously Regulating Tumor Microenvironment. *Theranostics*. 2019;9(13):3732-53.
28. Zunino F, Dallavalle S, Laccabue D, Beretta G, Merlini L, Pratesi G. Current status and perspectives in the development of camptothecins. *Current pharmaceutical design*. 2002;8(27):2505-20.
29. Gaur S, Wang Y, Kretzner L, Chen L, Yen T, Wu X, ve ark. Pharmacodynamic and pharmacogenomic study of the nanoparticle conjugate of camptothecin

- CRLX101 for the treatment of cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2014;10(7):1477-86.
30. Subramanian N, Sundaraganesan N, Sudha S, Aroulmoji V, Sockalingam G, Bergamin M. Experimental and theoretical investigation of the molecular and electronic structure of anticancer drug camptothecin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011;78(3):1058-67.
 31. Min KH, Park K, Kim Y-S, Bae SM, Lee S, Jo HG, ve ark. Hydrophobically modified glycol chitosan nanoparticles-encapsulated camptothecin enhance the drug stability and tumor targeting in cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. 2008;127(3):208-18.
 32. Amna T, Barakat NA, Hassan MS, Khil M-S, Kim HY. Camptothecin loaded poly (ϵ -caprolactone) nanofibers via one-step electrospinning and their cytotoxicity impact. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2013;431:1-8.
 33. Zhang L, Hu Y, Jiang X, Yang C, Lu W, Yang YH. Camptothecin derivative-loaded poly (caprolactone-co-lactide)-b-PEG-b-poly (caprolactone-co-lactide) nanoparticles and their biodistribution in mice. *Journal of controlled release*. 2004;96(1):135-48.
 34. Cao Z, Harris N, Kozielski A, Vardeman D, Stehlin JS, Giovanella B. Alkyl esters of camptothecin and 9-nitrocamptothecin: synthesis, in vitro pharmacokinetics, toxicity, and antitumor activity. *Journal of medicinal chemistry*. 1998;41(1):31-7.
 35. Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Chaidedgumjorn A, Rojanarata T, Apirakaramwong A, Phongying S, ve ark. Incorporation of camptothecin into N-phthaloyl chitosan-g-mPEG self-assembly micellar system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;64(3):269-76.
 36. Huang Zr, Hua Sc, Yang Yl, Fang Jy. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2008;29(9):1094-102.
 37. Garcia-Carbonero R, Supko JG. Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Clinical Cancer Research*. 2002;8(3):641-61.
 38. Chen AY, Chen PM, Chen Y-J. DNA topoisomerase I drugs and radiotherapy for lung cancer. *Journal of thoracic disease*. 2012;4(4):390.
 39. Bala V, Rao S, Boyd BJ, Prestidge CA. Prodrug and nanomedicine approaches for the delivery of the camptothecin analogue SN38. *Journal of controlled release*. 2013;172(1):48-61.
 40. Kunii R, Onishi H, Machida Y. Preparation and antitumor characteristics of PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles loaded with camptothecin. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2007;67(1):9-17.

41. Opanasopit P, Yokoyama M, Watanabe M, Kawano K, Maitani Y, Okano T. Block copolymer design for camptothecin incorporation into polymeric micelles for passive tumor targeting. *Pharmaceutical research*. 2004;21(11):2001-8.
42. Conover CD, Greenwald RB, Pendri A, Gilbert CW, Shum KL. Camptothecin delivery systems: enhanced efficacy and tumor accumulation of camptothecin following its conjugation to polyethylene glycol via a glycine linker. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1998;42(5):407-14.
43. Berrada M, Serreqi A, Dabbarh F, Owusu A, Gupta A, Lehnert S. A novel non-toxic camptothecin formulation for cancer chemotherapy. *Biomaterials*. 2005;26(14):2115-20.
44. Ünal H. Formulation and Anticancer Efficacy Evaluation of Polymeric and Cyclodextrin Nanocapsules Designed for Oral Application. (Doktora Tezi) Ankara: Hacettepe Üniversitesi. 2014.
45. Ünal H, d'Angelo I, Pagano E, Borrelli F, Izzo A, Ungaro F, ve ark. Core-shell hybrid nanocapsules for oral delivery of camptothecin: formulation development, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Nanoparticle Research*. 2015;17(1):42.
46. Laloo A, Chao P, Hu P, Stein S, Sinko PJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of a novel in situ forming poly (ethylene glycol)-based hydrogel for the controlled delivery of the camptothecins. *Journal of controlled release*. 2006;112(3):333-42.
47. Li C, Zhang H, Gong X, Li Q, Zhao X. Synthesis, characterization, and cytotoxicity assessment of N-acetyl-L-cysteine capped ZnO nanoparticles as camptothecin delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;174:476-82.
48. Bao H, Zhang Q, Yan Z. The impact of camptothecin-encapsulated poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles on the activity of cytochrome P450 in vitro. *International journal of nanomedicine*. 2019;14:383.
49. Chi Y, Wang Z, Wang J, Dong W, Xin P, Bi J, ve ark. Dimeric camptothecin-loaded mPEG-PCL nanoparticles with high drug loading and reduction-responsive drug release. *Colloid and Polymer Science*. 2019:1-8.
50. Aoki S, Fujita S. Pharmaceutical Preparation Containing Camptothecin-Based Polymeric Derivative. U.S. Patent No. US20190046653. Washington, DC: U.S; Patent and Trademark Office; 2019.
51. Dong S, Sun Y, Liu J, Li L, He J, Zhang M, ve ark. Multifunctional Polymeric Prodrug with Simultaneous Conjugating Camptothecin and Doxorubicin for pH/Reduction Dual-Responsive Drug Delivery. *ACS applied materials & interfaces*. 2019;11(9):8740-8.
52. Salustio PJ, Pontes P, Conduto C, Sanches I, Carvalho C, Arrais J, ve ark. Advanced technologies for oral controlled release: cyclodextrins for oral controlled release. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(4):1276-92.

53. Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International journal of pharmaceutics*. 2007;329(1-2):1-11.
54. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical reviews*. 1998;98(5):1743-54.
55. Hamilton LM, Kelly CT, Fogarty WM. cyclodextrins and their interaction with amylolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000;26(8):561-7.
56. Qiu N, Li X, Liu J. Application of cyclodextrins in cancer treatment. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2017;89(3-4):229-46.
57. Del Valle EM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*. 2004;39(9):1033-46.
58. Laza-Knoerr A, Gref R, Couvreur P. Cyclodextrins for drug delivery. *Journal of drug targeting*. 2010;18(9):645-56.
59. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(7):645-66.
60. J Otero-Espinar F, Blanco-Méndez J. Editorial (Thematic Issue: Natural & Synthetically-Modified Cyclodextrins and Polymers in Drug Delivery Systems). *Current topics in medicinal chemistry*. 2014;14(4):463-4.
61. Erden N, Çelebi N. A study of the inclusion complex of naproxen with β -cyclodextrin. *International journal of pharmaceutics*. 1988;48(1-3):83-9.
62. Escuder-Gilabert L, Martín-Biosca Y, Medina-Hernández M, Sagrado S. Cyclodextrins in capillary electrophoresis: recent developments and new trends. *Journal of Chromatography A*. 2014;1357:2-23.
63. Bilensoy E, Hincal AA. Recent advances and future directions in amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Expert opinion on drug delivery*. 2009;6(11):1161-73.
64. Szejtli J. Past, present and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry*. 2004;76(10):1825-45.
65. Pitha J, Milecki J, Fales H, Pannell L, Uekama K. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs. *international Journal of Pharmaceutics*. 1986;29(1):73-82.
66. Hill LE, Gomes C, Taylor TM. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology*. 2013;51(1):86-93.
67. Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *International journal of pharmaceutics*. 2013;453(1):167-80.
68. European Medicines Agency (EMA), Committee for Human Medicinal Products (CHMP), Cyclodextrins used as excipients. Sect. 333892/2013 (2017).

69. European Medicines Agency (EMA), Committee for Human Medicinal Products (CHMP), Questions and answers on cyclodextrins used as excipients in medicinal products for human use. In: EMA/CHMP/495747/2013, editor. 2017.
70. Sallas F, Darcy R. Amphiphilic cyclodextrins—advances in synthesis and supramolecular chemistry. *European Journal of Organic Chemistry*. 2008;2008(6):957-69.
71. Perret F, Duffour M, Chevalier Y, Parrot-Lopez H. Design, synthesis, and in vitro evaluation of new amphiphilic cyclodextrin-based nanoparticles for the incorporation and controlled release of acyclovir. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2013;83(1):25-32.
72. Erdogan N, Varan G, Bilensoy E. Amphiphilic cyclodextrin derivatives for targeted drug delivery to tumors. *Current topics in medicinal chemistry*. 2017;17(13):1521-8.
73. Date AA, Hanes J, Ensign LM. Nanoparticles for oral delivery: Design, evaluation and state-of-the-art. *Journal of Controlled Release*. 2016;240:504-26.
74. Sim T, Lim C, Hoang NH, Joo H, Lee JW, Kim D-w, ve ark. Nanomedicines for oral administration based on diverse nanoplatform. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2016;46(4):351-62.
75. Plapied L, Duhem N, des Rieux A, Pr eat V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. *Current opinion in colloid & interface science*. 2011;16(3):228-37.
76. Gaucher G, Satturwar P, Jones M-C, Furtos A, Leroux J-C. Polymeric micelles for oral drug delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2010;76(2):147-58.
77. Pridgen EM, Alexis F, Farokhzad OC. Polymeric nanoparticle drug delivery technologies for oral delivery applications. *Expert opinion on drug delivery*. 2015;12(9):1459-73.
78. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64(6):557-70.
79. Hunter AC, Elsom J, Wibroe PP, Moghimi SM. Polymeric particulate technologies for oral drug delivery and targeting: a pathophysiological perspective. *Maturitas*. 2012;73(1):5-18.
80. Malingre MM, Beijnen JH, Schellens JH. Oral delivery of taxanes. *Investigational new drugs*. 2001;19(2):155-62.
81. Thornton SJ, Wasan KM. The reformulation of amphotericin B for oral administration to treat systemic fungal infections and visceral leishmaniasis. *Expert opinion on drug delivery*. 2009;6(3):271-84.

82. De Leo L, Di Toro N, Decorti G, Malusà N, Ventura A, Not T. Fasting increases tobramycin oral absorption in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(4):1644-6.
83. Gao L, Liu G, Ma J, Wang X, Zhou L, Li X, et al. Application of drug nanocrystal technologies on oral drug delivery of poorly soluble drugs. *Pharmaceutical research*. 2013;30(2):307-24.
84. Chen M-C, Sonaje K, Chen K-J, Sung H-W. A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials*. 2011;32(36):9826-38.
85. Schenk M, Mueller C. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2008;22(3):391-409.
86. Kararli T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 1995;16(5):351-80.
87. Sood A, Panchagnula R. Peroral route: an opportunity for protein and peptide drug delivery. *Chemical Reviews*. 2001;101(11):3275-304.
88. Ensign LM, Schneider C, Suk JS, Cone R, Hanes J. Mucus penetrating nanoparticles: biophysical tool and method of drug and gene delivery. *Advanced Materials*. 2012;24(28):3887-94.
89. Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2000;279(2):G250-G4.
90. Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV. Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction opening': signaling via Rho and Rho kinase. *Journal of cell science*. 2003;116(22):4615-28.
91. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(4):285.
92. DeMario MD, Ratain MJ. Oral chemotherapy: rationale and future directions. *Journal of clinical oncology*. 1998;16(7):2557-67.
93. Salama NN, Eddington ND, Fasano A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery. *Tight junctions*: Springer; 2006. p. 206-19.
94. Satalkar P, Elger BS, Hunziker P, Shaw D. Challenges of clinical translation in nanomedicine: a qualitative study. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2016;12(4):893-900.
95. Guidance for Industry Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology, Adm: US Food Drug FDA-2010-D-0530,2014.

96. Klein K, Stolk P, De Bruin M, Leufkens H, Crommelin D, De Vlieger J. The EU regulatory landscape of non-biological complex drugs (NBCDs) follow-on products: Observations and recommendations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;133:228-35.
97. Flühmann B, Ntai I, Borchard G, Simoens S, Mühlebach S. Nanomedicines: The magic bullets reaching their target? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019;128:73-80.
98. Mohanraj V, Chen Y. Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*. 2006;5(1):561-73.
99. Chidambaram M, Manavalan R, Kathiresan K. Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*. 2011;14(1):67-77.
100. Conniot J, Silva JM, Fernandes JG, Silva LC, Gaspar R, Brocchini S, ve ark. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Frontiers in chemistry*. 2014;2:105.
101. Mirza AZ, Siddiqui FA. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. *International Nano Letters*. 2014;4(1):94.
102. Venturini CG, Jäger E, Oliveira CP, Bernardi A, Battastini AM, Guterres SS, ve ark. Formulation of lipid core nanocapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2011;375(1-3):200-8.
103. Santos SS, Lorenzoni A, Pegoraro NS, Denardi LB, Alves SH, Schaffazick SR, ve ark. Formulation and in vitro evaluation of coconut oil-core cationic nanocapsules intended for vaginal delivery of clotrimazole. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;116:270-6.
104. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2002;19(2).
105. Kukowska-Latallo JF, Candido KA, Cao Z, Nigavekar SS, Majoros IJ, Thomas TP, ve ark. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer research*. 2005;65(12):5317-24.
106. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*. 2010;75(1):1-18.
107. Park JH, Saravanakumar G, Kim K, Kwon IC. Targeted delivery of low molecular drugs using chitosan and its derivatives. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62(1):28-41.
108. Zhang Y, Yang M, Portney NG, Cui D, Budak G, Ozbay E, ve ark. Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomedical microdevices*. 2008;10(2):321-8.

109. Yue Z-G, Wei W, Lv P-P, Yue H, Wang L-Y, Su Z-G, et al. Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. *Biomacromolecules*. 2011;12(7):2440-6.
110. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(2):255-64.
111. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(2):265-73.
112. Freitas C, Müller RH. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. *International journal of pharmaceutics*. 1998;168(2):221-9.
113. Anderson DG, Akinc A, Hossain N, Langer R. Structure/property studies of polymeric gene delivery using a library of poly (β -amino esters). *Molecular Therapy*. 2005;11(3):426-34.
114. Green JJ, Shi J, Chiu E, Leshchiner ES, Langer R, Anderson DG. Biodegradable polymeric vectors for gene delivery to human endothelial cells. *Bioconjugate chemistry*. 2006;17(5):1162-9.
115. Jain RK, Stylianopoulos T. Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature reviews Clinical oncology*. 2010;7(11):653.
116. Nichols JW, Bae YH. EPR: Evidence and fallacy. *Journal of Controlled Release*. 2014;190:451-64.
117. Jain K. Advances in the field of nanooncology. *BMC medicine*. 2010;8(1):83.
118. Rocha M, Chaves N, Báo S. Nanobiotechnology for Breast Cancer Treatment. *Breast Cancer-From Biology to Medicine*. 2017.
119. Swartz MA, Fleury ME. Interstitial flow and its effects in soft tissues. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:229-56.
120. Luo C, Sun J, Du Y, He Z. Emerging integrated nanohybrid drug delivery systems to facilitate the intravenous-to-oral switch in cancer chemotherapy. *Journal of controlled release*. 2014;176:94-103.
121. Galindo-Rodriguez SA, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Critical reviews™ in therapeutic drug carrier systems*. 2005;22(5).
122. Carino GP, Mathiowitz E. Oral insulin delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 1999;35(2-3):249-57.
123. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*. 2008;5(4):505-15.

124. Ray D, Mohapatra DK, Mohapatra RK, Mohanta GP, Sahoo PK. Synthesis and colon-specific drug delivery of a poly (acrylic acid-co-acrylamide)/MBA nanosized hydrogel. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2008;19(11):1487-502.
125. Chahal A, Madgulkar A, Kshirsagar S, Bhalekar M, Dikpati A, Gawli P. Amorphous nanoparticles for solubility enhancement. *J Adv Pharm Sci*. 2012;2:167-78.
126. Chan H-K, Kwok PCL. Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(6):406-16.
127. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: a perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(6):427-40.
128. Liu Y, Sun C, Hao Y, Jiang T, Zheng L, Wang S. Mechanism of dissolution enhancement and bioavailability of poorly water soluble celecoxib by preparing stable amorphous nanoparticles. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2010;13(4):589-606.
129. Gao H, Wang Y, Chen C, Chen J, Wei Y, Cao S, et al. Incorporation of lapatinib into core-shell nanoparticles improves both the solubility and anti-glioma effects of the drug. *International journal of pharmaceutics*. 2014;461(1-2):478-88.
130. Grama C, Ankola D, Kumar MR. Poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles for peroral delivery of bioactives. *Current opinion in colloid & interface science*. 2011;16(3):238-45.
131. Cao S-j, Xu S, Wang H-m, Ling Y, Dong J, Xia R-d, et al. Nanoparticles: oral delivery for protein and peptide drugs. *AAPS PharmSciTech*. 2019;20(5):190.
132. Homayun B, Lin X, Choi H-J. Challenges and recent progress in oral drug delivery systems for biopharmaceuticals. *Pharmaceutics*. 2019;11(3):129.
133. Lai SK, Wang Y-Y, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(2):158-71.
134. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Advanced drug delivery reviews*. 2009;61(2):75-85.
135. Tang BC, Dawson M, Lai SK, Wang Y-Y, Suk JS, Yang M, et al. Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(46):19268-73.
136. Hidalgo IJ. Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Current topics in medicinal chemistry*. 2001;1(5):385-401.

137. Rekha M, Sharma CP. Oral delivery of therapeutic protein/peptide for diabetes—future perspectives. *International journal of pharmaceutics*. 2013;440(1):48-62.
138. Yun Y, Cho YW, Park K. Nanoparticles for oral delivery: targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(6):822-32.
139. Thanki K, Gangwal RP, Sangamwar AT, Jain S. Oral delivery of anticancer drugs: challenges and opportunities. *Journal of controlled release*. 2013;170(1):15-40.
140. Amin ML. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug target insights*. 2013;7:DTI. S12519.
141. Callaghan R, Luk F, Bebawy M. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy? *Drug Metabolism and Disposition*. 2014;42(4):623-31.
142. Srivalli KMR, Lakshmi P. Overview of P-glycoprotein inhibitors: a rational outlook. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;48(3):353-67.
143. Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS letters*. 2006;580(12):2903-9.
144. Niazi M, Zakeri-Milani P, Najafi Hajivar S, Soleymani Goloujeh M, Ghobakhlou N, Shahbazi Mojarrad J, ve ark. Nano-based strategies to overcome p-glycoprotein-mediated drug resistance. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2016;12(9):1021-33.
145. Ma L, Wei Y, Zhou Y, Ma X, Wu Xa. Effects of Pluronic F68 and Labrasol on the intestinal absorption and pharmacokinetics of rifampicin in rats. *Archives of pharmacal research*. 2011;34(11):1939-43.
146. Guan Y, Huang J, Zuo L, Xu J, Si L, Qiu J, ve ark. Effect of pluronic P123 and F127 block copolymer on P-glycoprotein transport and CYP3A metabolism. *Archives of pharmacal research*. 2011;34(10):1719-28.
147. Ünal H, Öztürk N, Bilensoy E. Formulation development, stability and anticancer efficacy of core-shell cyclodextrin nanocapsules for oral chemotherapy with camptothecin. *Beilstein journal of organic chemistry*. 2015;11(1):204-12.
148. Peltier S, Oger J-M, Lagarce F, Couet W, Benoît J-P. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules. *Pharmaceutical research*. 2006;23(6):1243-50.
149. Kuppens I, Bosch T, Van Maanen M, Rosing H, Fitzpatrick A, Beijnen J, ve ark. Oral bioavailability of docetaxel in combination with OC144-093 (ONT-093). *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2005;55(1):72-8.
150. Troutman MD, Thakker DR. Novel experimental parameters to quantify the modulation of absorptive and secretory transport of compounds by P-

- glycoprotein in cell culture models of intestinal epithelium. *Pharmaceutical research*. 2003;20(8):1210-24.
151. Shin S-C, Choi J-S, Li X. Enhanced bioavailability of tamoxifen after oral administration of tamoxifen with quercetin in rats. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;313(1-2):144-9.
 152. Oostendorp RL, Huitema A, Rosing H, Jansen RS, ter Heine R, Keessen M, ve ark. Coadministration of ritonavir strongly enhances the apparent oral bioavailability of docetaxel in patients with solid tumors. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(12):4228-33.
 153. Bisht S, Feldmann G, Koorstra J-BM, Mullendore M, Alvarez H, Karikari C, ve ark. In vivo characterization of a polymeric nanoparticle platform with potential oral drug delivery capabilities. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(12):3878-88.
 154. Upadhyay AK, Singh S, Chhipa RR, Vijayakumar MV, Ajay AK, Bhat MK. Methyl- β -cyclodextrin enhances the susceptibility of human breast cancer cells to carboplatin and 5-fluorouracil: Involvement of Akt, NF- κ B and Bcl-2. *Toxicology and applied pharmacology*. 2006;216(2):177-85.
 155. Grosse P-Y, Bressolle F, Pinguet F. Methyl- β -cyclodextrin in HL-60 parental and multidrug-resistant cancer cell lines: effect on the cytotoxic activity and intracellular accumulation of doxorubicin. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 1997;40(6):489-94.
 156. Varan G, Öncül S, Ercan A, Benito JM, Mellet CO, Bilensoy E. Cholesterol-targeted anticancer and apoptotic effects of anionic and polycationic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2016;105(10):3172-82.
 157. Ercan A, Çelebier M, Varan G, Öncül S, Nenni M, Kaplan O, ve ark. Global omics strategies to investigate the effect of cyclodextrin nanoparticles on MCF-7 breast cancer cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;123:377-86.
 158. Alcaro S, Ventura CA, Paolino D, Battaglia D, Ortuso F, Cattel L, ve ark. Preparation, characterization, molecular modeling and in vitro activity of paclitaxel-cyclodextrin complexes. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2002;12(12):1637-41.
 159. Agueros M, Ruiz-Gaton L, Vauthier C, Bouchemal K, Espuelas S, Ponchel G, ve ark. Combined hydroxypropyl- β -cyclodextrin and poly (anhydride) nanoparticles improve the oral permeability of paclitaxel. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;38(4):405-13.
 160. Arima H, Yunomae K, Hirayama F, Uekama K. Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl- β -cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;297(2):547-55.

161. Torne SJ, Ansari KA, Vavia PR, Trotta F, Cavalli R. Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded nanospheres. *Drug Delivery*. 2010;17(6):419-25.
162. Yavuz B, Bilensoy E, Vural İ, Şumnu M. Alternative oral exemestane formulation: improved dissolution and permeation. *International journal of pharmaceuticals*. 2010;398(1-2):137-45.
163. Wong CY, Martinez J, Dass CR. Oral delivery of insulin for treatment of diabetes: status quo, challenges and opportunities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2016;68(9):1093-108.
164. Arbit E. The physiological rationale for oral insulin administration. *Diabetes technology & therapeutics*. 2004;6(4):510-7.
165. Quellhorst E. Insulin therapy during peritoneal dialysis: pros and cons of various forms of administration. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002;13(suppl 1):S92-S6.
166. Chen M-C, Mi F-L, Liao Z-X, Hsiao C-W, Sonaje K, Chung M-F, ve ark. Recent advances in chitosan-based nanoparticles for oral delivery of macromolecules. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(6):865-79.
167. Sonia TA, Sharma CP. An overview of natural polymers for oral insulin delivery. *Drug discovery today*. 2012;17(13-14):784-92.
168. Eaton RP, Allen RC, Schade DS, Standefer JC. "Normal" insulin secretion: the goal of artificial insulin delivery systems? *Diabetes Care*. 1980;3(2):270-3.
169. Clement S, Still JG, Kosutic G, McAllister R. Oral insulin product hexyl-insulin monoconjugate 2 (HIM2) in type 1 diabetes mellitus: the glucose stabilization effects of HIM2. *Diabetes technology & therapeutics*. 2002;4(4):459-66.
170. A Lopes M, A Abraham B, Seiça R, Veiga F, R Rodrigues C, J Ribeiro A. Intestinal uptake of insulin nanoparticles: facts or myths? *Current pharmaceutical biotechnology*. 2014;15(7):629-38.
171. Hans ML, Lowman AM. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002;6(4):319-27.
172. Brogden RN, Heel R. Human insulin. *Drugs*. 1987;34(3):350-71.
173. Pridgen EM, Alexis F, Kuo TT, Levy-Nissenbaum E, Karnik R, Blumberg RS, ve ark. Transepithelial transport of Fc-targeted nanoparticles by the neonatal fc receptor for oral delivery. *Science translational medicine*. 2013;5(213):213ra167-213ra167.
174. Sonaje K, Lin K-J, Wey S-P, Lin C-K, Yeh T-H, Nguyen H-N, ve ark. Biodistribution, pharmacodynamics and pharmacokinetics of insulin analogues in a rat model: oral delivery using pH-responsive nanoparticles vs. subcutaneous injection. *Biomaterials*. 2010;31(26):6849-58.

175. Jongen PJ, Hengstman G, Hupperts R, Schrijver H, Gilhuis J, Vliegen JH, ve ark. Drug adherence and multidisciplinary care in patients with multiple sclerosis: protocol of a prospective, web-based, patient-centred, nation-wide, Dutch cohort study in glatiramer acetate treated patients (CAIR study). *BMC neurology*. 2011;11(1):40.
176. Cetin M, Aktas MS, Vural I, Ozturk M. Salmon calcitonin-loaded Eudragit® and Eudragit®-PLGA nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *Journal of microencapsulation*. 2012;29(2):156-66.
177. Guggi D, Kast CE, Bernkop-Schnürch A. In vivo evaluation of an oral salmon calcitonin-delivery system based on a thiolated chitosan carrier matrix. *Pharmaceutical research*. 2003;20(12):1989-94.
178. Loftus Jr EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17.
179. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2003;124(2):521-36.
180. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, ve ark. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2011;60(5):571-607.
181. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity reviews*. 2004;3(5):394-400.
182. Karlinger K, Györke T, Makö E, Mester Á, Tarján Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *European journal of radiology*. 2000;35(3):154-67.
183. Lautenschlager C, Schmidt C, Fischer D, Stallmach A. Drug delivery strategies in the therapy of inflammatory bowel disease. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;71:58-76.
184. Cunliffe R, Scott B. Monitoring for drug side-effects in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2002;16(4):647-62.
185. Collnot E-M, Ali H, Lehr C-M. Nano-and microparticulate drug carriers for targeting of the inflamed intestinal mucosa. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2):235-46.
186. Coco R, Plapied L, Pourcelle V, Jérôme C, Brayden DJ, Schneider Y-J, ve ark. Drug delivery to inflamed colon by nanoparticles: comparison of different strategies. *International journal of pharmaceutics*. 2013;440(1):3-12.
187. Lamprecht A, Schäfer U, Lehr C-M. Size-dependent bioadhesion of micro-and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharmaceutical research*. 2001;18(6):788-93.
188. Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schäfer U, Takeuchi H, Maincent P, ve ark. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of

- inflammatory bowel disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;299(2):775-81.
189. Nakase H, Okazaki K, Tabata Y, Uose S, Ohana M, Uchida K, ve ark. An oral drug delivery system targeting immune-regulating cells ameliorates mucosal injury in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001;297(3):1122-8.
 190. Pertuit D, Moulari B, Betz T, Nadaradjane A, Neumann D, Ismaïli L, ve ark. 5-amino salicylic acid bound nanoparticles for the therapy of inflammatory bowel disease. *Journal of Controlled Release*. 2007;123(3):211-8.
 191. Sainz V, Conriot J, Matos AI, Peres C, Zupančič E, Moura L, ve ark. Regulatory aspects on nanomedicines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;468(3):504-10.
 192. Nagaich U. *Nanotechnology: The vision of 2025*. Wolters Kluwer--Medknow Publications; 2014.
 193. Amidon S, Brown JE, Dave VS. Colon-targeted oral drug delivery systems: design trends and approaches. *Aaps Pharmscitech*. 2015;16(4):731-41.
 194. Tuba ŞTC, Hasçıçek C. Colon Targeted Drug Delivery Systems. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*.35(2):125-48.
 195. Prathap M, Gulshan M, Rao NR. Colon: targeted drug delivery system A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Nano Science*. 2014;3(5):429-37.
 196. Xiao B, Merlin D. Oral colon-specific therapeutic approaches toward treatment of inflammatory bowel disease. *Expert opinion on drug delivery*. 2012;9(11):1393-407.
 197. Anita, Singh A, Dabral A. A review on colon targeted drug delivery system. *International journal of pharmaceutical sciences and research*. 2019;10(1):47-56.
 198. Chourasia M, Jain S. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *J Pharm Pharm Sci*. 2003;6(1):33-66.
 199. Schacht E, Gevaert A, Molly K, Verstraete W, Adriaensens P, Carleer R, ve ark. Polymers for colon specific drug delivery. *Journal of controlled release*. 1996;39(2-3):327-38.
 200. Kosaraju SL. Colon targeted delivery systems: review of polysaccharides for encapsulation and delivery. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2005;45(4):251-8.
 201. Brondsted H, Andersen C, Hovgaard L. Crosslinked dextran—a new capsule material for colon targeting of drugs. *Journal of controlled Release*. 1998;53(1-3):7-13.
 202. Hirayama F, Uekama K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. *Advanced drug delivery reviews*. 1999;36(1):125-41.

203. Sinha VR, Kumria R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2001;224(1-2):19-38.
204. Krishnaiah Y, Satyanarayana V, Kumar BD, Karthikeyan R. In vitro drug release studies on guar gum-based colon targeted oral drug delivery systems of 5-fluorouracil. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2002;16(3):185-92.
205. Samyn C, Kalala W, Van den Mooter G, Kinget R. Synthesis and in vitro biodegradation of poly (ether-ester) azo polymers designed for colon targeting. *International journal of pharmaceutics*. 1995;121(2):211-6.
206. Krishnaiah Y, Reddy PB, Satyanarayana V, Karthikeyan R. Studies on the development of oral colon targeted drug delivery systems for metronidazole in the treatment of amoebiasis. *International journal of pharmaceutics*. 2002;236(1-2):43-55.
207. Fukui E, Miyamura N, Kobayashi M. An in vitro investigation of the suitability of press-coated tablets with hydroxypropylmethylcellulose acetate succinate (HPMCAS) and hydrophobic additives in the outer shell for colon targeting. *Journal of Controlled Release*. 2001;70(1-2):97-107.
208. Fukui E, Miyamura N, Uemura K, Kobayashi M. Preparation of enteric coated timed-release press-coated tablets and evaluation of their function by in vitro and in vivo tests for colon targeting. *International journal of pharmaceutics*. 2000;204(1-2):7-15.
209. Patil P, Uphade K, Saudagar R. A Review: Osmotic drug delivery system. *Pharma Science Monitor*. 2018;9(2).
210. Yang L, Chu JS, Fix JA. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *International journal of pharmaceutics*. 2002;235(1-2):1-15.
211. Takaya T, Niwa K, Muraoka M, Ogita I, Nagai N, Yano R-i, ve ark. Importance of dissolution process on systemic availability of drugs delivered by colon delivery system. *Journal of controlled release*. 1998;50(1-3):111-22.
212. Zou M-J, Cheng G, Okamoto H, Hao X-H, An F, Cui F-D, ve ark. Colon-specific drug delivery systems based on cyclodextrin prodrugs: In vivo evaluation of 5-aminosalicylic acid from its cyclodextrin conjugates. *World journal of gastroenterology*. 2005;11(47):7457.
213. Vong LB, Yoshitomi T, Matsui H, Nagasaki Y. Development of an oral nanotherapeutics using redox nanoparticles for treatment of colitis-associated colon cancer. *Biomaterials*. 2015;55:54-63.
214. Urbanska AM, Karagiannis ED, Guajardo G, Langer RS, Anderson DG. Therapeutic effect of orally administered microencapsulated oxaliplatin for colorectal cancer. *Biomaterials*. 2012;33(18):4752-61.
215. Warner DL, Burke TG. Simple and versatile high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous quantitation of the lactone

- and carboxylate forms of camptothecin anticancer drugs. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1997;691(1):161-71.
216. Rambla-Alegre M, Esteve-Romero J, Carda-Broch S. Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *Journal of Chromatography A*. 2012;1232:101-9.
217. Bilensoy E, Gürkaynak O, Ertan M, Şen M, Hıncal AA. Development of nonsurfactant cyclodextrin nanoparticles loaded with anticancer drug paclitaxel. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2008;97(4):1519-29.
218. Varan G, Varan C, Erdoğan N, Hıncal AA, Bilensoy E. Amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2017;531(2):457-69.
219. Erdoğan N, İskit AB, Mungan NA, Bilensoy E. Prolonged retention and in vivo evaluation of cationic nanoparticles loaded with Mitomycin C designed for intravesical chemotherapy of bladder tumours. *Journal of microencapsulation*. 2012;29(6):576-82.
220. Bilati U, Allémann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;24(1):67-75.
221. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug development and industrial pharmacy*. 1999;25(4):471-6.
222. Xie H, Smith JW. Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system. *Journal of nanobiotechnology*. 2010;8(1):18.
223. Lepeltier E, Bourgaux C, Couvreur P. Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to drug delivery devices. *Advanced drug delivery reviews*. 2014;71:86-97.
224. Zhou H, Qian H. Preparation and characterization of pH-sensitive nanoparticles of budesonide for the treatment of ulcerative colitis. *Drug design, development and therapy*. 2018;12:2601.
225. Roger E, Lagarce F, Benoit J-P. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. *International journal of pharmaceutics*. 2009;379(2):260-5.
226. Lazzari S, Moscatelli D, Codari F, Salmona M, Morbidelli M, Diomedede L. Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids. *Journal of nanoparticle research*. 2012;14(6):920.
227. Marques MR, Loebenberg R, Almukainzi M. Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing. *Dissolution Technol*. 2011;18(3):15-28.
228. Stippler E, Kopp S, Dressman J. Comparison of US Pharmacopeia simulated intestinal fluid TS (without pancreatin) and phosphate standard buffer pH 6.8,

- TS of the International Pharmacopoeia with respect to their use in in vitro dissolution testing. *Dissolution Technologies*. 2004;11(2):6-11.
229. Crater JS, Carrier RL. Barrier properties of gastrointestinal mucus to nanoparticle transport. *Macromolecular bioscience*. 2010;10(12):1473-83.
230. Ungaro F, d'Angelo I, Coletta C, di Villa Bianca RdE, Sorrentino R, Perfetto B, ve ark. Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers. *Journal of controlled release*. 2012;157(1):149-59.
231. Rossi S, Ferrari F, Bonferoni MC, Caramella C. Characterization of chitosan hydrochloride–mucin interaction by means of viscosimetric and turbidimetric measurements. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2000;10(4):251-7.
232. Mohammadian M, Zeynali S, Azarbaijani AF, Ansari MHK, Kheradmand F. Cytotoxic effects of the newly-developed chemotherapeutic agents 17-AAG in combination with oxaliplatin and capecitabine in colorectal cancer cell lines. *Research in pharmaceutical sciences*. 2017;12(6):517.
233. van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2005;1(2):175-85.
234. Press B. Optimization of the Caco-2 permeability assay to screen drug compounds for intestinal absorption and efflux. *Permeability Barrier*: Springer; 2011. p. 139-54.
235. Terracina KP, Aoyagi T, Huang W-C, Nagahashi M, Yamada A, Aoki K, ve ark. Development of a metastatic murine colon cancer model. *Journal of surgical research*. 2015;199(1):106-14.
236. Hackl C, Man S, Francia G, Milsom C, Xu P, Kerbel RS. Metronomic oral topotecan prolongs survival and reduces liver metastasis in improved preclinical orthotopic and adjuvant therapy colon cancer models. *Gut*. 2013;62(2):259-71.
237. Tseng W, Leong X, Engleman E. Orthotopic mouse model of colorectal cancer. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2007(10).
238. Agarwalla P, Banerjee R. N-end rule pathway inhibition assists colon tumor regression via necroptosis. *Mol Ther Oncolytics*. 2016;3:16020.
239. Chen H, Sells E, Pandey R, Abril ER, Hsu CH, Krouse RS, ve ark. Kallikrein 6 protease advances colon tumorigenesis via induction of the high mobility group A2 protein. *Oncotarget*. 2019;10(58):6062-78.
240. Cheriyaundath S, Basu S, Haase G, Doernberg H, Gavert N, Brabletz T, ve ark. ISG15 induction is required during L1-mediated colon cancer progression and metastasis. *Oncotarget*. 2019;10(67):7122-31.

241. Paulson B, Kim IH, Namgoong JM, Kim YG, Lee S, Moon Y, ve ark. Longitudinal micro-endoscopic monitoring of high-success intramucosal xenografts for mouse models of colorectal cancer. *Int J Med Sci.* 2019;16(11):1453-60.
242. Tan HX, Gong WZ, Zhou K, Xiao ZG, Hou FT, Huang T, ve ark. CXCR4/TGF-beta1 mediated hepatic stellate cells differentiation into carcinoma-associated fibroblasts and promoted liver metastasis of colon cancer. *Cancer Biol Ther.* 2019:1-11.
243. Owens TS, Dodds H, Fricke K, Hanna SK, Crews KR. High-performance liquid chromatographic assay with fluorescence detection for the simultaneous measurement of carboxylate and lactone forms of irinotecan and three metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B.* 2003;788(1):65-74.
244. Bartolomeo MP, Maisano F. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *Journal of biomolecular techniques: JBT.* 2006;17(2):131.
245. Varan G, Patrulea V, Borchard G, Bilensoy E. Cellular Interaction and Tumoral Penetration Properties of Cyclodextrin Nanoparticles on 3D Breast Tumor Model. *Nanomaterials.* 2018;8(2):67.
246. Erdoğan N, Esendağlı G, Nielsen TT, Şen M, Öner L, Bilensoy E. Design and optimization of novel paclitaxel-loaded folate-conjugated amphiphilic cyclodextrin nanoparticles. *International journal of pharmaceutics.* 2016;509(1-2):375-90.
247. Memisoglu-Bilensoy E, Vural I, Bochot A, Renoir JM, Duchene D, Hincal AA. Tamoxifen citrate loaded amphiphilic β -cyclodextrin nanoparticles: In vitro characterization and cytotoxicity. *Journal of controlled release.* 2005;104(3):489-96.
248. Mao S, Shuai X, Unger F, Simon M, Bi D, Kissel T. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. *International journal of pharmaceutics.* 2004;281(1-2):45-54.
249. Reul R, Renette T, Bege N, Kissel T. Nanoparticles for paclitaxel delivery: a comparative study of different types of dendritic polyesters and their degradation behavior. *International journal of pharmaceutics.* 2011;407(1-2):190-6.
250. Malenovic A, Medenica M, Ivanovic D, Jancic B, Markovic S. Development and validation of RP-HPLC method for cetrimonium bromide and lidocaine determination. *Il Farmaco.* 2005;60(2):157-61.
251. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of chromatography A.* 2003;987(1-2):57-66.

252. Gonzalez AG, Herrador MA. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2007;26(3):227-38.
253. Lemos-Senna E, Wouessidjewe D, Lesieur S, Puisieux F, Couarraze G, Duchêne D. Evaluation of the hydrophobic drug loading characteristics in nanoprecipitated amphiphilic cyclodextrin nanospheres. *Pharmaceutical development and technology*. 1998;3(1):85-94.
254. Beck-Broichsitter M, Nicolas J, Couvreur P. Solvent selection causes remarkable shifts of the “Ouzo region” for poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Nanoscale*. 2015;7(20):9215-21.
255. Schubert S, Delaney Jr JT, Schubert US. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly (lactic acid). *Soft Matter*. 2011;7(5):1581-8.
256. Bilensoy E, Doğan L, Şen M, Hıncal A. Complexation behavior of antiestrogen drug tamoxifen citrate with natural and modified β -cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2007;57(1-4):651-5.
257. Memişoğlu E, Bochot A, Özalp M, Şen M, Duchêne D, Hıncal AA. Direct formation of nanospheres from amphiphilic β -cyclodextrin inclusion complexes. *Pharmaceutical research*. 2003;20(1):117-25.
258. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International journal of pharmaceutics*. 1989;55(1):R1-R4.
259. Rivas CJM, Tarhini M, Badri W, Miladi K, Greige-Gerges H, Nazari QA, ve ark. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2017;532(1):66-81.
260. Galindo-Rodriguez S, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharmaceutical research*. 2004;21(8):1428-39.
261. He C, Yin L, Tang C, Yin C. Size-dependent absorption mechanism of polymeric nanoparticles for oral delivery of protein drugs. *Biomaterials*. 2012;33(33):8569-78.
262. Banerjee A, Qi J, Gogoi R, Wong J, Mitragotri S. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2016;238:176-85.
263. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, ve ark. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(2):57.

264. Putri DCA, Dwiastuti R, Marchaban M, Nugroho AK. Optimization of mixing temperature and sonication duration in liposome preparation. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Community*. 2017;14(2):79-85.
265. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov AV. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of controlled release*. 2010;145(3):182-95.
266. Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*: Springer; 2011. p. 63-70.
267. Alalaiwe A, Carpinone P, Alshahrani S, Alsulays B, Ansari M, Anwer M, ve ark. Influence of chitosan coating on the oral bioavailability of gold nanoparticles in rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019;27(2):171-5.
268. Du X-J, Wang J-L, Iqbal S, Li H-J, Cao Z-T, Wang Y-C, ve ark. The effect of surface charge on oral absorption of polymeric nanoparticles. *Biomaterials science*. 2018;6(3):642-50.
269. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31(13):3657-66.
270. Arvizo RR, Miranda OR, Thompson MA, Pabelick CM, Bhattacharya R, Robertson JD, ve ark. Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. *Nano letters*. 2010;10(7):2543-8.
271. Chen L, Mccrate JM, Lee JC, Li H. The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells. *Nanotechnology*. 2011;22(10):105708.
272. Yeung T, Gilbert GE, Shi J, Silvius J, Kapus A, Grinstein S. Membrane phosphatidylserine regulates surface charge and protein localization. *Science*. 2008;319(5860):210-3.
273. Varan G, Benito JM, Mellet CO, Bilensoy E. Development of polycationic amphiphilic cyclodextrin nanoparticles for anticancer drug delivery. *Beilstein journal of nanotechnology*. 2017;8(1):1457-68.
274. Memişoğlu E, Bochot A, Şen M, Charon D, Duchêne D, Hincal AA. Amphiphilic β -cyclodextrins modified on the primary face: synthesis, characterization, and evaluation of their potential as novel excipients in the preparation of nanocapsules. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2002;91(5):1214-24.
275. Griffin WC. Classification of surface-active agents by "HLB". *J Soc Cosmet Chem*. 1949;1:311-26.
276. Salatin S, Barar J, Barzegar-Jalali M, Adibkia K, Kiafar F, Jelvehgari M. Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. *Research in pharmaceutical sciences*. 2017;12(1):1.

277. Wang Y, Li P, Truong-Dinh Tran T, Zhang J, Kong L. Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. *Nanomaterials*. 2016;6(2):26.
278. Tan TB, Yussof NS, Abas F, Mirhosseini H, Nehdi IA, Tan CP. Forming a lutein nanodispersion via solvent displacement method: the effects of processing parameters and emulsifiers with different stabilizing mechanisms. *Food chemistry*. 2016;194:416-23.
279. Piñón-Segundo E, Ganem-Quintanar A, Rafael Garibay-Bermúdez J, Juan Escobar-Chávez J, López-Cervantes M, Quintanar-Guerrero D. Preparation of nanoparticles by solvent displacement using a novel recirculation system. *Pharmaceutical development and technology*. 2006;11(4):493-501.
280. Beck-Broichsitter M, Rytting E, Lehardt T, Wang X, Kissel T. Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: a shift in the “ouzo region” upon drug loading. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;41(2):244-53.
281. Fan L, Zhang Y, Luo C, Lu F, Qiu H, Sun M. Synthesis and characterization of magnetic β -cyclodextrin–chitosan nanoparticles as nano-adsorbents for removal of methyl blue. *International journal of biological macromolecules*. 2012;50(2):444-50.
282. Truong NP, Whittaker MR, Mak CW, Davis TP. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*. 2015;12(1):129-42.
283. Caldorera-Moore M, Guimard N, Shi L, Roy K. Designer nanoparticles: incorporating size, shape and triggered release into nanoscale drug carriers. *Expert opinion on drug delivery*. 2010;7(4):479-95.
284. Decuzzi P, Godin B, Tanaka T, Lee S-Y, Chiappini C, Liu X, et al. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *Journal of Controlled Release*. 2010;141(3):320-7.
285. Zhang Z, Feng S-S. The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly (lactide)–tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. *Biomaterials*. 2006;27(21):4025-33.
286. Song BK, Cho KO, Jo Y, Oh JW, Kim YS. Colon transit time according to physical activity level in adults. *Journal of neurogastroenterology and motility*. 2012;18(1):64.
287. Belali N, Wathoni N, Muchtaridi M. Advances in orally targeted drug delivery to colon. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*. 2019;10(3):100.
288. Fallingborg J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish medical bulletin*. 1999;46(3):183-96.

289. Memişoğlu E, Bochet A, Şen M, Duchêne D, Hincal AA. Non-surfactant nanospheres of progesterone inclusion complexes with amphiphilic β -cyclodextrins. *International journal of pharmaceutics*. 2003;251(1-2):143-53.
290. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2010;385(1-2):113-42.
291. Breunig M, Lungwitz U, Klar J, Kurtz A, Blunk T, Goepferich A. Polyplexes of polyethylenimine and per-N-methylated polyethylenimine-cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2004;4(5):512-20.
292. Son G-H, Lee B-J, Cho C-W. Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2017;47(4):287-96.
293. Borges O, Borchard G, Verhoef JC, de Sousa A, Junginger HE. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *International journal of pharmaceutics*. 2005;299(1-2):155-66.
294. Tobio M, Sanchez A, Vila A, Soriano I, Evora C, Vila-Jato J, et al. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2000;18(3-4):315-23.
295. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(6):456-69.
296. Erdogan N, Iskit AB, Eroglu H, Sargon MF, Mungan NA, Bilensoy E. Cationic core-shell nanoparticles for intravesical chemotherapy in tumor-induced rat model: safety and efficacy. *International journal of pharmaceutics*. 2014;471(1-2):1-9.
297. Maisel K, Ensign L, Reddy M, Cone R, Hanes J. Effect of surface chemistry on nanoparticle interaction with gastrointestinal mucus and distribution in the gastrointestinal tract following oral and rectal administration in the mouse. *Journal of controlled release*. 2015;197:48-57.
298. Gelperina S, Kisich K, Iseman MD, Heifets L. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;172(12):1487-90.
299. Dawson M, Krauland E, Wirtz D, Hanes J. Transport of polymeric nanoparticle gene carriers in gastric mucus. *Biotechnology progress*. 2004;20(3):851-7.
300. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: effects on drug permeation through biological membranes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011;63(9):1119-35.

301. Másson M, Loftsson T, Másson Gs, Stefánsson E. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. *Journal of Controlled Release*. 1999;59(1):107-18.
302. Loftsson T. Self-assembled cyclodextrin nanoparticles and drug delivery. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2014;80(1-2):1-7.
303. Mazzaferro S, Bouchemal K, Skanji R, Gueutin C, Chacun H, Ponchel G. Intestinal permeation enhancement of docetaxel encapsulated into methyl- β -cyclodextrin/poly (isobutylcyanoacrylate) nanoparticles coated with thiolated chitosan. *Journal of controlled release*. 2012;162(3):568-74.
304. Yildiz HM, McKelvey CA, Marsac PJ, Carrier RL. Size selectivity of intestinal mucus to diffusing particulates is dependent on surface chemistry and exposure to lipids. *Journal of drug targeting*. 2015;23(7-8):768-74.
305. Carrier RL, Miller LA, Ahmed I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*. 2007;123(2):78-99.
306. Sánchez-Moreno P, Ortega-Vinuesa JL, Martín-Rodríguez A, Boulaiz H, Marchal-Corrales JA, Peula-García JM. Characterization of different functionalized lipidic nanocapsules as potential drug carriers. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(2):2405-24.
307. Brunot C, Ponsonnet L, Lagneau C, Farge P, Picart C, Grosgeat B. Cytotoxicity of polyethyleneimine (PEI), precursor base layer of polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials*. 2007;28(4):632-40.
308. Okon EU, Hammed G, El Wafa PA, Abraham O, Case N, Henry E. In-vitro cytotoxicity of Polyethyleneimine on HeLa and Vero Cells. *International Journal of Innovation and Applied Studies*. 2014;5(3):192.
309. Kafil V, Omid Y. Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in A431 cells. *BioImpacts: BI*. 2011;1(1):23.
310. Xia T, Kovochich M, Liong M, Meng H, Kabehie S, George S, et al. Polyethyleneimine coating enhances the cellular uptake of mesoporous silica nanoparticles and allows safe delivery of siRNA and DNA constructs. *ACS nano*. 2009;3(10):3273-86.
311. Gao W, Lai JC, Leung S. Functional enhancement of chitosan and nanoparticles in cell culture, tissue engineering, and pharmaceutical applications. *Frontiers in physiology*. 2012;3:321.
312. Bilensoy E, Gürkaynak O, Doğan AL, Hıncal AA. Safety and efficacy of amphiphilic β -cyclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery. *International journal of pharmaceutics*. 2008;347(1-2):163-70.
313. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *small*. 2010;6(1):12-21.

314. Forgue-Lafitte M-E, Coudray A-M, Bréant B, Mešter J. Proliferation of the human colon carcinoma cell line HT29: autocrine growth and deregulated expression of the c-myc oncogene. *Cancer research*. 1989;49(23):6566-71.
315. Minelli R, Cavalli R, Ellis L, Pettazzoni P, Trotta F, Ciamporcero E, ve ark. Nanosponge-encapsulated camptothecin exerts anti-tumor activity in human prostate cancer cells. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2012;47(4):686-94.
316. Laloo AK, Luo FR, Guo A, Paranjpe PV, Lee S-H, Vyas V, ve ark. Membrane transport of camptothecin: facilitation by human P-glycoprotein (ABCB1) and multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *BMC medicine*. 2004;2(1):16.
317. Derakhshandeh K, Hochhaus G, Dadashzadeh S. In-vitro cellular uptake and transport study of 9-nitrocamptothecin PLGA nanoparticles across Caco-2 cell monolayer model. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2011;10(3):425.
318. Thakral NK, Ray AR, Bar-Shalom D, Eriksson AH, Majumdar DK. Soluplus-solubilized citrated camptothecin—a potential drug delivery strategy in colon cancer. *Aaps Pharmscitech*. 2012;13(1):59-66.
319. Hafner A, Lovrić J, Voinovich D, Filipović-Grčić J. Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *International journal of pharmaceuticals*. 2009;381(2):205-13.
320. Choi SY, Jang SH, Park J, Jeong S, Park JH, Ock KS, ve ark. Cellular uptake and cytotoxicity of positively charged chitosan gold nanoparticles in human lung adenocarcinoma cells. *Journal of Nanoparticle Research*. 2012;14(12):1234.
321. Gamboa JM, Leong KW. In vitro and in vivo models for the study of oral delivery of nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(6):800-10.
322. Alencar H, King R, Funovics M, Stout C, Weissleder R, Mahmood U. A novel mouse model for segmental orthotopic colon cancer. *International journal of cancer*. 2005;117(3):335-9.
323. Zhao X, Li L, Starr TK, Subramanian S. Tumor location impacts immune response in mouse models of colon cancer. *Oncotarget*. 2017;8(33):54775.
324. DE-SOUZA ASC, COSTA-CASAGRANDE TA. Animal models for colorectal cancer. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2018;31(2).
325. Kobaek-Larsen M, Thorup I, Diederichsen A, Fenger C, Hoitinga MR. Review of colorectal cancer and its metastases in rodent models: comparative aspects with those in humans. *Comparative medicine*. 2000;50(1):16-26.
326. Mittal VK, Bhullar JS, Jayant K. Animal models of human colorectal cancer: current status, uses and limitations. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(41):11854.

327. McIntyre RE, Buczacki SJ, Arends MJ, Adams DJ. Mouse models of colorectal cancer as preclinical models. *Bioessays*. 2015;37(8):909-20.
328. Mishra S, Tamta AK, Sarikhani M, Desingu PA, Kizkekra SM, Pandit AS, ve ark. Subcutaneous Ehrlich ascites carcinoma mice model for studying cancer-induced cardiomyopathy. *Scientific reports*. 2018;8(1):5599.
329. Siegler R, Koprowska I. Mechanism of an ascites tumor formation. *Cancer research*. 1962;22(11 Part 1):1273-7.
330. Xu J, Zhang Y, Xu J, Wang M, Liu G, Wang J, ve ark. Reversing tumor stemness via orally targeted nanoparticles achieves efficient colon cancer treatment. *Biomaterials*. 2019;216:119247.
331. Venditto VJ, Simanek EE. Cancer therapies utilizing the camptothecins: a review of the in vivo literature. *Molecular pharmaceuticals*. 2010;7(2):307-49.
332. Han Z, Wei W, Dunaway S, Darnowski JW, Calabresi P, Sedivy J, ve ark. Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(19):17154-60.
333. Pizzolato JF, Saltz LB. The camptothecins. *The Lancet*. 2003;361(9376):2235-42.
334. Manikandan M, Kannan K. Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of camptothecin encapsulated poly (methacrylic acid-co-methyl methacrylate) nanoparticles. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017;7(03):009-16.
335. Hua S, Marks E, Schneider JJ, Keely S. Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: selective targeting to diseased versus healthy tissue. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*. 2015;11(5):1117-32.
336. Kawano K, Watanabe M, Yamamoto T, Yokoyama M, Opanasopit P, Okano T, ve ark. Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long-circulating polymeric micelles. *Journal of Controlled Release*. 2006;112(3):329-32.
337. Sharma S, Longo WE, Baniadam B, Vernava AM. Colorectal manifestations of endocrine disease. *Diseases of the colon & rectum*. 1995;38(3):318-23.
338. Mecklenburg I, Leibig M, Weber C, Schmidbauer S, Folwaczny C. Recurrent severe gastrointestinal bleeding and malabsorption due to extensive habitual megacolon. *World journal of gastroenterology*. 2005;11(48):7686.
339. Snipstad S, Westrom S, Morch Y, Afadzi M, Aslund AK, de Lange Davies C. Contact-mediated intracellular delivery of hydrophobic drugs from polymeric nanoparticles. *Cancer nanotechnology*. 2014;5(1):8.
340. Han M, He C-X, Fang Q-L, Yang X-C, Diao Y-Y, Xu D-H, ve ark. A novel camptothecin derivative incorporated in nano-carrier induced distinguished improvement in solubility, stability and anti-tumor activity both in vitro and in vivo. *Pharmaceutical research*. 2009;26(4):926-35.

341. Behnke T, Würth C, Hoffmann K, Hübner M, Panne U, Resch-Genger U. Encapsulation of hydrophobic dyes in polystyrene micro-and nanoparticles via swelling procedures. *Journal of fluorescence*. 2011;21(3):937-44.
342. Chen C-H, Chang C-C, Shih T-H, Aljuffali IA, Yeh T-S, Fang J-Y. Self-nanoemulsifying drug delivery systems ameliorate the oral delivery of silymarin in rats with Roux-en-Y gastric bypass surgery. *International journal of nanomedicine*. 2015;10:2403.
343. Ma Y, Fuchs AV, Boase NR, Rolfe BE, Coombes AG, Thurecht KJ. The in vivo fate of nanoparticles and nanoparticle-loaded microcapsules after oral administration in mice: evaluation of their potential for colon-specific delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. 2015;94:393-403.
344. Wanebo HJ, LeGolvan M, Paty PB, Saha S, Zuber M, D'Angelica MI, et al. Meeting the biologic challenge of colorectal metastases. *Clinical & experimental metastasis*. 2012;29(7):821-39.
345. Hong Y, Rao Y. Current status of nanoscale drug delivery systems for colorectal cancer liver metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2019;114:108764.
346. Kotelevets L, Chastre E, Caron J, Mouglin J, Bastian G, Pineau A, et al. A squalene-based nanomedicine for oral treatment of colon cancer. *Cancer research*. 2017;77(11):2964-75.
347. Sharma A, Madhunapantula SV, Robertson GP. Toxicological considerations when creating nanoparticle-based drugs and drug delivery systems. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 2012;8(1):47-69.
348. Jain A, Jain SK, Ganesh N, Barve J, Beg AM. Design and development of ligand-appended polysaccharidic nanoparticles for the delivery of oxaliplatin in colorectal cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010;6(1):179-90.