

**BEYİN GLİOMA TEDAVİSİNDE DOSETAKSEL YÜKLÜ
KATYONİK NANOPARTİKÜLLERİN TASARIMI VE
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**DESIGN AND *İN VİTRO* EVALUATION OF
DOCETAXEL-LOADED CATIONIC NANOPARTICLES FOR
BRAIN GLIOMA TREATMENT**

CEM VARAN

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

: Prof. Dr. Sema Çalış

Üye (Danışman)

: Doç. Dr. Erem Bilensoy

Üye

: Prof. Dr. Filiz Öner

Üye

: Prof. Dr. Füsün Acartürk

Üye

: Doç. Dr. Hakan Eroğlu

ONAY

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

Prof.Dr. Fatma Sevin Düz
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Gamzem'e

BEYİN GLİOMA TEDAVİSİNDE DOSETAKSEL YÜKLÜ KATYONİK NANOPARTİKÜLLERİN TASARIMI VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Cem Varan

ÖZ

Beyin tümörü neoplastik hücrelerin beyin içinde anormal gelişmesidir. Beyin tümörlerinin tedavisindeki en büyük problem kemoterapinin yetersiz kalmasıdır. Hücre kültürü çalışmaları kemoterapi ilaçlarının glioma hücreleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir fakat bu etki *in vivo* çalışmalarda görülmemektedir. Bu nedenle yeni ilaç taşıma stratejilerine ihtiyaç vardır ve nanopartiküller bu alanda umut vadeden sistemlerdir. Polikaprolakton (PCL) nanopartikül hazırlamada kullanılan FDA tarafından tedavi amaçlı kullanım için onaylı biyoparçalanır, biyouyumlu ve non-toksik bir polimerdir. Kitosan (CS) katyonik gruplar içeren lineer bir polisakkarittir ve antikanser, mukoadezif ve immünoadjuvan etkisi vardır. Ayrıca kitosan nanopartikül hazırlamada polimer ve kaplama materyali olarak da kullanılır. Bu çalışmada, beyin glioma tedavisinde cerrahi operasyonu takiben tümörün çıkartıldığı bölgeye implante edilerek kullanılmak üzere farklı polimerik nanopartiküllerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çerçevede PCL baz polimer olarak seçilmiş ve metoksi polietilen glikol-polikaprolakton (mePEG-PCL) kopolimerleri ve yüzey yükünü pozitif hale getirebilmek için de CS kaplamadan yararlanılmıştır. Çalışılan formülasyonların partikül büyüklüğü kullanılan polimerin tipine, hazırlama yöntemine ve diğer teknolojik parametrelere göre değişmekle birlikte 70-270 nm aralığındadır. Bu partikül büyüklüğü aralığı hücre içine giriş ve kanserli dokuda birikme açısından avantajlıdır. Model ilaç Dosetaksel tüm nanopartiküllere yüksek oranda yüklenmiştir. Yapılan hücre kültürü çalışmalarında ise boş nanopartiküller fare fibroblast hücrelerinde sitotoksikite göstermemiş, buna karşın dosetaksel yüklü formülasyonlar RG-2 sıçan glioma hücre hattına karşı yüksek sitotoksik etki göstermiştir. Özellikle CS-mePEG-PCL formülasyonu hem pozitif yüzey yükü hem de CS'in antikanser ve immünojenik özellikleri nedeni ile ilacın çözeltisinden daha yüksek sitotoksikite göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Dosetaksel, PCL, mePEG-PCL, glioma, kitosan, nanopartikül.

Danışman: Doç. Dr. Erem Bilensoy, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı ve Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

DESIGN AND *IN VITRO* EVALUATION OF DOCETAXEL-LOADED CATIONIC NANOPARTICLES FOR BRAIN GLIOMA TREATMENT

Cem Varan

ABSTRACT

Brain tumor is an abnormal growth of neoplastic cells within the brain. The most common problem for treatment of brain tumors is the insufficiency of chemotherapy. Cell culture studies show that chemotherapy drugs are effective against glioma cell lines. However, the same effect didn't occur at *in vivo* studies. Thus, developments of novel drug delivery strategies are necessary and nanoparticles are promising systems in this field. Polycaprolactone (PCL), which is used for nanoparticle preparation, is biodegradable, biocompatible and non-toxic polymer approved by FDA for therapeutic use. Chitosan (CS) is a linear polysaccharide. It contains cationic groups and has anticancer, mucoadhesive and immunoadjuvant effect. It is used for nanoparticle preparation as polymer or coating material. The aim of this study was to develop different polymeric nanoparticles to be applied as implants to the tumor site following surgical operation in brain glioma treatment. In this context, PCL was selected as base polymer and methoxy polyethylene glycol-polycaprolactone (mePEG-PCL) copolymers along with CS coating to render positive surface charge were used. Although the particle size of the formulations varied according to polymer type, preparation technique and other technological parameters, it varies in the range of 70 to 270 nm. This size is favorable in terms of cellular uptake and accumulation in tumor site. Model drug Docetaxel (DOC) is highly loaded into all particle formulations. It was found that in the cell culture studies blank nanoparticles did not show any cytotoxic effect on mouse fibroblast cells, however DOC loaded nanoparticles demonstrated significantly high cytotoxic effect on RG-2 rat glioma cell line. CS-mePEG-PCL formulation in particular shows higher cytotoxicity than the drug solution itself due to its positive surface charge as well the anticancer and immunogenic effects of chitosan.

Keywords: Docetaxel, PCL, mePEG-PCL, glioma, chitosan, nanoparticle.

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Erem Bilensoy, Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Nanotechnology and Nanomedicine Division

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince tüm bilgilerini ve imkânlarını bana cömertçe sunan ve yol gösteren değerli hocam sayın Doç. Dr. Erem BİLENSOY'a,

Deneylerim boyunca benden hiçbir desteğini esirgemeyen ve *in vitro* çalışmalarımıdaki yardımları nedeniyle Dr. Can SARISÖZEN ve Prof. Dr. İmran VURAL'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca dostlukları ve destekleri ile her zaman yanımda olan Ecz. (B.U) Nazlı ERDOĞAR, Bio. Gamze IŞIK ve Kim. Öğ. Hale ÜNAL'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince tüm desteğini hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. S. Ali TUNCEL, Öğretim Üyesi Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ'a ve tüm Nanoteknoloji ve Nanotıp ailesine,

Deney ve tez yazım aşamasında tavsiyeleri, samimiyetleri ve arkadaşlıkları ile her zaman yanımda olan Eczacılık Teknolojisi Bölümü'nün bütün yüksek lisans ve doktora öğrencilerine,

Eczacılık Teknolojisi Bölümü'ndeki değerli hocalarıma, idari personelimize, teknisyenlerimize,

Bıkmadan usanmadan beni bekleyen Hardal'a,

Her zaman yanımda olan Gamzem'e,

Ve karşılıksız sevgileri ve destekleri için Canım annem Hülya ve babam Beyazıt VARAN'a

Sonsuz Sevgi ve Teşekkürlerimi Sunarım

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Beyin	4
2.2. Kanser	6
2.3. Beyin Tümörleri	10
2.3.1. Beyin tümörlerinin epidemiyolojisi	12
2.3.2. Beyin tümörlerinin fizyolojisi	13
2.3.3. Beyin tümörlerinin belirtileri ve tanısı	15
2.3.4. Beyin tümörlerinin tedavisi.....	15
2.3.4.1. Cerrahi tedavi	16
2.3.4.2. Radyoterapi	17
2.3.4.3. Kemoterapi	17
2.4. Beyine İlaç Ulaştırma Stratejileri.....	17
2.4.1. Tümör içi enjeksiyon.....	18
2.4.1.1. Cerrahi sonrası tampon sistemler.....	18
2.4.1.2. Kateter sistemler	20
2.4.2. Damar içi enjeksiyon ve oral.....	21
2.4.3. Kan beyin engeli.....	21
2.4.3.1. Kan beyin engelini aşma stratejileri	23
2.4.3.1.1. Kan beyin engelini yapısını geçici olarak bozmak	23
2.4.3.1.2. Biyolojik geçiş mekanizmalarını taklit etmek.....	23
2.4.3.1.3. Artmış permeabilite ve tutulma etkisi EPR'den yararlanmak	25
2.5. Nanoteknoloji.....	26
2.5.1. Nanotıp.....	27
2.5.1.1. Kanser tedavisinde nanoteknoloji (nanoonkoloji)	29
2.5.2. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler	32

2.5.2.1. Polimerik nanopartiküller	32
2.5.2.1.1. Nanopartikül hazırlama yöntemleri	34
2.5.2.1.2. Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonları	38
2.5.2.1.3. Nanopartiküllerin fiziksel karakterizasyonu	38
2.5.2.1.4. Nanopartiküllerin sterilizasyonu	39
2.6. Dosetaksel.....	39
2.6.1. Genel özellikleri	40
2.6.2. Etki mekanizması	40
2.6.3. Yan etkileri.....	41
2.6.4. Dosetakselin ticari preparatları	42
2.7. Polikaprolakton.....	43
2.7.1. Genel özellikleri	43
2.7.2. Kullanım alanları.....	44
2.7.3. Üstünlükleri.....	44
2.7.4. Türevleri	45
2.7.4.1. mePEG-PCL.....	45
2.8. Kitosan	45
2.8.1. Genel özellikleri	45
2.8.2. Kullanım alanları.....	46
2.8.3. Mukoadezif etkisi.....	46
2.8.4. Antitümöral etkisi	46
2.8.5. İmmünoadjuvan etkisi.....	47
2.8.6. Kaplama materyali olarak kitosan.....	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Gereçler.....	48
3.1.1. Kimyasallar	48
3.1.2. Cihazlar	49
3.1.3. Hücre kültürü malzemeleri.....	50
3.2. Yöntem	51
3.2.1. Stok çözeltilerin hazırlanması	51
3.2.2. Dosetakselin <i>in vitro</i> miktar tayini ve yöntemin validasyonu	51
3.2.2.1. Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması	52
3.2.2.1.1. Analitik yöntemin validasyonu	52
3.2.2.1.2. Doğrusallık	52
3.2.2.1.3. Doğruluk	52

3.2.2.1.4. Kesinlik	53
3.2.2.1.5. Duyarlılık	54
3.2.2.1.6. Özgünlük	54
3.2.2.1.7. Stabilite.....	54
3.2.3. Nanopartiküllerin hazırlanması	55
3.2.3.1. Ön formülasyon çalışmaları	55
3.2.3.1.1. Polimer seçimi	55
3.2.3.1.2. Hazırlama yönteminin seçimi.....	55
3.2.3.1.3. Polimer oranının seçimi	56
3.2.3.1.4. Organik faz/sulu faz oranının seçimi.....	56
3.2.3.1.5. Sürfaktan oranının seçimi.....	56
3.2.3.1.6. Kitosan (Protasan™) oranının seçimi	57
3.2.3.2. Formülasyon çalışmaları	57
3.2.3.2.1. Anyonik nanopartikül formülasyon çalışmaları	57
3.2.3.2.2. Katyonik nanopartikül formülasyon çalışmaları	57
3.2.4. Nanopartiküllerin karakterizasyonu	59
3.2.4.1. Ortalama partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı.....	59
3.2.4.2. Zeta potansiyeli	59
3.2.4.3. Kısa süreli fiziksel stabilite çalışması.....	59
3.2.4.4. Taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleme	59
3.2.4.5. İlaç yükleme etkinliğinin belirlenmesi.....	60
3.2.4.6. <i>In vitro</i> etkin madde salım profilinin incelenmesi	60
3.2.5. <i>In vitro</i> sitotoksosite çalışması	61
3.2.5.1. <i>In vitro</i> güvenilirlik çalışması	61
3.2.5.2. Dosetakselin glioma hücreleri üstüne etkisi.....	62
3.2.5.3. <i>In vitro</i> etkinlik çalışması.....	62
4. BULGULAR	63
4.1. Dosetakselin <i>in vitro</i> Miktar Tayini ve Yöntemin Validasyonu.....	63
4.1.1. Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması	64
4.1.1.1. Doğrusallık	65
4.1.1.2. Doğruluk	66
4.1.1.3. Kesinlik	67
4.1.1.4. Duyarlılık	69
4.1.1.5. Özgünlük	69
4.1.1.6. Stabilite.....	72

4.2. Ön Formülasyon Çalışmaları.....	72
4.2.1. Polimerin seçimi	73
4.2.2. Yöntem seçimi.....	74
4.2.3. Polimer oranının seçimi.....	76
4.2.4. Organik faz/sulu faz oranının seçimi	77
4.2.5. Sürfaktan oranının seçimi.....	79
4.2.6. Kitosan (Protasan™) oranının seçimi.....	82
4.3. Formülasyon Çalışmaları.....	84
4.3.1. Ortalama partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı.....	86
4.3.2. Zeta potansiyeli	88
4.3.3. Kısa süreli fiziksel stabilite çalışması.....	90
4.3.4. Taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleme çalışmaları.....	92
4.3.5. İlaç yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi.....	93
4.3.6. <i>In vitro</i> etkin madde salım çalışmalarının değerlendirilmesi	94
4.5. <i>In vitro</i> Sitotoksosite Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	96
4.5.1. <i>In vitro</i> güvenilirlik çalışmalarının değerlendirilmesi.....	96
4.5.2. Dosetakselin glioma hücreleri üstüne etkisi değerlendirilmesi.....	97
4.5.3. <i>In vitro</i> etkinlik çalışmalarının değerlendirilmesi	99
5. TARTIŞMA.....	102
5.1. Yöntemin Validasyonun Değerlendirilmesi	102
5.2. Ön Formülasyon ve Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	103
5.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi	109
5.4. İlaç Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi	110
5.5. <i>In vitro</i> Etkin Madde Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	111
5.6. <i>In vitro</i> Sitotoksosite Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	112
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	114
KAYNAKLAR.....	117
EKLER	129
ÖZGEÇMİŞ	139

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Beyin'in yapısı	5
Şekil 2.2. Nöron çeşitleri	5
Şekil 2.3. Nöroglia türleri	5
Şekil 2.4. Kansereleşen hücrelerin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.5. Amerikan Kanser Topluluğu verilerine göre 2012 yılında tahmini yeni kanser vakası ve tahmini ölüm oranlarının kanser türlerine göre dağılımı.....	8
Şekil 2.6. Dünya çapında kadın ve erkeklerde en sık görülen kanser türlerinin ülkelere göre dağılımı	9
Şekil 2.7. Normal damarlanma ve tümörlü bölgedeki damarlanma arasındaki farkların şematik gösterimi.....	14
Şekil 2.8. Kraniotomi prosedürünün şematik gösterimi	16
Şekil 2.9. Gliadel® tamponların uygulanması	19
Şekil 2.10. Ommaya rezervuarının şematik gösterimi	20
Şekil 2.11. Beyin kılcal damarları ile diğer dokulardaki kılcal damar yapısının karşılaştırmalı şematik gösterimi	22
Şekil 2.12. Kan Beyin Engelini geçiş mekanizmalarının toplu gösterimi.....	24
Şekil 2.13. Artmış permeabilite ve tutulma etkisinin şematik gösterimi	26
Şekil 2.14. Nanoteknolojinin başlıca uygulama alanları	27
Şekil 2.15. Nanometre boyutundaki biyolojik sistemler ve nano yapılar	28
Şekil 2.16. Polimerik nanopartiküllerin şematik gösterimi A)Nanoküre B)Nanokapsül.....	33
Şekil 2.17. Nanopartikül hazırlama yöntemleri	34
Şekil 2.18. A) Paklitaksel ve B) Doksetakselin kimyasal yapısı ve farklılıkları	40
Şekil 3.1. Nanopartikül hazırlamada kullanılan nanoçöktürme yönteminin şematik gösterimi	58
Şekil 4.1. 20 µM'lık DOC çözeltisine ait kromatogram	63
Şekil 4.2. 100 µM'lık DOC çözeltisine ait kromatogram	63
Şekil 4.3. DOC'in kalibrasyon doğrusu.....	64
Şekil 4.4. 1-200 µg/L konsantrasyon aralığında bulunan 9 farklı çözeltinin HPLC analizi ile elde edilen piklerinin toplu gösterimi	65
Şekil 4.5. Doğruluk parametresi için hazırlanan 150 µg/L konsantrasyonluk 6 seri çözeltinin HPLC analizi ile elde edilen piklerinin toplu gösterimi.....	67
Şekil 4.6. DOC'in HPLC piki.....	70
Şekil 4.7. PCL'nin HPLC piki.....	70
Şekil 4.8. mePEG-PCL'nin HPLC piki	71
Şekil 4.9. CS'nin HPLC piki.....	71

Şekil 4.10. 25 µg/L konsantrasyonluk çözeltinin 0. ve 48. saatlerdeki HPLC analizi ile elde edilen piklerinin birlikte gösterimi	72
Şekil 4.11. mePEG-PCL (5,000:5,000) ve mePEG-PCL (5,000:13,000) nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi.....	73
Şekil 4.12. mePEG-PCL (5,000:5,000) ve mePEG-PCL (5,000:13,000) nanopartiküllerin zeta potansiyeli	74
Şekil 4.13. Farklı yöntemlerle hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi.....	75
Şekil 4.14. Farklı yöntemlerle hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli.....	75
Şekil 4.15. Farklı polimer oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi.....	76
Şekil 4.16. Farklı polimer oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli.....	77
Şekil 4.17. Farklı organik faz/sulu faz oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi.....	78
Şekil 4.18. Farklı organik faz/sulu faz oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli.....	78
Şekil 4.19. Farklı sürfaktan oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi.....	80
Şekil 4.20. Farklı sürfaktan oranları ile hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi.....	80
Şekil 4.21. Farklı sürfaktan oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli.....	81
Şekil 4.22. Farklı sürfaktan oranları ile hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli.....	81
Şekil 4.23. Farklı kitosan oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi.....	83
Şekil 4.24. Farklı kitosan oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli.....	83
Şekil 4.25. Hazırlanan anyonik ve katyonik nanopartiküllerin şematik gösterimi .	85
Şekil 4.26. Boş PCL, mePEG-PCL, CS-PCL ve CS-mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi.....	87
Şekil 4.27. DOC yüklü PCL, mePEG-PCL, CS-PCL ve CS-mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi.....	87
Şekil 4.28. Boş PCL, mePEG-PCL, CS-PCL ve CS-mePEG-PCL nanopartiküllerinin zeta potansiyeli.....	89
Şekil 4.29. DOC yüklü PCL, mePEG-PCL, CS-PCL ve CS-mePEG-PCL nanopartiküllerinin zeta potansiyeli.....	89
Şekil 4.30. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin 30 gün boyunca farklı zaman aralıklarındaki ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi.....	91

Şekil 4.31. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin 30 gün boyunca farklı zaman aralıklarındaki zeta potansiyeli	91
Şekil 4.32. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin toplu SEM görüntüsü; A: PCL nanopartiküller, B: mePEG-PCL nanopartiküller, C: CS-PCL nanopartiküller, D: CS-mePEG-PCL nanopartiküller	92
Şekil 4.33. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin % Enkapsülasyon Etkinliği (%EE).....	93
Şekil 4.34. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin % Yükleme Kapasitesi (%LC).....	94
Şekil 4.35. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin salım profilinin toplu gösterimi.....	95
Şekil 2.36 Anyonik ve katyonik boş nanopartiküllerin L929 hücreleri üstüne 24 saatlik etkisi	96
Şekil 2.37 Anyonik ve katyonik boş nanopartiküllerin L929 hücreleri üstüne 48 saatlik etkisi	97
Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlardaki dozetaksel çözeltilerinin RG-2 hücreleri üstüne 24 saatlik etkisi	98
Şekil 4.39. Farklı konsantrasyonlardaki dozetaksel çözeltilerinin RG-2 hücreleri üstüne 48 saatlik etkisi	98
Şekil 4.40. İlaç yüklü ve boş anyonik ve katyonik nanopartiküllerin RG-2 hücreleri üstüne 24 saatlik etkisi	100
Şekil 4.41. İlaç yüklü ve boş anyonik ve katyonik nanopartiküllerin RG-2 hücreleri üstüne 48 saatlik etkisi	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. DOC'in doğrusal regresyon verileri	64
Çizelge 4.2. Doğruluk parametresi için hazırlanan çözeltilerin % geri kazanım, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri.....	66
Çizelge 4.3. Tekrar edilebilirlik parametresi için hazırlanan çözeltilerin ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri.....	67
Çizelge 4.4. Tekrar elde edilebilirlik parametresi için hazırlanan çözeltilerin ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri.....	68
Çizelge 4.5. Farklı günlerde hazırlanan çözeltilerin ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri	68
Çizelge 4.6. LOD ve LOQ değerleri	69
Çizelge 4.7. Farklı sürfaktan oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri .	79
Çizelge 4.8. Farklı sürfaktan oranları ile hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri.	79
Çizelge 4.9. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılacak parametreler.....	84
Çizelge 4.10. PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerleri	86
Çizelge 4.11. PCL ve mePEG nanopartiküllerinin zeta potansiyeli değerleri	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%EE	Yüzde Enkapsülasyon Etkinliği
%LC	Yüzde Yükleme Etkinliği
a	Ağırlık
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BBT	Birincil Beyin Tümörü
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
CS	Kitosan
dk	Dakika
DOC	Dosetaksiel
EVAc	Etilen vinil asetat
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
h	Hacim
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
İBT	İkincil Beyin Tümörü
KBE	Kan Beyin Engeli
kV	Kilovolt
mePEG-PCL	Metoksi polietilen glikol-polikaprolakton
mL	Mililitre
mm	Milimetre
M _n	Sayıca Ortalama Molekül Ağırlığı
MPS	Mononükleer Fagositik Sistem
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
mV	Milivolt
M _w	Kütlece Ortalama Molekül Ağırlığı
N	Normal
nm	Nanometre

nM	Nanomolar
°C	Santigrat Derece
PCL	Polikaprolakton
PCPP-SA	Polianhidrit poli[bis(p-karboksifenoksi) propan-sebasik asit]
PDI	Polidispersite İndeksi
PEG	Polietilen glikol
PF-68	Pluronik® F68
PGA	Poliglikolik asit
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Polilaktikglikolik asit
PSS	Periferal Sinir Sistemi
PVA	Polivinil Alkol
r ²	Korelasyon Katsayısı
RES	Retikuloendotelyal Sistem
rpm	dakika başı devir
S/Y	Su/Yağ
S/Y/S	Su/Yağ/Su
SS	Standart Sapma
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
VK %	Varyasyon Katsayısı
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
x	ortalama
Y/S	Yağ/Su
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Beyin ve merkezi sinir sistemi tümörleri tüm kanser türleri içinde yetişkinlerde %1'lik bir oranda görülmesine karşın çocukluk çağı kanserleri içinde %27'lik bir oranla lösemiden sonra karşılaşılan en yaygın kanser türüdür. Beyin kanseri günümüz yaşam şartlarında görülme sıklığının artmasının yanı sıra oldukça yayılgı, hızlı gelişen ve öldürücü bir kanser türüdür. Bu tümörler en çok sinir sistemi yardımcı hücreleri olan nöroglia hücrelerinden köken alırlar. Örneğin glioblastoma multiforme, beyin nöroglia hücrelerinde oluşan bir beyin tümörüdür. Oldukça hızlı ilerleyen ve öldürücü olan bu kanser türü tanısı konulan hastaların %50'si ilk yıl, %25'i ise 2. yıl hayatını kaybetmektedir. Günümüzde beyin tümörlerinin tedavisinde en sık tercih edilen yöntem cerrahi müdahaledir. Kemoterapi ve radyoterapi ise genellikle destekleyici tedavi konumundadır. Kemoterapiden istenildiği derecede yararlanılamamasının en önemli nedeni kan beyin engeli nedeni ile beyinin vücuttaki diğer organlara göre çok daha ulaşılmaz bir organ olmasıdır. Oral yolla veya damar içi enjeksiyon ile kana geçen ilaçlar beyine ulaşmak için kan beyin engeli denilen özelleşmiş bir endotel duvarını geçmek zorundadır. Kemoterapi ilaçlarının yalnızca %1'lik kısmı antitümöral etkinliğini kaybetmeden bu engeli geçebilmektedir. Bu nedenle beyin tümörlerinde oral ve parenteral olarak kullanılan ilaçların etkinliği çok düşüktür. Tedavi etkinliğinin artırılması açısından umut vadeden bir yöntem ise kemoterapi ilaçlarının doğrudan tümörlü dokuya verilmesidir. Özellikle yapılması mutlaka gerekli olan cerrahi operasyon sonrası tümörün çıkarıldığı dokuya, nüks veya ilerlemeyi önlemek amacıyla, kemoterapötik ilaç içeren, hücre içine ilaç taşınması ve ilaç için depo oluşturma görevlerini yerine getirebilecek bir implante sistemin uygulanmasının tedavinin etkinliğini oldukça artıracağı düşünülmektedir.

Kemoterapide kullanılan sitotoksik veya sitostatik ilaçların en önemli sorunu vücuttaki biyoyararlanımının düşük olması ve ilacın gösterdiği sitotoksitenin seçici olmamasıdır. Yani ilaçlar kanserli hücreleri öldürürken aynı zamanda sağlıklı hücreleri de öldürmektedir. Bu soruna son zamanlarda nanoteknolojik yaklaşımlarla çözüm aranmaktadır. Yeterli miktarda ilacın tümör dokusuna ulaşması ve kanserli hücrelere spesifik sitotoksitenin göstermesi için boyutları 50-400 nm arasında olması gerekmektedir. Ayrıca katyonik yüklü nanopartiküllerin

negatif yüklü hücre yüzeyi ile etkileşerek hücre içine girişinin kolaylaştığı, böylece ilacın tedavi etkinliğini artırdığı bilinmektedir.

Polimerik nanopartiküllerin formülasyonunda sıklıkla kullanılan polikaprolakton (PCL), insanda terapötik ve implante sistemlerde kullanımı için Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi'nden (FDA) onay almış ender polimerlerden biridir. Özellikle insan vücudu için toksik olmaması ve biyoparçalanır olması bu polimerin önemli avantajlarından. Ayrıca PCL'nin polietilen glikol (PEG) ile kopolimerizasyonu sonucunda metoksi polietilen glikol-polikaprolakton (mePEG-PCL) kopolimeri elde edilir. Bu işlem sistematik uygulamalarda nanopartikülün vücut içine verildikten sonra proteinlerce tanınmasına ve mononükleer fagositik sistem (MPS) tarafından alınarak vücuttan uzaklaştırılmasına engel olmaktadır. Yüzey yükü pozitif tasarlanabilen mePEG-PCL nanopartikülleri boyutları nedeniyle tümörlü dokularda birikebilecek, yüzeylerindeki pozitif yük ise hücre içine girişlerini kolaylaştıracak daha etkin ve güvenilir tedaviye olanak verebilecektir. mePEG-PCL nanopartiküllerin yüzeyinin katyonik hale getirilmesinde kitosan (CS) kaplamadan faydalanılacaktır. Biyoparçalanır ve biyoyumlu bir polimer olan kitosan, katyonik polimerler içinde toksisite göstermeyen ender polimerlerdendir. Kitosanın mukozal uygulamalardaki bir başka üstünlüğü ise mukoadezif özelliğidir. Ayrıca kaspaz-3 aktivatörü olarak antikanser etkinliği kanıtlanmış bir polimer olması sebebiyle mePEG-PCL nanopartiküllerin antikanser etkinliğine sinerjik katkıda bulunacağı düşünülmektedir. İmmün cevap oluşturma özelliği kitosanın bir diğer önemli özelliğidir. Kitosanın tüm bu özellikleri ile tedavinin etkinliğinin artıracığı düşünülmektedir.

Bu tezde, glioma tedavisinde post operatif kullanılmak üzere antikanser model ilaç (dosetaksel) yüklü katyonik ve anyonik PCL nanopartikülleri hazırlanmıştır. Anyonik nanopartiküllerin hazırlanmasında PCL ve onun bir türevidir olan mePEG-PCL polimerleri kullanılmıştır. Katyonik nanopartiküller ise hazırlanan anyonik nanopartiküllerin kitosan ile kaplanmasıyla elde edilmiştir. İlaç yüklü ve boş formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, yüzey yükü (zeta potansiyeli), yüzey morfolojisi, ilaç yükleme kapasitesi ve *in vitro* salım profili gibi karakteristik özellikleri incelenmiştir. Formülasyonların antikanser etkinliği ve sitotoksitesinin belirlenmesi amacı ile farklı hücre hatlarıyla hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

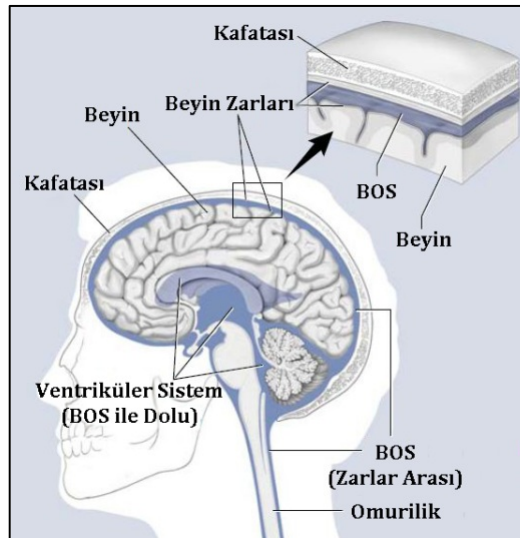
Bu tezin amacı beyin ve merkezi sinir sistemi tümörlerinin tedavisinde cerrahi operasyonu takiben tümörün çıkartıldığı bölgeye implante edilerek kullanılacak etkin ve güvenilir ilaç formülasyonlarının geliştirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beyin

İnsanlarda sinir sistemi Merkezi Sinir Sistemi (MSS) ve Periferal Sinir Sistemi (PSS) olmak üzere iki kısımdan oluşur. MSS ise beyin ve omurilik olmak üzere iki kısmı kapsamaktadır. Beyin veya yunanca adıyla encephalon (kafa içi) sinirsel iletişimin yönetim merkezidir. Omurgalı hayvanların tümünde bulunan bu organ diğer tüm organlardan daha karmaşık bir yapıya sahiptir. İstemli ve istemsiz yapılan tüm hareketler doğrudan beyinin kontrolü altındadır. Ayrıca beyin duyu (görme, işitme, dokunma, tatma ve koklama), hafıza, kişilik ve duygudan sorumlu bir organdır.

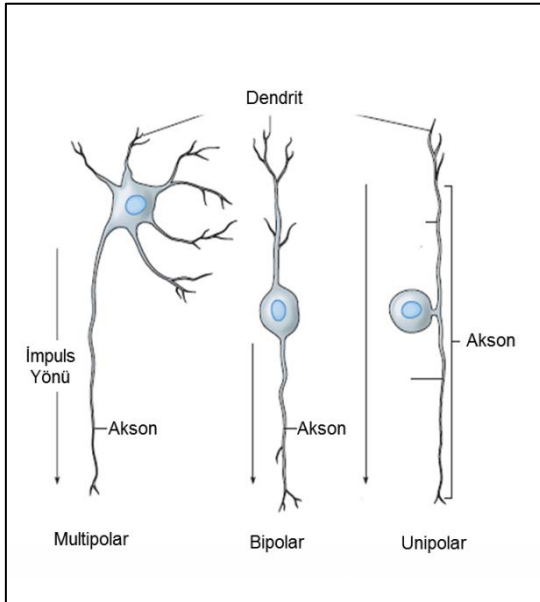
MSS ile diğer tüm organlar ve dokular arasında sinir hücrelerinin oluşturduğu bir iletişim ağı vardır. Bu ağ aracılığıyla beyin vücuttaki tüm hareket ve değişimleri kontrolü altında tutmaktadır. Göz gibi beyine yakın organlar bu sinir hücresi ağı sayesinde doğrudan bağlı olmasında karşın, vücudun diğer bölgeleri omurga ile dolaylı olarak bağlıdır. Beyinin bu denli önemli bir organ olması onu diğer organlardan ayıran çeşitli koruma mekanizmalarının içinde olmasına neden olmuştur. Beyin en dıştan kafatası denilen güçlü bir kemik doku ile darbelere karşı korunmaktadır. Kafatası ve beyin arasında tampon görevi gören beyin zarları vardır. Ayrıca beyin ve omurilik olmak üzere tüm merkezi sinir sistemi elemanları beyin omurilik sıvısı (BOS) denilen özelleşmiş bir sıvı ile doludur (Şekil 2.1.).



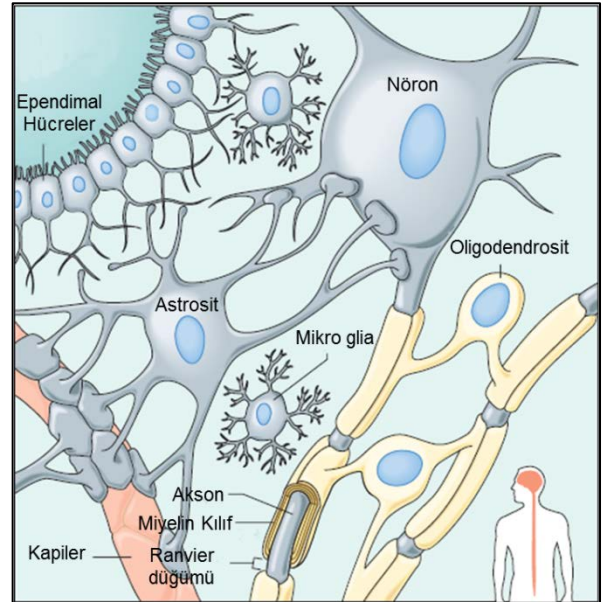
Şekil 2.1. Beyin'in yapısı [1].

Histolojik olarak incelendiğinde sinir sistemi hücreleri nöron ve nöroglialar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır;

Nöronlar sinir sisteminin fonksiyonel birimleridir. Tüm sinirsel iletişimde bu hücreler sorumludur. Oldukça farklılaşmış hücreler olan nöronlar temelde dendrit ve akson olmak üzere iki kısımdan oluşur. Bu hücrelerde sinirsel ileti dendrit algılanır ve akson aracılığıyla iletilir. Ayrıca nöronlar akson ve dendrit şekillerine göre farklılık gösterirler ve bu nedenle farklı isimlendirmeler söz konusudur (Şekil 2.2.). Bu hücrelerdeki en ufak bir değişim bile kişinin hayatını ciddi etkileyecek sorunlar doğurabilir.



Şekil 2.2. Nöron çeşitleri [3].



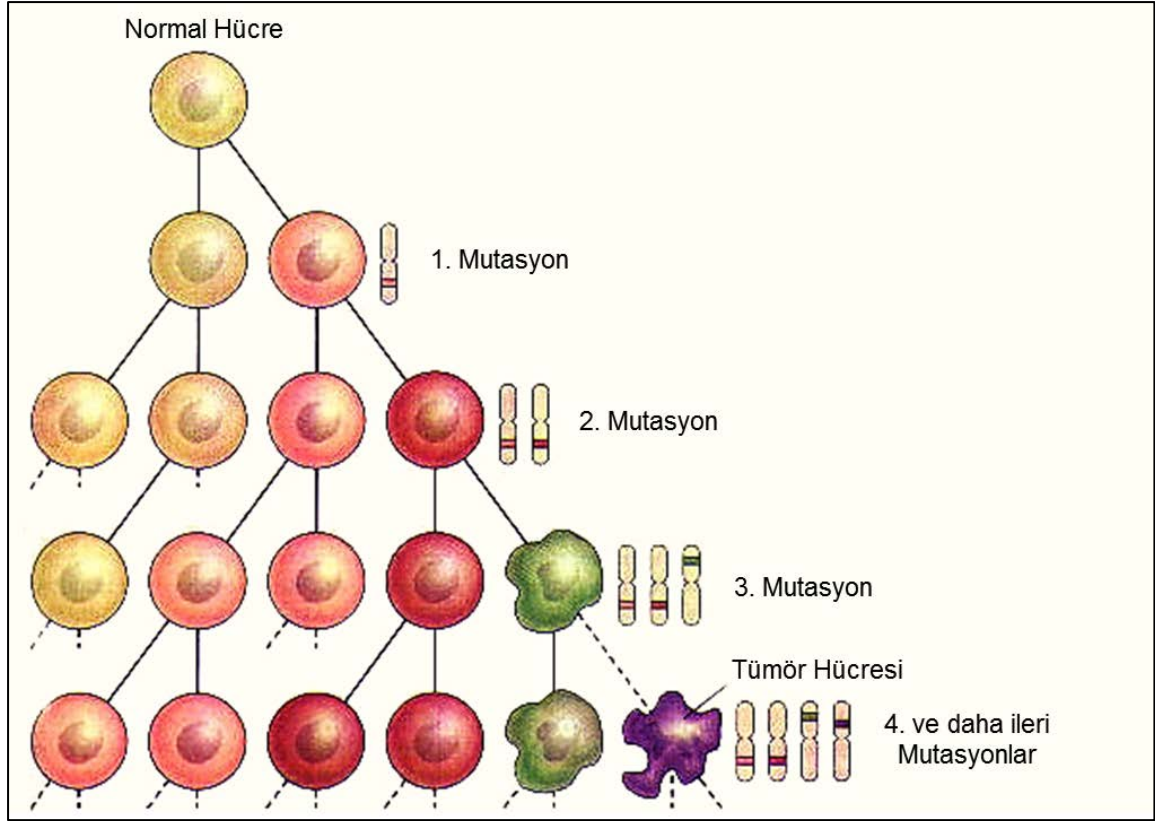
Şekil 2.3. Nöroglia türleri [3].

Nöroglialar, sinir sisteminin yardımcı elamanlarıdır. Görev ve yapı olarak çok farklı hücreleri içine alan geniş bir gruptur. Astrozit, oligodendrosit, ependimal, radial hücre, Schwann hücreleri, mikro glial hücreler ve uydu hücreler bu gruba girmektedir (Şekil 2.3.). Her hücre şekil ve görev bakımından MSS'nin değişik ihtiyaçlarının karşılamaktadır. Astrozitler veya astrioglia MSS'de en çok bulunan glial hücrelerdir. Yıldız biçiminde olan bu hücrelerin nöronlara yapısal destek olmak, besin sağlamak, iyon dengesini kurmak ve darbe ve yaralanmalara karşı onarıcı görevleri vardır. Astrozitlerin bir diğer önemli görevi ise endotel hücrelere destek olarak kan beyin engelinin (KBE) bütünlüğünü sağlamaktır. Oligodendrositler

veya oligodendrogliaların en önemli görevi MSS nöronlarının akson kısmını sararak miyelin kılıf oluşturmaktadır. Miyelin kılıf sayesinde sinirsel iletimin hızının artmaktadır. Schwann hücreleri ise PSS nöronları için aynı görevi yapmaktadır. Ependimal hücreler beyinin ventriküler sistemi ve omuriliği saran ince bir membran olan ependimayı oluşturur. Radial hücreler ya da radiogialar embriyonik dönemde MSS'in gelişmesinde anahtar rol oynayan hücrelerdir. Mikroglialar ise MSS'nin makrofajlarıdır. Herhangi bir patojenik durumda MSS'i korumla görevlidirler. Uydu hücreler PSS nöronlarının gangliyon kısımlarını saran hücrelerdir ve buradaki mikro çevrenin korunmasında sorumludurlar [1-4].

2.2. Kanser

Amerika Ulusal Kanser Enstitüsüne (National Cancer Institute) göre kanser kontrol edilemeyen anormal hücre bölünmesi ve bu hücrelerin diğer dokuları istila etmesi sonucu oluşan bir hastalıklar topluluğudur [5]. Vücut hücrelerinde doğal veya çevresel nedenlerden ötürü çeşitli DNA hasarları oluşmaktadır. Bu hasarların birikmesi sonucunda hücreler köken aldıkları hücrelerden farklılaşır ve çoğalarak tümör olarak adlandırılan kitleleri oluştururlar (Şekil 2.4.). Bu tümörler kanserleşme sürecine girebileceği gibi doğal yollarla vücuttan elimine de olabilirler. Her tümör kanser değildir. Tümörleşen hücreler eğer çevre dokuları istila etmiyor, vücudun diğer bölgelerine sıçramıyor ve bulunduğu bölgedeki vücut fonksiyonların etkilemiyor ise iyi huylu ya da benign tümörler olarak adlandırılırlar. Eğer tümörleşen hücreler buldukları bölgedeki dokuları işgal ediyor, kan ve lenfatik sistem yardımıyla vücudun diğer bölgelerine sıçrıyor veya kontrolsüz bölünmeye devam ediyor ise kötü huylu (malign) tümörler ya da kanser olarak tanımlanırlar [6-9].

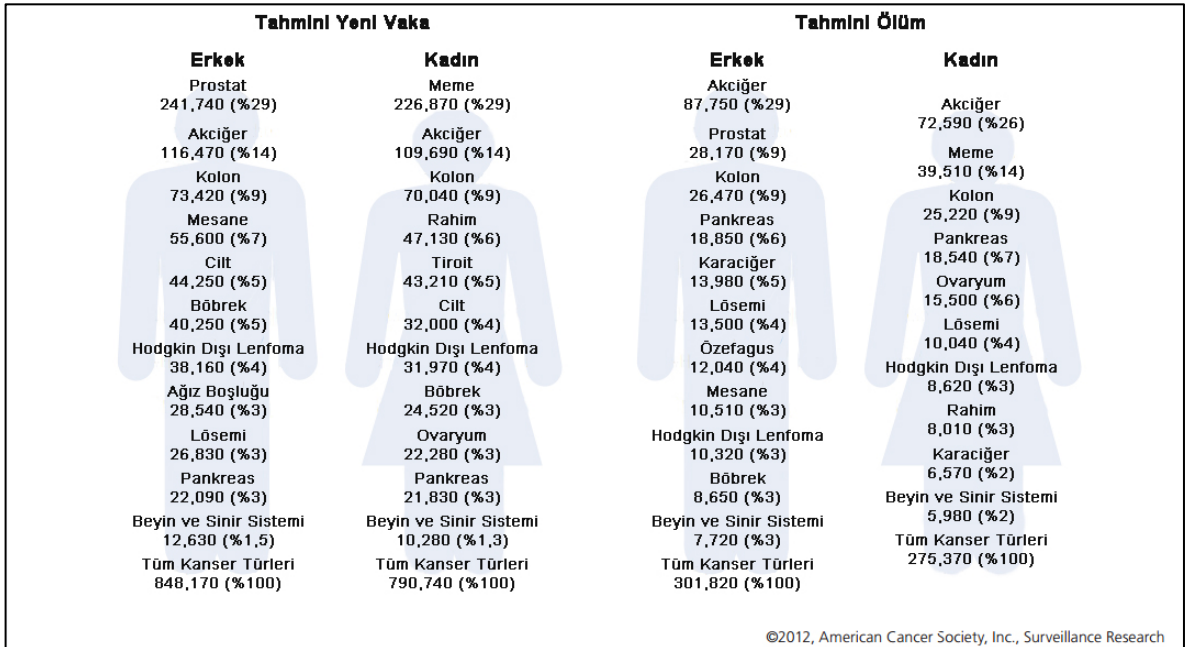


Şekil 2.4. Kanserleşen hücrelerin şematik gösterimi [10].

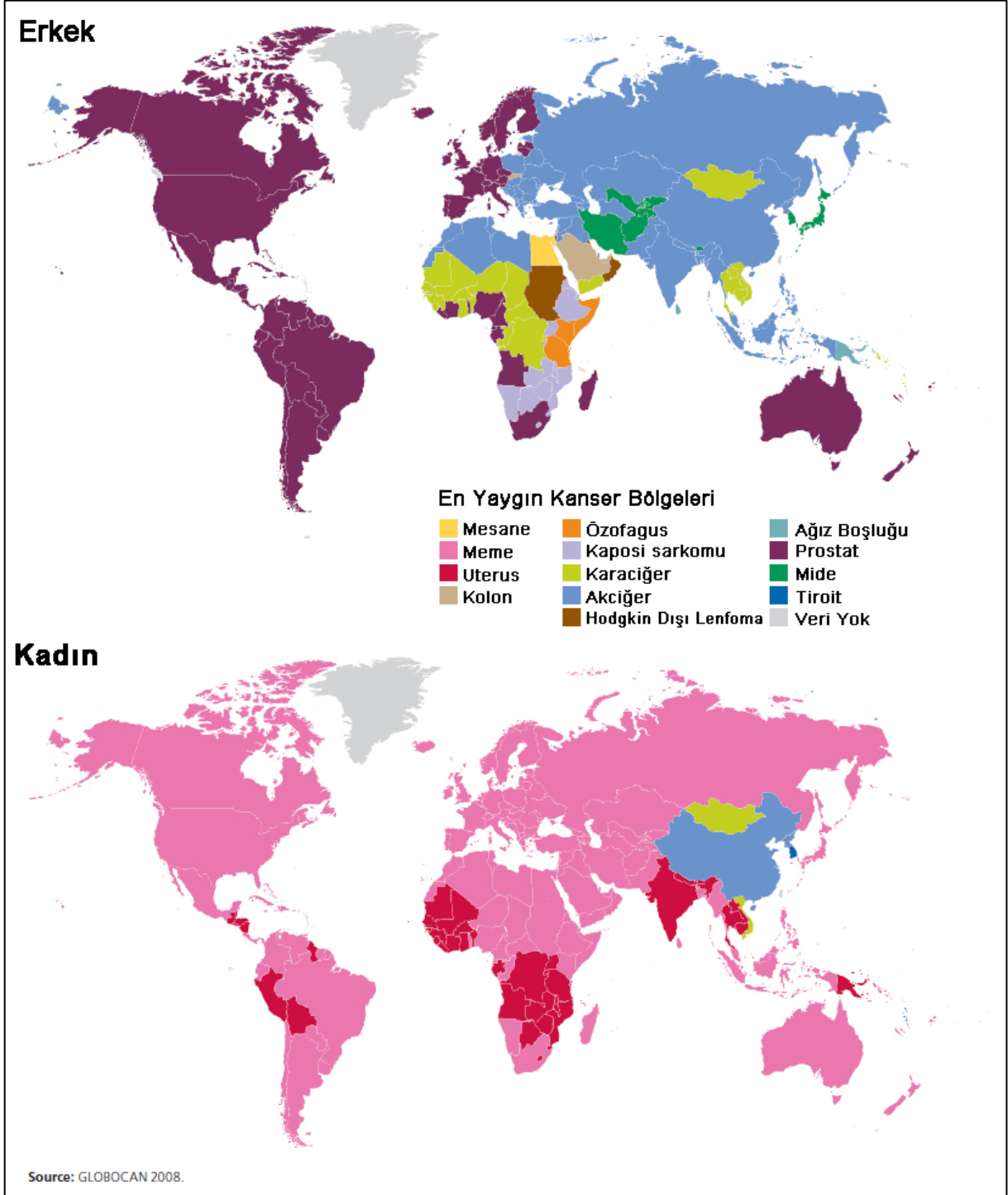
Günümüzde hastalık kaynaklı ölümlerin büyük bir kısmı kanser ve buna bağlı hastalıklardan kaynaklanmaktadır. 2004 yılında yapılan bir çalışmaya göre dünya çapında 8,923,000 kişi (hastalık kaynaklı ölüm nedenlerinin %15.1'i) kalp hastalıkları nedeniyle ölmekteyken bunu 7,424,000 kişi (hastalık kaynaklı ölüm nedenlerinin %12.6'sı) ile kanser izlemektedir. Gelişmiş ülkelerde ise kanser kaynaklı ölümler (2,154,000 kişi ile hastalık kaynaklı ölümlerin %26.6'sı) kalp hastalıklarını (1,563,000 kişi ile hastalık kaynaklı ölümlerin %19.3'ü) geride bırakarak en sık karşılaşılan ölüm nedeni durumundadır [11]. Amerikan Kanser Derneği (American Cancer Society) araştırmalarına göre 2012 yılında Amerika'da 1,638,910 yeni kanser vakası olacağı ve 577,190 Amerikalının kanser nedeniyle hayatını kaybedeceği tahmin edilmektedir. Kanser tiplerinin görülme sıklığı, ilerleme hızı, tanı ve tedavi etkinliği kendi aralarında farklılık gösterebildiği gibi hastanın ırkı, cinsiyeti, genetik geçmişi, yaşı ve sosyo-ekonomik durumuna bağlı olarak da farklılık göstermektedir. Örneğin erkeklerde en sık karşılaşılan kanser tipi prostat (tüm kanser vakalarının %29'u) kanseri iken kadınlarda en sık

karşılaşılan kanser tipi meme kanseridir (tüm kanser vakalarının %29'u). Buna kaşın her iki cinsiyet için en öldürücü kanser tipi Akciğer kanseridir (Tüm kansere bağılı ölümlerin, erkeklerde %29'u kadınlarda %26'sı) (Şekil 2.5.) [12]. 2008 yılı verilerine göre ise en sık görülen kanser tipleri dünyanın farklı bölgelerinde farklılık göstermektedir (Şekil 2.6.) [11].

Çocukluk çağıında, kaza dışı ölümlerden sonra görülen en sık ölüm nedeni kanser kaynaklıdır. 2012 yılında Amerika'da 1,340 çocuğun (0-14 yaş) kanser nedeniyle öleceğı tahmin edilmektedir. Çocukluk çağı (0-14 yaş) kanserleri içinde ise en sık görülen kanser Lösemidir (Tüm kanser vakalarının %34'ü), bunu Beyin ve Diğer Sinir Sistemi Kanserleri (Tüm kanser vakalarının %27'si) izlemektedir [12].



Şekil 2.5. Amerikan Kanser Topluluğı verilerine göre 2012 yılında tahmini yeni kanser vakası ve tahmini ölüm oranlarının kanser türlerine göre dağılımı [12].



Şekil 2.6. Dünya çapında kadın ve erkeklerde en sık görülen kanser türlerinin ülkelere göre dağılımı [11].

2.3. Beyin Tümörleri

Beyin Tümörleri köken aldıkları hücre türüne göre Birincil Beyin Tümörleri (BBT) ve İkincil Beyin Tümörleri (İBT) olmak üzere ikiye ayrılır. Birincil Beyin Tümörleri merkezi sinir sistemi hücreleri olan nöron veya nörogliaların kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalması sonucunda beyinde oluşan anormal doku kütleleridir. Bu nedenle birincil beyin tümörleri doğrudan beyin içinde oluşan ve gelişen olgulardır. İkincil Beyin Tümörleri ise vücudun başka bir dokusunda gelişen tümör hücrelerinin (genellikle akciğer, meme, kolon ve böbrek kanser hücrelerinin) beyine göç etmesi ve buraya yerleşerek gelişmesi sonucunda oluşan tümörlerdir. Kan Beyin Engeli İkincil Beyin Tümörlerinin oluşmasında sınırlayıcı bir rol oynamasına karşın her yıl yaklaşık 170,000 hastaya İBT tanısı konulmaktadır. İBT beyin hücrelerinden köken almadığı için genellikle köken aldığı kanser hücresinin özelliklerini göstermektedir ve ilgili kanser türüyle ilişkilendirilir. Beyin Tümörleriyle ilgili araştırmalar ise köken aldığı hücrelerin MSS hücreleri olması nedeniyle BBT üstüne yoğunlaşmıştır [13, 14].

Birincil Beyin Tümörleri genellikle MSS yardımcı hücreleri olan nöroglialardan, nadirense MSS fonksiyonel hücreleri olan nöronlardan köken almaktadır. Nöronlar oldukça farklılaşmış hücrelerdir bu nedenle bu hücrelerin genetik materyalindeki en ufak bir değişiklik kanserleşme yerine hücrenin ölümüne neden olmaktadır. Nöroglia hücreleri nöronların aksine çoğalabilen, farklılaşabilen, nispeten daha az özelleşmiş hücrelerdir bu nedenle de kanserleşmeye daha yatkın hücrelerdir. Günümüzde BBT büyük bir kısmı nöroglial hücrelerden köken almaktadır [1].

BBT isimlendirilmesi ve sınıflandırılmasında birçok farklı yaklaşım olmakla birlikte BBT'in isimlendirilmesinde genellikle köken alınan hücre veya bölge adı kullanılmaktadır. Örneğin glial bir hücre tipi olan astrositlerin kanserleşmesi sonucunda astrositoma, oligodendrosit hücrelerindeki kanserleşme sonucunda oligodendroglioma, beyin zarında oluşan kanserleşmeye ise Beyin Zarı Tümörleri olarak isimlendirilmektedir [13, 15].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) beyin tümörlerini köken aldıkları hücre, farklılaşma düzeyi, çoğalma ve yayılma davranışına göre 4 evreye ayırmıştır;

1. **Evre Tümörler:** Hücreler sağlıklı hücelere benzer, yavaş gelişir ve sınırları bellidir. Genellikle yayılmacı olmayan iyi huylu (benign) tümörlerdir (Örn: pilositik astrositoma).
2. **Evre Tümörler:** Hücreler sağlıklı hücelere 1. evre tümörlerine kıyasla daha az benzer. Kötü huylu (malign) tümörlerdir (Örn: düşük dereceli astrositoma).
3. **Evre Tümörler:** Hücreler sağlıklı hücelerden oldukça farklılaşmıştır. 1. ve 2. evre tümörlerine kıyasla sağlıklı hücelere daha az benzer. Kötü huylu (malign) tümörlerdir (Örn: anaplastik astrositoma).
4. **Evre Tümörler:** Hücreler sağlıklı hücelere neredeyse hiç benzemez ve çok hızlı gelişirler. Tümör kütesinin merkezinde ölü hücre bölgeleri vardır ve kan damarları bakımından zengindir. Hayatta kalma süresi en düşük ve en yayılmacı kötü huylu (malign) tümörlerdir (Örn: glioblastoma multiforme (GBM)) [1, 16] .

Birincil beyin tümörlerin kendi içinde iyi huylu (benign) tümörler ve kötü huylu (malign) tümörler veya beyin kanserleri olmak üzere ikiye ayrılır. İyi huylu beyin tümörleri kanser hücresi içermez, cerrahi operasyon ile çıkartılabilir ve tekrar etme riski düşüktür. Ancak iyi huylu beyin tümörleri diğer dokulardaki iyi huylu tümörlere göre çok daha tehlikelidir. Bunun en önemli nedeni beyinin kafatası ile sınırlı bir alan içinde bulunmasıdır. Kafatasının sınırlayıcı bu etkisi nedeniyle buradaki hacimsel en ufak bir artış bile ciddi sorunlara neden olabilmektedir. Kafatası içinde gelişen iyi huylu tümör kütleleri beyine baskı yaparak beyinin normal fonksiyonlarını engellemekte nöronların fonksiyonlarını gerçekleştirememesine hatta hücre ölümlerine neden olarak hastanın hayatını ciddi riske sokmaktadır. Ayrıca diğer iyi huylu tümörlerde olduğu gibi birincil beyin tümörlerinin de her zaman kötü huylu beyin tümörlerine dönüşme riski vardır.

Kötü huylu beyin tümörleri veya diğer adıyla beyin kanserleri hasta hayatı için oldukça tehlikeli kanserlerdir. Bu beyin tümörleri iyi huylu beyin tümörlerinin aksine hızlı ve yayılmacı bir şekilde gelişerek çevre dokuları istila eder ve nadiren diğer organlara metastaz yapar [1, 13, 17]. Kötü huylu beyin tümörlerinin tedavisi

oldukça güçtür ve ileri evrelerinde (Örn: glioblastoma multiforme) hayatta kalma süresi tanıdan sonra 1 yıla kadar düşmektedir [18].

2.3.1. Beyin tümörlerinin epidemiyolojisi

Birincil Beyin Tümörleri tüm kanser tipleri içinde yetişkinlerde %1'lik bir kesim kapsamına karşın çocuklarda %27'lik bir oranla lösemiden sonra 2. sıklıkla görülen kanser tipidir. Ayrıca çocukluk çağında en sık görülen katı tümör tipidir. Yapılan araştırmalara göre Amerika Birleşik Devletlerinde 2013 yılında 69,720 kişiye BBT tanısı konulacak bunların 24,620'si kötü huylu beyin tümörü olmasına karşın 45,100'ün iyi huylu beyin tümörü olması beklenmektedir. Ayrıca yaklaşık 4,300 20 yaş altı çocuğa birincil beyin tümörü tanısı konulacağı bunların 3,050'sinin 15 yaş altı olacağı öngörülmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde her 100,000 kişiden yaklaşık 221'ine beyin tümörü tanısı konulmaktadır [17].

Birincil Beyin Tümörleri içinde yetişkinlerde en sık karşılaşılan tümör tipi %34'lük oranla menenjiom'dur (Meningioma). Menenjiom beyin ile kafatası arasında bulunan beyin zarlarında oluşan bir tümör tipidir. Bu tümör tipi genellikle yavaş ilerler, asemptomatik (belirti göstermeyen) olabilir ve iyi huyludur. İkinci sıklıkla görülen BBT tipi %30'luk oranla glioma'dır ayrıca glioma tüm kötü huylu beyin tümörleri içinde %80'lik bir payla en sık karşılaşılan kötü huylu beyin tümörüdür. Glioma nöroglial hücre kaynaklı beyin tümörlerine verilen genel bir addir. Bu grubun içinde glioblastoma, astrositoma ve oligodendroglioma gibi birçok beyin tümörü tipi bulunmaktadır. Tüm glioma vakalarının %54'ünü glioblastoma, %7'sini astrositoma, %76'sını ise bu iki tümörün kombinasyonu oluşturmaktadır. Ayrıca glioblastoma'nın ileri evresi olan glioblastoma multiforme oldukça yayılgı, hızlı ilerleyen ve öldürücü bir tümördür. Glioblastoma multiforme tanısı konulan hastaların %50'si ilk yıl %25'i ise ikinci yıl hayatını kaybetmektedir[17].

Birincil Beyin Tümörleri içinde 20 yaş altı çocuklarda en sık karşılaşılan tümör tipi %20'lik oranla meduloblastomadır. Bunu %15-20'lik oranla düşük evreli astrositomalar (Örn: pilositik astrositoma), %10-15'lik oranla beyin kökü gliomaları ve %8-10'luk oranla ependioma izler [19].

Birincil Beyin Tümörlerine yakalanma oranı yaşa bağılı olarak değışiklik göstermektedir. 2005-2009 yılları arasında Birinci Beyin Tümörüne yakalanana

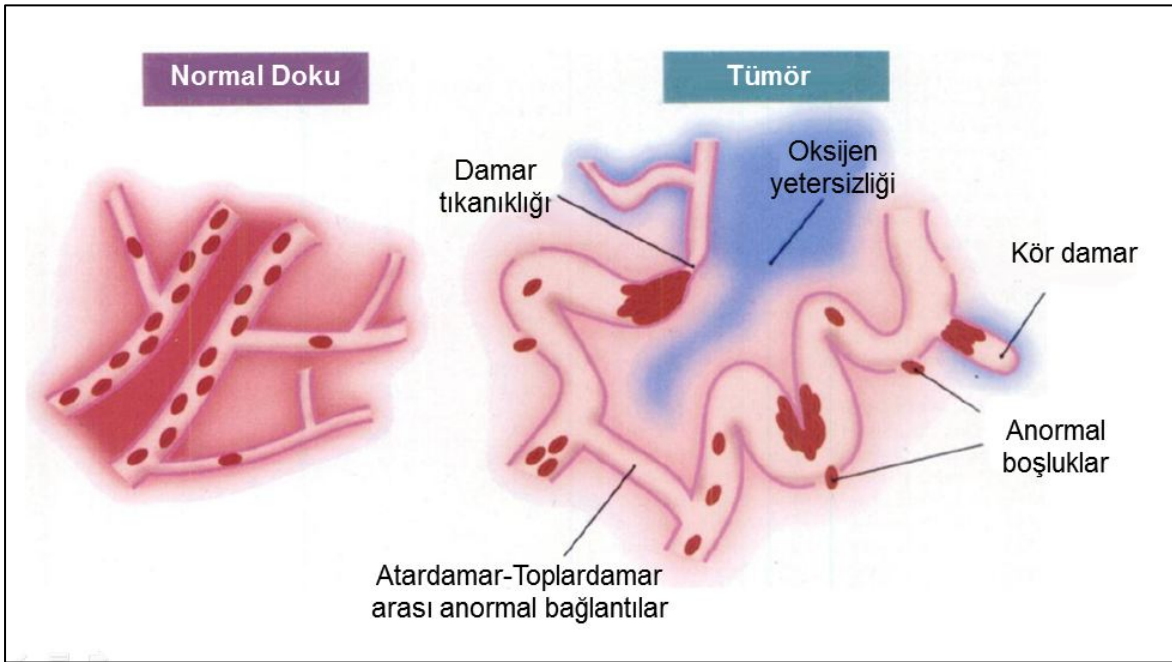
hastaların ortalama yaşı 59'dur. Bunların %13'ü 20 yaş altı çocuklar olmasına karşın, %8.8'i 20-34 yaş arası, %9.2'si 35-44 yaş arası, %14.8'i 45-54 yaş arası, %19'u 55-64 yaş arası, %16.7'si 65-74 yaş arası, %13.8'i 75-84 yaş arası ve %4.7'si 85'yaş üstüdür. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2005-2009 yılları arasında birincil beyin tümörü nedeniyle ölen hastaların ortalama yaşı 64'tür. Bunların %3.9'u 20 yaş altı çocuklar olmasına karşın, %3.7'si 20-34 yaş arası, %6.5'i 35-44 yaş arası, %14.6'sı 45-54 yaş arası, %22.5'i 55-64 yaş arası, %22.5'i 65-74 yaş arası, %19.4'ü 75-84 yaş arası ve %6.9'u 85'yaş üstüdür. Verilerden de anlaşılacağı gibi 20 yaş altı ve 44 yaş üstünde kişilerin birincil beyin tümörlerine yakalanma riski diğer yaş gruplarına göre daha fazladır. 45 yaş ve üstü hastaların ise beyin tümörü nedeniyle hayatını kaybetme oranı 44 yaş altı hastalara göre çok daha fazladır. Ayrıca yapılan araştırmalar BBT'ye erkeklerin kadınlara oranla daha fazla yakalandığını göstermektedir. BBT'ye yakalanma oranı ırklar arasında da farklılık göstermektedir [20].

2.3.2. Beyin tümörlerinin fizyolojisi

Beyin tümörleri sağlıklı beyin dokusuna göre bazı farklılıklar içerir. Bu farklılıklar tümörün evresine göre değişmektedir. Düşük evreli astrositomalar veya diğer düşük evreli beyin tümörlerinde tümör kütlesi henüz oluşmamıştır ve kanser hücreleri sağlıklı hücreler arasında dağılmıştır. Genellikle tümör bölgesi sağlıklı beyin dokusundan çok az farklılık gösterir. Anaplastik astrositoma gibi 3. evre tümörlerde ise tümör hücrelerinin bir arada bulunduğu tümör kütleleri oluşur ve damarlanmada artış görülür. Oluşan damarlar sağlıklı beyin dokusundaki damarlara göre; endotel hücreleri arası anormal boşluklar, kıvrımlı damarlanma, damar tıkanıklıkları, normalden ince endotel tabaka, kör damarlanma, atardamar ile toplardamar arası anormal bağlantılar, düşük kan akış hızı gibi yapısal bozukluklar içerir (Şekil 2.7.).

Damarlanma tümörün gelişimi için oldukça önemlidir. Damarlanma oluşmadığı takdirde kanser hücreleri gelişemez ve genellikle tümör kütlelerinin boyutu 1-2 mm'i geçmez. Besin ve oksijen tümör kütlelerinin en dışındaki hücreden merkezinde bulunan hücreye doğru difüzyon yolu ile iletilir. Bu nedenle tümör merkezine doğru gidildikçe oksijen ve besin eksikliği buna karşı metabolit birikimi oluşur. Bu durum tümör kütlelerinin normal dokuya göre daha asidik olmasına neden olur. Oksijen

eksikliği ve artan asidite tüm hücrelerde olduğu gibi kanser hücrelerinde de öldürücüdür. Tümör merkezindeki oksijen eksikliği ve artan asidite buradaki kanser hücrelerinin ölmesine ve nekrotik tabakaların oluşmasına neden olur. Bu durum özellikle glioblastoma multiforme gibi 4. evre beyin tümörlerinde yaygın olarak görülmektedir. Oksijen eksikliğine karşı kanser hücrelerinden vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi damarlanma tetikleyici ajanların salımı gerçekleşir. Bu ajanlar damar endotel hücrelerini tetikleyerek tümör kütesine doğru damarlanmanın artışına neden olur. Yapılan çalışmalar glioblastoma multiforme'de VEGF konsantrasyonunun normal beyin dokusuna kıyasla 200 ile 300 kat daha fazla olduğunu göstermiştir. Oksijen eksikliği damarlanmayı artırdığı gibi tümörün radyoterapi ve bazı kemoterapi ajanlarına karşı dirençli olmasının da sebebidir [21-22]. Günümüzde tümör kütesine özgü bu durumdan yararlanarak yeni tedavi yaklaşımları da geliştirilmektedir.



Şekil 2.7. Normal damarlanma ve tümürlü bölgedeki damarlanma arasındaki farkların şematik gösterimi [22].

2.3.3. Beyin tümörlerinin belirtileri ve tanısı

Birincil Beyin Tümörlerinin belirtileri tümörün bulunduğu bölgeye göre çeşitlilik gösterebilmektedir. Bunun nedeni tümörün, geliştiği bölgedeki sınırlara baskı yapması sonucu hastanın yaşamının olumsuz etkilemesi ve buna bağlı belirtilerin ortaya çıkmasıdır. Genellikle hastalarda baş ağrısı ve bunu takip eden kusma nöbetleri, mide bulantısı, iştahsızlık, görme, duyma ve konuşma bozuklukları, denge kaybı ve yürüme bozuklukları, kişilik, ruh hali ve davranış değişiklikleri, dikkat eksikliği ve unutkanlık, kas titremeleri ve seğirmeler, kol ve bacaklarda uyuşma ve sızlamalar gibi belirtiler görülür. Tümörün bulunduğu bölgeye göre bu belirtilerin bir veya daha fazlası görülebilir [1, 23-25]. Şüphesiz birçok hastalıkta buna benzer belirtiler görülmektedir bu nedenle hastada beyin tümörü olup olmadığı tanı yöntemleri ile desteklenmelidir.

Beyin tümörlerinin tanısında hekimler genel sağlık muayenesi ve nörolojik muayene ile elde ettiği bulguları manyetik rezonanslı görüntüleme ve bilgisayarlı tomografi gibi ileri görüntüleme yöntemleri ile desteklemelidir. İleri görüntüleme yöntemleri ile herhangi bir tümör kütesine rastlanmış ise biyopsi yapılarak örnek alınır ve tümörün kesin tespiti, evresi, kökeni ve türünün belirlenir. Tanı işlemini ardından uygun bir tedavi prosedürü belirlenerek hastanın tedavisine geçilir [26].

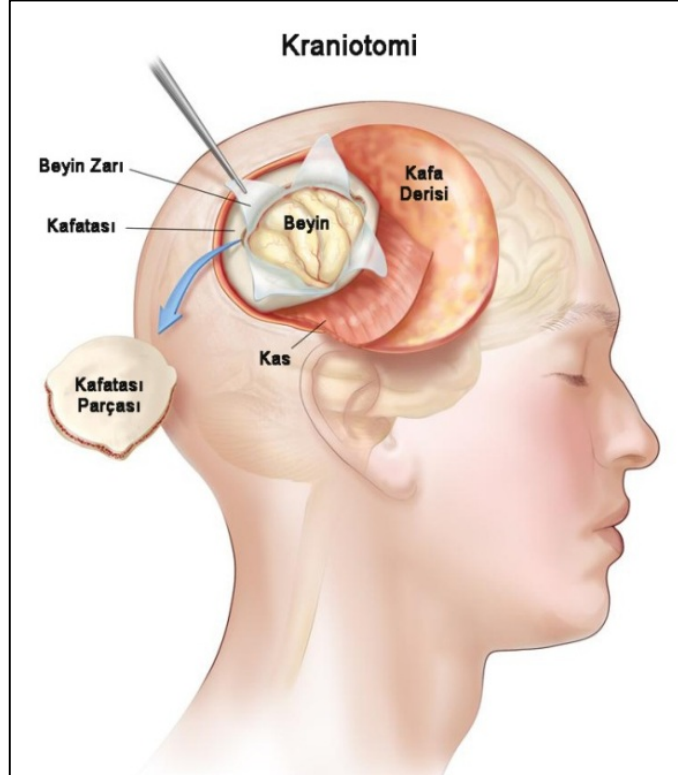
2.3.4. Beyin tümörlerinin tedavisi

Beyin tümörlerinin tedavisinde tümörün tipi, evresi, yeri, cerrahi olarak alınıp alınmayacağı, cerrahi operasyon sonrası kanser hücresi kalıp kalmayacağı ya da ne kadar kalacağı, tekrarlama riski ve hastanın genel sağlık durumu göz önünde tutularak uygun bir tedavi prosedürü belirlenir. Günümüzde beyin tümörlerinin tedavisinde en sık tercih edilen yöntem cerrahi müdahaledir. Kemoterapi ve radyoterapi ise genellikle destekleyici tedavi konumundadır. Bunun nedeni beyin tümörlerinin tedavisinde kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğinin oldukça düşük olmasıdır. Ancak tümör beyin sapı gibi cerrahi müdahale için çok riskli veya olanaksız bir bölgede ise cerrahi müdahale olmaksızın radyoterapi veya kemoterapi uygulanır [1, 24, 26].

2.3.4.1. Cerrahi tedavi

Cerrahi müdahalenin ilk basamağında ileri görüntüleme yöntemleri ile tümörün yeri belirlenir daha sonra kraniotomi yöntemi ile hastanın kafatasında bir bölge açılır (Şekil 2.8.). Açılan bu bölgeden tümöre ulaşılarak tümör çıkartılır. Tümör çıkartıldıktan sonra beyin zarları dikilir, hastanın kafatasında açılan bölge implantlar veya özel yapıştırıcılar yardımıyla geri takılır ve kafa derisi dikilerek cerrahi müdahale tamamlanır. Cerrahi müdahale ile tümörün büyük bir kısmının çıkartılması mümkündür ayrıca bu yöntemin herhangi bir sistemik yan etkisi bulunmamaktadır.

Bu yöntemin en büyük dezavantajları ise tümörün tamamının çıkartılamaması sonucunda tümörün tekrar nüks etme riskin olması ve oldukça deneyimli cerrahlara ihtiyaç olmasıdır. Ayrıca cerrahi operasyon sırasında kişinin sağlıklı dokularına zarar verilmesi sonucu kişide duyu kaybı, kişilik değişikliği gibi sorunları oluşabileceği gibi cerrahi operasyon sonrası beyinde ödem veya enfeksiyon oluşması gibi riskler de vardır [1, 27-28].



Şekil 2.8. Kraniotomi prosedürünün şematik gösterimi [26].

2.3.4.2. Radyoterapi

Radyoterapi tümör hücrelerinin x-ışını, gama ışını veya proton gibi yüksek enerji uygulanarak öldürülmesi temeline dayanan bir tedavi yöntemidir. Beyin tümörlerinin tedavisinde genellikle cerrahi sonrası bölgede kalan kanser hücrelerinin temizlenmesinde kullanılır. Radyoterapinin yan etkileri oldukça düşüktür, saç dökülmesi, kafa derisinde kızarıklık, kuruluk veya hassasiyet oluşabilir. Bazı durumlarda radyoterapinin sağlıklı beyin dokusuna zarar verdiği, özellikle çocuklarda öğrenme güçlüğü ve gelişim bozukluklarına neden olduğu görülmüştür [1, 29].

2.3.4.3. Kemoterapi

Kemoterapi de genellikle radyoterapi gibi cerrahi sonrası bölgede kalan kanser hücrelerinin temizlenmesinde kullanılır. Beyin tümörlerinin tedavisinde kemoterapiden istenildiği derecede yararlanılamamasının en önemli nedeni kan beyin engeli nedeni ile beyinin vücuttaki diğer organlara göre çok daha ulaşılması güç bir organ olmasıdır. Kana geçen ilaç beyine ulaşmak için kan beyin engeli denilen özelleşmiş bir endotel duvarını geçmek zorundadır. Küçük moleküllü ilaçlarının yalnızca %2'lik bir kısmı bu engeli geçebilirken büyük moleküllü ilaçların neredeyse tamamı bu engeli geçemez. Bu nedenle kemoterapi ilaçlarının beyine ulaştırılmasında farklı stratejiler kullanılmakta ve tedavi etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır [30-33].

2.4. Beyine İlaç Ulaştırma Stratejileri

Antikanser ilaçlar başta olmak üzere beyin hastalıkları ile ilgili ilaçların uygulama şekilleri genellikle beyin içi enjeksiyon, damar içi enjeksiyon veya oral şeklindedir.

Beyin içi enjeksiyon ya da kanser hastaları için tümör içi enjeksiyonda ise ilaç invaziv bir şekilde doğrudan dokuya verildiğinden kan beyin engeliyle karşılaşmadan hedef bölgeye ulaşmaktadır.

Damar içi enjeksiyon ya da oral olarak verilen bir ilacın beyine geçmesi için kan damarları boyunca ilerlemesi ve hedef bölgeye ulaşması için kan beyin engelini geçmesi gerekir. Bu nedenle damar veya ağız yolu ile kullanılacak ilaçların kan beyin engelini geçmesine olanak sağlayan bir formülasyon ile hazırlanması

gerekmektedir. Her iki dozaj şeklinin birbirlerine göre üstünlükleri ve dezavantajları mevcuttur.

2.4.1. Tümör içi enjeksiyon

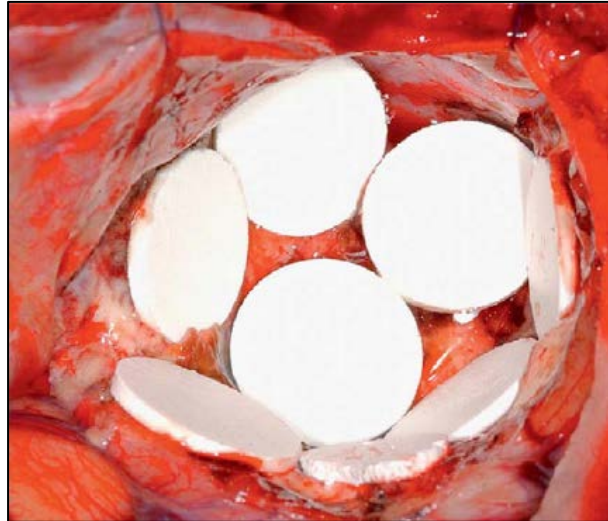
Tümör içi enjeksiyonda antikanser ilaçlar bir kateter veya ilaç içeren implante tampon yardımıyla doğrudan tümör içine verilir. Bu yöntemi cerrahi sonrası kullanılan tampon sistemler ve kateter sistemler olmak üzere temelde iki sisteme ayırmak mümkündür [34].

2.4.1.1. Cerrahi sonrası tampon sistemler

İlaç içeren implante tamponlar merkezi sinir sistemine doğrudan ilaç salarak beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılabilen yeni bir yaklaşımdır. 1976 yılında Lange ve Folkman yaptıkları çalışmada ilk kez biyoparçalanır olmayan etilen vinil asetat (EVAc) kopolimerinin makromolekülleri belirli bir süre salabildiğini göstermiştir. Bu polimerik tamponlara ilaç moleküllerinin hapsedilmesi ile istenilen süre ve hızda ilaç salan tamponlar oluşturulmuştur. Difüzyon hızı ilacın molekül ağırlığı, yüzey yükü ve suda çözünürlüğü gibi kimyasal özelliklerine bağlıdır. EVAc polimerleri uzun yıllar kliniklerde doğum kontrolü, glokom ve astım gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Bu tamponların en büyük sakıncası ise biyolojik olarak parçalanabilir olmamaları ve bu nedenle vücutta ilaç salımı bittikten sonra da kalmalarıdır.

Günümüzde EVAc tamponların yerini biyoparçalanır polimerlerden yapılan yeni nesil tampon sistemler almıştır. Bu sistemlerde ilaç salımı sırasında polimerin parçalanması da gerçekleştiği için tedavi sonrasında vücutta tampon artığı kalmamakta ve biyolojik yollarla yıkılmaktadır. Biyoparçalanır polimerlere örnek olarak Polianhidrit poli[bis(p-karboksifenoksi) propan-sebasik asit] (PCPP-SA) polimeri verilebilir. Bu polimer su ile spontan olarak reaksiyona girerek dikarboksilik asite bozunmaktadır. Bu yeni nesil tampon sistemler EVAc tampon sistemlerine göre salım hızının neredeyse sabit olması, salım süresinin 1-2 günden birkaç yıla kadar ayarlanabilir olması, istenilen şekil ve boyutta üretilebilir olması, vücutta tampon artığı kalmaması ve parçalanma ürünlerinin toksik, mutojenik ve teratojenik olmaması gibi üstünlükleri söz konusudur.

Biyoparçalanır polimerler ilaç yüklü tamponların beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılmasına olanak vermiştir. Bu amaçla beyin tümörleri tedavisinde kullanılmak üzere ilk tampon olan Gliadel® Amerikan Gıda ve İlaç İdaresinden (U.S. Food and Drug Administration (FDA)) 1996 yılında ruhsat almış ve piyasaya sürülmüştür. Gliadel® Karmustin yüklü PCPP-SA polimerinden oluşturulmuş bir tampon sistemdir. Karmustin beyin tümörü hücreleri üstüne etkili olmakla birlikte sistemik olarak verildiğinde düşük yarılanma ömrüne (yaklaşık 15 dk) sahiptir ve çeşitli sistemik toksisitelere neden olmaktadır. Gliadel® tamponlarda ise ilacın yan etkilerini azaltmak ve tedavi etkinliğini artırmak amacı ile ilaç polimerik bir matriks içinde tümörlü bölgeye cerrahi operasyon sırasında doğrudan uygulanır (Şekil 2.9.). Yetişkinlerde sık görülen ve oldukça öldürücü olan glioblastoma multiforme tedavisinde cerrahi operasyon şarttır. Cerrahi operasyon ile tümör kütlesi alındıktan sonra tümör hücrelerinin bir kısmı bölgede kalır. Bu da hastalığın tekrar nüks etmesine neden olur. Gliadel® tamponlar destekleyici tedavi konumundadır ve tümör kütlesi alındıktan sonra bölgeye yerleştirilerek kalan tümör hücrelerinin yok edilmesini amaçlamaktadır. Yapılan çalışmalar da Gliadel® uygulanan glioblastoma multiforme hastalarında hayatta kalma süresinin arttığı gözlenmiştir. Bu tampon sistemler özellikle glioblastoma multiforme tedavisinde kliniklerde kullanılmaktadır [17, 34-40].



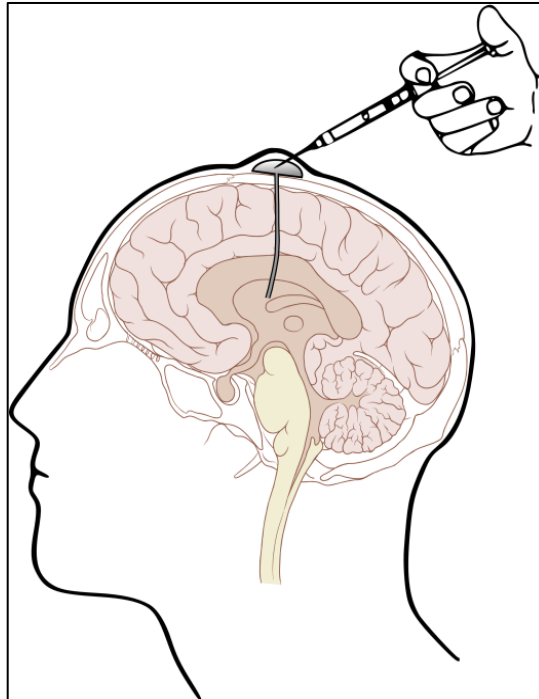
Şekil 2.9. Gliadel® tamponların uygulanması [35].

2.4.1.2. Kateter sistemler

Beyin tümörlerinin tedavisindeki bir diğer yaklaşım ise kateter sistemlerin kullanılmasıdır. Beyin tümörü hastalarında kateter, bir ucu tümör bölgesine diğer ucu ise genellikle kafa derisi olmak üzere vücudun kolay ulaşılabilir bir yerine cerrahi operasyon ile yerleştirilir (Şekil 2.10.).

Kateter sistemlere örnek olarak uzun yıllardır kliniklerde uygulanan Ommaya rezervuarları gösterilebilir. Antikanser ilaçlar hastalara dozlar halinde belirli zaman aralıklarında verilmektedir. Kan beyin engeli, sistemik toksisite ve tedavi edici doza ulaşamaması gibi nedenlerle bu ilaçların damar içi enjeksiyon veya oral olarak kullanılmasında sıkıntılar söz konusudur.

Ommaya rezervuarlarında ilaç doğrudan tümör içine verildiği için bu olumsuzluklar söz konusu değildir. Ancak bu sistemler tedavi süresince hastada takılı kalacağı için hastanın yaşam kalitesini oldukça düşürür. Bunun yanı sıra enfeksiyon ve tıkanma riski gibi olumsuzluklarda söz konusudur [17, 34, 36].



Şekil 2.10. Ommaya rezervuarın şematik gösterimi.

2.4.2. Damar içi enjeksiyon ve oral

Günümüzde antikanser ilaçların büyük bir kısmı damar içi enjeksiyon ufak bir kısmı ise oral olarak kullanılmaktadır. Antikanser ilaçların oral kullanımı hasta uyuncu bakımından olumlu olmasına karşın biyoyararlanım sorunu nedeniyle oldukça düşüktür. Damar içi enjeksiyon ise ilacın bir şırınga yardımıyla doğrudan hastanın damarına verildiği invaziv bir yöntemdir. Hasta uyuncu nispeten düşük, uzman sağlık personeli tarafından uygulanan, hastanın kendiliğinden uygulayamadığı bir dozaj şeklidir. Her iki dozaj şeklinde de ilacın kan yolu ile tümör dokuya ulaşması, bu süre zarfında retiküloendotelyal sistemden (RES) korunması ve kan beyin engelini aşması gerekmektedir.

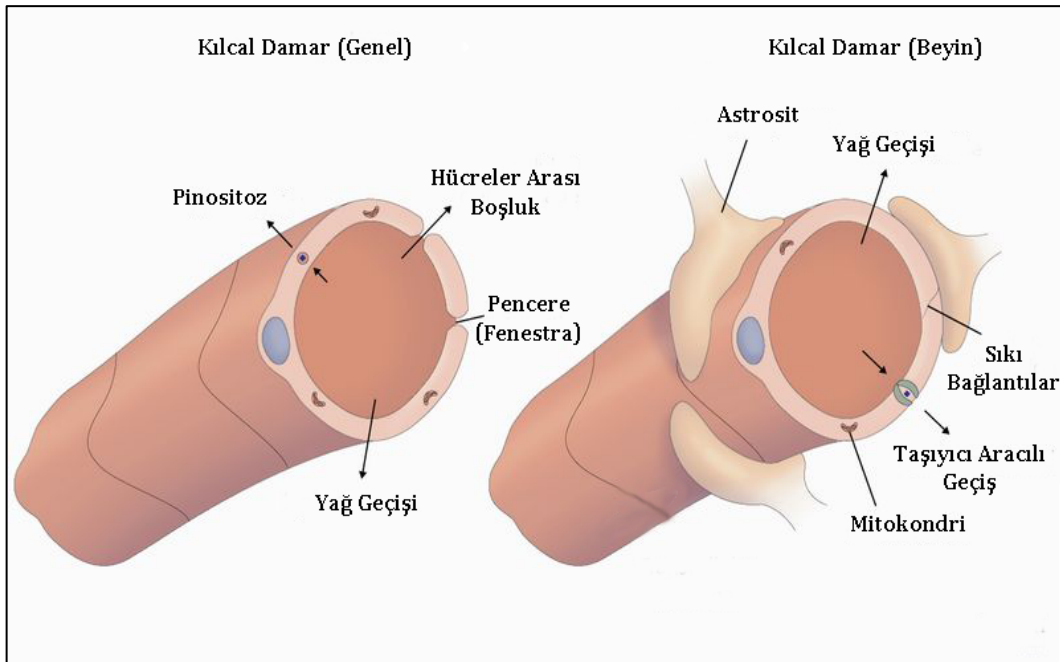
Hem parenteral hem de oral uygulama sonrası kemoterapinin etkinliği oldukça düşüktür. Bu düşük etkinliğin nedenleri arasında ilaç moleküllerinin büyük olması, fizikokimyasal özelliklerinin uygun olmaması, retiküloendotelyal sistem tarafından opsonizasyonu ve kan beyin bariyerini geçememesi gibi nedenler sayılabilir [41]. Paklitaksel ve Dosetaksel gibi birçok antikanser ilacın suda çözünürlüğü çok düşüktür. Damar içi enjeksiyon ile verilecek olan bu ilaçlar ancak Cremophor® EL ve Polisorbat® 80 gibi çözücüler ile uygulanabilir. Damar içi verilen antikanser ilaçların ve Cremophor® EL gibi çözücülerin sistemik toksisite ve yan etkiler göstermesi bir diğer önemli sorundur. Tüm bu olumsuzluklar göz önünde tutularak yeni ilaç formülasyonlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır ve bu alanda çalışmalar sürmektedir [42].

2.4.3. Kan beyin engeli

Kan beyin engeli ilk kez 1902 yılında alman mikrobiyolog Paul Ehrlich tarafından gözlenmiştir. Paul Ehrlich suda çözünebilir boya (tripan mavisi) enjekte ettiği fareleri incelediğinde farelerin beyinleri dışında tüm organlarının boyandığını gözlemiştir. 1913 yılında Ehrlich'in öğrencisi olan Edwin Goldmann farelerin beyin omurilik sıvısına boya enjekte etmiş ve farelerin sadece beyinlerinin boyandığını diğer oranlarının boyanmadığını göstermiştir. Bu çalışmalar beyin ile vücudun geri kalanı arasında bir engel olduğunu açıkça göstermiştir. Kan beyin engeli ile ilgili ilk çalışmalar 1898 yılında Biedl ve Kraus ile 1900 yılında Lewandowsky tarafından yapılmış olmasına rağmen, ancak 1960'lı yıllarda taramalı elektron mikroskopu ile görüntülenerek varlığı kanıtlanmıştır [43-44].

Kan beyin engeli hem fiziksel hem de metabolik bir bariyer konumundadır. Beyinde bulunan kılcal damarlar vücudun diğer bölgelerindeki kılcal damarlardan farklılık göstermektedir (Şekil 2.11.). Kılcal damarların duvarlarını oluşturan endotel hücreleri arasında sıkı bağlantılar (tight junction) denilen hücreler arası bağlar bulunmaktadır. Bu bağlantılar endotel hücrelerini birbirine bağlar, hücreler arası boşluğu oldukça azaltır ve yüksek bir elektrik direnci oluşturarak fiziksel bir bariyer oluşturur. Endotel hücrelerinde diğer dokulardaki endotel hücrelerinin aksine fenestra ya da pencere denilen porlar yoktur. Bu porların olmaması geçişi engelleyici bir diğer faktördür. Ayrıca hücre yüzeyinde oldukça fazla miktarda P-glikoprotein pompaları vardır. Bu pompalar, damardan endotel hücresinin içine geçen maddelerin hücre boyunca ilerleyip beyine geçmesine izin vermeden tekrar damar içine aktarmaktadır. Ayrıca beyin endotel hücreleri peptidaz, nükleotidaz, monoamin oksidaz ve sitokrom P450 gibi hücre içi ve hücre dışı birçok enzim içermekte böylece metabolik bir bariyer oluşturmaktadır.

Kan beyin engeli kandaki toksik ve zararlı maddelere karşı beyini koruyan bir engeldir. Bu engelin varlığı nedeniyle, ilaçların %98'i beyine ulaşamamakta bu da kanser tedavisinde damar içi veya oral olarak uygulanan kemoterapinin etkinliğini ciddi oranda düşürmektedir [46-48].



Şekil 2.11. Beyin kılcal damarları ile diğer dokulardaki kılcal damar yapısının karşılaştırmalı şematik gösterimi [45].

2.4.3.1. Kan beyin engelini aşma stratejileri

Kan beyin engelini varlığı ilaçların beyine geçişini ciddi ölçüde sınırlamıştır. Ağız veya damar yolu ile verilen kemoterapi ilaçlarının etkinliğinin artırılması için bu engelin aşılması şarttır. Bu amaçla kan beyin bariyerinin yapısını geçici olarak bozmak ve biyolojik geçiş mekanizmalarını taklit etmek başta olmak üzere çeşitli stratejiler öne sürülmüştür.

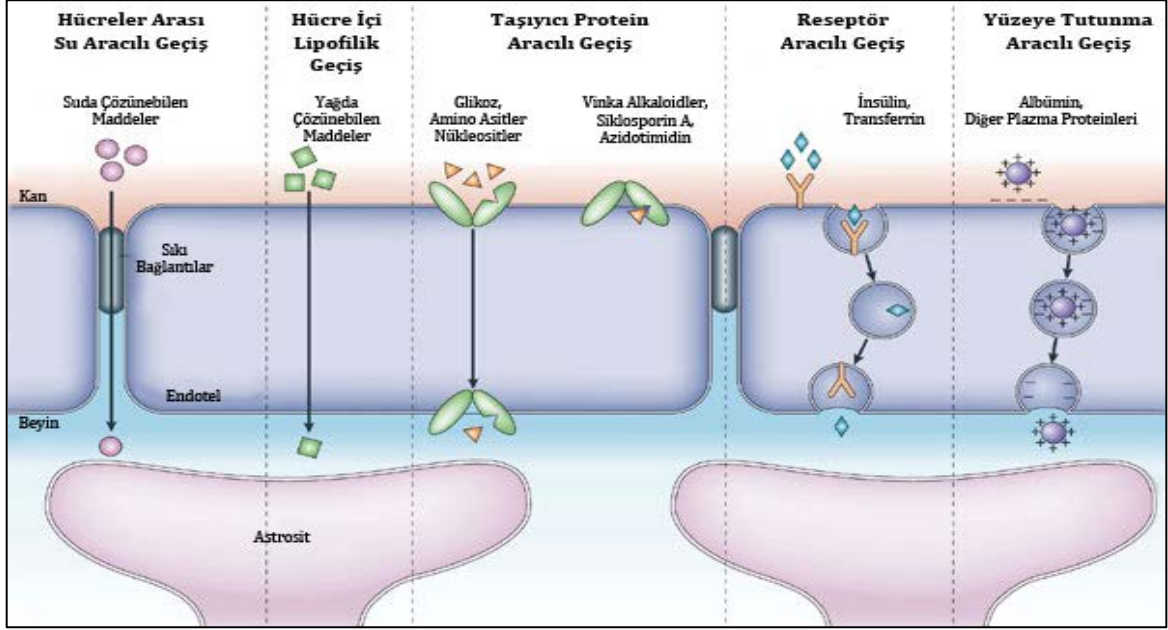
2.4.3.1.1. Kan beyin engelini yapısını geçici olarak bozmak

Kan beyin engelini aşmanın bir yolu kan beyin engelini yapısını geçici olarak bozmaktır. Kan beyin engeli hiperozmotik ajanlar, lökotrinler ve vazoaaktif peptidler yardımıyla geçici olarak açılabilen bu sayede damar içindeki maddelerin beyine geçişi sağlanabilmektedir. Cosolo ve arkadaşlarının 1989 yılında yaptıkları bir çalışmada sıçanlara hiperozmotik ajan olan mannitol verildiğinde kan beyin engelindeki sıkı bağlantıların geri dönüşümlü olarak açıldığı ve kandan beyine madde geçişinin arttığı gösterilmiştir [49]. Hiperozmotik ajanlar kan içindeki konsantrasyonu artırarak endotel hücrelerinin damar içine sıvı vermesine neden olur. Sıvı kaybeden hücreler büzülür ve hücreler arası mesafe artarak sıkı bağlantıların kopmasına neden olur. Bu olayın sonucunda hücreler arasında büyük boşluklar oluşur ve böylece kan damarından beyin içine madde geçişi olur. Ayrıca bradikinin, lökotrien C4 ve sereport gibi vazoaaktif maddeler de beyin kılcal damarlarının genişlemesini sağlayarak beyine madde geçişini artırmaktadır.

Bu yöntem kan beyin engelini aşılmasında kullanılabilir ancak kandan beyine kontrollü bir geçiş olmadığı için toksik maddelerin de beyine geçmesine sebep olur. Bu durum, hastanın tedavisi sırasında çok büyük bir risk oluşturur ve hasta için telafisi mümkün olmayan sorunlara neden olabilir [36, 41].

2.4.3.1.2. Biyolojik geçiş mekanizmalarını taklit etmek

Beyin diğer tüm organlar gibi ihtiyacı olan maddeleri kan damarları yolu ile alır. Kan beyin engeli maddelerin beyine geçişini engellemesine karşın beyin için gerekli maddeler çeşitli geçiş mekanizmaları ile beyine geçmektedir (Şekil 2.12.). Bu geçiş mekanizmalarının taklit edilmesi ile ilaçların beyine ulaştırılması mümkündür.



Şekil 2.12. Kan Beyin Engelini geçiş mekanizmalarının toplu gösterimi [46].

Kandaki maddelerin beyine geçişini 5 temel başlıkta toplamak mümkündür. Bunlar;

Hücreler Arası Su Aracılı Geçiş: Küçük molekül ve iyonlar sıkı bağlantıların arasından geçerek beyine ulaşabilmektedir.

Hücre İçi Lipofilik Geçiş: Endotel hücrelerinin zarları diğer tüm hücrelerde olduğu gibi lipit yapıdadır. Yağda çözünebilir maddeler endotel hücresinin zarından hücre içine girebilir ve hücre boyunca ilerleyerek beyine geçebilir. Bu geçiş mekanizmasında en büyük sınırlayıcı faktörü ise P-glikoprotein pompalarıdır. Bu pompalar hücre içine giren maddelerin bir kısmını yakalayarak damar içine pompalar.

Taşıyıcı Protein Aracılı Geçiş: Beyin endotel hücreleri yüzeyinde glikoz'un taşınmasından sorumlu GLUT1, laktik asit'in taşınmasında sorumlu MCT1, aminoasitlerin taşınmasından sorumlu LAT1 ve arjinin gibi aminoasitlerin taşınmasından sorumlu CHT1 gibi 20 farklı taşıyıcı protein vardır. Bu proteinler ATP kullanarak maddelerin beyine aktif taşınmasını sağlar.

Reseptör Aracılı Geçiş: Beyin endotel hücreleri üzerinde insülin ve transferin gibi hormonların taşınmasından sorumlu reseptörler vardır. Kan yolu ile gelen bu hormonlar reseptörlere tutunarak endotel hücresi içine girer ve hücre boyunca ilerleyerek beyine geçer. Bu taşıma mekanizmasında da ATP kullanılır.

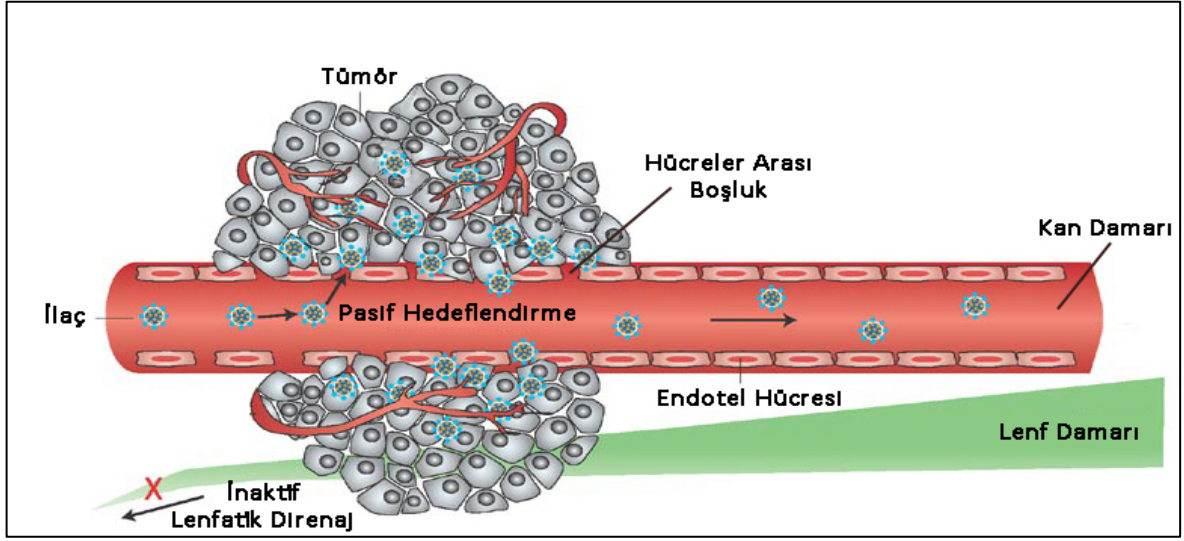
Yüzeğe Tutunma Aracılı Geçiş: Endotel hücrelerinin zarları diğer tüm hücrelerde olduğu gibi negatif bir yüzeğe yüküne sahiptir. Albümin gibi pozitif yüklü plazma proteinleri negatif yüklü hücre zarları ile etkileşime girerek veziküller oluşturur ve bu veziküller aracılığı ile hücre boyunca ilerleyen pozitif yüklü maddeler beyine geçebilmektedir.

Tüm bu geçiş mekanizmalarını taklit eden sistemler oluşturularak beyine ilaç taşınması mümkündür. Ayrıca bu strateji kan beyin engelini yapısını bozmadığı için kontrollü bir geçişe olanak sağlar [36, 46, 50].

2.4.3.1.3. Artmış permeabilite ve tutulma etkisi EPR'den yararlanmak

Artmış permeabilite ve tutulma etkisi (EPR) tümörlü dokulara özgü bir durumdur. Tümör gelişimi normal hücre gelişimine göre çok daha hızlıdır. Tümör dokuları bu hızlı gelişim boyunca yüksek miktarda enerjiye ihtiyaç duyar ve bunu kan damarlarından sağlar. Tümör hücreleri vasküler endotel büyüme faktörü ve benzeri büyüme faktörleri salarak tümör çevresinde damarlanmayı (anjyogenezin) artırarak ihtiyacı olan enerjiyi sağlamaya çalışır. Ancak bu damarlarının gelişimi tümör dokusunun gelişim hızına ayak uyduramaz ve endotel hücreleri arasındaki bütünlük bozularak hücreler arasında ciddi boşlukların oluşmasına neden olur. Bu boşlukların büyüklüğü tümör tipine göre değişiklik gösterir ve damar içindeki maddelerin bu bölgedeki permeabilitesini artırır. Ayrıca tümörlü dokuya lenf damarları yeterince ulaşamaz bu da bölgedeki metabolik artıkların yeterince uzaklaştırılmamasına böylece tutunma etkisinin artmasına neden olur (Şekil 2.13.). Beyin tümörlerinde de artmış permeabilite ve tutulma etkisi gözlenir ve kan beyin engelini yapısı bozulur. Hücreler arasında açılan açıklıklar ve lenf sisteminin yeterince gelişmemiş olması sistemik olarak verilen ilaçların (bu açıklıklardan geçebilecek kadar küçük olan ilaçların) tümörlü bölgeye geçişine ve birikmesine olanak sağlar. İlaç formülasyonları bu durum göz önünde tutularak

hazırlandığı takdirde boyuta bağlı pasif hedeflendirme gerçekleşecek ve tümör dokusundaki birikimi artacaktır [51-56].

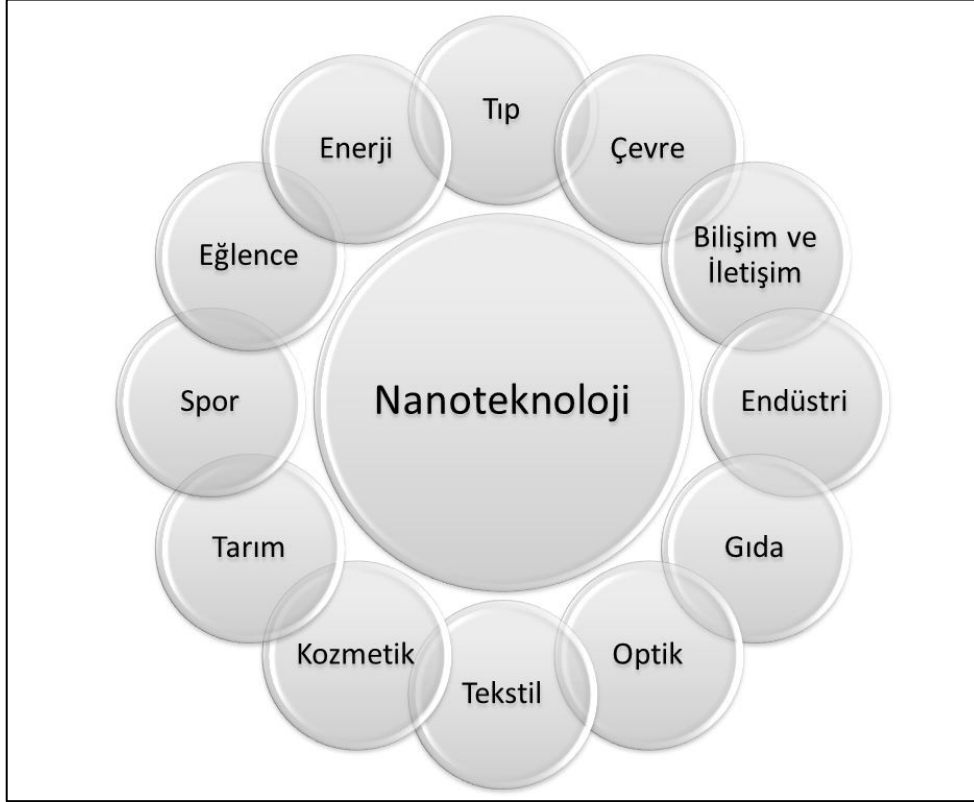


Şekil 2.13. Artmış permeabilite ve tutulma etkisinin şematik gösterimi [56].

2.5. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, yunanca cüce anlamındaki nano ve sanat, zanaat ve beceri alanındaki çalışmalar anlamına gelen technología kelimelerinin birleşiminden oluşmuştur. Metrenin milyarda biri olan nanometre ölçeğinde maddeleri, araçları ve sistemleri kontrol etme, yaratma ve manipüle etme çalışmalarının tümüdür. Amerika Ulusal Nanoteknoloji Girişim'ine (National Nanotechnology Initiative) göre ise nanoteknoloji nanoölçekte (1-100 nm) yürütülen bilim, mühendislik ve teknoloji çalışmalarıdır [57]. Nanoteknoloji fikri ilk kez 29 Aralık 1959 yılında Amerikan Fizik Derneğinin Kaliforniya Teknoloji Enstitüsünde düzenlediği bir toplantıda ünlü fizikçi Richard Feynman'ın "There's Plenty of Room at the Bottom" başlıklı konuşmasında ortaya atılmıştır. Nanoteknoloji kelimesi ise ilk kez 1974 yılında yayınladığı bir makalesinde Norio Taniguchi tarafından ortaya atılmıştır. 1981 yılında taramalı elektron mikroskobu geliştirilinceye kadar nanometre ölçeğinde gözlemlenemeyen yapılamamış ancak bu tarihten sonra taramalı elektron mikroskobunun keşfi ile modern nanoteknoloji çalışmaları başlamıştır.

Nanoteknoloji fizik, kimya ve biyoloji başta olmak üzere birçok bilim dalının ortaklaşa çalışması ile ortaya çıkan multidisipliner bir alandır. Günümüzde popülaritesi giderek artmakta ve neredeyse hayatın her alanında karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.14.) [58-60].

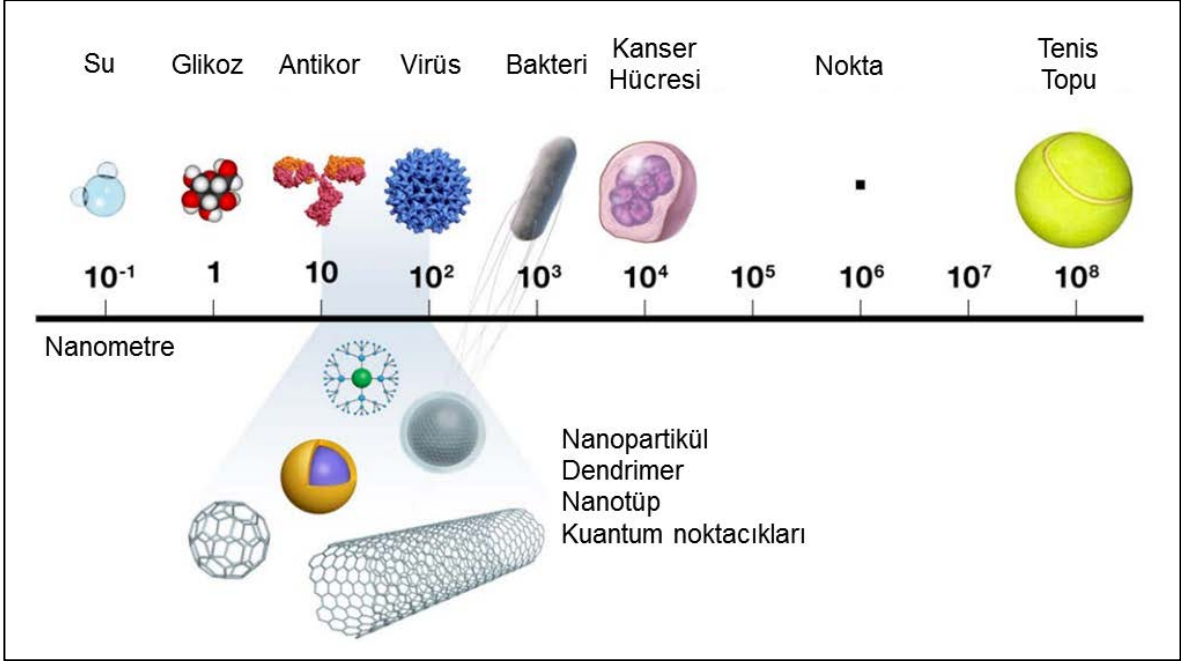


Şekil 2.14. Nanoteknolojinin başlıca uygulama alanları.

2.5.1. Nanotıp

Nanoteknolojinin tıp alanındaki çalışmalarını Nanotıp oluşturmaktadır. Nanotıp terimi son yıllarda ortaya atılmasına karşın bu alanda yapılan çalışmalar daha eski tarihlerden günümüze kadar uzanmaktadır. Lipozom olarak da bilinen nanoölçekli lipit taşıyıcılar ilk kez 1965 yılında, kontrollü ilaç salabilen polimerik sistemler 1976 yılında, uzun süre kan dolaşımında kalabilen hayalet nanotaşıyıcılar 1994 yılında, biyokonjige kuantum noktacıkları (quantum dot) 1998 yılında, biyosensör amaçlı nanoteller 2001 yılında ortaya çıkmıştır ve günümüzde de bu alandaki çalışmalar devam etmektedir [61]. Biyolojik sistemler nano ölçekte çalışan sistemlerdir (Şekil 2.15.). Örneğin kırmızı kan hücreleri yaklaşık 2,500 nm, bakteriler 1,000 nm, hücre vezikülleri 200 nm, virüsler 100 nm, proteinler 1-20 nm, DNA iplikleri 2.5 nm,

amino asitler 1.2 nm çapındadır. Bu nedenle nanotıp alanında yapılan çalışmalar oldukça önemlidir. Biyolojik sistemleri taklit ederek birçok hastalığın tanı ve tedavisi mümkündür.



Şekil 2.15. Nanometre boyutundaki biyolojik sistemler ve nanoyapılar [62].

Nanoteknolojik sistemlerin tıp alanında kullanılmasında boyutları itibariyle 3 temel üstünlük söz konusudur. Bunlar;

1. İleri tanı biyosensörleri, hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler ve akıllı ilaçların hazırlanmasına uygundur.
2. Genomik ve proteomik gibi moleküler tıp çalışmalarından yararlanılarak yapay biyolojik sistemlerin tasarlanmasına uygundur.
3. Nanoboyutta çok fonksiyonlu robotik sistemlerin yapımına olanak sağlayarak tanı ve tedavinin eşzamanlı yapılmasına fırsat vermektedir.

Nanotıp çalışmalarının 7 temel başlık altında sınıflamak mümkündür. Bunlar;

1. **Nanotanı:** Moleküler tanı, nanoendoskopi ve nanogörüntüleme gibi tıbbi tanı ve görüntülemeye yönelik nanoteknoloji çalışmalarını kapsar.

2. **Nanoteknoloji Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemler:** Hedeflendirilmiş, kontrollü salım sağlayan, yan etkileri azaltılmış, biyoyararlanımı artırılmış ilaç taşıyıcı formülasyonlarının geliştirilmesine yönelik nanoteknoloji çalışmalarını kapsar.
3. **Rejeneratif Tıp Uygulamaları:** Doku mühendisliğine yönelik nanoteknoloji çalışmalarını kapsar.
4. **Transplantasyon Tıbbı:** Doku nakline yöneliktir. Özellikle doku uyumsuzluğunu ortadan kaldırmaya yönelik nanoteknoloji çalışmalarını kapsar.
5. **Nanorobotik Uygulamalar:** Özellikle kalp ve damar hastalıklarına yönelik nanorobotik sistemler ile kanser tanı ve tedavisine yönelik nanorobotik sistemlerin oluşturulmasına yönelik nanoteknoloji çalışmalarını kapsar.
6. **Implantlar:** İmplant biyosensörler, uzun ömürlü ve biyouyumlu yapay organ ve dokular, ilaç yüklü ve tıkanmayan damar içi stentleri ve implante kontrollü ilaç salınan yapılar üzerine yapılan nanoteknoloji çalışmalarını kapsar.
7. **Minimum İnvaziv Ameliyatlara Yönelik Kateterler:** Gerçek zamanlı ameliyatlarda kullanılacak nanosensörlü kateterler ve nanocerrahiye yönelik cihazlarla ilgili nanoteknoloji çalışmalarını kapsar [58, 62].

2.5.1.1. Kanser tedavisinde nanoteknoloji (nanoonkoloji)

Nanoonkoloji nanotıpın kanser hastalığına özelleşmiş bir alt dalıdır. Kanser hücreleri her ne kadar vücut hücrelerinden türemiş olsalar da sağlıklı hücrelere kıyasla bazı farklılıklara sahiptirler. Nanoonkoloji alanındaki çalışmalar bu farklılıklardan yararlanarak kanserin tanı ve tedavisini amaçlamakta ayrıca geleneksel tanı ve tedavi yöntemlerinin olumsuzluklarını gidermeye çalışmaktadır. Geleneksel antikanser ilaçların kanser tedavisinde kullanımında çeşitli yan etkiler ortaya çıkmakta ayrıca yeterli etkinlik gözlenememektedir. Bu sorunlara formülasyon faktörleri, ilacın farmakokinetiği ve fizikokimyasal özellikleri, ilaç

direnci ve antikanser ilaçların oral biyoyararlanımının düşük olması gibi 4 temel problem neden olmaktadır;

- 1. Formülasyon faktörleri:** Kliniklerde kullanılan paklitaksel ve dosetaksel gibi birçok antikanser ilaç hidrofobik yani suda çözünmeyen ilaçlardır. Bu ilaçlar genellikle hastalara damar içi enjeksiyon şeklinde verilir. Ancak ilaç hastaya verilmeden önce suda çözünür hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla da Cremophor® EL gibi bazı yardımcı çözücülerden yararlanılır. Bu yardımcı çözücüler aşırı duyarlılık, nefrotoksisite, hiperlipidemi, anormal lipoprotein düzeyi, eritrosit agregasyonu ve periferik nöropati gibi ciddi yan etkilere neden olmakta ve tedavi sürecini olumsuz etkilemektedir.
- 2. İlacın farmakokinetik ve farmokokimyasal özelliği:** Kanser tedavisinde kanser hücrelerinin tedavi edici dozda ilaca yeterli süre boyunca maruz kalmaları gerekmektedir. Kanser tedavisinde antikanser ilaçlar genellikle hastaya belirli zaman aralıklarında yüksek dozlar halinde verilmektedir. Böylece ilacın istenmeyen yan etkilerine karşı hastanın kendini toparlayacağı zaman aralıkları yaratılmaktadır. Ancak bu dinlenme evrelerinde kanser hücreleri de çoğalmaya devam etmektedir. Ayrıca bu durum hasta vücudunda antikanser ilaçların kısa süreli ani doz değişimleri oluşmasına neden olmaktadır. Oysa ilacın vücutta sabit dozda uzun süreli kalması tedavinin etkinliği için gereklidir. Birçok antikanser ilaç kanser hücrelerinin hücre döngüsü ve hücre büyümesi üzerine etkilidir. Bu da bu ilaçların etkinliğini ancak kanser hücrelerinin kendilerini yenileme ve büyüme evrelerinde gösterebileceği anlamına gelmektedir. Bu nedenle etkili bir kemoterapi için tedavi edici dozda ilacın yeterli süre boyunca sabit dozda hedeflenen bölgede bulunması ve bu süre zarfında sağlıklı hücreler için güvenilir olması gerekmektedir. Geleneksel kemoterapi ilaçlarıyla bu durumu sağlamak oldukça güçtür.
- 3. İlaç direnci:** Fizyolojik bariyerler ve hücrel mekanizmalar günümüzde kemoterapinin yeterince başarılı olamamasının nedenlerindedir. İlaçlar hedef bölgeye gidene kadar birçok fizyolojik bariyeri (endotel hücreleri arası bağlantı, transendotelial kanal, veziküler vakuolar organel ve

fenestrasyon gibi) geçmek zorundadır. Ayrıca tümör kütleleri normal hücrelerin aksine tümör çekirdeği de denilen çok daha yoğun bir sıvı merkeze sahiptir. Bu merkez yüksek bir hidrostatik basınç oluşturarak içeriye madde girişine engel olur. Bu da ilaçların tümör kütlelerinin içine girişini engelleyen bir bariyer görevi görür. Tümör kütlelerinin pH değerleri normal dokulardan farklılık gösterir. Tümör bölgesindeki yoğun metabolik aktiviteye bağlı olarak karboksilik ve laktik asit gibi metabolitler birikir ve tümör ekstraselüler sıvısının normal dokuların aksine asidikleşir. Bu durum antikanser ilaçların tümör hücresi içine geçişi engellediği gibi asidik pH'ya dayanıksız ilaçların aktivitelerini de bozmaktadır.

Tüm bu farklılıklar antikanser ilaçlara karşı tümör hücrelerinin direnç kazanmasına neden olmaktadır. Bu bariyer ve mekanizmaların aşılarak etkili bir tedavinin sağlanmasında yeni ilaç formülasyonlarına ihtiyaç vardır.

- 4. Oral biyoyararlanımının düşük olması:** Hasta için kanser tedavisi oldukça uzun süreli ve zahmetli bir süreçtir. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların birçoğu damar içi enjeksiyon şeklinde verilmektedir. Bu dozaj şeklini hasta ilacı kendi kendine yapamayacağı için tedavi boyunca hastane ya da sağlık merkezlerine gitmesi gerekir. Bu durum hastaya ve devlete maddi bir külfet getirmesinin yanı sıra hastayı psikolojik olarak da olumsuz etkiler. Antikanser ilaçların oral kullanımı ile bu olumsuzlukların ortadan kalkması mümkündür. Ancak günümüzde oral kullanılan antikanser ilaçların biyoyararlanımı damar içi enjeksiyona kıyasla çok daha düşüktür. Bu nedenle oral ilaçların biyoyararlanımını artıracak yeni formülasyonlara ihtiyaç vardır [51].

Nanoonkoloji alanındaki çalışmalar ile bu sorunların ortadan kaldırılması mümkündür.

Günümüzde nanoteknoloji bazlı ilaçlar olan Doxil® (doksorubisin içeren lipozom formülasyonu veya ABD dışındaki ismi ile Caelyx®), Myocet® (doksorubisin içeren lipozom formülasyonu), DaunoXome® (daunorubisin içeren lipozom formülasyonu) ve Abraxane® (paklitaksel içeren albümin nanopartikülleri) FDA tarafından

onaylıdır ve kanser tedavisinde kliniklerde kullanılmaktadır. Ayrıca bu alanda yaklaşık 150 nanoteknoloji temelli ilacın geliştirilme çalışmaları devam etmektedir [61, 63] .

2.5.2. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler

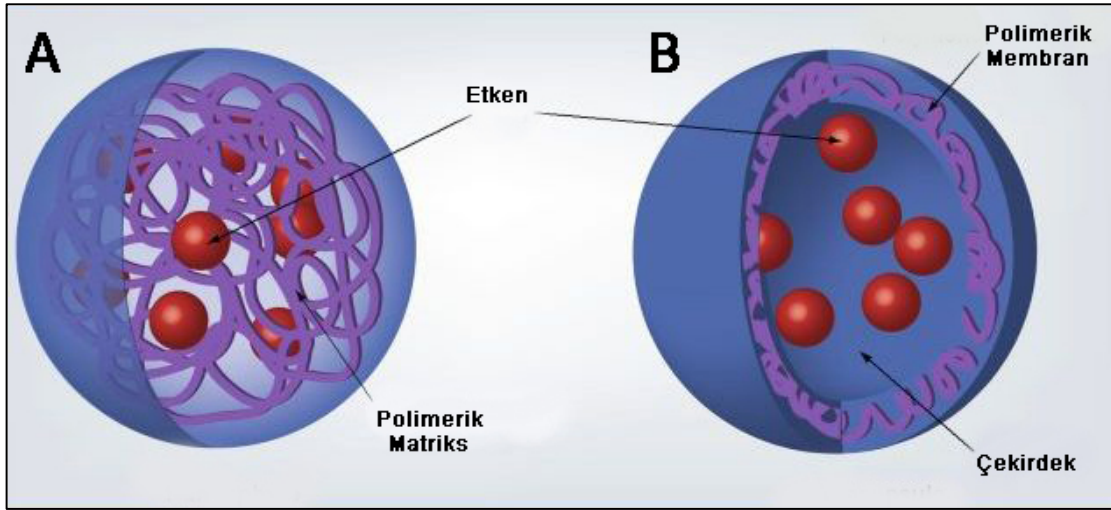
Nanoonkoloji çalışmalarının büyük bir kısmını nanopartikül temelli ilaç taşıyıcı sistemler oluşturmaktadır. Bu alandaki çalışmalar ile kemoterapinin etkinliği artacağı gibi yan etkileri de azalacaktır. Günümüzde bu amaçla ilaç yüklü nanopartiküller hazırlanmaktadır. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler hazırlandığı madde ve yonteme göre çok çeşitlilik gösterir. Polimerik nanopartiküller, dendrimerler, lipozomlar, polimerik miseller, katı lipit nanopartiküller, lipit nanoyapılı sistemler bu alanda en sık çalışılan sistemlerdir [63-64].

2.5.2.1. Polimerik nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, boyutları 10-1000 nm arasında değişen, genellikle doğal ya da sentetik polimerlerden hazırlanan koloidal ilaç taşıyıcı sistemlerdir. İlaç nanopartikülde çözülmüş veya enkapsüle edilmiş olabileceği gibi yüzeyine adsorbe edilmiş de olabilir. Nanopartiküller hazırlama yöntemine ve yapısına göre nanoküre ve nanokapsül olarak iki gruba ayrılır. Nanoküreler polimerik bir ağ yumağından oluşan matriks tipi ilaç taşıyıcı sistemlerdir. İlaç polimerik kürenin içinde disperse olduğu gibi yüzeye adsorbe veya konjüge halde de bulunabilir. İlaç polimerik yapının arasından difüze olabilir, bu yapının erozyonu ile salımı gerçekleşebilir veya bu iki mekanizma birlikte gerçekleşebilir. Nanokapsül ise polimerik bir membranın yağlı bir iç çekirdeği sardığı membran tipi sistemlerdir. Etken madde bu yağlı iç çekirdekte hapsedilir (Şekil 2.16.).

Nanoküre ve nanokapsüllerin diğer geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlere göre pek çok üstün özelliği vardır. Nanoküreler ve nanokapsüllerin boyut ve yüzey özellikleri değiştirilerek değişik amaçlara uygun hale getirilebilirler. Örneğin aktif veya pasif hedeflendirmeye uygun ilaç taşıyıcı sistemler oluşturulabileceği gibi Polietilen glikol (PEG) gibi hidrofilik yapılar ile yüzeyleri kaplanarak RES tarafından algılanmayan ilaç taşıyıcı sistemler de geliştirilebilir. Bu sistemler biyolojik sistemler için uygun büyüklüktedir. Partikül büyüklüğünün nanometre seviyesinde olması kılcal damarlardan geçebilmelerini ve hücreler tarafından alınabilmelerine

olanak sağlar. Etkin maddenin salım özelliği kontrol edilebilir. Nanopartiküler sistemler ile vücuda verildikten hedef bölgeye gidene kadar salım yapmayan ancak hedef bölgede kısa veya uzun sürede salım yapan sistemler oluşturulabilir. Ayrıca bu sistemler biyolojik ortamda yüksek stabilite gösterirler, etkin maddeyi enzimatik degradasyona karşı koruyabilirler ve etkin maddenin biyoyararlanımını artırarak tedavi etkinliğini artırır. Bu sistemler biyoparçalanır polimerlerden üretildikleri takdirde ilaç salımının ardından parçalanarak vücuttan atılabilirler ve parçalanma ürünleri toksik olmadığı için vücutta zarar vermezler. Nanopartiküllerin üretim basamakları genellikle basittir ve farklı yöntemlerle sterilize edilebilmeleri de mümkündür.

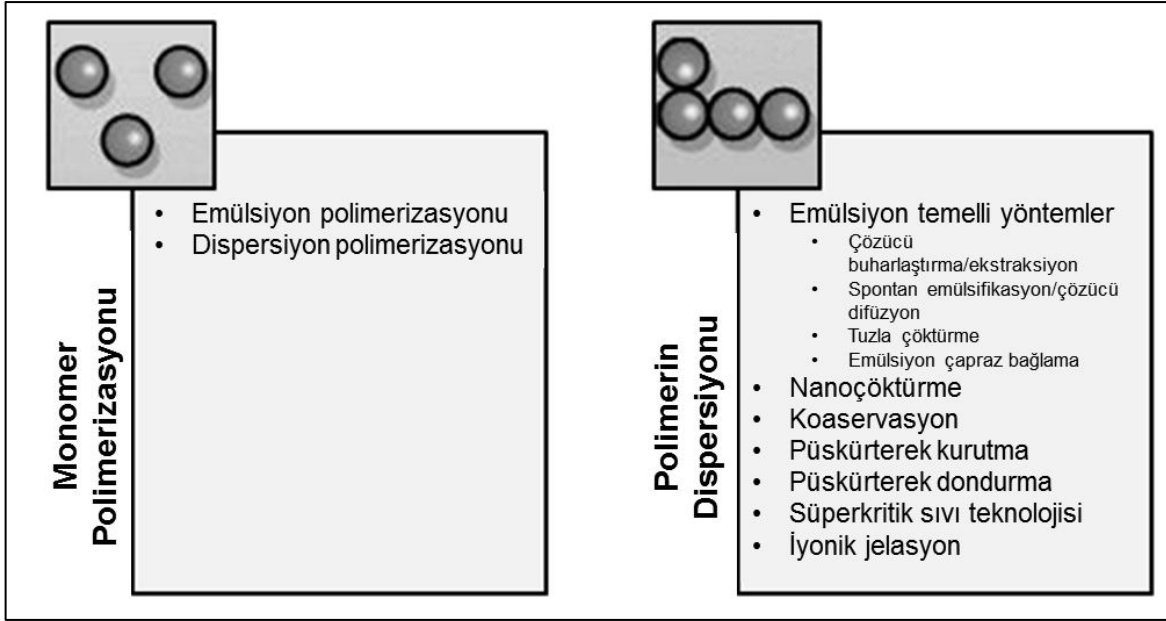


Şekil 2.16. Polimerik nanopartiküllerin şematik gösterimi
A) Nanoküre B) Nanokapsül [65].

Nanopartiküllerin boyutlarının düşük olması ve buna bağlı olarak yüzey alanlarının yüksek olması bazı sakıncaları ortaya çıkarmaktadır. Bu durum partiküller arası agregasyona neden olmakta ve partiküllerin uzun süre saklanmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca düşük partikül büyüklüğü ilaç yüklemesini sınırlamakta, ilacın salımında ani artış olarak bilinen “burst effect” veya “patlama etkisine” neden olmakta ve nanopartikülün biyolojik membranlar ile etkileşimini artırarak KBE gibi çeşitli biyolojik bariyerleri rahatlıkla geçmesine, böylece vücudun istenmeyen bölgelerine çok kısa sürede ulaşmasına neden olmaktadır [65-69].

2.5.2.1.1. Nanopartikül hazırlama yöntemleri

Nanopartikül hazırlama yöntemleri formülasyonda kullanılacak ilaç, polimer veya monomerin özelliklerine göre çok çeşitlilik göstermekle birlikte monomerlerin polimerizasyonu ve polimerlerin dispersiyonu olmak üzere iki ana başlık altında sınıflandırabiliriz (Şekil 2.17.).



Şekil 2.17. Nanopartikül hazırlama yöntemleri [64, 66-67].

Monomer polimerizasyonu

Bu yöntemde nanopartikül oluşumu monomerlerin polimerizasyonu ile oluşturulur. Yöntemin emülsiyon polimerizasyonu ve dispersiyon polimerizasyonu olmak üzere başlıca iki türü vardır. Emülsiyon polimerizasyonu yönteminde polimerizasyon işlemi emülgatör maddelerin oluşturduğu miseller içinde oluşur. Monomer damlacıklarından misel içine difüze olan monomerler polimerizasyon başlatıcı moleküllerin etkisiyle polimerleşir ve bu işlem tüm monomerler polimerleşinceye kadar devam eder. Böylece nanopartiküller oluşturulur. Dispersiyon polimerizasyonu yönteminde ise monomer, başlatıcı molekül ve stabilizan maddeyi içeren bir çözelti hazırlanır. Monomerin polimerizasyonu ile devamlı faz içinde çözünmeyen partikül oluşumu sağlanır ve böylece partiküller elde edilir. Bu yöntemde oldukça homojen boyutlu partiküller elde edilir.

Her iki yöntemde de polimerizasyon sırasında kullanılan yardımcı maddeler oldukça toksik olduğu için hazırlanan partiküllerin uzun saflaştırma basamaklarına ihtiyacı vardır.

Polimerin dispersiyonu

Bu yöntemde nanopartikül oluşturmada polimerizasyon işlemi gerçekleştirilerek polimerler sentezlenir veya hazır polimerler kullanılır. Dolayısıyla polimerizasyon sırasındaki toksik maddelerin arındırılması ile çok daha güvenilir nanopartiküller oluşturulabilir.

Emülsiyon Temelli Yöntemler

Emülsiyon temelli yöntemler kendi içinde çok çeşitlilik göstermekle birlikte temelde emülsiyon oluşturma ve çözücü uzaklaştırma olmak üzere iki temel basamağı içerir.

Çözücü buharlaştırma/ekstraksiyon

Bu yöntemde ilaç ve polimerin çözünürlüğüne göre tekli emülsiyon (yağ/su (Y/S) veya su/yağ (S/Y)) veya çoklu emülsiyon (su/yağ/su (S/Y/S)) oluşturularak nanopartiküller hazırlanır.

Tekli emülsiyon yönteminde polimer ve ilaç aynı organik çözücüde çözünür. Bu organik çözücü uçucu ve suyla çok az karışabilen bir çözücü olmalıdır. Organik çözücü hacimce daha yüksek olan ve emülgatör içeren sulu faza eklenir ve Y/S emülsiyonu oluşturulur. Nanopartiküllerin oluşumu hafifi karıştırma altında organik çözücünün uçurulması ile veya ekstraksiyonu ile sağlanır. S/Y emülsiyonunda ise Y/S emülsiyonundan farklı olarak polimer ve ilaç sulu fazda çözünerek hacimce daha fazla olan organik faza eklenir.

Çoklu emülsiyon yönteminde genellikle ilaç ve polimer farklı fazlarda çözünür. İlk olarak S/Y emülsiyonu oluşturulur bu emülsiyonda su fazında ilaç yağ fazında ise polimer bulunur. Bu S/Y emülsiyonu hacimce daha fazla olan sulu faza eklenir ve böylece S/Y/S emülsiyonu oluşturulur. Organik solvanın uçurulması veya ekstraksiyonu ile nanopartiküller elde edilir.

Spontan emülsifikasyon/çözücü difüzyon

Y/S emülsiyonu yönteminin bir modifikasyonudur. Bu yöntemde Y/S emülsiyonunun aksine yağ fazı suda çözünen (aseton, etanol gibi) ve suda çözünmeyen (diklorometan gibi) iki çözücü içerir. Polimer ve ilaç bu çözücü karışımının içinde çözünür ve sürfaktan içeren sulu faza aktarılır. Suda çözünen çözücünün spontan difizyonu iki faz arasında bir türbülans oluşturur ve böylece küçük nanopartiküller elde edilir.

Tuzla çöktürme

Bu yöntemde normal şartlar altında su ile karışabilen ancak tuz konsantrasyonunda karışamayan bir çözücünün içinde ilaç ve polimer çözünür. Bu çözelti elektrolit ve kolloidal stabilizan içeren sulu faza aktarılarak emülsiyon oluşturulur. Oluşan bu Y/S emülsiyonu seyreltilerek tuz oranı düşürülür. Böylece organik fazın sulu faza dispersiyonu ile nanopartiküller elde edilir. Özellikle sıcaklıktan etkilenen ilaçlar için çok uygundur. Yöntemin en büyük dezavantajı ise sistemden elektrolitlerin giderilmesinin güç olmasıdır.

Emülsiyon çapraz bağlama

Diğer emülsiyon temelli yöntemlerde olduğu gibi bu yöntemde de ilaç, polimer ve sürfaktan içeren bir emülsiyon hazırlanır. Bu emülsiyona glutaraldehid gibi bir çapraz bağlayıcı ajan ilave edilerek nanopartiküller elde edilir. Bu yöntemde tuzla çöktürme yönteminde olduğu gibi toksik maddeler içerdiğinden uzun yıkama ve saflaştırma basamaklarına ihtiyaç vardır.

Nanoçöktürme

Çözücü çöktürme olarak da adlandırılan bu yöntemde herhangi bir emülsiyon basamağı yoktur. Bu nedenle oldukça basit ve ekonomik bir yöntemdir. Polimer su ile karışabilen bir organik çözücü (aseton, etanol gibi) ile çözünür ve sulu faza eklenir. Organik çözücünün sulu faza difüze olmasıyla polimerler sulu ortamda çöker ve böylece spontan olarak nanopartiküller oluşur.

Koaservasyon

Bu yöntemde polimer ve ilaç bir çözücü içinde çözünür. Çözeltinin çözücülüğü hazırlanma işlemi sırasında azaltılarak normalde tek faz olan sistemin iki faza ayrılması sağlanır. Faz ayrımı ile oluşan koaservant ekstrakte edilir ve böylece nanopartiküller elde edilir.

Püskürterek kurutma

Bu yöntemde ilaç ve polimer içeren çözelti özel cihazlar yardımı ile sıvı halden sıcak kuru ortam içine püskürtülerek kurutulur. Böylece katı hale geçmiş nanopartiküller elde edilir.

Püskürterek dondurma

Bu yöntemde ilaç ve yardımcı madde erime noktasının üzerinde bir sıcaklıkta atomize edilir ve özel cihazlar yardımı ile püskürtülerek partikül damlacıklarının soğuk hava ile katılaşması sağlanır. Böylece nanopartiküller elde edilir.

Süperkritik sıvı teknolojisi

Polimer ve ilaç basınç ve sıcaklık altında süperkritik akışkan (CO₂ gibi) içinde çözünür. Özel bir cihaz yardımıyla çözelti püskürtülür ve basınç azaltılarak çözeltinin çözücülüğü azaltılır. Böylece partiküllerin çökmesi sağlanır ve nanopartiküller elde edilir. Toksik bir madde içermediği için oldukça güvenilir bir yöntemdir ve nanopartiküller oldukça saf bir şekilde elde edilir. Dezavantajı ise oldukça pahalı bir sistem olmasıdır.

İyonik jelyasyon

Zıt yüklü maddelerin elektrositatik etkileşiminden ve birleşerek jelleşmesi temeline dayanan bir yöntemdir. Genellikle kitosan nanopartiküllerin oluşturulmasında kullanılır. Kitosan katyonik, sodyum tripolifosfat ise anyonik bir maddedir. Her iki maddenin ayrı ayrı çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltiler birbiri içinde karıştırıldığında iki madde elektrostatik etkileşim nedeni ile birleşir ve böylece nanopartiküller oluşur [64, 66-67].

2.5.2.1.2. Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonları

Hazırlanan nanopartiküllerin yüzey özellikleri aktif hedeflendirme, kanda kalış süresini ve biyolojik membranlarla etkileşimini artırma gibi amaçlara yönelik olarak modifiye edilebilir. Bu işlem için partikülün yüzeyi doğrudan kaplama malzemesi (polimer veya sürfaktan) ile kaplanabilir veya nanopartikül hazırlanması sırasında polimer olarak uygun kopolimerler kullanılabilir. Yüzey modifikasyonlarından en çok bilinen ve çalışılan Polietilen glikoldür. Nanopartiküller PEG ile kaplanarak MPS tarafından tanınmamakta ve kanda kalış süresi artmaktadır. Kanda uzun süre kalan nanopartiküllerin hedef bölgeye ulaşabilme olasılığı kısa kalan partiküllere göre çok daha yüksektir. Bir diğer yüzey modifikasyonu stratejisi ise nanopartikülün yüzeyinin antikorlar ile kaplamaktır. Çeşitli antikorlarla kaplanan nanopartiküller ile aktif hedeflendirmeye yönelik ilaç taşıyıcı partiküller elde etmek mümkündür. Ayrıca çeşitli kaplamalar ile nanopartiküllerin yüzey yükleri de değiştirilebilir. Hücre zarları doğal olarak negatif yüke sahiptir, bu nedenle pozitif yüzey yüklü nanopartiküller hücre zarı ile elektrostatik etkileşerek hücre içine negatif yüklü nanopartiküllere oranla daha hızlı ve fazla sayıda alınırlar. Kitosan gibi pozitif yüklü polimerler ile nanopartiküllerin yüzeylerinin kaplanması onlara hücre içine geçişte avantaj sağlamaktadır [67, 70-73].

2.5.2.1.3. Nanopartiküllerin fiziksel karakterizasyonu

Fiziksel karakterizasyon nanopartiküllerin *in vivo* davranışlarının anlaşılmasında oldukça önemlidir. Fiziksel karakterizasyonda nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, yüzey morfolojisi, yüzey yükü, kristallik ve kimyasal bileşimi gibi özellikleri incelenir.

Partikül büyüklüğü nanopartikülün vücuttaki birikim bölgesi, biyolojik membranlardan geçişi, yarılanma ömrü, ilaç yükleme kapasitesi, ilaç salım profili gibi birçok parametreyi doğrudan etkilemektedir. Yapılan çalışmalar nanopartiküllerin büyüklüklerindeki azalmaya bağlı olarak dokulardaki dağılımının değiştiğini göstermektedir. Partikül büyüklüğü ölçümünde bir çok yöntem olmakla birlikte dinamik ışık saçılımı tekniği bu alanda sıklıkla kullanılan hızlı bir yöntemdir.

Yüzey yükü ölçümünde zeta potansiyeli değeri kullanılmaktadır. Zeta potansiyeli partiküllerin yüzey yükü hakkında dolaylı yoldan bilgi vermektedir. Kolloidal

partiküller dispersiyon ortamından iyon adsorbe ederler ve her partikül yüzey yüküne göre, aksi yöndeki iyonlarla çevrilidir. Partikülün etrafında tek tabakalı moleküler bir iyon bulutu oluşur. Bu tabakanın etrafında da partiküle bağlı olmayan ve hareketli ikinci bir iyon tabakası yer almaktadır. Partikül yüzeyine yapışmış olan elektriksel tabakanın potansiyeline elektrotermodinamik potansiyel denir. Ayrıca dispersiyon ortamında bu çift tabakanın dışında da pozitif iyonların negatif iyonlara eşit olduğu nötral bir alan vardır. Partikül yüzeyi ile bu nötral bölge arasındaki potansiyel farka zeta potansiyel denir. Bu potansiyel zetasizer ile ölçülür ve birimi milivolt'tur. Zeta potansiyel kolloidal dağılımların stabilitesinin değerlendirilmesinde önemlidir [64, 74].

2.5.2.1.4. Nanopartiküllerin sterilizasyonu

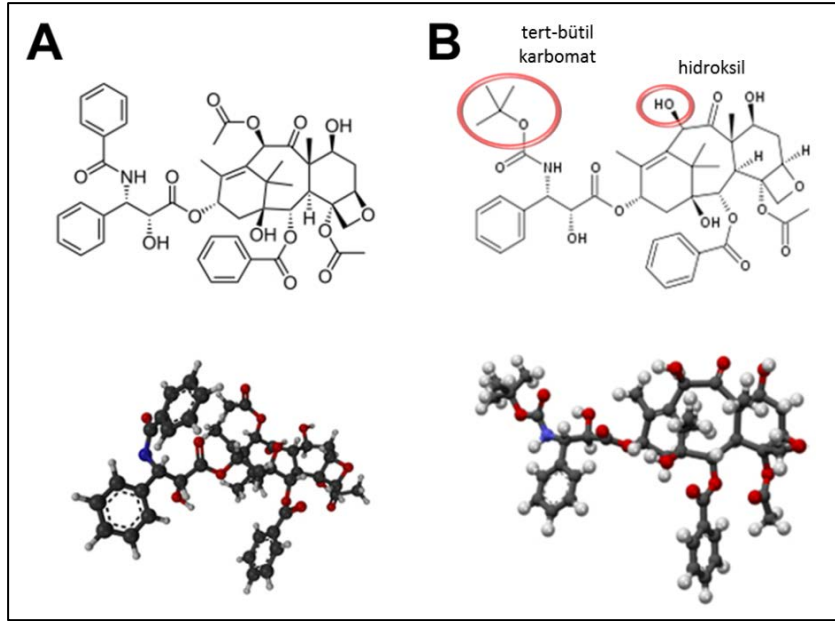
Sterilizasyon, bir üründeki tüm mikroorganizmaların vejetatif ve spor şekillerinin öldürülme veya uzaklaştırma işlemidir. *In vivo* uygulanacak olan nanopartiküllerin sterilizasyonu oldukça önemlidir. Partiküllerin aseptik ortamda hazırlanması, filtrasyonu, otoklavlanması ve gama sterilizasyonu gibi yöntemler mevcuttur. Sterilizasyon sırasında nanopartikülün fizikokimyasal özelliklerinin değişmemesi gerekmektedir [64, 74].

2.6. Dosetaksel

Dosetaksel (Taxotere®) taksan sınıfı üyesi olan antineoplastik bir ajandır. Bu sınıfın en bilinen üyesi pasifik porsuk ağacından (*Taxus brevifolia*) elde edilen paklitakseldir (Taxol®). Bu ağaç yavaş büyüyen nadir bir ağaç olması nedeniyle son yıllarda nesli tükenme tehlikesine girmiştir. Paklitaksel üretimindeki bu risk 1985 yılında yarı sentetik analogu olan dosetakselin geliştirilmesine neden olmuştur. Dosetaksel daha yaygın bulunan Avrupa porsuk ağacının (*Taxus baccata*) iğne yapraklarından elde edilen 10-deasetilbakkatin'in esterleştirilmesi ile elde edilir. Her iki ilaç da akciğer kanseri, meme kanseri, prostat kanseri, Kaposi sarkomu, boğaz kanseri, mide kanseri, özofagus kanseri ve mesane kanseri başta olmak üzere birçok kanser türüne karşı etkilidir [75-76]. Ayrıca yapılan *in vitro* çalışmalar dosetakselin glioma hücreleri üzerine etkili olduğunu göstermektedir [77].

2.6.1. Genel özellikleri

Dosetaksel'in sistematik (IUPAC) adı 1,7β,10β-trihydroxy-9-oxo-5β,20-epoxytax-11-ene-2α,4,13α-triyil 4-acetate 2-benzoate 13-((2R,3S)-3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]-2-hydroxy-3-phenylpropanoate) ve kapalı formülü C₄₃H₅₃NO₁₄ olan diterpenoid bir moleküldür. Dosetakselin kimyasal yapısı paklitaksel'den iki önemli farklılık ile ayrılır. Dosetakselin fenilpropionat yan zincirinde benzil amit yerine tert-bütil karbomat esteri ve 10. karbonunda asetat esteri yerine hidroksil grubu içerir (Şekil 2.18.). 10. karbonundaki bu hidroksil



Şekil 2.18. A) Paklitaksel ve B) Dosetaksel'in kimyasal yapısı ve farklılıkları.

grubu dosetakselin paklitaksel'e göre daha hidrofilik olmasını sağlar [75]. Dosetaksel paklitaksel gibi suda çözünmez (suda çözünürlüğü 4.93 µg/mL'dir) ancak 0.1 N'lik hidroklorik asit, kloroform, dimetilformamit, sodyum hidroksit, metanol ve etanol'de (h/h %95-96) iyi çözünür. Klinik kullanımında Polysorbate® 80 içinde çözünür. Dosetaksel erime sıcaklığı 175-192 °C olan beyaz kristalize bir tozdur [76, 78, 77].

2.6.2. Etki mekanizması

Dosetaksel taksan sınıfındaki diğer ajanlar gibi hücrelerin mikrotübül fonksiyonunu etkileyerek hücrelerin mitotik aktivitelerini bozar ve hücre ölümüne neden olur. Mikrotübüller tubilin dimerlerinin polimerizasyonu ile oluşur ve depolarizasyon ile

tubulin dimerlerine ayrılır. Sağlıklı bir hücrede bu sistem dinamik bir yapı gösterir. Mikrotübüllerin temel görevi hücre bölünmesi sırasında mitotik iplikleri oluşturmaktır. Bunun yanı sıra hücre iskeletini oluşturarak hücrenin şeklini, hareketini, sinyal iletimini ve hücreler arası geçişi sağlamak gibi hayati görevleri de vardır. Mikrotübülleri parçalayan vinca alkaloitlerinin aksine taksan sınıfı ajanlar tubulin dimerlerinin β alt ünitesindeki N-terminal 31 amino asidine bağlanır. Böylece tubulinlerin polimerizasyonunu hızlandırır ve mikrotübüllerin depolimerizasyonunu inhibe eder. Taksan sınıfı ajanların bağlanması sonucunda oluşan bu mikrotübüller oldukça stabil ve fonksiyonsuzdur. Bu nedenle hücre mitotik aktivitesini tamamlayamayarak geç G_2 ve M evrelerinde kalır ve hücre ölümleri gerçekleşir [80-82]. Ayrıca bu ilaçlar iyonize radyasyonun etkisini ve tümör nekrozis faktör α 'nın ekspresyonunu da artırarak tümör hücreleri üzerine sitotoksik etki yapar [83].

Dosetaksel paklitaksel'e oranla hücre içine daha hızlı girer ve daha uzun süre kalır ayrıca anjiyogenezisi 10 kat daha fazla inhibe eder [84]. Bu nedenle bazı kanser türünde paklitaksel'den daha etkili olduğu görülmüştür [76].

2.6.3. Yan etkileri

Dosetaksel paklitaksel gibi suda çözünmeyen bir ilaçtır. Her iki ilacında dozaj şekli damar içi enjeksiyondur ve bu nedenle her iki ilacın da suda çözünebilir bir çözeltisi hastaya verilir. Günümüzde bu çözeltilerin hazırlanmasında çeşitli çözücüler kullanılmaktadır ve ilaçla ilgili yan etkiler genellikle bu çözücülerden kaynaklanmaktadır. Dosetakselin çözünmesinde kullanılan Polisorbat® 80 Cremophor® EL'e kıyasla daha az toksik bir madde olmasına karşın hasta üstüne olumsuz etkileri mevcuttur. Dosetaksel ile ilgili kliniklerde görülen belli başlı yan etkiler şu şekildedir;

Ateşli nötropeni: En sık karşılaşılan doz kısıtlayıcı toksisite miyelosüpresyon bağlı ateşli nötropenidir (klinik veya mikrobiyal enfeksiyon kaynaklı olmayan ateş). Bu durumda hastanın ciddi enfeksiyon riski vardır ve hastaneye gitmesi şarttır. Genellikle planlanan tedavi şeması değiştirilir veya ertelenir.

Aşırı duyarlılık reaksiyonu: Nadiren öldürücü akut aşırı duyarlılık reaksiyonları görülmüştür. Bu reaksiyonlar tedavinin devamlılığını etkileyebilir. Ciltte kızarıklık, kurdeşen (kaşıntılı veya kaşıntısız), göğüs darlığı, sırt ağrısı, nefes darlığı, ateş, üşüme ve titreme gibi semptomlar görülebilir. Nadiren hipotansiyon, akciğer spazmı, vücudun tamamına yayılmış kızarıklık ve eritem oluşabilir.

Su retansiyonu: Kol ve bacaklarda periferik ödem, plevral effüzyon, perikard effüzyonu, asit ve kiloartışı ile karakterize edilir. Bazı durumlarda tedavinin ertelenmesine veya iptal edilmesine neden olur.

Tırnak bozukluğu: En sık karşılaşılan hematolojik olmayan toksisitesidir. Tırnak altı ve splinter hemoraji, hiperkeratoz, tırnak iltihabı, tırnak kaybı, hiperpigmentasyon ve BeRail çizgileri görülür. Bazı hastalarda bu semptomlar ağrı ve fonksiyonel bozukluklarla birlikte gelişir ve tedavinin devamlılığını etkiler.

Nöropati: Periferik nöropati dosetakselin doza bağımlı yan etkisidir. Parestezi, güçsüzlük ve yürüme güçlüğü gibi semptomlar görülür. Genellikle bu semptomlar tedaviden sonra düzeltilebilir ancak bazı durumlarda doz sınırlayıcı etki gösterebilir [42, 76, 85].

2.6.4. Dosetakselin ticari preparatları

Taxotere® (SANOFI-AVENTIS U.S.)

Her bir mL başına 40 mg dosetaksel ve 1040 mg Polisorbat® 80 içermek üzere 20 mg/0.5mL, 80 mg/2mL ve 160 mg/4mL dilüsyonlar şeklinde 3 farklı preparatı vardır. Meme kanseri, küçük-hücreli dışı akciğer kanseri, hormona dirençli prostat kanseri, mide adenokarsinomu ve skuamöz hücreli baş boyun kanseri tedavisinde kullanılmaktadır [86].

Docefrez® (SUN PHARMA GLOBAL)

20 mg ve 80 mg etken madde ve Polisorbat® 80 içeren dilüsyonlar şeklinde 2 farklı preparatı vardır. Meme kanseri, küçük-hücreli dışı akciğer kanseri ve hormona dirençli prostat kanseri tedavisinde kullanılmaktadır [87].

Türkiye piyasasında bulunan diğer ticari preparatları

- Doceter® (20, 40, 80, 160 mg etken içeren çözelti, i.v., Farmako Eczacılık)
- Doxel® (20, 40, 80, 160 mg etken içeren çözelti, i.v., Mustafa Nevzat)
- Doxitax® (20, 40, 80 mg etken içeren çözelti, i.v., Koçak Farma)
- Tadocel® (20, 80 mg etken içeren çözelti, i.v., Actavis)
- Trekso (20, 80 mg etken içeren çözelti, i.v., Nobel İlaç) [88]

2.7. Polikaprolakton

Polikaprolakton (PCL) 1934 yılında Carothers ve Van Natta tarafından sentezlenen en eski polimerlerden biridir. Biyoyumlu, biyoparçalanır ve toksik olmayan bir polimer olan polikaprolakton FDA tarafından insanda tıbbi amaçlı kullanımı onaylıdır. PCL özellikle yavaş parçalanma hızı nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerde polimer olarak kullanıma oldukça uygundur. Literatürde bu amaçla yapılan birçok çalışma mevcuttur [89-91].

2.7.1. Genel özellikleri

PCL poliester yapıda hidrofobik yarı kristal bir polimerdir. Halkasal bir monomer olan ϵ -kaprolaktonun anyonik, katyonik veya serbest radikaller ve kurşun oktoat gibi katalizörler ile halka-açılma polimerizasyonu yöntemi ile elde edilmektedir. Polikaprolaktonun polimerizasyonunun sırasında polimerin kütlece ortalama molekül ağırlığı (M_w), M_w dağılımını, son grup kompozisyonu ve kopolimerin kimyasal yapısı gibi parametreleri etkileyen birçok faktör vardır. Örneğin düşük M_w alkoller polimerin M_w 'sini kontrol etmekte kullanılabilir. Sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n) 3,000-80,000 g/mol arasında değişmektedir. Düşük erime derecesine (kristal yapısına göre 59-64 °C arasında değişmektedir) ve camsı geçiş sıcaklığına (-60 °C) sahiptir. Bu özellikleri sayesinde düşük sıcaklıklarda bile kolay şekil alabilir. PCL oda sıcaklığında kloroform, diklorometan, karbon tetraklorür, benzen, tolüen, sikloheksan ve 2-nitropropan'da iyi çözünür. Aseton, 2-bütanon, etil asetat, dimetilformamid ve asetonitril ile az çözünür ve alkol, petrol eteri ve dietil eterde ise çözünmez. Düşük parçalanma hızı nedeniyle kontrollü ilaç salım sistemlerinde

ve implantlarda kullanıma oldukça uygundur. İlaç salım süresi polimerin M_w 'asına göre 2 ila 4 yıla kadar çıkabilmektedir. Ayrıca bu süre diğer polimerler ile kopolimerize edilerek değiştirilebilir. PCL'nin parçalanması iki aşamalı kütle erozyonuna dayanmaktadır. İlk aşamada ester grubunun otokatalitik degradesyonu ile M_n 5.000 Da'a kadar bir kayıp, ikinci aşamada ise hücre içi degradesyona uğrar. PCL biyouyumlu bir polimerdir. Yapılan çalışmalar 2 yıla kadar herhangi bir yan etkiye neden olmadığını göstermiştir [89-91].

2.7.2. Kullanım alanları

PCL'nin parçalanma hızı polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve polilaktikglikolik asit (PLGA) gibi polimerler ile kıyaslandığında çok daha yavaştır. Ayrıca parçalanma hızı diğer polimerler ile kopolimerize edilerek değiştirilebilir. PCL nanopartikül ve mikropartikül yapımına oldukça uygun bir polimerdir. PCL emülsiyon temelli nanopartikül oluşturma yöntemleri, nanoçöktürme, püskürterek kurutma ve dializ yöntemi gibi birçok nanopartikül hazırlama yönteminde polimer olarak kullanıma uygundur ve bu nedenle PCL kontrollü ilaç salın sistem ve implant hazırlanmasında kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra PCL uzun yıllardır sütür materyali, yara örtüsü, doğum kontrol cihazı, yapıştırma materyali, dişçilik materyali olarak biyomedikal alanda kullanılmaktadır. Ayrıca PCL doku mühendisliği çalışmalarında yapı iskelesi (scaffold) materyali olarak kullanılmaktadır [89-92].

2.7.3. Üstünlükleri

PCL düşük maliyetli oluşu, biyouyumlu ve biyoparçalanır olması, FDA onaylı olması, parçalanma kinetiği ve mekanik özelliğinin ayarlanabilmesi, şekillendirme ve üretim kolaylığı, kararlı olması, büyük ölçekte üretilebilir olması, mikro ve nanopartikül yapımına uygun olması nedeniyle implante ve ilaç taşıyıcı sistemlerin yapımında birçok polimere kıyasla avantajlıdır. Doku mühendisliği çalışmalarında por çapının ayarlanabildiği yapı iskelesi yapımına olanak sağlar. Polimer yapısına farklı fonksiyonel gruplar eklenerek daha hidrofilik, adhesiv ve biyouyumlu polimerler elde etmeye imkân sağlar. Ayrıca doğal ve sentetik polimerlerle kompozit ve kopolimerler oluşturmaya oldukça uygun olması bir diğer üstün yanıdır [89-90].

2.7.4. Türevleri

PCL'nin etilen oksit, polivinilklorür, kloropren, polietilen glikol ve polistiren gibi birçok monomer ve polimer ile kopolimer oluşturmaya oldukça elverişli olduğu bilinmektedir. Bu sayede PCL'a yeni özellikler kazandırmak mümkündür [90].

2.7.4.1. mePEG-PCL

Kan yolu ile verilen ilaç formülasyonlarında ilacın etki yerine ulaşmasındaki en büyük sınırlayıcı etken Mononükleer Fagositik Sistemdir (MPS). MPS hücreleri tarafından alınan formülasyon parçalanarak hızla vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Bu durumun önüne geçilmesinde polietilen glikolün (PEG) önemli bir yeri vardır. PEG ile kaplanan nano ve mikropartiküllerin yüzeyleri hidrofilik olur. MPS hücreleri bu yüzeylere tutunamadığı için nano ve mikropartikülleri fagosite ederek sistemik dolaşımdan uzaklaştırılmaz. PCL ile PEG'ün kopolimerizasyonu ile amfifilik özellikteki mePEG-PCL (metoksi polietilen glikol-polikaprolakton) kopolimeri elde edilir. Bu kopolimer ile hazırlanacak nano ve mikropartiküllerin yüzeyleri PEG ile kaplıdır. Bu PEG kaplı yüzey sayesinde nano ve mikropartiküller MPS tarafından tanınmadığı için sistemik dolaşımda daha uzun süre kalır böylece EPR etkisinden yararlanarak pasif hedeflendirmeye uygun ilaç formülasyonları oluşturulur [93-95].

2.8. Kitosan

Kitin (poly (b-(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine)) selülozdan sonra dünyada en bol bulunan ikinci doğal polimerdir. Genellikle deniz kabuklularının dış iskeletinden elde edilen bu polimer böceklerin dış iskeletinde ve bazı mantar türlerinde de bulunmaktadır. Doğal bir polisakkarit olan kitin ilk kez 1884 yılında keşfedilmiş. Kitinin en önemli türevi olan kitosan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosandır [96].

2.8.1. Genel özellikleri

Kitosan yarı kristal ve lineer bir polimerdir. Kütlece ortalama molekül ağırlığı (M_w) 3,800-20,000 Da ve deasetilasyon derecesi %66-95 arasında değişmektedir. Kitosanın çözünme özellikleri deasetilasyon derecesine ve ana zincire dağılan asetil gruplarının M_w 'a etkisine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Kitinin aksine kitosan formik, asetik, tartarik ve sitrik asit gibi organik asit solüsyonlarında (pH

6,5'den düşük) çözünebilir. Ancak fosforik asit ve sülfürik asit içinde çözünemez. Katyonik bir polimer olan kitosanın reaktif amino ve hidroksil grupları vardır. Doğal bir polimer olması ve doğal kaynaklardan bol miktarda elde edilebilmesi nedeniyle, biyouyumlu, biyoparçalanır, toksik olmayan, ucuz ve bol miktarda üretilebilen bir polimerdir. Ayrıca mukoadezif, antimikrobiyal, rejeneratif, hemostatik, fungustatik, spermid, antitümöral ve immünoadjuvan etkisi vardır [96-103].

2.8.2. Kullanım alanları

Kitosan fiziksel, kimyasal ve biyolojik üstünlükleri nedeniyle başta medikal ve kozmetik olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Kitosanın kullanıldığı başlıca alanlar içinde medikal, kozmetik, su arıtımı, kâğıt endüstrisi, tekstil, gıda, tarım, fotoğrafçılık, kromatografi ve pil üretimi sayılabilir. Medikal alanda kitosan doku mühendisliği, sütür materyali, diş implantı, yara örtüsü, yanık tedavisi, yapay deri, oftalmoloji alanında korneal kontakt lens ve ilaç taşıyıcı sistemlerde hem taşıyıcı polimer olarak hem de yüzey kaplaması olarak kullanılmaktadır [100-102].

2.8.3. Mukoadezif etkisi

Kitosan mukoadezif etkiye sahiptir. Bu etkiyi hem biyoadheziv etkisi ile hem de epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları geçici olarak açması ile sağlamaktadır. Bu nedenle mukozal uygulamalar (nasal, bukkal, vajinal gibi) için oldukça uygundur. Kitosanın biyolojik sistemlere zarar vermeden mukozal ilaç absorpsiyonunu artırdığı bilinmektedir [103].

2.8.4. Antitümöral etkisi

Kitosanın antitümöral özelliği vardır. 2001 yılında Hasegawa ve arkadaşlarının insan mesane tümör hücreleri üzerine yaptığı bir çalışmada kitosanın bu hücreler üzerine büyüme inhibitörü etkisi olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada kitosanın bu etkisinin hücrelerde kaspaz-3 mekanizmasını aktif etmesi sonucunda hücrelerde programlanmış hücre ölümüne neden olması sonucunda olduğu gösterilmiştir [104].

2.8.5. İmmünoadjuvan etkisi

Kitosanın immünoadjuvan etkisi vardır. Kitosan süspansiyonlarının ve mikropartiküllerinin immün tetikleyici etki yaparak makrofaj ve polimorf nükleer hücrelerin sayısını ve aktivasyonunu artırdığı bilinmektedir [105].

2.8.6. Kaplama materyali olarak kitosan

Kitosanın iyi bir film oluşturma özelliği vardır. Kitosan mikro ve nanopartiküllerin yüzeyinde bir film tabakası oluşturarak bu partiküllerin yüzey özelliklerini, ilaç yükleme kapasitesini, biyoadezif özelliğini ve ilaç salım süresini değiştirir. Ayrıca mikro ve nanopartiküllerin yüzey yükünü katyonik hale getirdiği için biyolojik membranlardan daha iyi geçmesini sağlar. Çeşitli çalışmalarda negatif yüklü PCL nanopartiküllerinin yüzeylerinin kitosan ile kaplanarak pozitif hale getirildiği gösterilmiştir [73, 103, 106].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

Kimyasal	Kaynak
Aseton (HPLC Grade)	Merck & Co, Almanya
Asetonitril (HPLC Grade)	Sigma & Aldrich, ABD
Diklorometan (HPLC Grade)	Sigma & Aldrich, ABD
Disodyum hidrojenfosfat	Merck & Co, Almanya
Dosetaksel ($\geq\%97$)	Fluka, Almanya
Kitosan (Protasan™ UP G-113)	Novamatrix, Norveç
Pluronik® F-68	Sigma & Aldrich, ABD
Polietilen glikol-Polikaprolakton (M_n 5000-13000)	Sigma & Aldrich, ABD
Polietilen glikol-Polikaprolakton (M_n 5000-5000)	Sigma & Aldrich, ABD
Polikaprolakton (M_n 80,000)	Sigma & Aldrich, ABD
Polivinil Alkol (W_t 30.000-70,000)	Sigma & Aldrich, ABD
Potasyum dihidrojen fosfat	Riedel-de Haën, Almanya
Potasyum Klorür	Horasan Kimya, Türkiye
Sodyum Klorür	Riedel-de Haën, Almanya
Tween® 80	Merck & Co, Almanya

3.1.2. Cihazlar

Cihaz	Firma
Çalkalamalı Su Banyosu	Memmert WNE22, Almanya
Filtre (0.45 µm)	Scheicher&Schvell, Almanya
Hassas Terazi	Mettler Telode XS 105 dualrange, ABD
Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı	IKA RCT Basic, Almanya
Liyofilizatör	Heto PowerDry PL 3000, Danimarka
Manyetik Karıştırıcı	Variomag Multipoint HP, Almanya
Mikropipet (10-100 µL, 100-1000 µL)	Eppendorf, Almanya
Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Ölçüm Cihazı	Malvern Zetasizer Nano ZS, İngiltere
pH metre	Sartorius PP-20, Almanya
Rotavapor	IKA RV06-ML, Almanya
Rotavapor	IKA RV10 Basic, Almanya
Santrifüj Aleti (500-18000 rpm)	Hettich EBA21, Almanya
Şırınga (DistriTip 12.5 mL)	Gilson DITRITIPS®, Fransa
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	FEI Nova™ NanoSEM 430, ABD
Terazi	Shimadzu AUX220, Japonya
Ultra Saf Su Sistemi	Simplicity 185-Milipore, ABD
Ultrasonik banyo	Advantage-Lab ALO4-12, İsviçre
Ultraturaks (Yüksek Hızlı Homojenizatör)	IKA T25 basic, Almanya
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	HP Agilent 1100 Series, Almanya
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Kolonu (HPLC Kolonu)	Nomura Develosil™ ODS-UG-5, Japonya

3.1.3. Hücre kültürü malzemeleri

Malzeme	Firma
96 Kuyucuklu steril plaka	Greiner Bio-one, Almanya
Biyogüvenlik Kabini	Faster BHG 2004, Class 2, İtalya
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 4.5 g/L glukoz, sodyum pirüvat, stabil glutamin içeren	Biochrom AG, Almanya
Hemasitometre	Marienfeld Haemacytometer Laboratory Glassware, Almanya
Hücre kültür kapları (flask, 25 cm ²)	Greiner Bio-one, Almanya
İnverted mikroskop Leica DMIL, DFC 320 kamera sistemi ve Leica Qwin software destekli	Leica, Almanya
L-929 Fare Fibroblast hücre hattı	Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Koleksiyonu, Türkiye
Mikroplaka okuyucu	Molecular Devices VersaMax, ABD
Pipetler (2, 5, 10, 25 mL)	Greiner Bio-one, Almanya
RG-2 Sıçan Glioma hücre hattı	ATTC American Type Tissue Cell Culture Collection, ABD
Tripan mavisi	Sigma Aldrich, ABD
Trypsin-EDTA çözeltisi (%0.05-% 0.02), PBS içinde, Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺ içermeyen	Biochrom AG, Almanya
WST-1 (Suda Çözünebilir Tetrazolium Tuzu)	Clontech, ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. Stok çözeltilerin hazırlanması

Dosetakselin (DOC) HPLC ile miktar tayini, analitik yöntem validasyonunun yapılması ve ilaç yüklü nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılmak üzere her serinin ve formülasyonun hazırlanmasında önce taze dosetaksel çözeltisi hazırlanmıştır. Bu amaçla 200 µg/mL (a/h) dosetaksel olacak şekilde tartılan dosetaksel, formülasyon hazırlama amacıyla asetonda, HPLC ile miktar tayini ve yöntemin validasyonu için asetonitrilde çözünmüş ve +4 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Dosetakselin *in vitro* miktar tayini ve yöntemin validasyonu

Dosetakselin *in vitro* miktar tayini ve yöntemin validasyonu için HP Agilent 1100 yüksek performanslı sıvı kromatografi sistemi kullanılmıştır. Geliştirilen metodun özellikleri aşağıdaki gibidir;

Mobil faz: Asetonitril:Su (50/50 h/h)

Sabit faz: Develosil ODS-UG-5 4.6 mm/150mm 5.6µm

Mobil faz akış hızı: 1 mL/dk

Enjeksiyon hacmi: 50 µL

Dedektör: Diode Array Dedektörü

Dalga Boyu: 229,6 nm

Dosetakselin alıkonma süresi: 8 dk

Kolon Sıcaklığı: 25 °C

Analiz Süresi: 10 dk

3.2.2.1. Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması

Dosetakselin asetonitril içinde hazırlanmış 200 µg/mL (a/h) stok çözeltisinden hareketle 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ve 150 µg/mL (a/h) konsantrasyonlar elde edilecek şekilde 8 adet çözelti hazırlanmış ve HPLC sistemi ile stok çözelti dâhil 9 çözeltinin ölçümü yapılmıştır. Seyreltme noktalarına karşılık gelen pik alanları kullanılarak bir kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır.

3.2.2.1.1. Analitik yöntemin validasyonu

Analitik yöntemin validasyonu, yöntemin doğruluk, kesinlik ve güvenilirliğinin kanıtlanmasına yönelik bir çalışmadır. Bu amaçla doğrusallık (linearity), doğruluk (accuracy), kesinlik (precision), duyarlılık (sensitivity), özgünlük (specificity), stabilite (stability) gibi parametreler incelenmiştir [107-109].

3.2.2.1.2. Doğrusallık

Doğrusallık (linearity) parametresinin gösteriminde Bölüm 3.2.2.1. de anlatılan kalibrasyon doğrusundan yararlanılmıştır. Dosetakselin farklı seyreltme noktalarına karşılık gelen pik alanlarının arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunun gösterilmesi amacı ile kalibrasyon doğrusunun korelasyon katsayısı (r^2) hesaplanmıştır.

3.2.2.1.3. Doğruluk

Doğruluk (accuracy) parametresi analitik yöntem ile elde edilen bulguların gerçek değerlere uygunluğunu gösteren bir parametredir. Bu amaçla 3.2.2.1.'de açıklanan seyreltme noktalarından seyreltik, orta ve yoğun olmak üzere üç farklı derişim seçilmiş (2, 50 ve 150 µg/mL) ve 6 seri taze çözelti hazırlanarak HPLC analizi yapılmıştır. Bulunan pik alanları kalibrasyon denkleminde uygun yere yerleştirilerek karşılık gelen konsantrasyon değerleri bulunmuş ve her bir seyreltme noktası için ortalama % geri kazanım (x), standart sapma (SS) ve % varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak değerler yorumlanmıştır.

3.2.2.1.4. Kesinlik

Kesinlik (precision) parametresi analitik yöntemin art arda ölçümler arasındaki tutarlılık derecesini gösteren bir parametredir. Bu parametre aynı konsantrasyondaki örneğin HPLC analizi ile bulunan konsantrasyon değerlerinin \bar{x} , SS ve VK'nın hesaplanması ile değerlendirilmektedir. Bu amaçla tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve günler arası fark incelenmiştir.

Tekrar edilebilirlik

Kesinliğin bir alt parametresi olan tekrar edilebilirlik aynı konsantrasyondaki çözeltinin aynı laboratuvar şartları, aynı analist ve aynı cihaz ile gerçekleştirilen tekrarlanan ölçümlerinin birbiri arasındaki tutarlılığı inceler. Tekrar edilebilirlik parametresinin tespiti amacı ile dosetakselin 25 µg/mL çözeltisi seçilmiştir. Bu çözeltinin 6 kez art arda HPLC analizi yapılmış ve bulunan pik alanlara karşılık gelen konsantrasyon değerleri saptanmıştır. Hesaplanan konsantrasyon değerlerinin \bar{x} , SS ve VK değerleri hesaplanarak yorumlanmıştır.

Tekrar elde edilebilirlik

Kesinliğin bir alt parametresi olan tekrar elde edilebilirlik aynı derişimdeki farklı çözeltilerin HPLC analizi ile ölçülen değerlerin birbiri arasındaki tutarlılığı inceler. Bu amaçla dosetakselin 25 µg/mL çözeltisi seçilmiştir. Stok çözeltilerden hareketle 6 farklı 25 µg/mL'lik çözelti hazırlanmış, HPLC analizi yapılmış ve bulunan pik alanlara karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan konsantrasyon değerlerinin \bar{x} , SS ve VK değerleri hesaplanarak yorumlanmıştır.

Günler arası farklılık

Kesinliğin bir alt parametresi olan günler arası farklılık farklı günlerde hazırlanan aynı derişimdeki çözeltinin HPLC analizi ile ölçülen değerlerin birbiri arasındaki tutarlılığı inceler. Bu amaçla dosetakselin 25 µg/mL çözeltisi seçilmiştir. 3 farklı günde stok çözeltilerden hareketle 25 µg/mL'lik çözelti hazırlanmış, HPLC analizi yapılmış ve bulunan pik alanlara karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan konsantrasyon değerlerinin \bar{x} , SS ve VK değerleri hesaplanarak yorumlanmıştır.

3.2.2.1.5. Duyarlılık

Duyarlılık (sensitivity) parametresi dosetakselin saptama sınırını (limit of detection (LOD)) ve tayin edilebilirlik sınırını (limit of quantitation (LOQ)) inceleyen bir parametredir. LOD, HPLC cihazının tayin edilecek maddeyi algılayabildiği en düşük konsantrasyon değeridir. LOQ ise tayin edilecek maddeyi doğru ve tekrarlanabilir bir şekilde tayin edebildiği en düşük konsantrasyon değeridir. LOD ve LQD değerlerinin hesaplanmasında kalibrasyondaki en seyreltik konsantrasyon olan 1 µg/mL seçilmiştir. Bu konsantrasyondaki HPLC analizinde pik alanından önceki ve sonraki düzgün bölgeler seçilmiş ve sinyal/gürültü oranı hesaplanarak bu oranın 3 olduğu konsantrasyon değeri LOD ve 10 olduğu konsantrasyon değeri LOQ olarak belirlenmiştir.

3.2.2.1.6. Özgünlük

Özgünlük (specificity) parametresi dosetaksel dışında ortamda bulunacak olası maddelerin dosetaksel ile girişimsel bir pik verip vermediğinin göstergesidir. Bu amaçla formülasyonda kullanılan polimer ve yardımcı maddelerin aynı koşullarda HPLC analizi yapılmıştır.

3.2.2.1.7. Stabilite

Stabilite (stability) parametresi dosetakselin analiz süresi boyunca bozulmadan stabil olarak kalıp kalmadığının gösterildiği bir parametredir. Bu amaçla 25 µg/mL konsantrasyon seçilmiş ve aynı örneğin 0. ve 48. saatlerde HPLC analizi yapılmıştır. Bulunan pik alanlara karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır.

3.2.3. Nanopartiküllerin hazırlanması

3.2.3.1. Ön formülasyon çalışmaları

3.2.3.1.1. Polimer seçimi

Nanopartiküllerin hazırlanmasında toksik olmaması, biyouyumlu olması, biyo-parçalanabilir olması, literatürde sıklıkla kullanılır olması, nanopartikül hazırlama yöntemlerine uygun olması ve FDA tarafından insanda tıbbi amaçlı kullanımı onaylı olması nedeniyle polikaprolakton ve polikaprolaktonun bir türevi olan metoksi polietilen glikol-polikaprolakton kopolimeri seçilmiştir. Her iki polimerin de nanopartikül hazırlamasında polimer olarak kullanıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur [110-111].

3.2.3.1.2. Hazırlama yönteminin seçimi

Bölüm 2.5.2.1.1. de anlatılan nanopartikül hazırlama yöntemlerinden nanoçöktürme, Y/S tekli emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma ve S/Y/S çoklu emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yöntemleri PCL nanoküre ve nanokapsüllerinin hazırlanmasında sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. PCL nanopartiküllerinin hazırlama yöntemine bağlı olarak boyut, yüzey yükü ve polidispersite indeksi gibi özellikleri değişiklik göstermektedir. Bu nedenle formülasyon çalışmalarına geçilmeden önce bu 3 yöntem kullanılarak bir ön formülasyon çalışması yapılmış ve PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli gibi karakteristik özelliklerindeki değişim incelenmiştir.

Nanoçöktürme yönteminde polimer 35°C'de organik çözücü olan asetonda çözülmüş ve manyetik karıştırıcı altında şırınga yardımıyla (Gilson DISTRITIPS®) sulu faza damlatılmıştır. Organik çözücü rotavapor yardımıyla uzaklaştırılmış ve nanopartiküller elde edilmiştir.

Y/S tekli emülsiyon oluşturma çözücü buharlaştırma yönteminde %0.1 (a/h) polimer organik çözücü olan diklorometan içinde çözülmüş, sürfaktan içeren sulu faza aktarılmış ve ultraturax yardımıyla emülsiyon damlaları elde edilmiştir. Organik çözücü rotavapor yardımıyla uzaklaştırılmış ve nanopartiküller elde edilmiştir.

S/Y/S çoklu emülsiyon oluşturma-çözücü buharlaştırma yönteminde ise polimer organik çözücü olan diklorometan içinde çözünmüştür. Sürfaktan içeren sulu faz polimer içeren ve hacimce fazla olan organik faza aktarılmış ve ultraturax yardımıyla S/Y emülsiyon damlaları elde edilmiştir. Bu primer emülsiyon hacimce daha fazla olan ve sürfaktan içeren sulu faza aktararak ve ultraturax yardımıyla homojenize edilerek S/Y/S emülsiyon damlaları elde edilmiştir. Organik çözücü rotavapor yardımıyla uzaklaştırılarak nanopartikül dispersiyonu elde edilmiştir.

3.2.3.1.3. Polimer oranının seçimi

Literatürde %0.1-0.5 arasında değişen polimer oranlarda kullanılarak PCL ve mePEG-PCL nanopartikülleri hazırlanmıştır [112-114]. Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan nanopartiküller için en uygun polimer oranının seçilmesi amacı ile % 0.05, 0.1 ve 0.2 (a/h) PCL içeren 1 mL'lik aseton çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir PCL çözeltisi manyetik karıştırıcı altında 2 mL %0.5 (a/h) Pluronik® F-68 içeren sulu faza şırınga yardımıyla (Gilson DISTRITIPS®) damlatılmış ve formülasyonlar Bölüm 3.2.3.1.2.'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

3.2.3.1.4. Organik faz/sulu faz oranının seçimi

Literatürde farklı organik faz/sulu faz (2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:10) oranları kullanılarak PCL ve mePEG-PCL nanopartikülleri hazırlanmıştır [112-115]. Bu çalışmada en uygun organik faz/sulu faz oranının seçilmesi amacı % 0.1 (a/h) PCL içeren 1 mL aseton çözeltisi manyetik karıştırıcı altında 1:1, 1:2 ve 1:4 oranlarında %0.5 (a/h) Pluronik® F-68 içeren sulu faza şırınga yardımıyla (Gilson DISTRITIPS®) damlatılmıştır ve formülasyonlar Bölüm 3.2.3.1.2.'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

3.2.3.1.5. Sürfaktan oranının seçimi

Literatürde %0-5 arasında değişen sürfaktan oranlarda kullanılarak PCL ve mePEG-PCL nanopartikülleri hazırlanmıştır [112-114]. Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan nanopartiküller için en uygun sürfaktan oranının seçilmesi amacı ile % 0, 0.25, 0.5, 1 ve 2 (a/h) Pluronik® F-68 içeren 2 mL'lik sulu çözeltiler kullanılmıştır. PCL %0.1 (a/h) olacak şekilde 1 mL aseton içinde çözünmüş, manyetik karıştırıcı altında 1:2 oranında sulu faza aktarılmış ve formülasyonlar Bölüm 3.2.3.1.2.'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

3.2.3.1.6. Kitosan (Protasan™) oranının seçimi

Farklı çalışma grupları kitosan kullanarak katyonik PCL nanopartikülleri elde etmiştir [73, 103, 106]. Katyonik nanopartiküllerin hazırlanmasında kaplama maddesi olarak Protasan™'ın kullanılması planlanmıştır. Nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanacak katyonik nanopartiküller için en uygun Protasan™ oranının seçilmesi amacı ile % 0.01 ve 0.025 Protasan™ (a/h) içeren 2 mL'lik sulu çözeltiler kullanılmıştır. PCL %0.1 (a/h) oranda 1 mL aseton içinde çözünmüş ve manyetik karıştırıcı altında 1:2 oranında sulu faza aktarılmış ve formülasyonlar Bölüm 3.2.3.1.2.'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

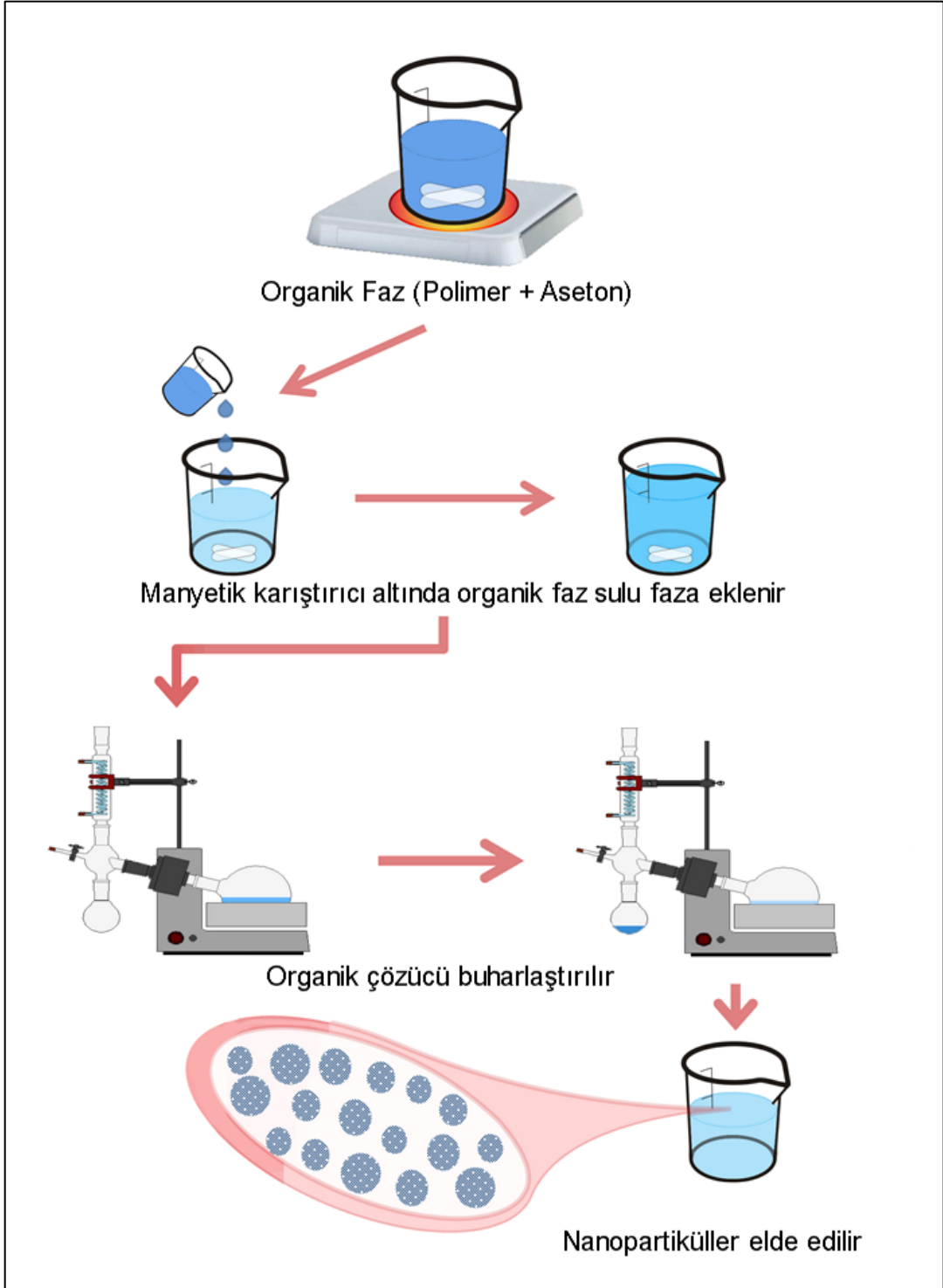
3.2.3.2. Formülasyon çalışmaları

3.2.3.2.1. Anyonik nanopartikül formülasyon çalışmaları

Ön formülasyon çalışmaları sonucu elde edilen verilere göre dosetaksel içeren anyonik PCL veya mePEG-PCL formülasyonlarının hazırlanmasında nanoçöktürme yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla 100 µg dosetaksel ve 1 mg polimer (PCL veya mePEG-PCL) 1 mL aseton içinde 35°C'de çözünmüştür. Bu çözelti manyetik karıştırma altında şırınga (Gilson DISTRITIPS®) yardımıyla damla damla 2 mL olan sulu faza oda sıcaklığında aktarılmıştır. Organik çözücü rotavapor yardımıyla 37°C'de uzaklaştırılmış ve nanopartiküller elde edilmiştir (Şekil 3.1.).

3.2.3.2.2. Katyonik nanopartikül formülasyon çalışmaları

Dosetaksel içeren katyonik PCL veya mePEG-PCL formülasyonları 200 µg Protasan™ içeren 2'şer mL sulu faz kullanılarak Bölüm 3.2.3.2.1.'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. İlaç içermeyen formülasyonların hazırlanmasında da aynı yöntem ve oranlar kullanılmış sadece organik faza DOC eklenmemiştir.



Şekil 3.1. Nanopartikül hazırlamada kullanılan nanoçöktürme yönteminin şematik gösterimi.

3.2.4. Nanopartiküllerin karakterizasyonu

3.2.4.1. Ortalama partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı

Nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi analizinde yarı-elastik ışık saçılımı (dinamik ışık saçılımı) tekniğinden yararlanılmıştır [116]. Her bir örnek, küvet (Disposable capillary cell) içine konularak 25°C'de, 173° açı ile Malvern Zetasize Nano ZS cihazında her bir ölçüm 3 defa tekrarlanacak şekilde ölçülmüş ve nm cinsinden x ve SS değerleri bulunmuştur. Ölçümler sırasında polimerin refraktif indeks değeri 1.34, çözücünün refraktif indeks değeri olarak 1.33 seçilmiştir.

3.2.4.2. Zeta potansiyeli

Nanopartiküllerin zeta potansiyeli ölçümünde Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılmıştır. Her bir örnek, küvet (Disposable capillary cell) içine konularak 25°C'de ve her bir ölçüm 3 defa tekrarlanacak şekilde ölçülmüş ve mV cinsinden x ve SS değerleri bulunmuştur.

3.2.4.3. Kısa süreli fiziksel stabilite çalışması

DOC yüklü anyonik ve katyonik nanopartiküllerinin kısa süreli fiziksel stabilite çalışması amacı ile hazırlanan formülasyonlar sulu dispersiyon halinde saklanmış ve belirli zaman aralıklarında (0., 1., 2., 7., 15. ve 30. günlerde) örnek alınarak ortalama partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli Bölüm 3.2.4.1. ve 3.2.4.2. de özetlendiği gibi saptanmıştır. Stabilite çalışmaları boyunca örnekler +4 °C'de ışıktan etkilenmeyecek şekilde saklanmıştır.

3.2.4.4. Taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleme

Anyonik ve katyonik PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskop (SEM) ile görüntülenmesi için formülasyonlar karbon tab üzerine fikse edilmiş ve altın paladyum alaşımı ile kaplanarak Nova™ NanoSEM 430 cihazı ile 5-20 kV hızlandırılmış voltajda SEM görüntüleri elde edilmiştir.

3.2.4.5. İlaç yükleme etkinliğinin belirlenmesi

İlaç yüklü nanopartikül formülasyonlarının enkapsülasyon etkinliği (% EE) ve yükleme kapasitesinin (% LC) belirlenmesi amacı ile hazırlanan nanopartikül süspansiyonları 15 dakika boyunca 5,000 rpm'de santrifüj edilmiş ve bu sayede serbest DOC kristallerinin çökmesi, nanopartiküllerin ise süpernatant içinde kalması sağlanmıştır. Süpernatant ayrılarak 24 saat boyunca liyofilize edilmiş ve böylece ilaç yüklü nanopartiküller toz halde elde edilmiştir. Toz haldeki nanopartiküller hassas terazi ile tartılmış, 300 µL diklorometan (DCM) içinde çözülmüş ve bu çözelti 3 mL asetonitril içine eklenerek nanopartiküllerin tamamen çözünmesi ile yüklenen ilacın çözeltisi elde edilmiştir. Çözeltideki DCM azot gazı ile uçurulmuş ve çözelti içindeki DOC miktarı HPLC yardımıyla ölçülmüştür.

Enkapsülasyon etkinliğinin “Eş. 3.1.” ve yükleme kapasitesinin “Eş. 3.2.” belirlenmesinde direkt yöntem seçilmiş ve aşağıdaki denklem kullanılmıştır;

$$\% \text{ Enkapsülasyon Etkinliği (\% EE)} = \frac{\text{Ölçülen DOC miktarı (\mu\text{g})}}{\text{Başlangıçtaki DOC miktarı (\mu\text{g})}} \times 100 \quad (3.1.)$$

$$\% \text{ Yükleme Kapasitesi (\% LC)} = \frac{\text{Ölçülen DOC miktarı (\mu\text{g})}}{\text{Polimer miktarı (\mu\text{g})}} \times 100 \quad (3.2.)$$

3.2.4.6. *In vitro* etkin madde salım profilinin incelenmesi

İlaç yüklü nanopartikül formülasyonları için *in vitro* etkin madde salım profilinin incelenmesinde tüp yöntemi kullanılmıştır. İlaç yüklü nanopartikül formülasyonları hazırlandıktan sonra nanopartikül süspansiyonları 15 dakika boyunca 5,000 rpm'de santrifüj edilmiş ve serbest DOC kristallerinin çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant toplanarak santrifüj sonundaki hacimleri ölçülmüş (yaklaşık 1.5 mL) ve sink koşulları sağlamak amacı ile salım ortamı olan 15mL'lik %0.1 Tween® 80 içeren pH 7,4 fosfat tamponu çözeltisine eklenmiştir. Salım ortamı 37°C'de sabit tutulmuş ve çalkalama hızı 100 rpm olarak belirlenmiş olan çalkalayıcı su banyosuna beher içinde yerleştirilmiştir. Salım ortamından 15., 30., 45., 60. ve 75.

dakikalarda 0.75 mL örnek alınmış ve her bir örnek alma işleminden sonra salım ortamına 0.75'er mL fosfat tamponu ilave edilerek salım ortamı 15 mL'e tamamlanmıştır. Alınan örneklerin HPLC analizi yapılmış, her bir ölçümün pik alanı değerleri kalibrasyon doğru denklemine yerleştirilerek konsantrasyon ve bu konsantrasyon değerleri toplam hacim ile çarpılarak serbest hale geçen DOC miktarı hesaplanmıştır. Böylece zamana karşı % kümülatif ilaç salım profili elde edilmiştir.

3.2.5. *In vitro* sitotoksisite çalışması

Formülasyonların güvenilirliği ve etkinliği *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile tespit edilmiştir.

Boş nanopartiküllerin sitotoksisitesini belirlemeye yönelik *in vitro* güvenilirlik çalışmaları için fare fibroblast hattı olan L-929 hücre hattı kullanılmıştır. Bu yöntem, Amerikan Farmakopesinde (USP) polimerler için verilen standart sitotoksisite tayin yöntemidir ve literatürde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

In vitro etkinlik çalışmalarında ise RG-2 sıçan glioma hücre hattı kullanılmıştır. RG-2 sıçan glioma hücre hattı glioblastoma multiforme tümörleri için iyi bir modeldir. Günümüzde ilaç taşıyıcı sistemler, gen taşıyıcı sistemler, KBE yapısal değişimlerinin araştırılması ve damar geçirgenliğindeki değişimlerin değerlendirilmesi gibi çok çeşitli prelinik çalışmalarda kullanılmaktadır [117].

Tüm *in vitro* hücre kültürü çalışmaları H.Ü. Eczacılık Fakültesi, Eczacılık Teknolojisi Bölümü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. *In vitro* güvenilirlik çalışması

Formülasyonların güvenilirliğinin tespiti amacı ile L-929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmış ve boş nanopartikül formülasyonlarının bu hücre hattı üstündeki etkisi WST-1 (suda çözünebilir tetrazolium tuzu) testi ile belirlenmiştir. WST1 testinde 96'lı kuyucuklu plakalara her kuyucukta eşit miktarda hücre (5,000 hücre/100 µL) olacak şekilde hücre ve besiyeri konularak 24 saat boyunca etüvde (37°C ve % 5 CO₂) inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda hücrelere boş nanopartikül formülasyonu içeren 100 µL taze besi yeri, kontrol grubuna ise sadece besiyeri

eklenmiştir. Nanopartikül uygulanan hücreler 24 ve 48 saat boyunca etüvde (37°C ve % 5 CO₂) inkübe edilmiştir. 24 veya 48 saatin sonunda hücreler WST-1 boyası ile boyanıp mikropilaka okuyucu ile absorbans değerleri ölçülmüştür. Absorbans değerleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak her bir formülasyon için % hayatta kalan hücre sayısı hesaplanmıştır.

3.2.5.2. Dosetakselin glioma hücreleri üstüne etkisi

Dosetakselin RG-2 sıçan glioma hücre hattı üstüne etkisinin tespiti Bölüm 3.2.5.1. de özetlendiği gibi WST-1 testi ile yapılmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 200, 500 nM ve 1 µM) dosetaksel içeren DMEM (%1 DMSO içeren 100 µL) çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler 24 ve 48 saat süreyle RG-2 hücrelerine uygulanmış ve bu sürelerin sonunda hücreler WST-1 boyası ile boyanmıştır. Hücrelerin absorbans değerleri ölçülerek % hayatta kalan hücre sayısı hesaplanmış ve böylece dosetakselin farklı konsantrasyondaki çözeltilerinin RG-2 hücrelerine etkisi incelenmiştir.

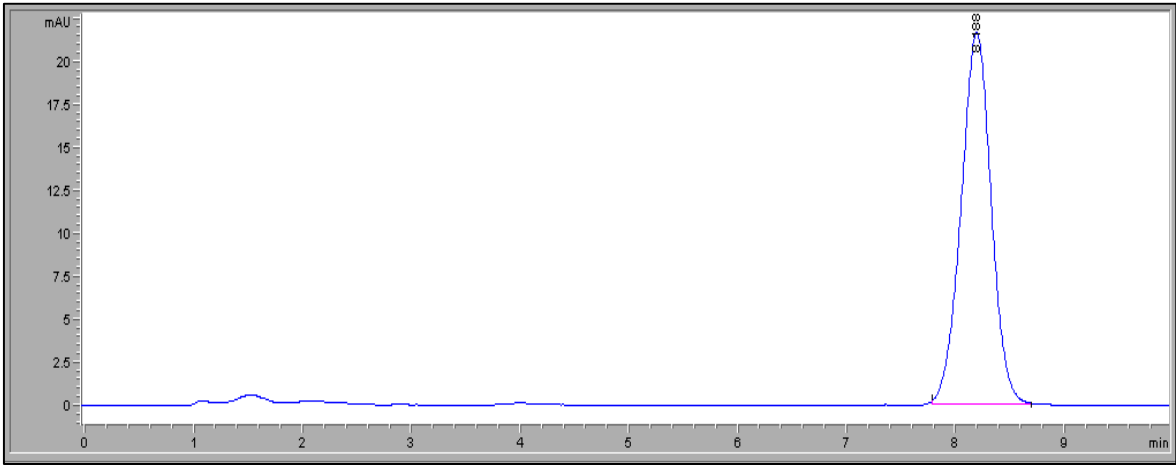
3.2.5.3. *In vitro* etkinlik çalışması

Formülasyonların glioma hücre hattı üstüne etkinliğinin tespiti amacı ile RG-2 sıçan glioma hücre hattı kullanılmıştır. İlaç yüklü nanopartikül formülasyonlarının bu hücre hattı üstündeki etkisi Bölüm 3.2.5.1. de anlatıldığı gibi WST-1 testi ile belirlenmiştir. Eşit miktarda ilaç içeren (100 µL DMEM içinde 500 nM dosetaksel içerecek şekilde) anyonik ve katyonik nanopartikül formülasyonları ve ilaç (100 µL %1 DMSO içeren DMEM içinde 500 nM) solüsyonu her bir kuyucuğa eklenmiştir. 24 ve 48 saat boyunca RG-2 sıçan glioma hücrelerine uygulanmıştır ve etüvde (37°C ve % 5 CO₂) inkübe edilmiştir. Bu sürelerin sonunda hayatta kalan hücreler WST-1 boyası ile boyanmıştır. Boyanan hücrelerin absorbans değerleri mikropilaka okuyucu ile ölçülerek % hayatta kalan hücre sayısı hesaplanmış ve formülasyonlar birbiri ile ve eşit miktarda dosetaksel içeren ilaç solüsyonu ile karşılaştırılmıştır.

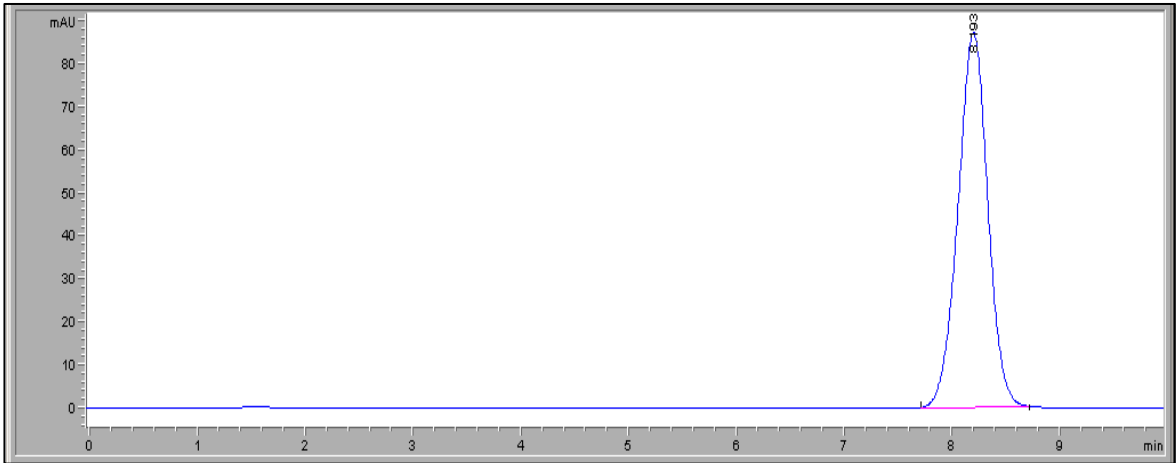
4. BULGULAR

4.1. Dosetaksin *in vitro* Miktar Tayini ve Yöntemin Validasyonu

DOC'in *in vitro* miktar tayini ve yöntemin validasyonu Bölüm 3.2.2.'de özetlendiği şekilde yapılmıştır. DOC'e ait HPLC piki düzgün bir şekilde 8,2. dakikada elde edilmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2.). Yöntemin validasyonunda doğrusallık (linearity), doğruluk (accuracy), kesinlik (precision), duyarlılık (sensitivity), özgünlük (specificity), stabilite (stability) gibi parametreler incelenmiştir.



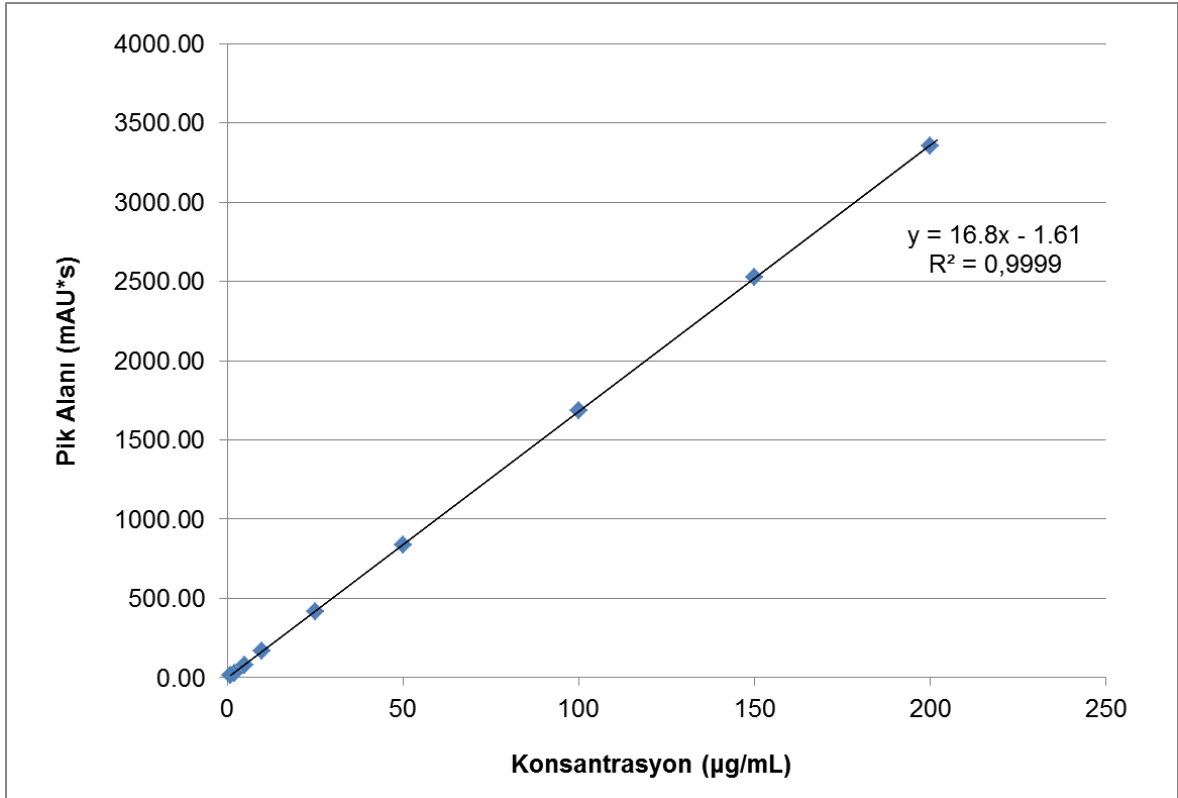
Şekil 4.1. 20 µM'lık DOC çözeltisine ait kromatogram.



Şekil 4.2. 100µM'lık DOC çözeltisine ait kromatogram.

4.1.1. Kalibrasyon doğrusunun hazırlanması

DOC'in kalibrasyon doğrusu Bölüm 3.2.2.1.'de özetlendiği şekilde hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğrusu, denklemi ve korelasyon katsayısı (r^2) farklı konsantrasyondaki çözeltilerin analizi sonucunda elde edilen pik alanlarının grafiğe geçirilmesi ve doğrusal regresyonu ile bulunmuştur. DOC'in doğrusal regresyon verileri (Çizelge 4.1.) ve kalibrasyon doğrusu (Şekil 4.3.) aşağıda verilmiştir.



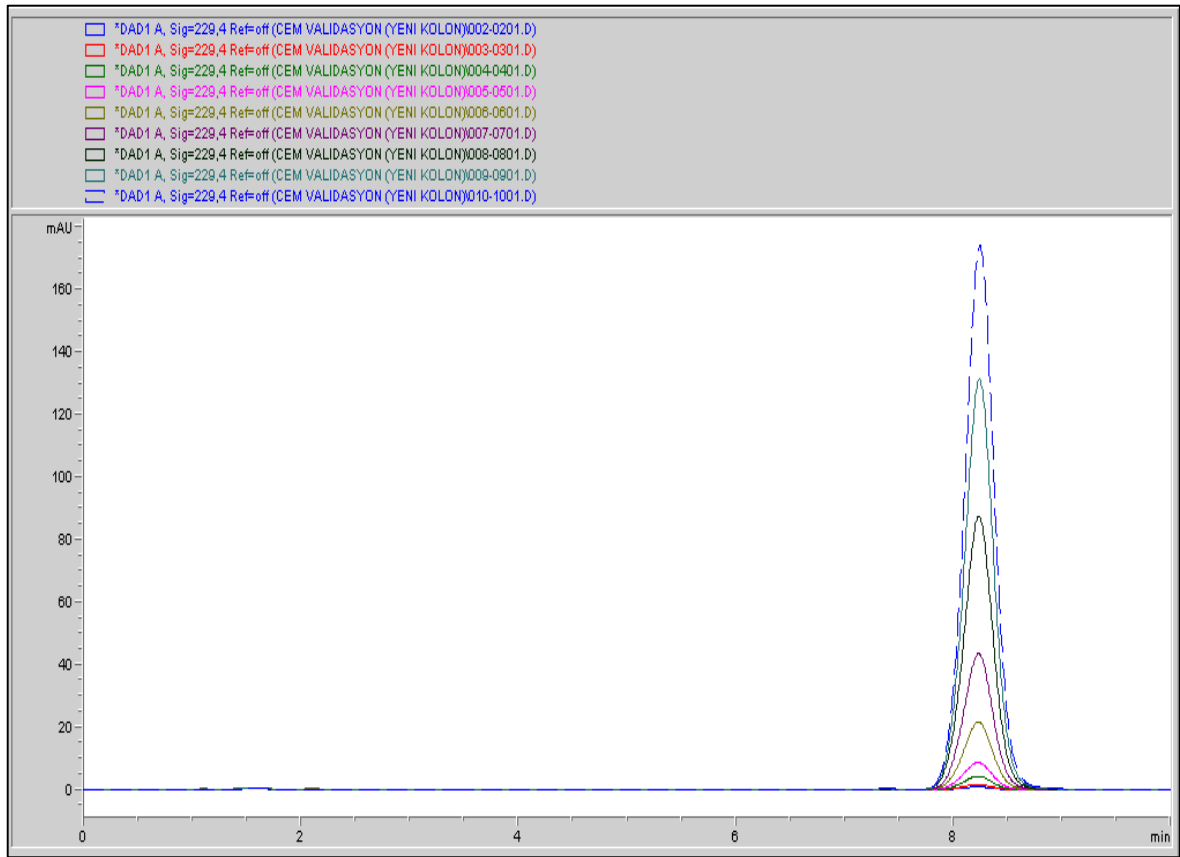
Şekil 4.3. DOC'in kalibrasyon doğrusu.

Çizelge 4.1. DOC'in doğrusal regresyon verileri.

Konsantrasyon Aralığı	1-200 µg/mL
Kalibrasyon Denklemi	$y = 16.8x - 1.61$
Eğim	16.8
Kesişim	1.61
Korelasyon katsayısı (r^2)	0.9999

4.1.1.1. Doğrusallık

DOC'in kalibrasyon doğrusu Bölüm 3.2.2.1.2.'de özetlendiği şekilde hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğrusu, denklemi ve korelasyon katsayısı (r^2) 1-200 µg/L konsantrasyon aralığında bulunan 9 farklı çözeltinin HPLC analizi ile elde edilen pik alanlarının (Şekil 4.4.) grafiğe geçirilmesi ile hesaplanmıştır. Korelasyon katsayısı (r^2) 0.9999 olarak bulunmuştur.



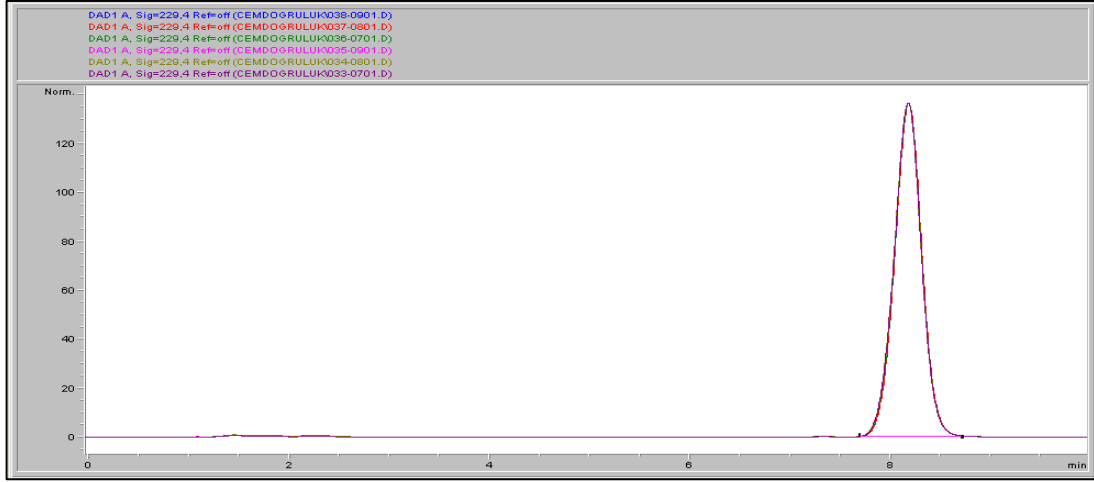
Şekil 4.4. 1-200 µg/L konsantrasyon aralığında bulunan 9 farklı çözeltinin HPLC analizi ile elde edilen piklerinin toplu gösterimi.

4.1.1.2. Doğruluk

Doğruluk parametresi Bölüm 3.2.2.1.3.'de özetlendiği şekilde incelenmiştir. Bu amaçla kalibrasyon sınırları içinde bulunan düşük, orta ve yüksek yoğunlukta 3 farklı konsantrasyon (2, 50, 150 µg/mL) seçilmiş ve stok çözeltilerden hareketle 6 seri çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin HPLC analizi yapılmış (Şekil 4.5.) ve pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplanmıştır. Hesaplanan değerlerin ortalama % geri kazanım (x), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) bulunmuştur ve aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.2.). Yapılan hesaplamalar sonucunda 2 µg/mL'lik çözeltinin VK'ı 1.46, 50 µg/mL'lik çözeltinin VK'ı 1.14, 150 µg/mL'lik çözeltinin VK'ı 0.40 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Doğruluk parametresi için hazırlanan çözeltilerin % geri kazanım, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri.

Örnek	2 µg/mL % Geri Kazanım	50 µg/mL % Geri Kazanım	150 µg/mL % Geri Kazanım
1	100.3	102.8	102.6
2	99.6	100.8	102.2
3	98.9	100.5	101.8
4	99.0	102.8	101.8
5	97.0	100.8	102.8
6	101.4	102.8	102.3
X	99.3	101.7	102.2
SS	1.45	1.16	0.41
VK	1.46	1.14	0.40



Şekil 4.5. Doğruluk parametresi için hazırlanan 150 µg/L konsantrasyonluk 6 seri çözeltinin HPLC analizi ile elde edilen piklerinin toplu gösterimi.

4.1.1.3. Kesinlik

Kesinlik parametresi Bölüm 3.2.2.1.4.'de özetlendiği şekilde incelemiştir. Bu amaçla kalibrasyon sınırları içinde bulunan 25 µg/mL çözeltisi seçilmiştir.

Tekrar edilebilirlik

Bu parametrenin incelenmesinde 25 µg/mL çözeltinin art arda 6 kez HPLC analizi yapılmış ve pik alanlarına karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplanarak konsantrasyonun \bar{x} , SS ve VK değerleri bulunmuştur (Çizelge 4.3.). Tekrar edilebilirlik parametresi için VK değeri 1.19 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. Tekrar edilebilirlik parametresi için hazırlanan çözeltilerin ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri.

Örnek	Konsantrasyon (µg/mL)
1	26.0
2	25.1
3	25.2
4	25.4
5	25.4
6	25.4
\bar{x}	25.4
SS	0.30
VK	1.19

Tekrar elde edilebilirlik

Bu parametrenin incelenmesinde 25 µg/mL çözeltinin art arda 6 kez HPLC analizi yapılmış ve tekrar edilebilirlik parametresinde olduğu gibi x, SS ve VK değerleri bulunmuştur (Çizelge 4.4.). Tekrar elde edilebilirlik parametresi için VK değeri 1.90 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4. Tekrar elde edilebilirlik parametresi için hazırlanan çözeltilerin ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri.

Örnek	Konsantrasyon (µg/mL)
1	26.8
2	26.9
3	25.6
4	26.0
5	26.7
6	26.7
x	26.4
SS	0.50
VK	1.90

Günler arası fark

Bu parametrenin incelenmesinde 25 µg/mL DOC çözeltisi 3 farklı günde hazırlanmış ve HPLC analizi yapılarak x, SS ve VK değerleri bulunmuş (Çizelge 4.5.). Günler arası fark parametresi için VK değeri 0.62 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.5. Farklı günlerde hazırlanan çözeltilerin ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri.

Gün	Konsantrasyon (µg/mL)
1.	26.5
2.	26.5
3.	26.8
x	26.6
SS	0.16
VK	0.62

4.1.1.4. Duyarlılık

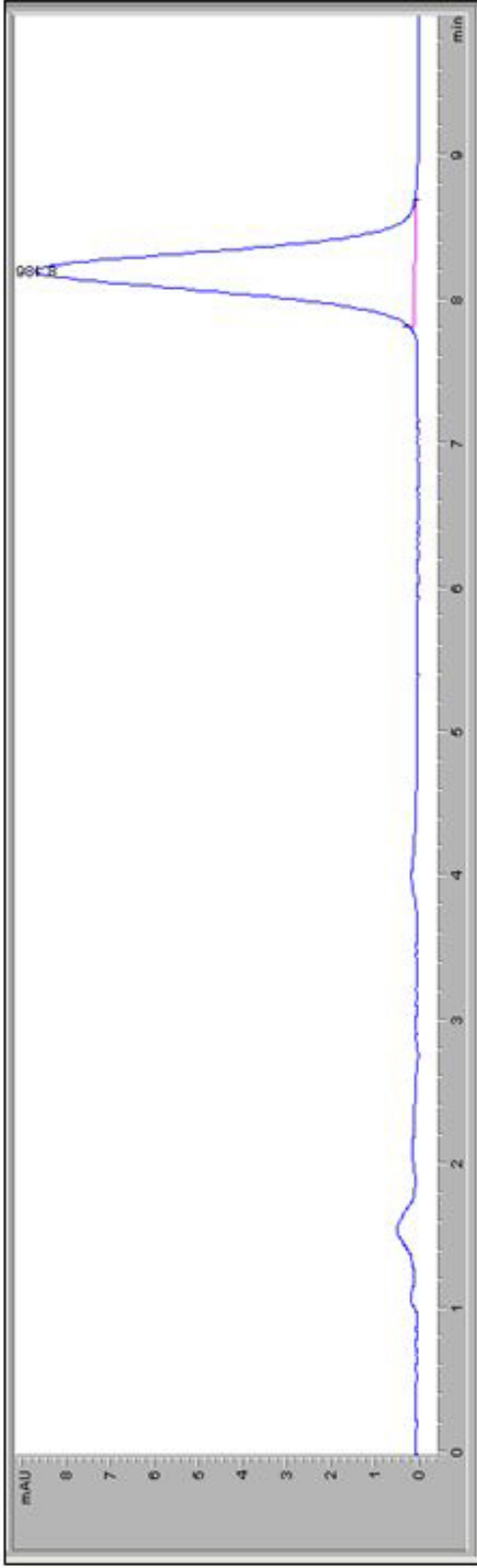
Duyarlılık parametresinin Tanıma Sınırı (LOD) ve Alt Tayin Sınırı (LOQ) Bölüm 3.2.2.1.5.'de özetlendiği şekilde incelemiştir. Bu amaçla kalibrasyon sınırları içinde bulunan en düşük konsantrasyon olan 1 µg/mL çözeltisi seçilmiştir ve sinyal/gürültü değeri 34.9 olarak bulunmuştur. Buradan yola çıkılarak bu değerin 3 olduğu konsantrasyon yani LOD değeri 0.09 µg/mL olarak, bu değerin 10 olduğu konsantrasyon yani LOQ değeri 0.29 µg/mL olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. LOD ve LOQ değerleri.

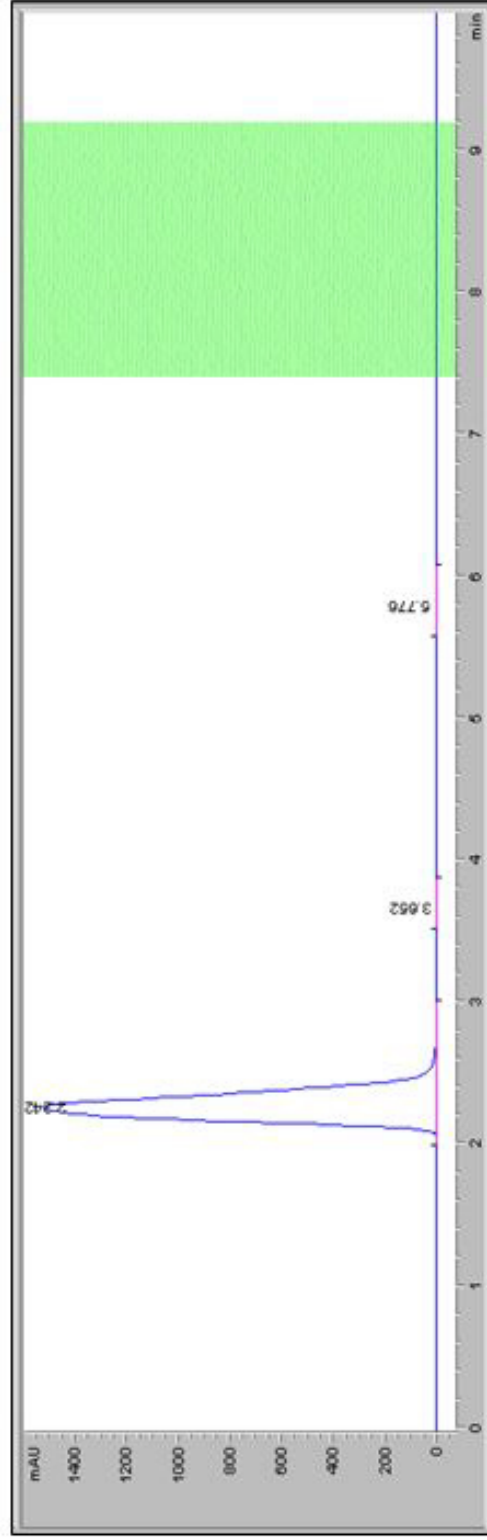
LOD	0.09 µg/mL
LOQ	0.29 µg/mL

4.1.1.5. Özgünlük

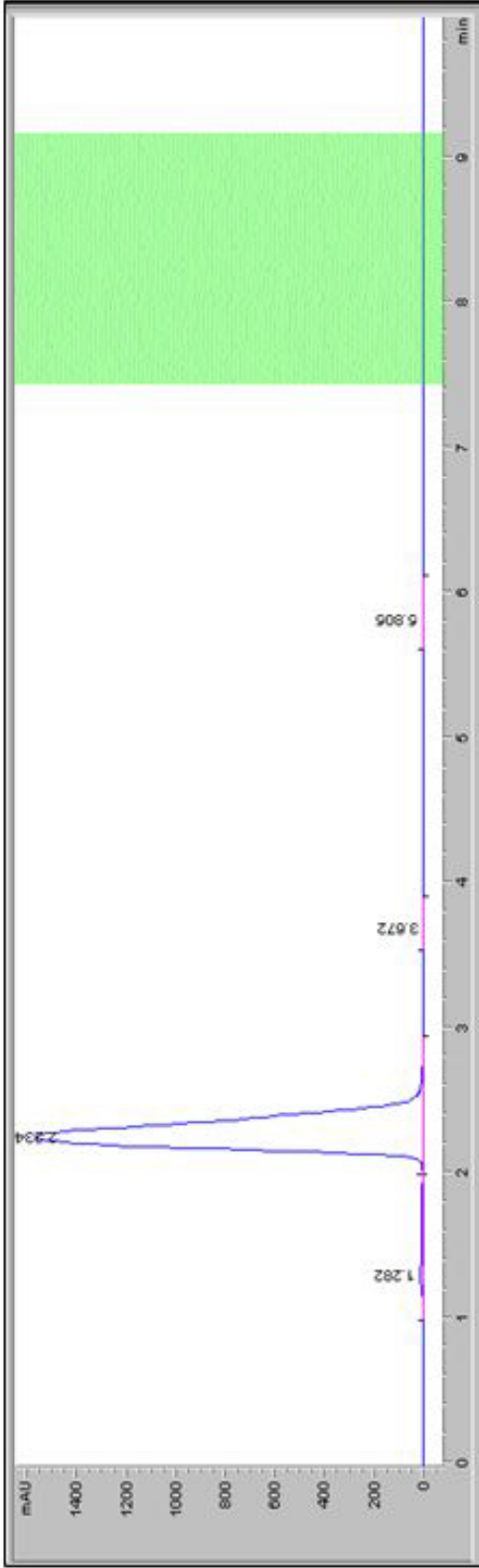
Özgünlük parametresi Bölüm 3.2.2.1.6.'da özetlendiği şekilde incelemiştir. Bu amaçla formülasyon geliştirilmesi sırasında kullanılan PCL ve mePEG-PCL ve kitosan çözeltilerinin aynı kromatografi şartlar altında DOC'in piki (Şekil 4.6.) ile girişimli bir pik verip vermeyeceği incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda formülasyonda kullanılan PCL (Şekil 4.7.), mePEG-PCL (Şekil 4.8.) ve CS'in (Şekil 4.9.) DOC'in pik verdiği zaman aralığında (7,5-9,5 dakika aralığında) herhangi bir pik vermediği görülmüştür. Ayrıca HPLC deneyleri boyunca DOC'in piki ile girişimli hiçbir pike rastlanmamıştır.



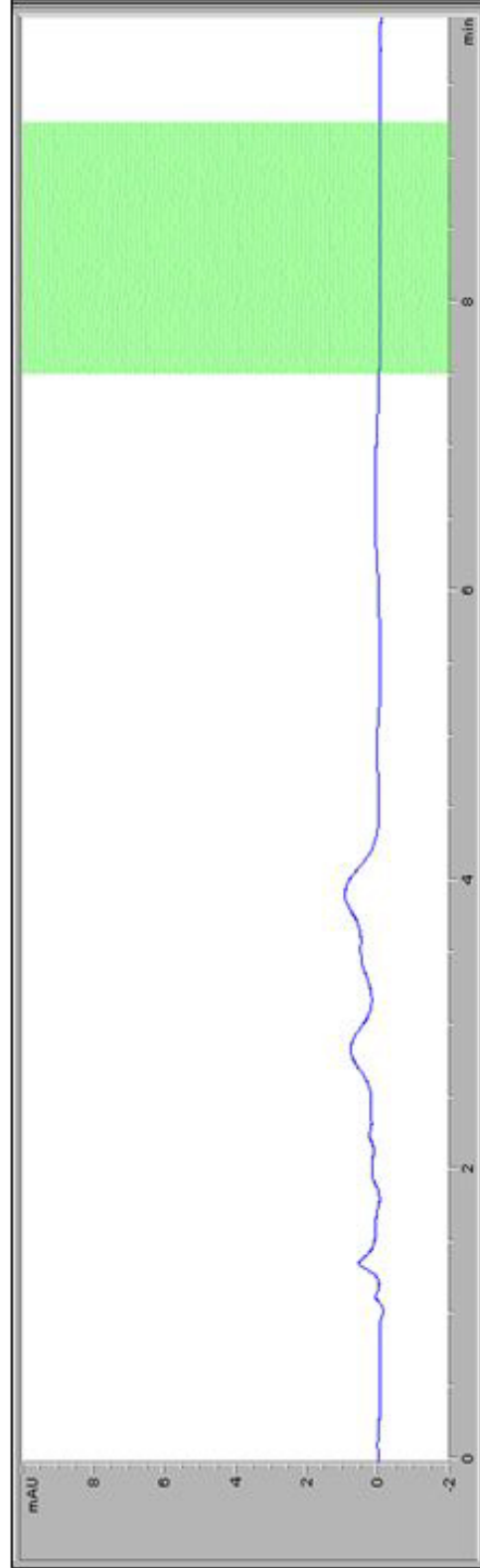
Şekil 4.6. DOC'in HPLC piki.



Şekil 4.7. PCL'nin HPLC analizi.



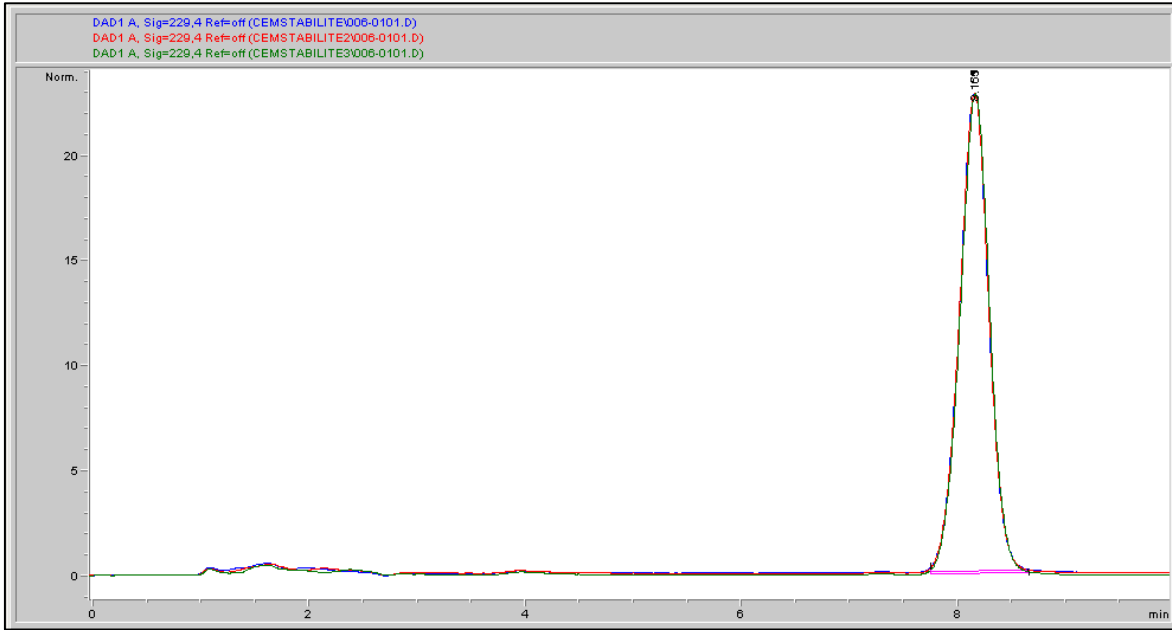
Şekil 4.8. mePEG-PCL'nin HPLC analizi.



Şekil 4.9. CS'nin HPLC analizi.

4.1.1.6. Stabilite

Stabilite parametresi Bölüm 3.2.2.1.7.'de özetlendiği şekilde incelemiştir. Bu amaçla kalibrasyon sınırları içinde bulunan 25 µg/mL çözeltisi seçilmiş ve 0. ve 48. saatlerde HPLC ile ölçülerek stabilitesine bakılmıştır (Şekil 4.10.). 48 saat sonunda başlangıç konsantrasyonunun ortalama %98.35'inin (± 0.08) (n=3) ortamda bulunduğu görülmüştür. Bu süre zarfında herhangi bir bozunma ürününe ait pik gözlenmemiştir.



Şekil 4.10. 25 µg/L konsantrasyonluk çözeltinin 0. ve 48. saatlerdeki HPLC analizi ile elde edilen piklerinin birlikte gösterimi.

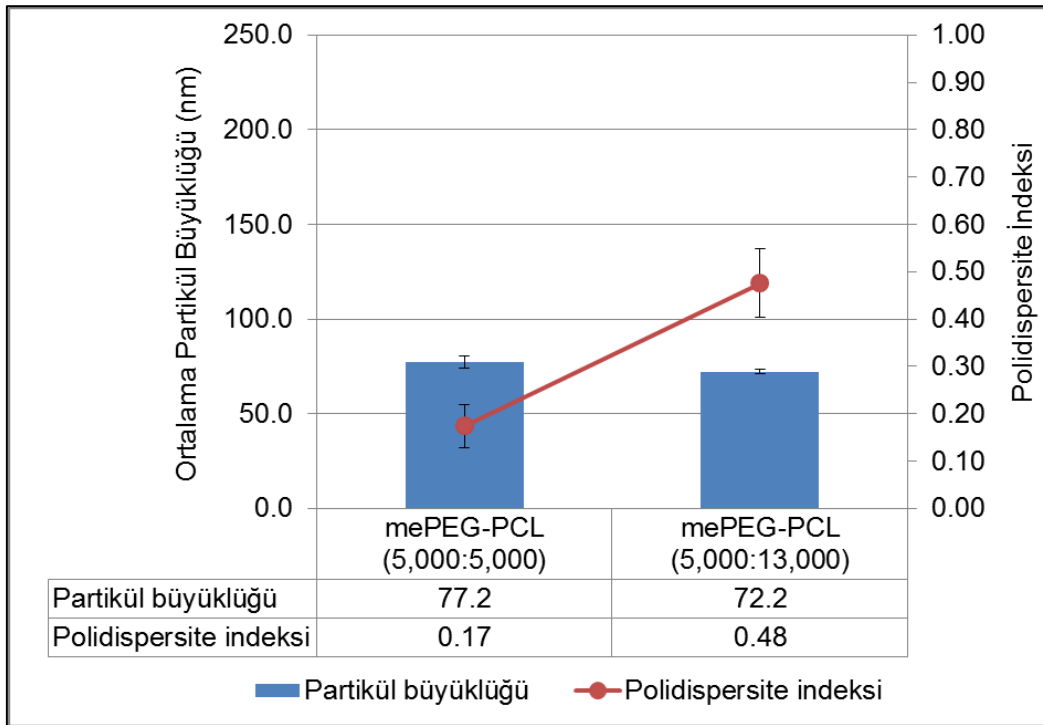
4.2. Ön Formülasyon Çalışmaları

Kullanılacak polimerin, yöntemin, polimer oranının, organik faz/sulu faz oranının, sürfaktan oranının ve katyonik nanopartiküller için kitosan oranının seçilmesi amacı ile ön formülasyonlar hazırlanmıştır. Bu formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli ölçülerek birbiri içinde karşılaştırılmış ve formülasyon çalışmaları için en uygun formülasyon parametreleri tespit edilmiştir.

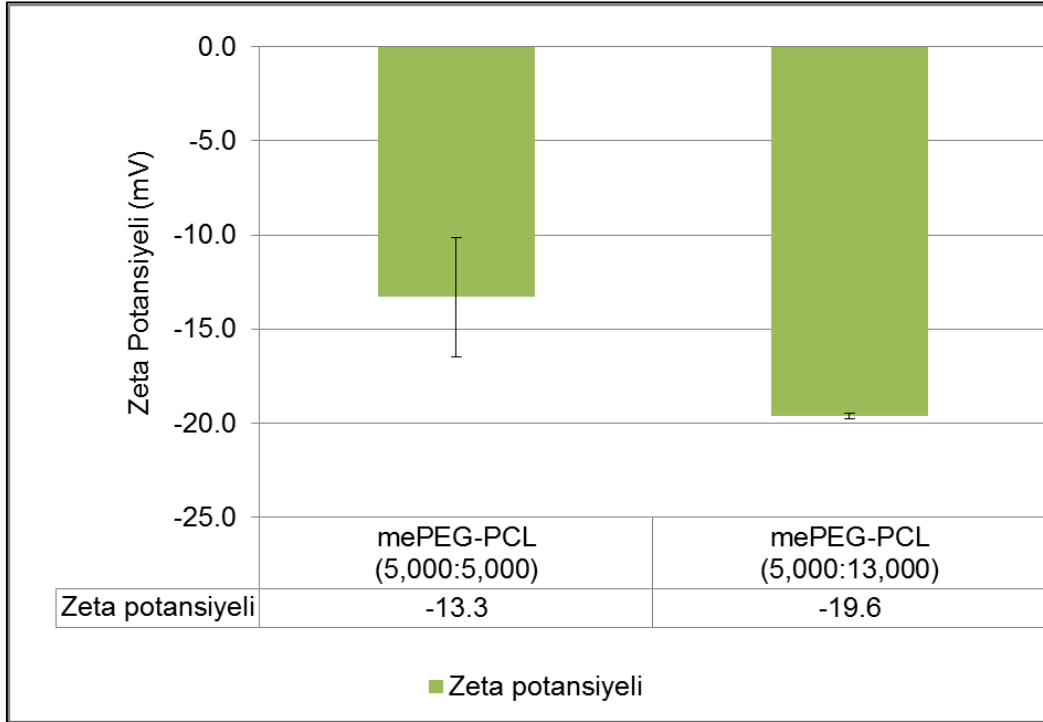
4.2.1. Polimerin seçimi

Yapılan kapsamlı literatür çalışması sonucunda ve Bölüm 2.7. de özetlenen avantajları nedeniyle PCL ve onun bir türevi olan mePEG-PCL polimerlerinin nanopartikül formülasyonlarında kullanılacak polimerler olmasına karar verilmiştir. Yapılan çalışmalarda PCL nanokürelerin büyüklükleri 140-220 nm arasında, mePEG-PCL ile hazırlanan nanokürelerin büyüklükleri 70-120 nm bulunmuştur.

Bu tez kapsamında PCL M_n değerleri farklı olmak üzere 2 farklı polimer olan mePEG-PCL (PEG $M_n = 5,000$ Da; PCL $M_n = 5,000$ Da) ve mePEG-PCL (PEG $M_n = 5,000$ Da; PCL $M_n = 13,000$ Da) ile ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Her iki polimer ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (Şekil 4.11.) ve zeta potansiyeli (Şekil 4.12.) değerleri incelenmiştir. Nanopartiküllerin polidispersite indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir fark vardır ve mePEG-PCL (PEG $M_n = 5,000$ Da; PCL $M_n = 13,000$ Da) nanopartiküllerinin polidispersite indeksi 0.4'ün üstündedir. Bu nedenle mePEG-PCL (PEG $M_n = 5,000$ Da; PCL $M_n = 5,000$ Da) kopolimerinin formülasyon çalışmalarında kullanılmasına karar verilmiştir.



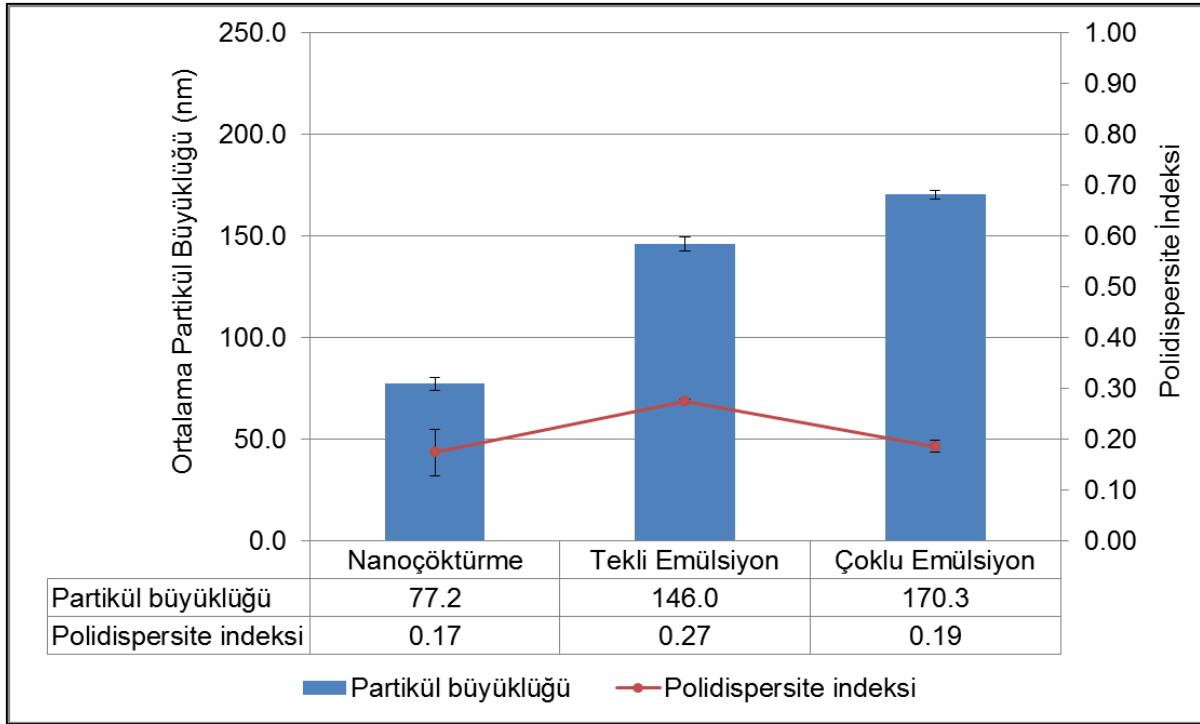
Şekil 4.11. mePEG-PCL (5,000:5,000) ve mePEG-PCL (5,000:13,000) nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (n=3).



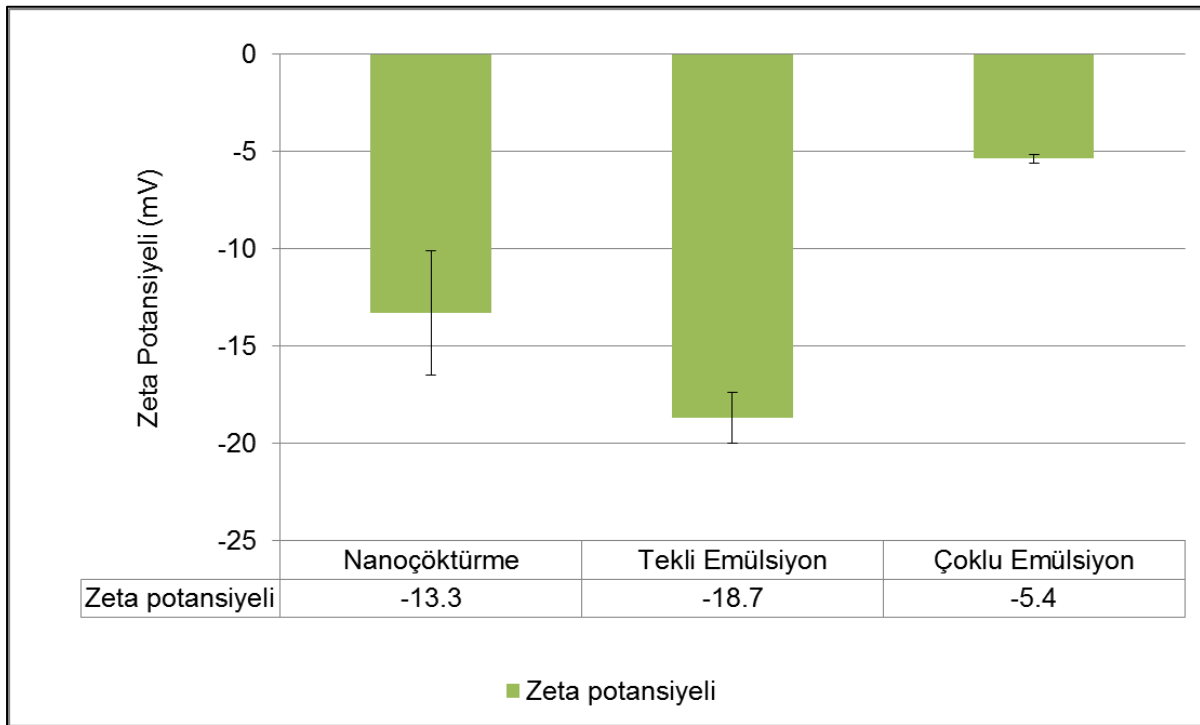
Şekil 4.12. mePEG-PCL (5,000:5,000) ve mePEG-PCL (5,000:13,000) nanopartiküllerin zeta potansiyeli (n=3).

4.2.2. Yöntem seçimi

PCL ve mePEG-PCL nanopartikülleri Bölüm 2.5.2.1.1.'de özetlenen nanopartikül hazırlama yöntemlerinden nanoçöktürme, tekli emülsiyon ve çoklu emülsiyon yöntemleri ile hazırlanmış ve her üç yöntem ile hazırlanan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (Şekil 4.13.) ve zeta potansiyeli (Şekil 4.14.) gibi karakteristik özellikleri incelenmiştir. Yapılan çalışmalara sonucunda hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklükleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir fark vardır ve en küçük partikül büyüklüğü nanoçöktürme yöntemi ile elde edilmiştir.



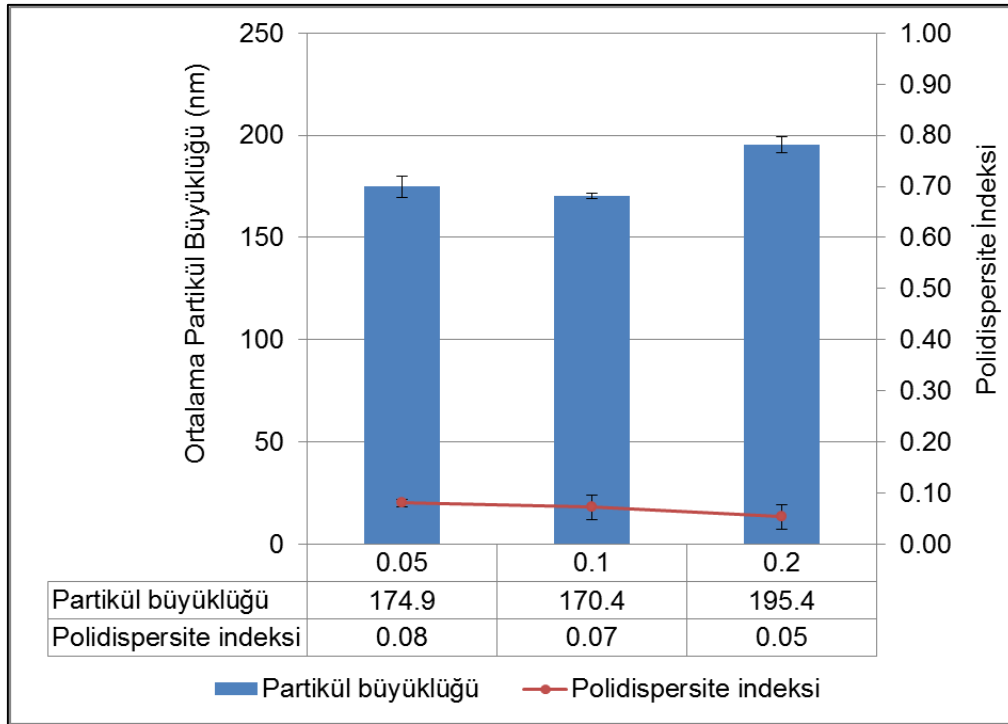
Şekil 4.13. Farklı yöntemlerle hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (n=3).



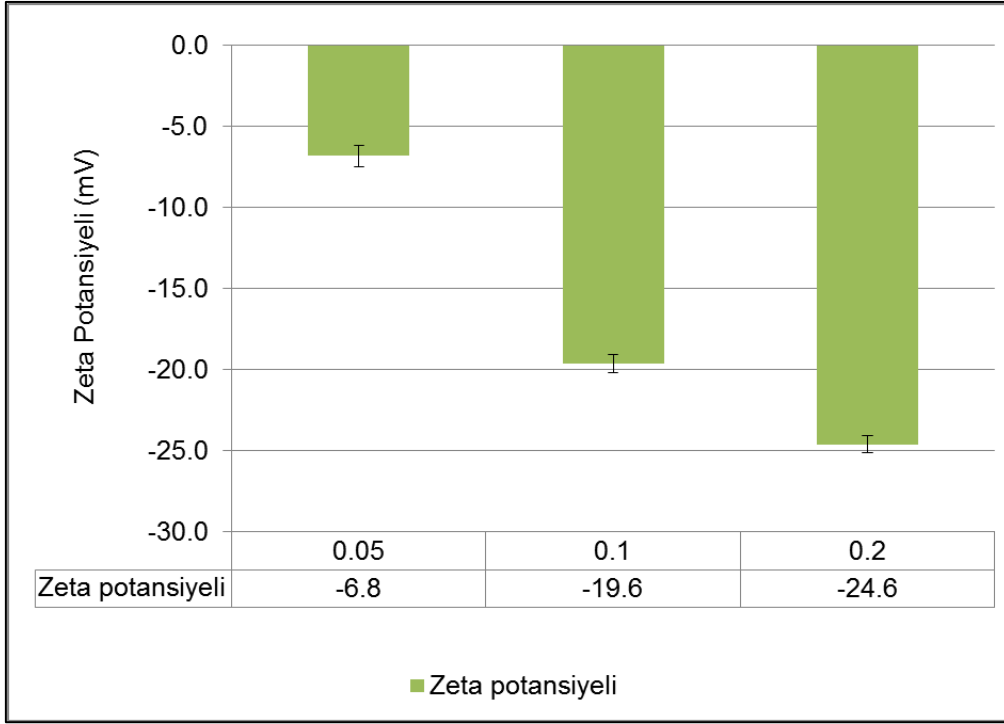
Şekil 4.14. Farklı yöntemlerle hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli (n=3).

4.2.3. Polimer oranının seçimi

Polimer oranının seçiminde 3 farklı (%0.05, %0.1 ve %0.2 a/h) polimer oranı denenmiş ve nanoçöktürme yöntemiyle PCL nanopartikülleri hazırlanmıştır. Polimer oranının nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (Şekil 4.15.) ve zeta potansiyeli (Şekil 4.16.) gibi karakteristik özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Yapılan ön formülasyon çalışmalarında %0.05 PCL ile %0.1 PCL içeren nanopartikül formülasyonlarının partikül büyüklükleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$) bir fark yoktur ancak %0.2 PCL içeren nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ile her iki formülasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir fark vardır.



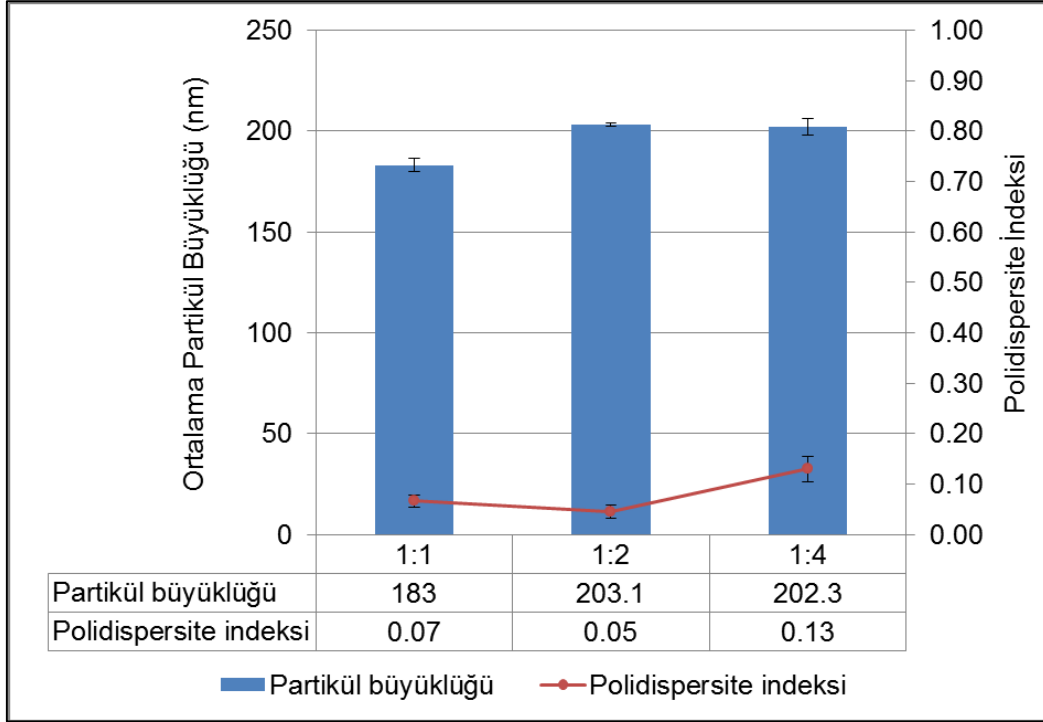
Şekil 4.15. Farklı polimer oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (n=3).



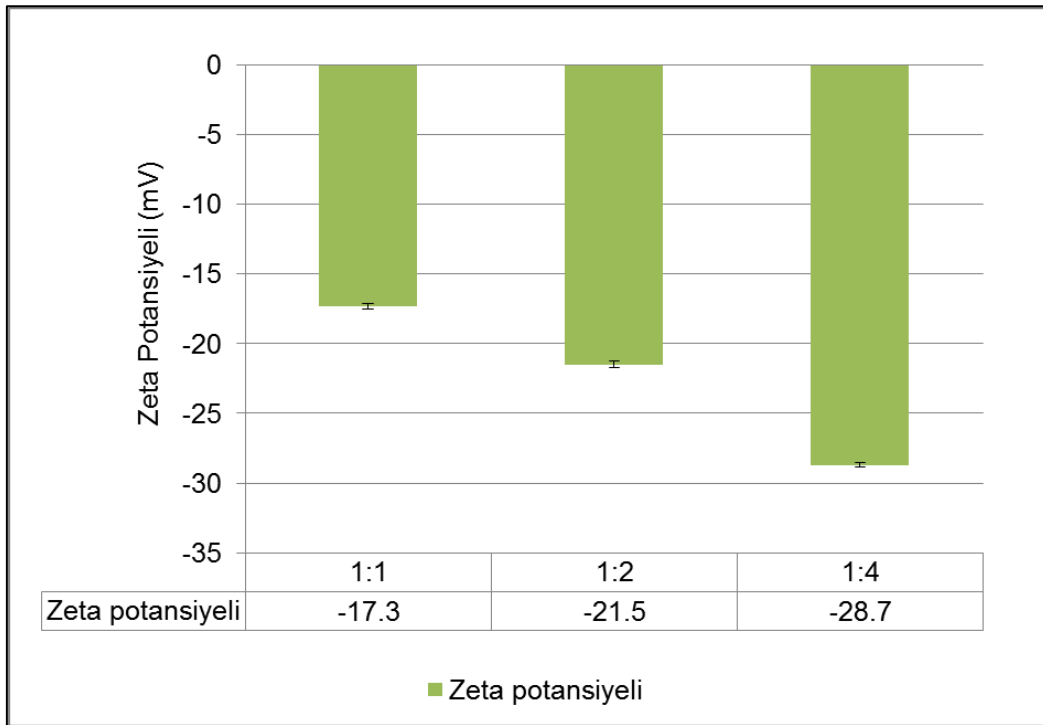
Şekil 4.16. Farklı polimer oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli (n=3).

4.2.4. Organik faz/sulu faz oranının seçimi

Organik faz/sulu faz oranının seçimi için 3 farklı (1:1, 1:2, 1:4) oran seçilmiş ve nanoçöktürme yöntemiyle PCL nanopartiküller hazırlanmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (Şekil 4.17.) ve zeta potansiyeli (Şekil 4.18.) gibi karakteristik özellikleri incelenmiştir. 1:2 ve 1:4 oranları ile elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p>0.05$) bir fark yoktur ancak polidispersite indeksleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Ayrıca tüm formülasyonların zeta potansiyelleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).



Şekil 4.17. Farklı organik faz/sulu faz oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (n=3).



Şekil 4.18. Farklı organik faz/sulu faz oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli (n=3).

4.2.5. Sürfaktan oranının seçimi

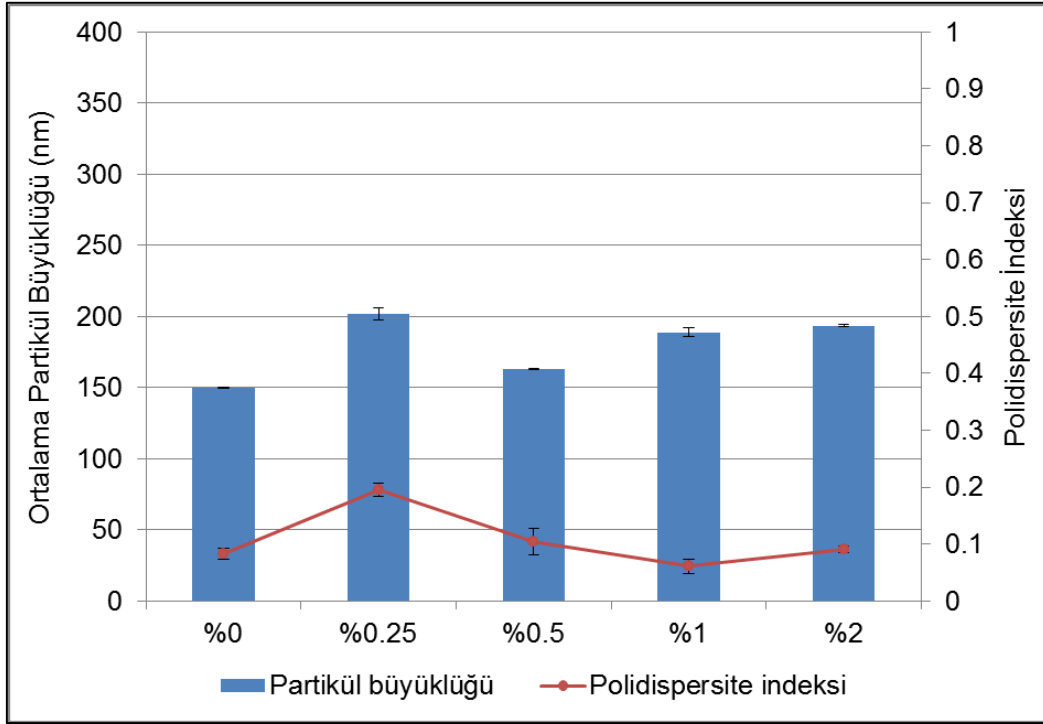
Sürfaktan oranının seçimi için 5 farklı (%0, %0.25, %0.5, %1, %2 a/h) oran seçilmiştir. Sürfaktan olarak Pluronik F68® (PF-68) kullanılmıştır, PCL ve mePEG-PCL nanopartikül formülasyonları nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanmıştır. Her bir formülasyonun ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (Şekil 4.19., Şekil 4.20.) ve zeta potansiyeli (Şekil 4.21., Şekil 4.22.) ölçülmüştür. Tüm formülasyonların partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri Çizelge 4.7. ve Çizelge 4.8.'de verilmiştir. Yapılan ön formülasyon çalışmalarında sürfaktan oranına bağlı olarak PCL nanopartiküllerinin partikül büyüklükleri 150-200 nm, mePEG-PCL nanopartiküllerinin partikül büyüklüğünün 71-314 nm arasında değiştiği görülmüştür. Her iki polimerde de sürfaktan kullanılmadan hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğünün sürfaktanlı formülasyonlardan daha küçük olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0.05$) görülmüştür.

Çizelge 4.7. Farklı sürfaktan oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri.

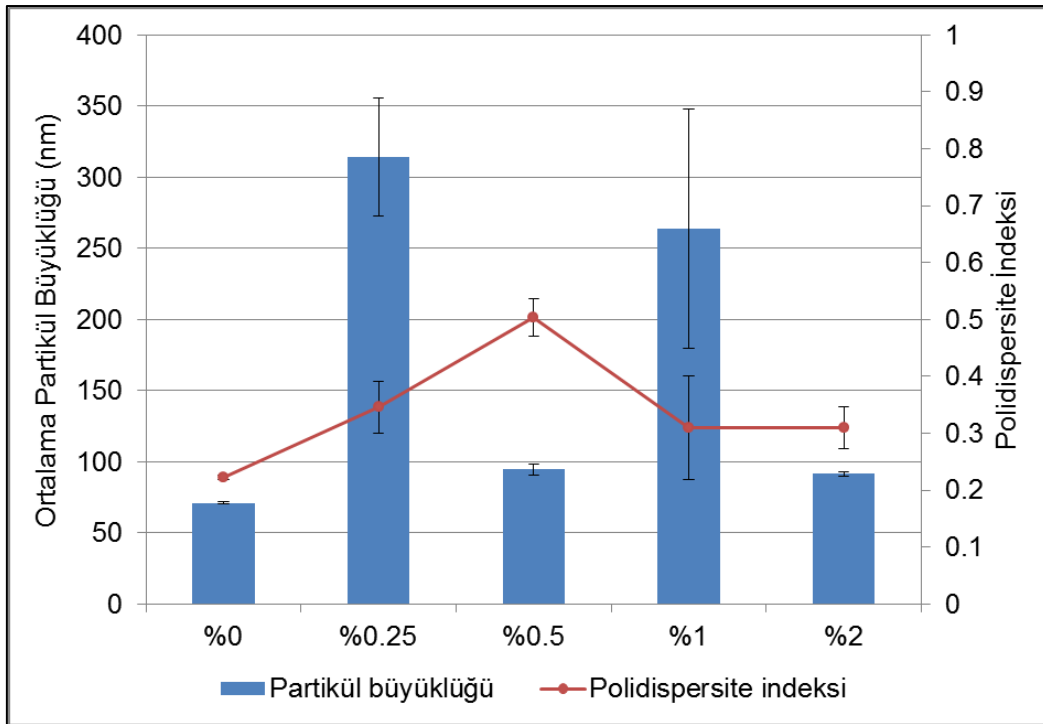
Sürfaktan Oranı	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyeli (mV)
% 0	150	0.08	-21.5
% 0.25	202	0.20	-13.7
% 0.50	163	0.10	-19.5
% 1	189	0.06	-15.2
% 2	194	0.09	-15.0

Çizelge 4.8. Farklı sürfaktan oranları ile hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerleri.

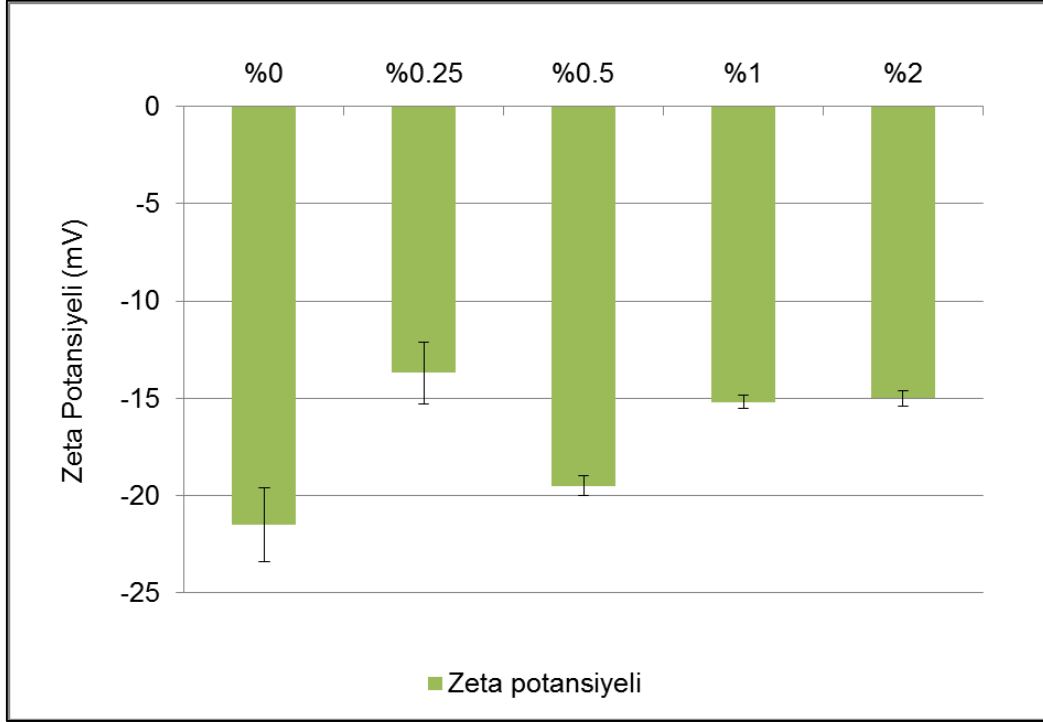
Sürfaktan Oranı	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi	Zeta Potansiyeli (mV)
% 0	71	0.22	-22.1
% 0.25	314	0.35	-20.7
% 0.50	95	0.50	-27.1
% 1	264	0.31	-13.7
% 2	91	0.31	-19.5



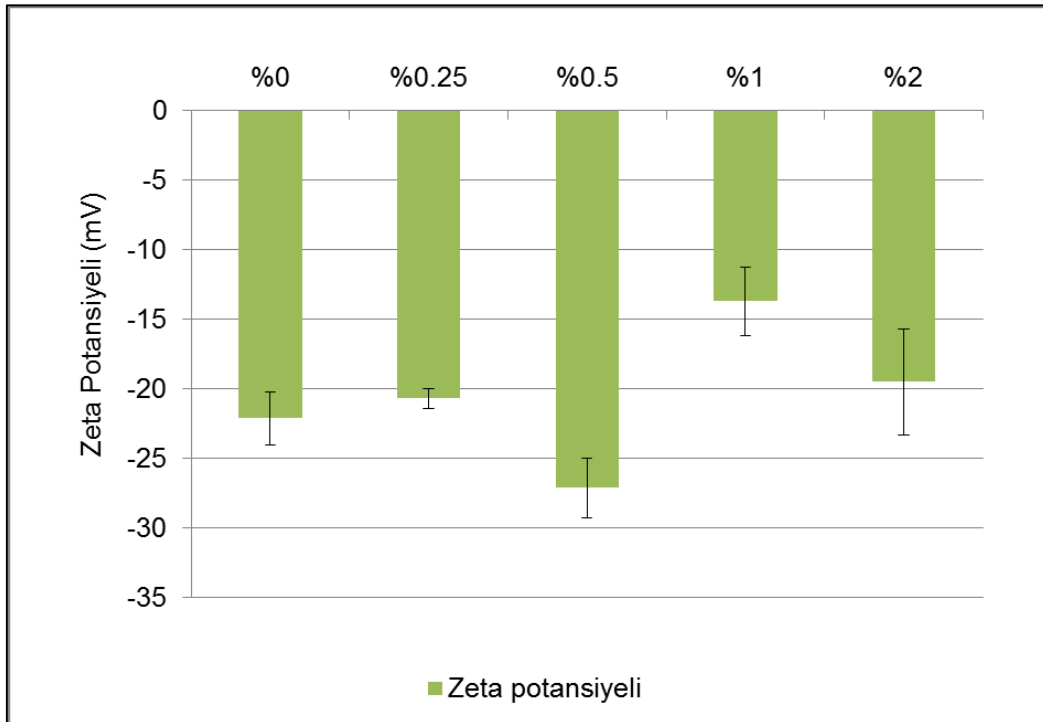
Şekil 4.19. Farklı süfaktan oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (n=3).



Şekil 4.20. Farklı süfaktan oranları ile hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (n=3).



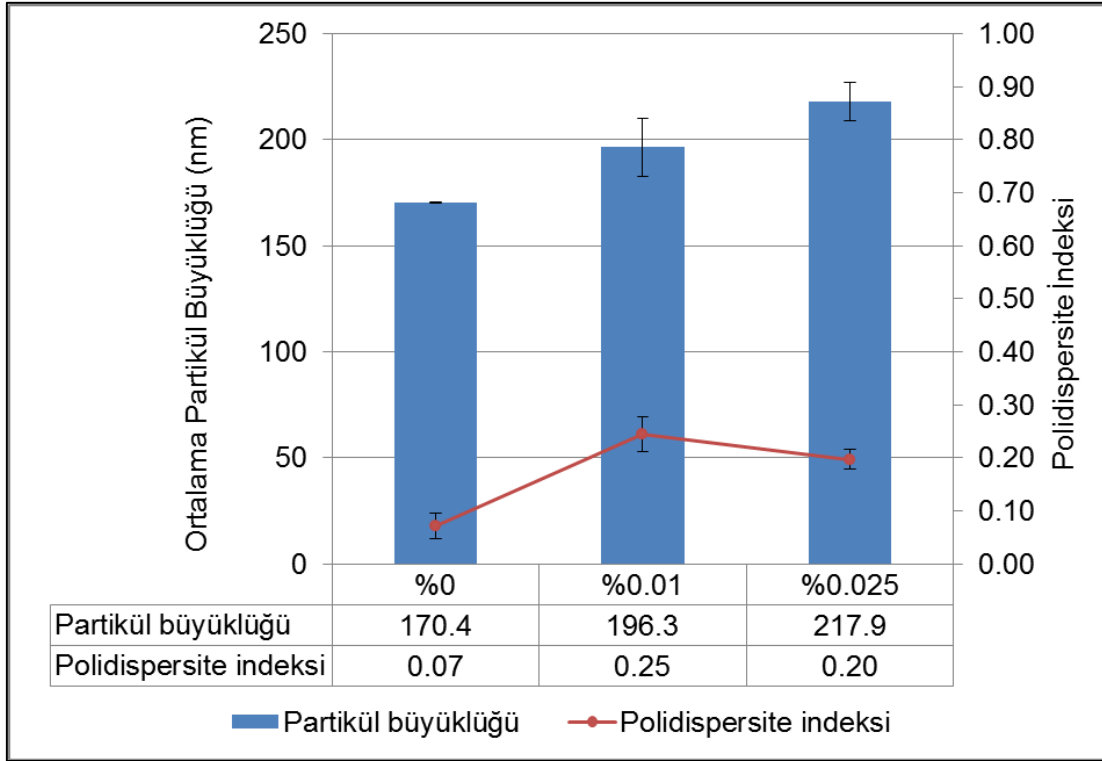
Şekil 4.21. Farklı süfaktan oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli (n=3).



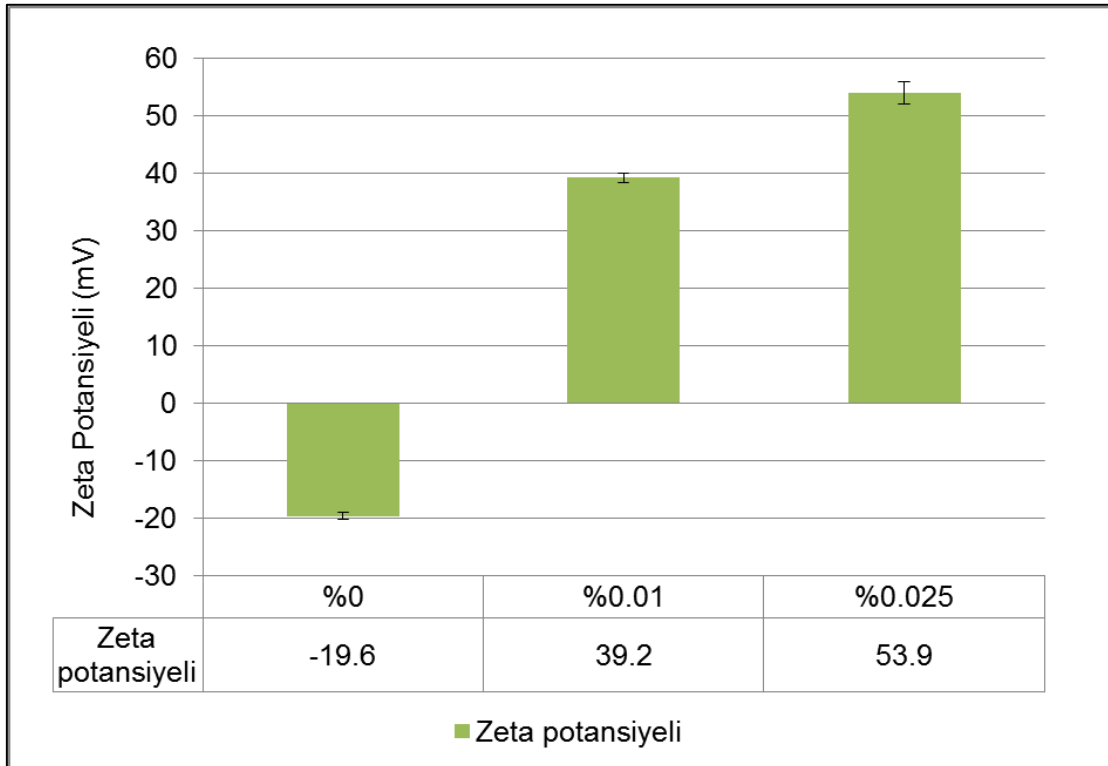
Şekil 4.22. Farklı süfaktan oranları ile hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli (n=3).

4.2.6. Kitosan (Protasan™) oranının seçimi

PCL ve mePEG-PCL polimerleri ile hazırlanan nanopartiküllerin yüzey yükü negatiftir. Her iki nanopartikülün yüzey yükünü pozitif hale getirmek için kitosan ile kaplanması öngörülmüştür. Nanopartiküllerin kitosan ile kaplanmasında kitosanın (CS) suda çözünebilir bir türevi olan Protasan™ kullanılmış ve 3 farklı (%0, %0.01, %0.025) Protasan™ oranı ile ön formülasyon çalışması yapılmıştır. Her bir formülasyon için ortalama partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (Şekil 4.23.) ve zeta potansiyeli (Şekil 4.24.) ölçülmüştür. Yapılan ön formülasyon çalışması ile nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüklerinin 170-220 nm, polidispersite indekslerinin 0.07-0.25 ve zeta potansiyellerini (-20)-(+54) mV arasında değiştiği ve kitosan ile kaplanan nanopartiküllerin net pozitif yüzey yüküne sahip olduğu görülmüştür. Kitosan oranındaki artışa bağlı olarak nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğünde bir artış görülmüştür. Ayrıca tüm nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir fark vardır.



Şekil 4.23. Farklı kitosan oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (n=3).



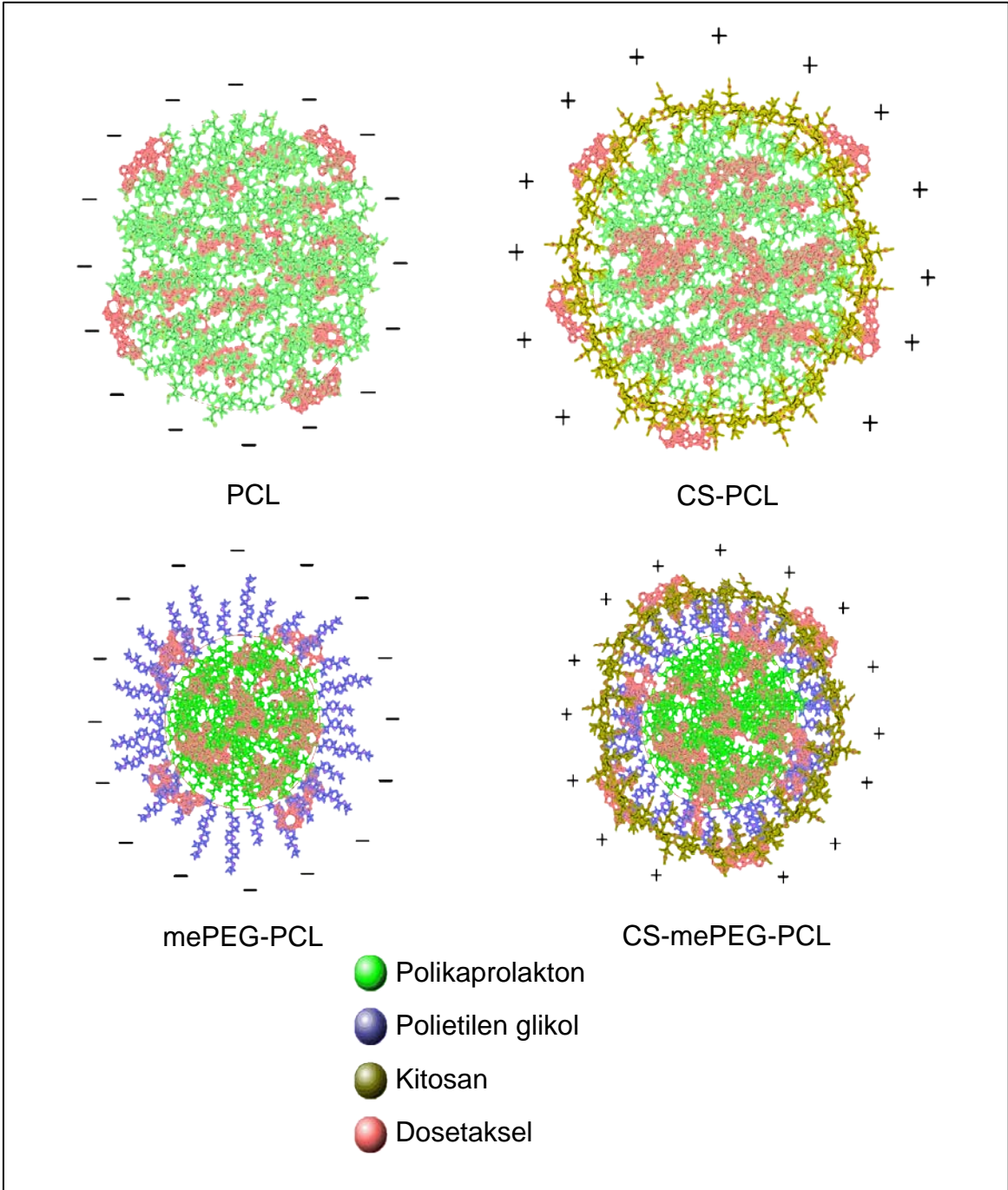
Şekil 4.24. Farklı kitosan oranları ile hazırlanan PCL nanopartiküllerin zeta potansiyeli (n=3).

4.3. Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmaları sonucunda anyonik formülasyonlar (PCL ve mePEG-PCL nanopartikülleri) Bölüm 3.2.3.2.1. ve katyonik formülasyonlar (CS-PCL ve CS-mePEG-PCL nanopartikülleri) Bölüm 3.2.3.2.2. de özetlendiği gibi nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanmasına karar verilmiştir. Yapılan ön formülasyon çalışmaları sonucunda anyonik ve katyonik nanopartiküllerin hazırlanması için sürfaktan kullanılmamasına, polimer oranı olarak organik fazın %0.1'lik polimer kullanılmasına ve organik faz/sulu faz oranının 1:2 olmasına karar verilmiştir. Ayrıca katyonik nanopartiküllerin hazırlanmasında %0.01 Protasan™ içeren sulu faz seçilmiştir. Formülasyonda kullanılacak bu parametreler Çizelge 4.9.'de toplu olarak verilmiştir. Ayrıca polikaprolakton (PCL), kitosan kaplı polikaprolakton (CS-PCL), metoksi polietilen glikol-polikaprolakton (mePEG-PCL) ve kitosan kaplı metoksi polietilen glikol-polikaprolakton (CS-mePEG-PCL) nanopartiküllerinin şematik gösterimi Şekil 4.25.'de verilmiştir.

Çizelge 4.9. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılacak parametreler.

Yöntem	Nanoçöktürme
Polimer Oranı	% 0.1
Organik Faz/Sulu Faz oranı	1:2
Sürfaktan Oranı	% 0
Kitosan Oranı	% 0.01



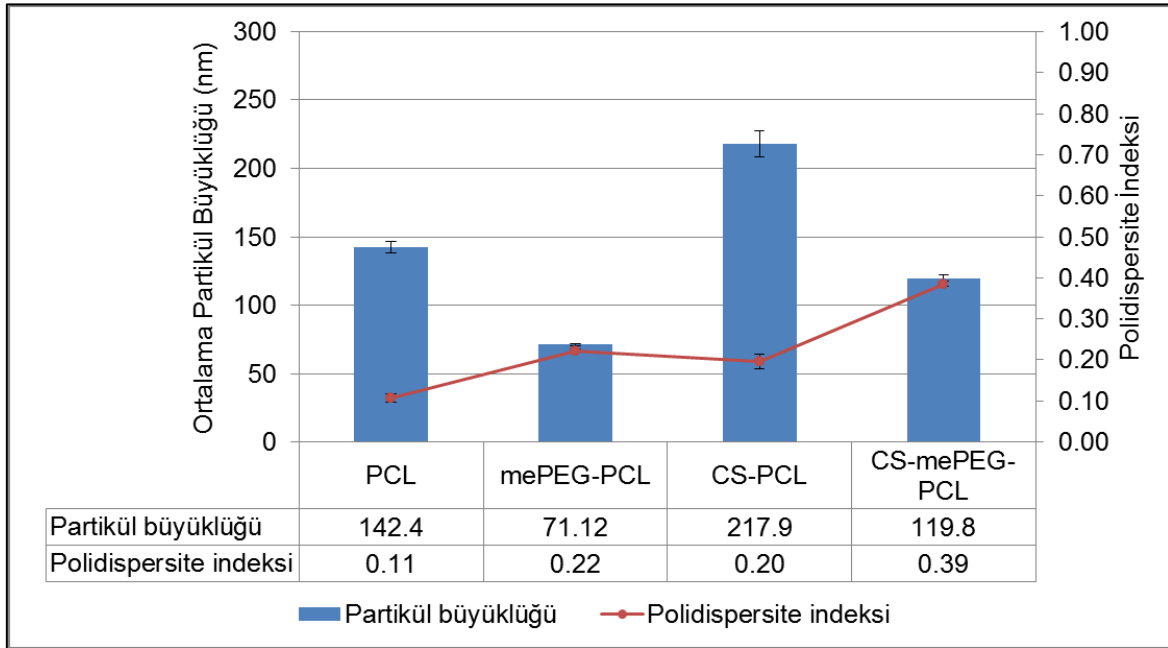
Şekil 4.25. Hazırlanan anyonik ve katyonik nanopartiküllerin şematik gösterimi.

4.3.1. Ortalama partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımı

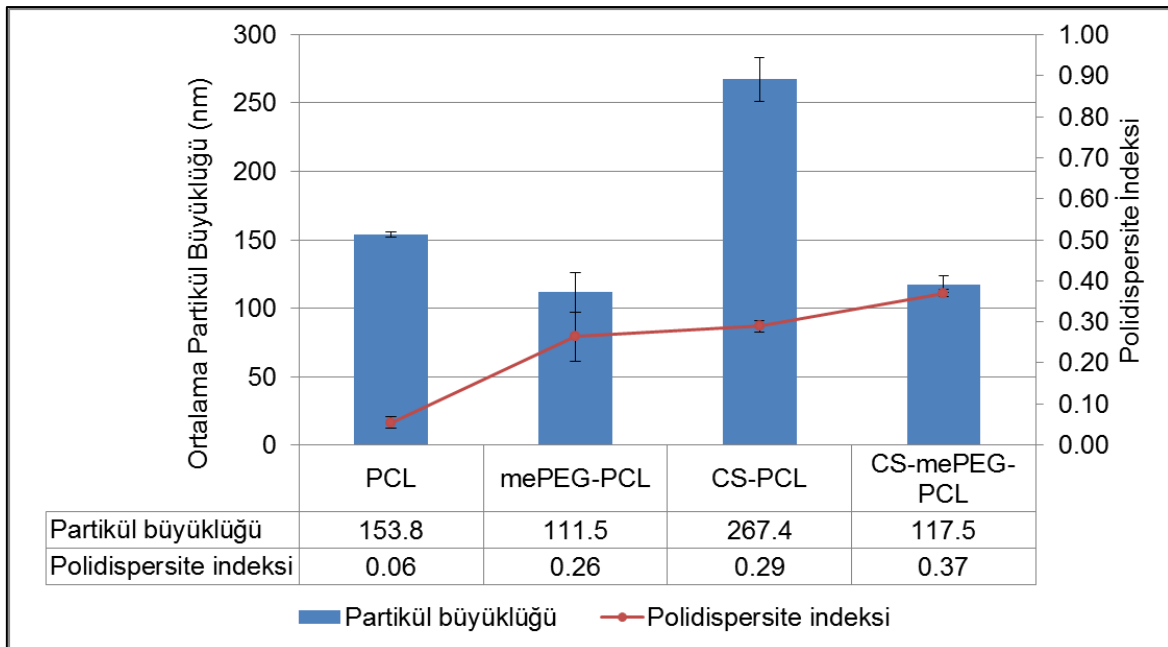
DOC yüklü ve yüksüz anyonik ve katyonik (kitosan kaplı ve kaplı olmayan) PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (Şekil 4.26., Şekil 4.27.) Bölüm 3.2.4.1. de özetlendiği gibi ölçülmüştür. İlaç yüklü ve yüksüz nanopartiküllerde en düşük polidispersite indeksi PCL (boş nanopartiküller için 0.107; ilaç yüklü için 0.055) ve en düşük ortalama partikül büyüklüğü mePEG-PCL (boş nanopartiküller için 71.12 nm; ilaç yüklü için 111.5 nm) nanopartiküllerinde bulunmuştur. Tüm formülasyonların ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü, ve polidispersite indeksi değerleri.

Formülasyon	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi
PCL	142.4	0.107
PCL + DOC	153.8	0.055
CS-PCL	217.9	0.197
CS-PCL + DOC	267.4	0.289
mePEG-PCL	71.12	0.222
mePEG-PCL + DOC	111.5	0.264
CS-mePEG-PCL	119.8	0.385
CS-mePEG-PCL + DOC	117.5	0.37



Şekil 4.26. Boş PCL, mePEG-PCL, CS-PCL ve CS-mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (n=3).



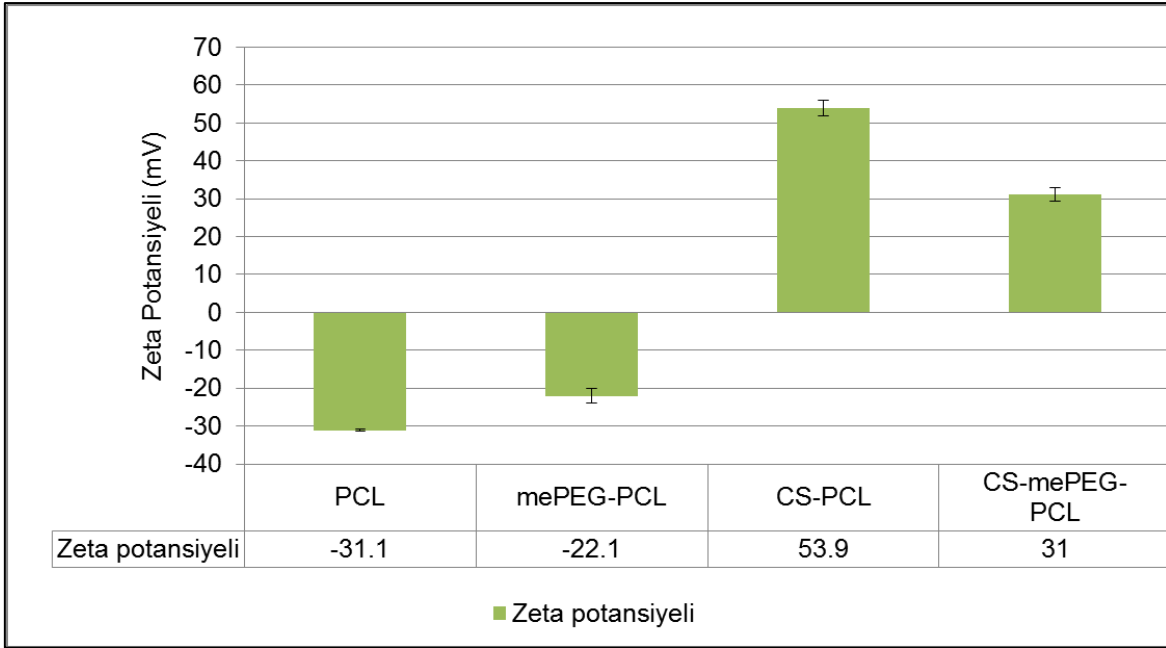
Şekil 4.27. DOC yüklü PCL, mePEG-PCL, CS-PCL ve CS-mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (n=3).

4.3.2. Zeta potansiyeli

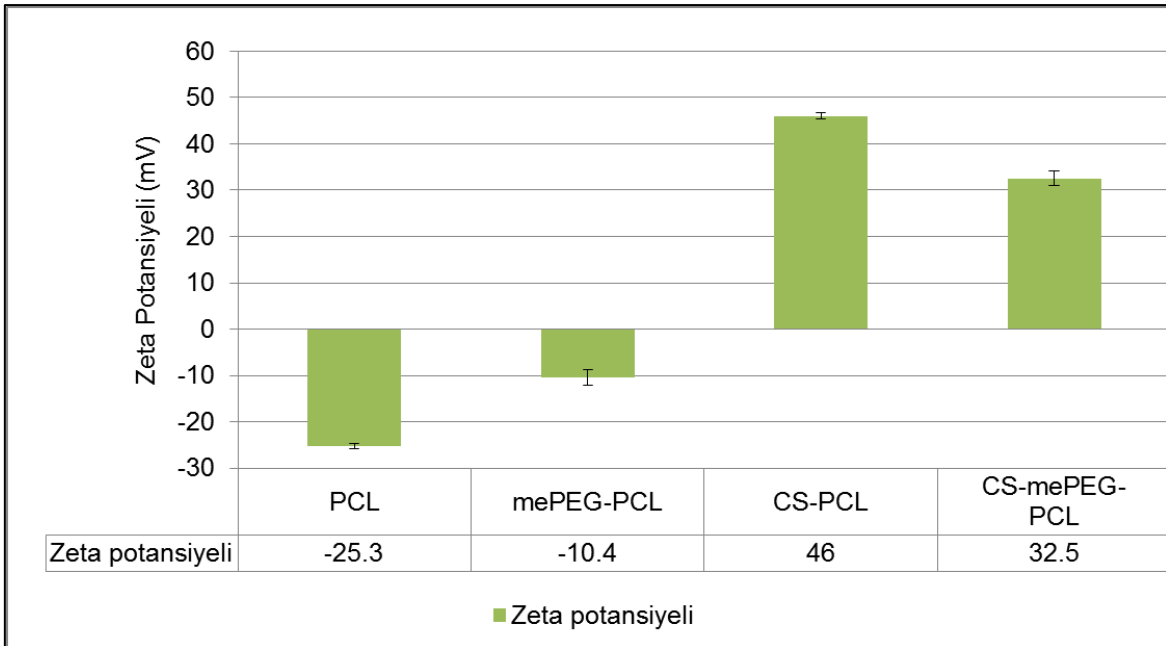
DOC yüklü ve boş anyonik ve katyonik (kitosan kaplı ve kaplı olmayan) PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin yüzey yükü (zeta potansiyeli) Bölüm 3.2.4.2. de özetlendiği gibi ölçülmüştür (Şekil 4.28., Şekil 4.29.). Yapılan çalışmalar sonucunda anyonik nanopartiküllerin zeta potansiyeli -31 ile -10 mV, katyonik nanopartiküllerin zeta potansiyeli 31 ile 54 mV arasında değişmektedir. Tüm formülasyonların zeta potansiyel değerleri Çizelge 4.11.'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. PCL ve mePEG nanopartiküllerinin zeta potansiyeli değerleri.

Formülasyon	Zeta Potansiyeli (mV)
PCL	-31.1
PCL + DOC	-25.3
CS-PCL	53.9
CS-PCL + DOC	46
mePEG-PCL	-22.1
mePEG-PCL + DOC	-10.4
CS-mePEG-PCL	31
CS-mePEG-PCL + DOC	32.5



Şekil 4.28. Boş PCL, mePEG-PCL, CS-PCL ve CS-mePEG-PCL nanopartiküllerinin zeta potansiyeli (n=3).



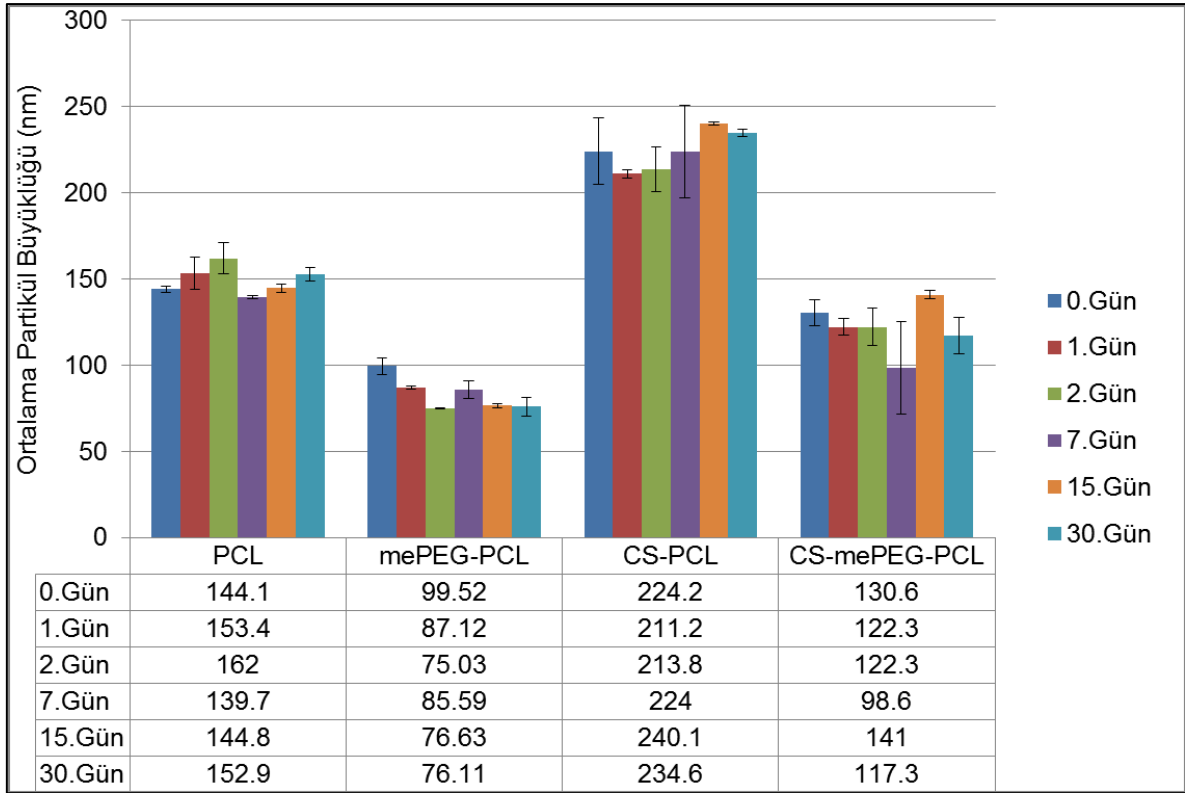
Şekil 4.29. DOC yüklü PCL, mePEG-PCL, CS-PCL ve CS-mePEG-PCL nanopartiküllerinin zeta potansiyeli (n=3).

4.3.3. Kısa süreli fiziksel stabilite çalışması

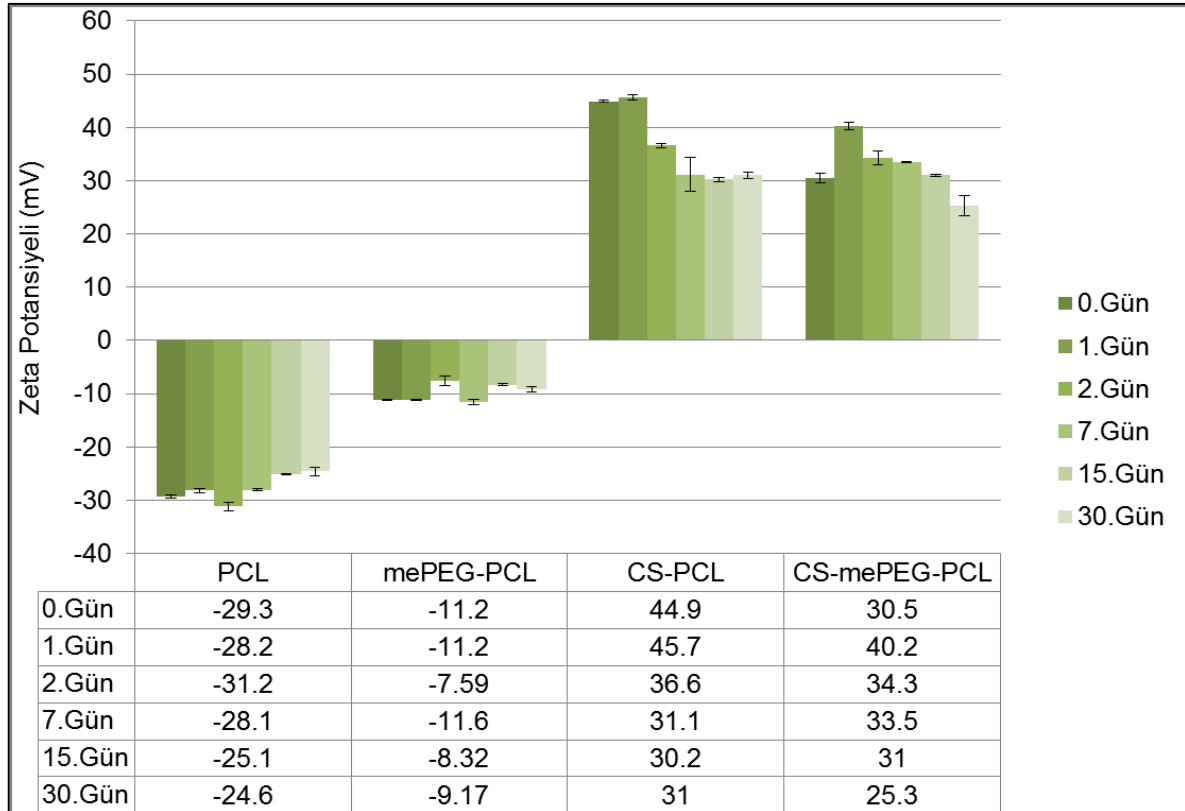
DOC yüklü anyonik ve katyonik PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerin 1 aylık süre içinde partikül büyüklüğü ve zeta potansiyelindeki değişikliklerin incelenmesi amacı ile kısa süreli fiziksel stabilite çalışması yapılmıştır. Bu çalışma için hazırlanan sulu dispersiyon halindeki formülasyonlardan belirli zaman aralıklarında (taze, 1., 2., 7., 15., 30. günlerde) örnekler alınmış, ortalama partikül büyüklüğü (Şekil 4.30.) ve zeta potansiyeli (Şekil 4.31.) Bölüm 3.2.4.1. ve 3.2.4.2. de özetlendiği gibi ölçülmüştür.

Yapılan kısa süreli fiziksel stabilite çalışmalarında kitosan kaplı ve kaplı olmayan PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğünde 8-10 nm'lik bir artış, mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğünde 13-23 nm'lik bir azalış görülmüştür.

Zeta potansiyeli üzerine yapılan çalışmalarda kitosan kaplı olmayan formülasyonlarda 2-5 mV bir artış, kitosan kaplı formülasyonlarda ise 5-15 mV'luk bir azalış görülmüş ve zamana bağlı olarak nanopartiküllerin nötre yaklaştığı gözlenmiştir.



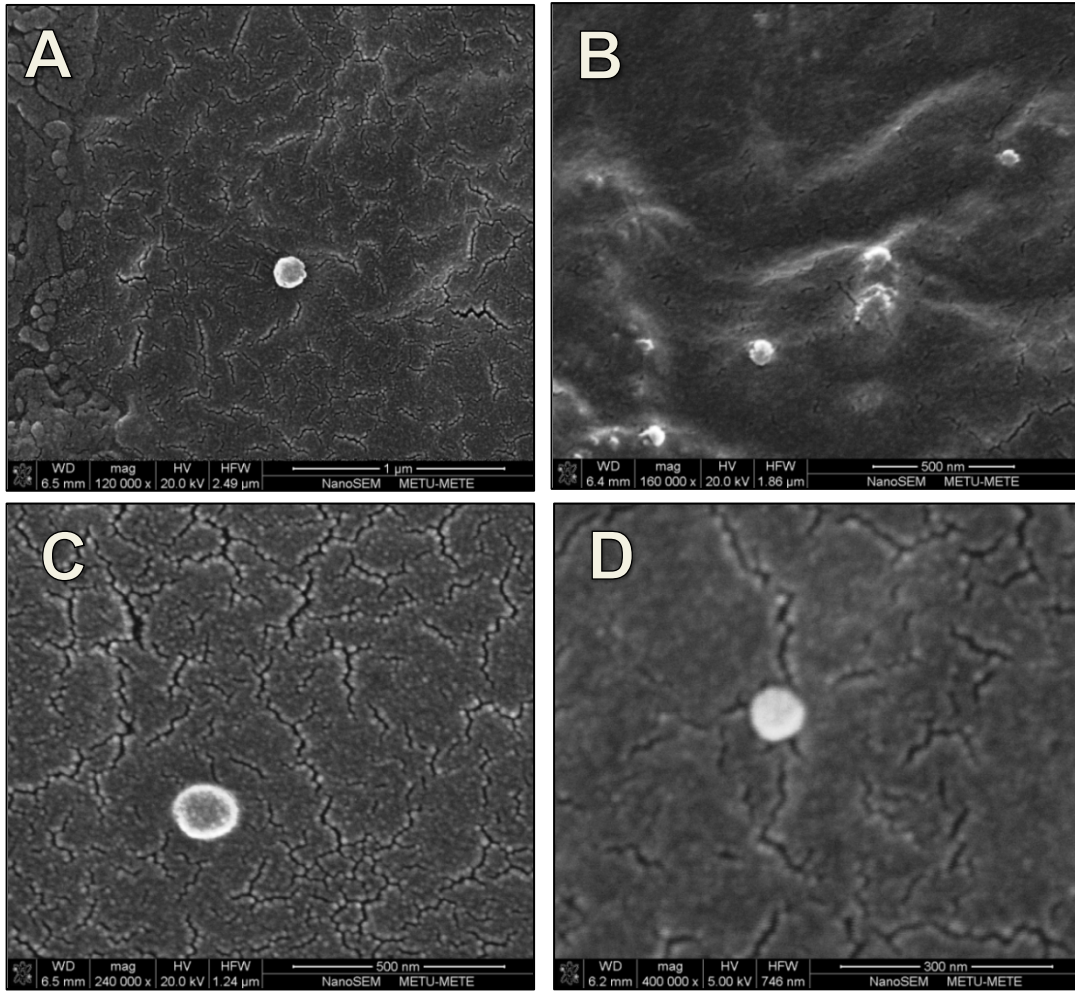
Şekil 4.30. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin 30 gün boyunca farklı zaman aralıklarındaki ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (n=3).



Şekil 4.31. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin 30 gün boyunca farklı zaman aralıklarındaki zeta potansiyeli (n=3).

4.3.4. Taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleme çalışmaları

Anyonik ve katyonik (kitosan kaplı ve kaplı olmayan) PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin görüntüleme çalışmaları Bölüm 3.2.4.4. de özetlendiği gibi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. PCL, CS-PCL, mePEG-PCL ve CS-mePEG-PCL nanopartiküllerinin SEM ile elde edilen görüntüleri Şekil 4.32.'de verilmiştir. SEM görüntüleri ile de görülebileceği gibi tüm formülasyonlarda dairesel ve düzgün yüzeyle nanoküreler elde edilmiştir. Ayrıca partikül büyüklükleri Malvern Zetasizer cihazı ile ölçülen ortalama partikül büyüklükleri ile uyum göstermektedir. Yapılan görüntüleme çalışmaları sırasında mePEG-PCL nanopartiküllerinin ve kitosan yüklü nanopartiküllerin elektron bombardımanına PCL nanopartiküllerine oranla daha dayanıksız olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle elde edilen görüntüler daha flu olarak gözlenmiştir.

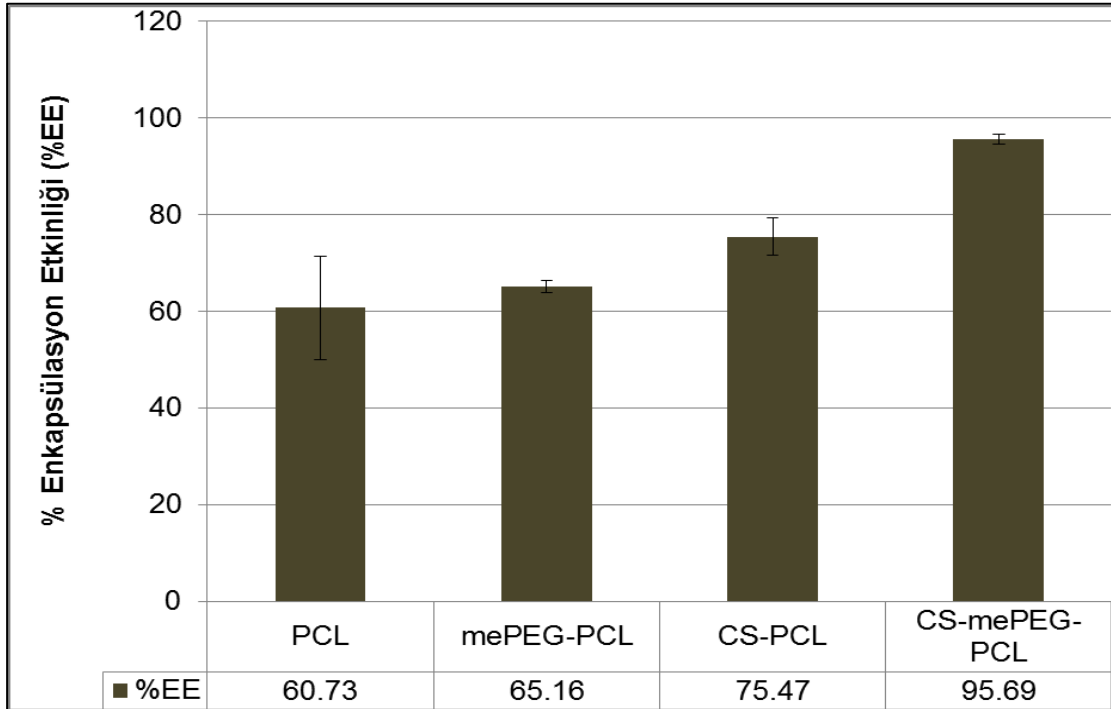


Şekil 4.32. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin toplu SEM görüntüsü;
A: PCL nanopartiküller, B: mePEG-PCL nanopartiküller, C: CS-PCL nanopartiküller, D: CS-mePEG-PCL nanopartiküller.

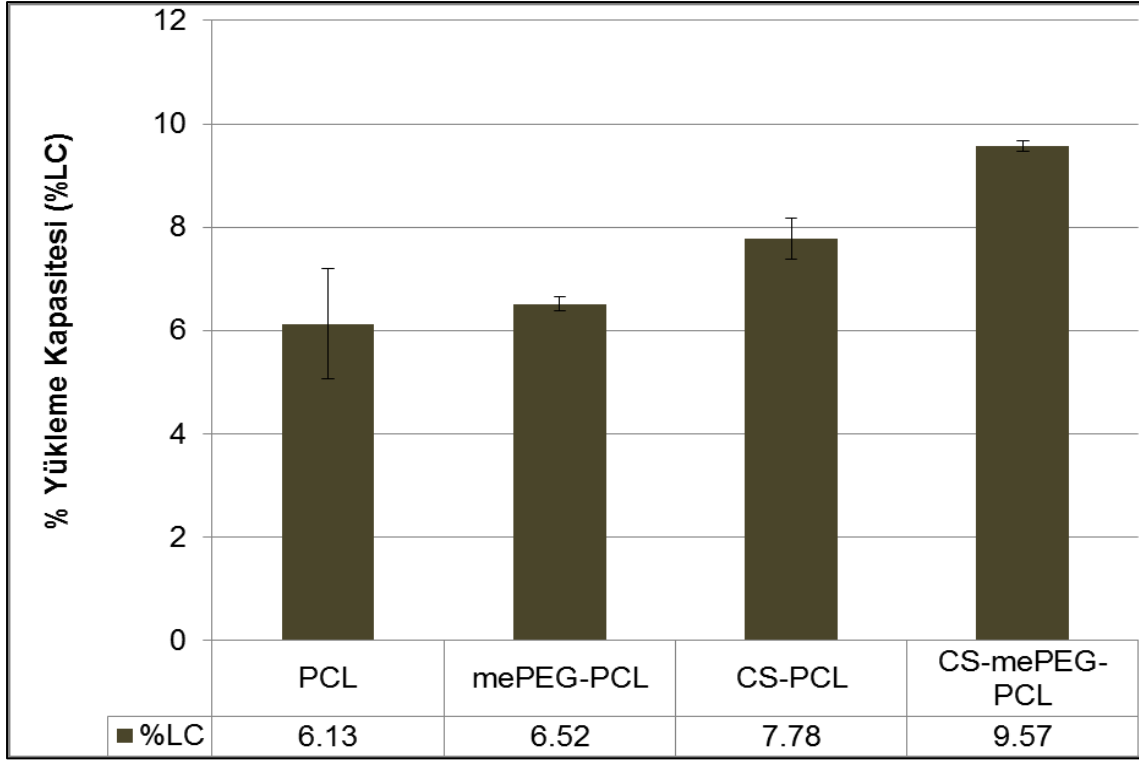
4.3.5. İlaç yükleme etkinliğinin değerlendirilmesi

Anyonik ve katyonik PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliğinin (Şekil 4.33.) ve yükleme kapasitesinin (Şekil 4.34.) belirlenmesi Bölüm 3.2.4.5. de özetlendiği gibi gerçekleştirilmiştir. Yapılan enkapsülasyon etkinlik çalışmaları sonucu kitosan kaplı mePEG-PCL'de %96'lık enkapsülasyon etkinliği (%EE) ile en yüksek enkapsülasyon etkinliğine sahip nanopartikül formülasyonu olduğu görülmüştür. Bunu %75'lik oranla kitosan kaplı PCL nanopartikülleri ve %65'lik oranla kitosan kaplı olmayan mePEG-PCL nanopartikülleri izlemektedir. En düşük enkapsülasyon etkinliği ise %61'lik oranla kitosan kaplı olmayan PCL nanopartiküllerine aittir.

Formülasyonların yükleme kapasitesinin (%LC) belirlenmesi için her bir formülasyonlarda bulunan ilaç ve polimer miktarı hesaplanmıştır. Başlangıçta polimer miktarının %10'u kadar ilaç kullanıldığı için her bir formülasyonun teorik %LC'si %10'dur. Yapılan çalışma sonucunda en yüksek yükleme kapasitesi %9.57'lik oranla kitosan kaplı mePEG-PCL nanopartiküllerde bulunmuştur. Bunu %7.78'lik oranla kitosan kaplı PCL, %6.52'lik oranla kitosan kaplı olmayan mePEG-PCL ve %6.13'lük oranla kitosan kaplı olmayan PCL nanopartikülleri izlemektedir.



Şekil 4.33. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin % Enkapsülasyon Etkinliği (%EE) (n=3).



Şekil 4.34. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin % Yükleme Kapasitesi (%LC) (n=3).

4.3.6. *In vitro* etkin madde salım çalışmalarının değerlendirilmesi

Anyonik ve katyonik PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin *in vitro* ilaç salım profili pH 7,4 fosfat tamponunda Bölüm 3.2.4.6. da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Hazırlanan formülasyonlar salım ortamına konulduktan sonra 15., 30., 45., 60., ve 75., dakikalarda örnekler alınmış ve HPLC ile miktar tayini yapılarak kümülatif salım değerleri hesaplanmıştır. Tüm formülasyonların salım profilleri Şekil 4.35.'de verilmiştir.

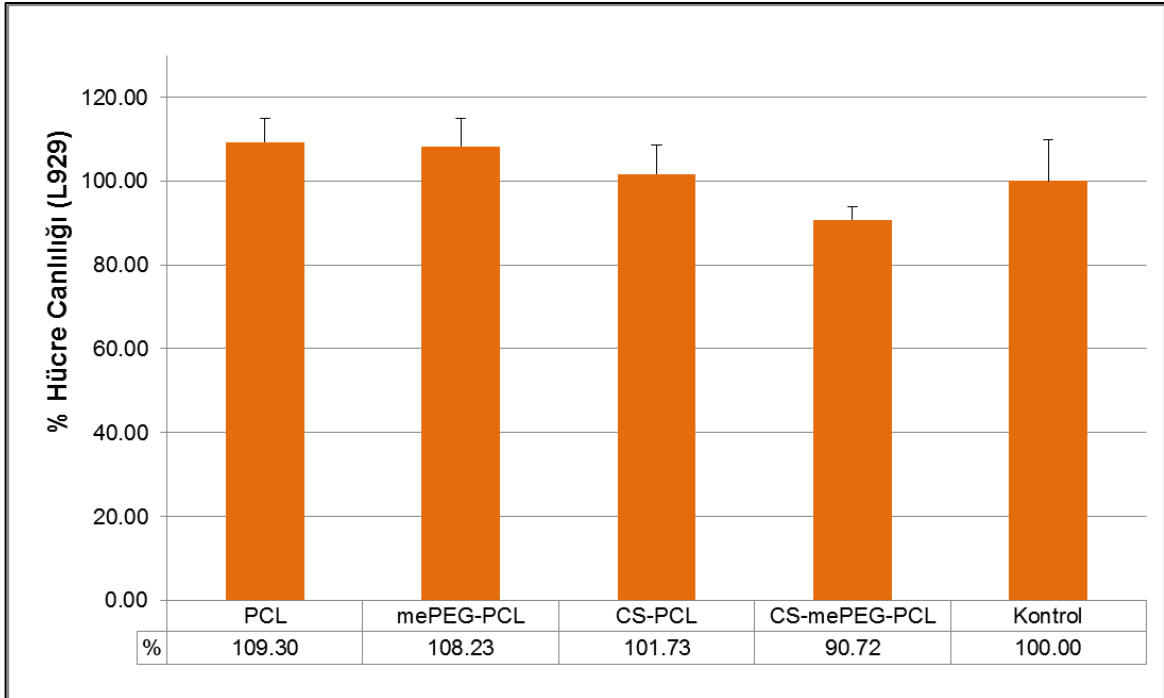


Şekil 4.35. Anyonik ve katyonik nanopartiküllerin salım profilinin toplu gösterimi (n=3).

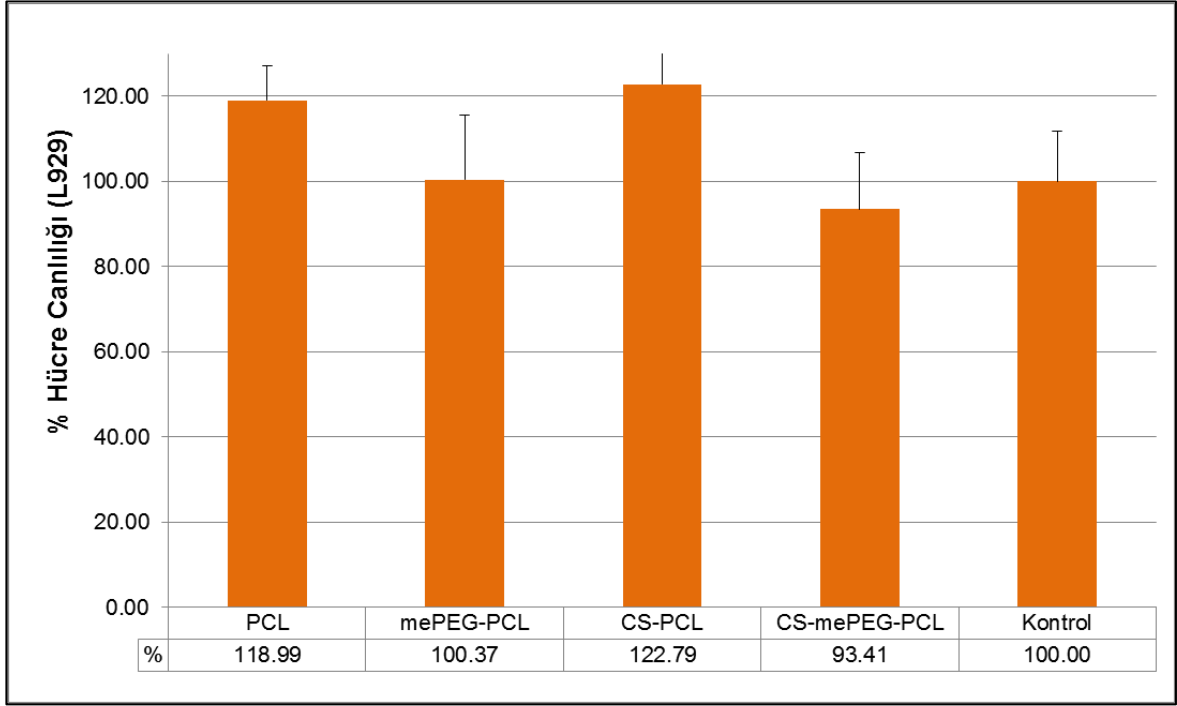
4.5. *In vitro* Sitotoksosite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

4.5.1. *In vitro* güvenilirlik çalışmalarının değerlendirilmesi

Anyonik ve katyonik PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin *in vitro* güvenilirlik çalışmaları L929 fare fibroblast hücreleri üzerine Bölüm 3.2.5.1. de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Boş nanopartikül formülasyonları 24 ve 48 saat boyunca L929 hücrelerine uygulanmış ve bu sürelerin sonunda % hayatta kalan hücre sayısı hesaplanarak formülasyonların güvenilirliği incelenmiştir (Şekil 2.36., Şekil 2.37.) Güvenilirlik çalışması sonucunda tüm formülasyonlarda her iki zaman aralığı için kontrol grubuna göre en az %90 hücre canlılığı elde edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda tüm formülasyonlar ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark ($p>0.05$) bulunamamıştır.



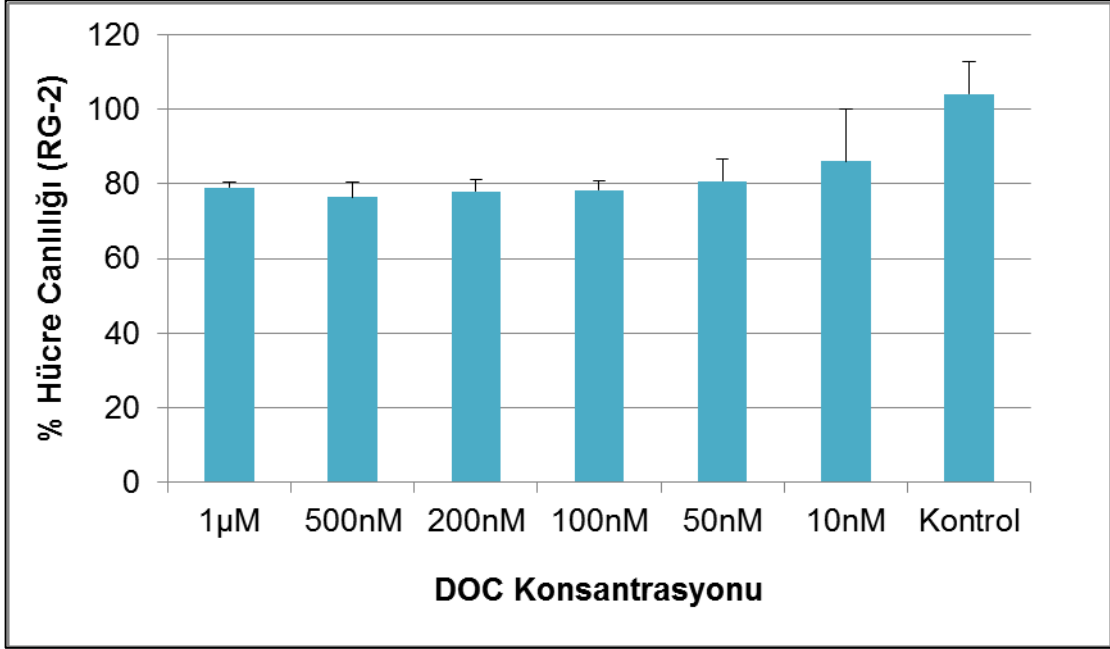
Şekil 2.36 Anyonik ve katyonik boş nanopartiküllerin L929 hücreleri üstüne 24 saatlik etkisi (n=3).



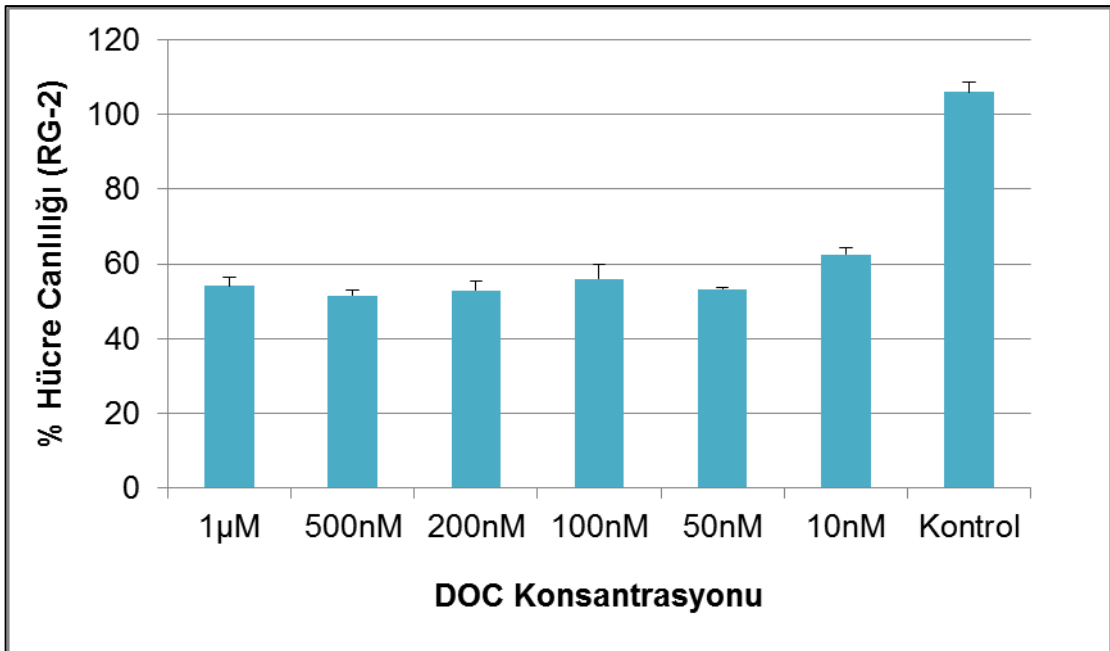
Şekil 2.37 Anyonik ve katyonik boş nanopartiküllerin L929 hücreleri üstüne 48 saatlik etkisi (n=3).

4.5.2. Doksetselin glioma hücreleri üstüne etkisi değerlendirilmesi

Doksetselin RG-2 sıçan glioma hücreleri üzerine etkisi Bölüm 3.2.5.2. de anlatıldığı gibi incelenmiştir. 24 ve 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda dosetaksel çözeltisine maruz bırakılan hücrelerin kontrol grubuna göre % hayatta kalan hücre sayısı hesaplanmış ve dosetaksel konsantrasyonuna bağlı olarak hücre yaşayabilirliği incelenmiştir (Şekil 4.38., Şekil 4.39.). Yapılan çalışma sonucunda en yüksek sitotoksik etki 500 nM'lık konsantrasyonda gözlenmiştir. 500 nM'lık ilaç çözeltisine 24 saat süresince maruz tutulan hücrelerin %24'ünün 48 saat süresince maruz tutulan hücrelerin ise yaklaşık %50'sinin öldüğü gözlenmiştir.



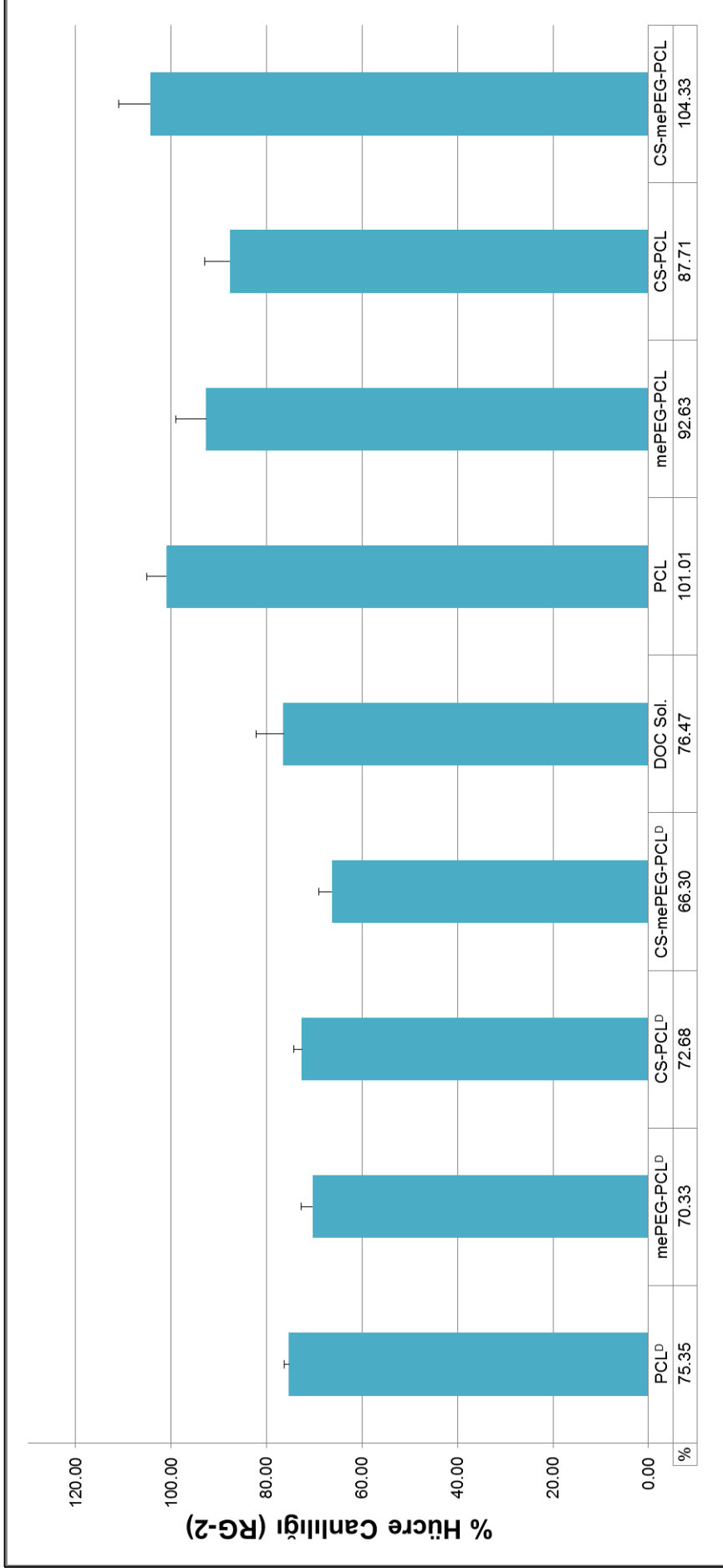
Şekil 4.38. Farklı konsantrasyonlardaki doksetaksel çözeltilerinin RG-2 hücreleri üstüne 24 saatlik etkisi (n=3).



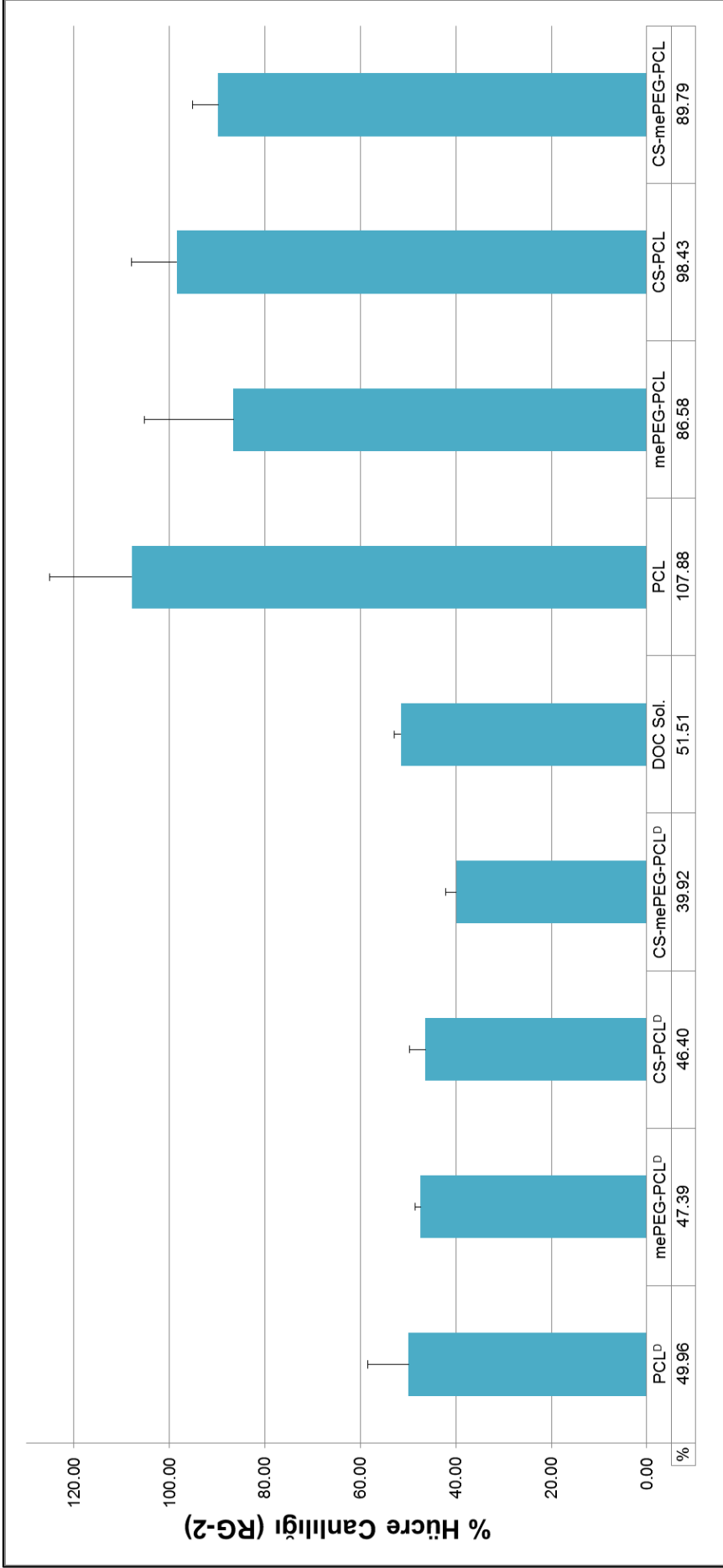
Şekil 4.39. Farklı konsantrasyonlardaki doksetaksel çözeltilerinin RG-2 hücreleri üstüne 48 saatlik etkisi (n=3).

4.5.3. *In vitro* etkinlik çalışmalarının değerlendirilmesi

Anyonik ve katyonik PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin *in vitro* etkinlik çalışmaları RG-2 sıçan glioma hücreleri üzerine Bölüm 3.2.5.3. de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Eşit miktarda ilaç içeren nanopartikül formülasyonları bu hücre hattına uygulanmış, 24 ve 48 saat sonunda % hayatta kalan hücre sayısı hesaplanarak formülasyonların etkinliği incelenmiştir (Şekil 4.40., Şekil 4.41.). Yapılan çalışmalar sonucunda 48 saatin sonunda dozetaksel solüsyonu verilen RG-2 hücrelerinin %52'sinin hayatta kaldığı buna karşın ilaç yüklü PCL nanopartiküllerde hücrelerin %50'sinin, mePEG-PCL nanopartiküllerinde %47'sinin, kitosan kaplı PCL nanopartiküllerinde %46'sının ve kitosan kaplı mePEG-PCL nanopartiküllerde %40'ının hayatta kaldığı ve bu sonucun DOC çözeltisine göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) olduğu görülmüştür.



Şekil 4.40. İlaç yüklü ve boş anyonik ve katyonik nanopartiküllerin RG-2 hücreleri üstüne 24 saatlik etkisi (n=3).



Şekil 4.41. İlaç yüklü ve boş anyonik ve katyonik nanopartiküllerin RG-2 hücreleri üstüne 48 saatlik etkisi (n=3).

5. TARTIŞMA

5.1. Yöntemin Validasyonun Değerlendirilmesi

Dosetaksel'in *in vitro* miktar tayini ve yöntemin validasyonu Bölüm 3.2.2.'de özetlendiği şekilde HPLC cihazı ile yapılmıştır. Literatürde dosetakselin HPLC ile miktar tayinine yönelik yapılan çalışmalarda absorbans değeri 227 nm ile 230 nm arasında değişmektedir [118-121]. Bu tez kapsamında dalgaboyu olarak 227 nm ve 229 nm denenmiş 229 nm ile yapılan analizler sonucunda daha yüksek absorbans elde edilmiştir. Dosetaksel'e ait kromatogram Bölüm 4.1.'de ve Şekil 4.1.'de verilmiştir. İlgili şekilde de görüldüğü gibi DOC'e ait pik 8,2 dakikada düzgün bir şekilde elde edilmiştir.

Dosetakselin miktar tayininde kullanılmak amacıyla Bölüm 3.2.2.1.'de özetlendiği gibi bir kalibrasyon doğrusu hazırlanmış ve yöntemin validasyonu yapılmıştır. Yöntemin validasyonunda doğrusallık (linearity), doğruluk (accuracy), kesinlik (precision), duyarlılık (sensitivity), özgünlük (specificity), stabilite (stability) gibi parametreler incelenmiştir.

Doğrusallık parametresinin incelenmesinde kalibrasyon doğrusunun korelasyon katsayısından (r^2) yararlanılmıştır ve 0.9999 olarak bulunmuştur. Bu değer 1'e çok yakındır. 1-200 µg/L konsantrasyon aralığındaki çözeltilerden elde edilen pik alanları arasında doğrusal bir ilişki olması ve korelasyon katsayısının 1'e çok yakın bir değer olması kalibrasyon doğrusunun doğrusal olduğunun kanıtıdır.

Doğruluk parametresi Bölüm 3.2.2.1.3.'de özetlendiği şekilde incelenmiştir. Kalibrasyon sınırları içinde bulunan düşük, orta ve yüksek yoğunlukta 3 farklı konsantrasyon için VK değerleri Bölüm 4.1.1.2.'de verilmiştir. FDA ve USP validasyon kılavuzlarında varyasyon katsayısının %2'den daha küçük olması gerektiği bildirilmiştir [107-109]. Yapılan çalışmada her üç konsantrasyon için de VK değerleri %2'nin altında olduğu görülmüştür ki bu da yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

Kesinlik parametresi Bölüm 3.2.2.1.4.'de özetlendiği şekilde incelenmiştir ve Bölüm 4.1.1.3.'de sonuçları verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda tekrar edilebilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve günler arası fark için ayrı ayrı elde edilen VK

değerleri %2'nin altında bulunmuştur. Bu da yöntemin tekrar edilebilir olduğu, verilerin tekrar elde edilebilir olduğu ve günler arası analiz sonuçlarında herhangi bir değişim olmadığının göstergesidir.

Duyarlılık parametresinin Tanıma Sınırı (LOD) ve Alt Tayin Sınırı (LOQ) Bölüm 3.2.2.1.5.'de özetlendiği şekilde incelenmiştir. Bölüm 4.1.1.4.'de de gösterildiği gibi LOD değeri 0.09 µg/mL, LOQ değeri ise 0.29 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu veriler yöntemin amacına uygun duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

Özgünlük parametresi Bölüm 3.2.2.1.6.'da özetlendiği şekilde incelenmiş ve formülasyonda kullanılan maddelere ait kromatogramlar Bölüm 4.1.1.5.'de verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda formülasyonda kullanılan PCL, mePEG-PCL ve CS'in DOC'in pik verdiği zaman aralığında (7,5-9,5 dakika aralığında) herhangi bir pik vermediği görülmüştür. Ayrıca HPLC deneyleri boyunca DOC'in piki ile girişimli hiçbir pike rastlanmamıştır. Tüm bu sonuçlar kullanılan yöntemin DOC için özgün olduğunun kanıtıdır.

Stabilite parametresi Bölüm 3.2.2.1.7.'de özetlendiği şekilde incelemiştir. Stabilite çalışmalarında kullanılan çözeltinin 48 saat sonunda başlangıç konsantrasyonunun ortalama %98'inin bulunduğu görülmüştür. Ayrıca bu süre zarfında herhangi bir bozunma ürününe ait pik gözlenmemiştir. Böylece DOC çözeltisinin yapılan çalışmalar boyunca bozunmadan stabil bir şekilde kaldığı gösterilmiştir.

Tüm bu validasyon çalışmaları sonucunda kullanılan yöntemin DOC'in nanopartikül formülasyonlarından *in vitro* deneylerde miktar tayini için uygun olduğu görülmüştür.

5.2. Ön Formülasyon ve Formülasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Ön formülasyon deneyleri özellikle teknolojik ve formülasyon parametrelerinin nanopartikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli üzerine etkisini ölçmek ve en uygun sonuçlar veren nanopartikül formülasyonları ile çalışabilmek için farklı parametrelerin farklı oranlarda denenmesi ile yürütülmüştür. Hazırlama yöntemi seçimi de dâhil olmak üzere detaylı bir ön formülasyon çalışması yapılmıştır. Her ne kadar PCL nanopartikülleri literatürde sıklıkla çalışılmış olsa da

mePEG-PCL ve CS kaplı mePEG-PCL nanopartiküller literatürde yenidir. Bu nedenle formülasyon geliştirme çalışmalarında her bir parametre dikkatle incelenmiştir ve nihai formülasyonlara bu bulgular ışığında ulaşılmıştır. Kullanılacak polimerin, yöntemin, polimer oranının, organik faz/sulu faz oranının, sürfaktan oranının ve katyonik nanopartiküller için kitosan oranının seçilmesi amacı ile Bölüm 3.2.3.1.'de özetlenen ön formülasyonlar çalışmaları yapılmıştır.

Nanopartiküllerin hazırlanması için Bölüm 2.7. de özetlenen avantajları nedeniyle PCL ve onun bir türevi olan mePEG-PCL polimeri seçilmiştir.

Her iki polimer de nanopartikül oluşturmak için uygun polimerlerdir ve bu alanda birçok çalışma mevcuttur. Çırpanlı ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir çalışmada nanoçöktürme yöntemi ile 274 nm boyutunda PCL nanoküreleri elde edilmiştir [115]. Verger ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptıkları bir başka çalışmada ise 208 nm boyutunda PCL nanopartiküller elde edilmiştir [111]. 2010 yılında Zheng ve arkadaşlarının nanoçöktürme yöntemi ile mePEG-PCL nanopartikülleri hazırlamış ve 80 nm boyutunda nanopartiküller elde etmişlerdir [110]. Aynı grubun 2011 yılında yaptığı bir başka çalışmada ise nanoçöktürme yöntemi ile 120 nm boyutunda mePEG-PCL nanopartiküller elde edilmiştir [112]. Bu polimer ile yapılan diğer çalışmalarda ise genellikle 70-80 nm arasında değişen nanopartiküller elde edilmiştir [118-119, 122]. Genel olarak mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü 50-150 nm arasında değişmesine karşın PCL nanopartikülleri 200-300 nm arasında değişmektedir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda da mePEG-PCL ile hazırlanan nanokürelerin büyüklükleri 70-120, PCL nanokürelerin büyüklükleri 140-220 arasında bulunmuştur. Bu sonuçlar literatürle paralellik göstermektedir. Genel olarak mePEG-PCL nanoküreler PCL nanokürelere göre daha düşük partikül büyüklüğüne sahiptir. mePEG-PCL amfifilik bir kopolimerdir ve hidrofilik PEG zincirlerine ve hidrofobik PCL zincirlerine sahiptir. Hidrofilik PEG zincirleri kopolimerin suda daha iyi difüze olmasını sağlar ve bu nedenle nanopartiküllerin boyutu PCL nanopartiküllerine oranla daha küçüktür. Küçük boyutlu nanopartiküllerin hücre içine alımı çok daha hızlıdır bu da ilacın kanser hücreleri içine daha etkili alınmasına olanak sağlayacaktır. mePEG-PCL ile hazırlanan nanopartiküllerin düşük partikül büyüklüğünün yanı sıra yüzeylerinin PEG zincirleri

ile kaplı olması da bir diğer önemli üstünlükleridir. Bu zincirler nanopartiküllerin MPS hücreleri tarafından algılanmasını engelleyerek nanopartiküllerin bölgede bozulmadan kalmasına ve ilaç salmasına olanak sağlayacaktır [93, 123]. Bu üstünlüklerinden yararlanmak amacıyla bu tez kapsamında mePEG-PCL nanopartikül hazırlamada polimer olarak seçilmiş ve PCL nanopartikülleri ile karşılaştırılmıştır.

Ayrıca tez kapsamında PCL M_n değerleri farklı olmak üzere 2 farklı polimer olan mePEG-PCL (PEG $M_n = 5,000$; PCL $M_n = 5,000$) ve mePEG-PCL (PEG $M_n = 5,000$; PCL $M_n = 13,000$) ile ön formülasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu alanda yapılan çalışmalar mePEG-PCL yapısında bulunan ve kopolimerin hidrofobik kısmını oluşturan PCL'nin M_n değerine bağlı olarak nanopartikülün ortalama büyüklüğünün değiştiğini göstermektedir [64, 94, 124-125]. PCL'nin M_n değerindeki artış kopolimerin hidrofobik kısmını artırmakta ve buna bağlı olarak kopolimerin su içindeki difüzyonu yavaşlamaktadır. Bunun sonucu olarak da nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü artmaktadır. Bu çalışmada, mePEG-PCL (5,000:5,000) ile hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü 77 nm, mePEG-PCL (5,000:13,000) ile hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü ise 72 nm olarak bulunmuştur ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı ($p > 0.05$) değildir. mePEG-PCL (5,000:13,000) ile hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğünün daha yüksek olmasının beklenmesine karşın her iki türevin PCL M_n arasındaki farkın partikül büyüklüğünü etkileyecek kadar büyük bir fark olmadığı düşünülmektedir. Literatürün aksine mePEG-PCL (5,000:13,000) ile hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğünün düşük çıkması nanopartiküllerin hazırlanması sırasındaki diğer parametrik farklılıklar ve hataların (karışma derecesi, karışma hızı, damlatma mesafesi, organik faz ve sulu fazdaki ufak hacimsel farklılıklar gibi) nanopartiküllerin boyutlarını etkilediği tahmin edilmektedir. Her iki polimerin polidispersite indeksleri karşılaştırıldığında ise mePEG-PCL (5,000:13,000) nanopartiküllerinin polidispersite indekslerinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle formülasyon çalışmaları için mePEG-PCL (5,000:5,000)'in kullanılmasına karar verilmiştir.

Yöntem seçiminde PCL ve mePEG-PCL ile nanopartikül hazırlamaya uygun olduğu literatürde gösterilen ve Bölüm 3.2.3.1.2. de anlatılan nanoçöktürme, tekli emülsiyon ve çoklu emülsiyon yöntemleri denenmiştir. Genellikle nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü emülsiyon bazlı yöntemler ile hazırlanan partiküllerden daha düşüktür. Özellikle çoklu emülsiyon ile hazırlanan nanopartiküllerin veya mikropartiküllerin ortalama partikül büyüklükleri oldukça büyüktür [119, 124, 126]. Yapılan çalışmalar sonucunda nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 77 nm, tekli emülsiyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 146 nm, çoklu emülsiyon yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 170 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğünün literatürle uyumlu olarak daha düşük olduğu görülmüştür. Daha düşük ortalama partikül büyüklüğüne sahip olması, pratik bir yöntem olması ve literatürde sıklıkla kullanılması nedeniyle formülasyon çalışmaları için nanoçöktürme yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

Polimer oranının seçiminde 3 farklı (%0.05, %0.1 ve %0.2 a/h) polimer oranında nanoçöktürme yöntemi ile PCL nanopartiküller hazırlanmıştır. Düşük polimer oranlarında daha düşük nanopartikül boyutları elde edileceği düşünülmeyle birlikte en uygun formülasyon polimerin ve yöntemin türüne göre değişmektedir [64]. Bu nedenle en uygun polimer oranının bulunması önemlidir. Wei ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada farklı polimer oranlarında mePEG-PCL nanopartikülleri hazırlanmış ve polimer konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak nanopartiküllerin boyutlarında artış olduğu görülmüştür [127]. Polimer konsantrasyonu ile partikül büyüklüğü arasındaki bu ilişki farklı grupların çalışmaları ile de gösterilmiştir [119, 128-129]. Yapılan ön formülasyon çalışmalarında %0.05 PCL içeren nanopartikül formülasyonu ile partikül büyüklüğünü 175 nm, %0.1 PCL içeren nanopartikül formülasyonu ile partikül büyüklüğünü 170 nm, %0.2 PCL içeren nanopartikül formülasyonu ile partikül büyüklüğü 195 nm olan PCL nanopartiküller elde edilmiştir. Sonuçlardan da anlaşıldığı gibi polimer oranlarının ortalama partikül büyüklüğüne belirgin bir etkisi tespit edilememiştir. En düşük ortalama partikül büyüklüğü elde edildiği için formülasyon çalışmalarında %0.1 PCL oranının kullanılmasına karar verilmiştir.

Organik faz/sulu faz oranının seçimi için 3 farklı (1:1, 1:2, 1:4) oran seçilmiştir. Genellikle organik faz/sulu faz oranındaki azalma veya artma nanopartikül boyutu üstüne etkili değildir. Ancak organik fazın sulu faz içindeki difüzyon hızı dolayısıyla organik fazın polaritesi ve su ile karışabilirliği nanopartiküllerin boyutunu etkilemektedir [64, 129-130]. Yapılan çalışmada bu bilgiyle uyumlu bir şekilde her üç oranında partikül büyüklüğüne belirgin bir etkisi görülmemiştir. 1:1 (organik faz/sulu faz) oranında hazırlanan nanopartikül formülasyonu ile partikül büyüklüğünü 183 nm, 1:2 oranında hazırlanan nanopartikül formülasyonu ile partikül büyüklüğünü 203 nm, 1:4 oranında hazırlanan nanopartikül formülasyonu ile partikül büyüklüğünü 202.3 nm olan PCL nanopartiküller elde edilmiştir. En düşük polidispersite indeksinin elde edilmesi, organik faz uçurulduktan sonraki son dispersiyonun çok yoğun ya da çok seyrek olmaması için formülasyon çalışmalarında 1:2 (organik faz/sulu faz) oranı seçilmiştir.

Süfaktan kullanılıp kullanılmayacağı ve kullanılacak süfaktan oranının seçimi için 5 farklı (%0, %0.25, %0.5, %1, %2 a/h) Pluronik F68® (PF-68) içeren nanopartikül formülasyonları hazırlanmıştır. Literatürde süfaktan oranının polimerin sulu faz içinde çözünürlüğünü artırdığı böylece ortalama partikül büyüklüğünü düşürdüğü gösterilmektedir [64]. Buna karşın süfaktansız nanopartikül formülasyonları ile daha düşük ortalama partikül büyüklüğünün elde edildiği çalışmalar da mevcuttur [113]. Yapılan ön formülasyon çalışmalarında süfaktansız PCL nanopartikül formülasyonu ile süfaktanlı formülasyonlara kıyasla daha küçük (150 nm) nanopartiküller elde edilmiştir. mePEG-PCL nanopartikül formülasyonu çalışmalarında süfaktansız formülasyon ile partikül büyüklüğünü 71 nm, %0.25 PF-68 ile 314 nm, %0.5 PF-68 ile 94.7 nm, %1 PF-68 ile 264.1 nm ve %2 PF-68 ile 91.5 nm büyüklüğünde mePEG-PCL nanopartiküller elde edilmiştir. (n=3). Sonuçlardan da görüldüğü gibi her iki polimer için de optimum partikül büyüklüğü süfaktansız formülasyonlar ile elde edilmiştir. Ayrıca mePEG-PCL polimeri amfifilik özellikte olması nedeni ile süfaktandan olumsuz etkilenmiş ve süfaktan oranına bağlı olarak ortalama partikül büyüklüğünde belirgin sapmalar oluşmuştur. mePEG-PCL amfifilik bir polimerdir ve bu özelliği sayesinde süfaktan gibi davranarak çekirdek-kabuk yapısında nanopartiküller oluşturmaktadır. Ortamda süfaktan bulunmasının bu yapının oluşumunu etkilediği, düzensiz ve heterojen nanopartiküller oluşturduğu düşünülmektedir. Hazırlanan süfaktanlı mePEG-PCL

nanopartiküllerinin yüksek polidispersite indeksine sahip olması da bu bilgiyi doğrulamaktadır.

PCL ve mePEG-PCL polimerleri ile hazırlanan nanopartiküllerin yüzey yükü negatiftir. Pozitif yüzey yüküne sahip katyonik nanopartiküllerin negatif yüklü ilaçları daha iyi enkapsüle ettiği bilinmektedir. Ayrıca katyonik nanopartiküller hücre zarının negatif doğası gereği hücre ile daha iyi etkileşime girerek anyonik nanopartiküllere kıyasla daha hızlı hücre içine alınırlar. Bunun yanı sıra katyonik nanopartiküllerin lokal ve mukosal uygulamalarda daha etkili olduğu bilinmektedir [71]. Negatif yüzey yüküne sahip nanopartiküllerin katyonik hale getirilmesinde kitosan ile bu partiküllerin kaplanması literatürde kullanılan bir yöntemdir. Bu sayede nanopartikülün yüzey yükü pozitif hale getirildiği gibi, kitosanın mukoadezif, antitümöral ve immün cevap artırıcı özelliğinden de yararlanılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda PCL nanopartiküllerin yüzeyleri kitosan ile kaplanarak pozitif hale getirilebildiği gösterilmiştir [73, 106]. Bu tez kapsamında nanopartiküllerin kitosan ile kaplanmasında kitosanın (CS) suda çözünebilir bir türevi olan Protasan™ seçilmiş ve 3 farklı (%0, %0.01, %0.025) Protasan™ oranı denenmiştir. Genel olarak Protasan™ miktarındaki artış polimerin yüzey kaplamasını artıracığı için ortalama partikül büyüklüğünü de artırmaktadır [106]. Kitosan kullanılmadan hazırlanan PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü 170.4 nm ve zeta potansiyeli -19.6 mV, %0.01 CS içeren nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü 196 nm ve zeta potansiyeli +39.2 mV, %0.025 CS içeren nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü 217.9 nm ve zeta potansiyeli +53.9 mV olarak elde edilmiştir. Böylece PCL nanopartiküllerinin yüzey yüklerinin kitosan ile kaplanarak anyonikten katyonığe değiştirildiği ve istenen net pozitif yüzey yükünün sağlandığı gösterilmiştir. Katyonik nanopartiküllerin hazırlanmasında nispeten daha düşük bir pozitif yüke sahip olması ve bu nedenle agregasyon riskinin daha az olması nedeniyle formülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere % 0.01'lik Protasan™ oranı seçilmiştir.

Özetle ön formülasyon çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar doğrultusunda anyonik nanopartikülleri nanoçöktürme yöntemi ile %0.01'lik polimer oranı ve 1:2 organik faz/sulu faz oranında ve sürfaktan içermeden hazırlanmasına karar

verilmiş. Katyonik nanopartiküllerin hazırlanmasında ise bu parametrelere ek olarak %0.01'lik Protasan™ kullanılması kararlaştırılmıştır.

5.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda, DOC yüklü ve boş anyonik ve katyonik PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin ortalama partikül büyüklüğü 70-270 nm arasında, polidispersite değerleri 0.4'ün altında ve zeta potansiyelleri -31 mV ile +54 mV arasında olduğu görülmüştür. Nanopartiküllere ilaç yüklenmesi partikül büyüklüğü artırmış zeta potansiyelini ise az da olsa nötre yaklaştırmıştır. Partikül büyüklüğünün 400 nm'nin altında olması önemlidir. Yapılan çalışmalar nanopartiküllerin boyutundaki küçülmeye bağlı olarak hücre sel alım oranlarının arttığını göstermektedir. Bu nedenle küçük partikül boyutlarının kanser hücreleri de dâhil olmak üzere hücre içine girişinin daha hızlı ve kolay olduğu söylenebilir [68, 131].

Kitosan pozitif yüke sahip bir polimerdir bu nedenle kitosan ile kaplanan nanopartiküllerin yüzey yükü beklendiği gibi pozitif değerlerdedir ayrıca kitosan ile kaplama beklendiği gibi partikül büyüklüğünü artırmıştır [73, 106]. Kitosan ile kaplama işlemi partikül büyüklüğünü artırmasına karşın yüzey yüklerini (zeta potansiyelini) pozitif hale getirmektedir. Yüzey yükü hücre içi alımda bir avantajdır ancak yüksek zeta potansiyelleri nanopartiküllerin agregasyonuna da neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar ± 30 mV zeta potansiyeli aralığındaki nanopartiküllerin agregasyon riskinin düşük olduğunu göstermekte bu değerlerin negatif veya pozitif yöndeki artışı ise agregasyon riskini artırmaktadır [132-133]. Kitosan kaplı ve dozetaksel yüklü nanopartiküllerin zeta potansiyeli, +32.5 mV ve +46 mV olarak bulunmuştur. CS-mePEG-PCL nanopartikülleri (+32.5 mV) CS-PCL (+46 mV) kıyasla daha uygun zeta potansiyeli değerlerine sahiptir. Ayrıca anyonik PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin zeta potansiyeli de -30mV'un üstünde bulunmuştur. Tüm formülasyonlar için elde edilen zeta potansiyelleri ± 30 'un çok üstünde veya çok altında değildir. Bu nedenle tüm formülasyonlar için agregasyon oluşma olasılığı düşüktür.

Yapılan kısa süreli fiziksel stabilite çalışmasında DOC yüklü anyonik ve katyonik PCL ve mePEG-PCL nanopartikülleri 1 aylık süre içinde partikül büyüklüğü ve zeta

potansiyelinde belirgin bir değişim olmamıştır. Genel olarak anyonik ve katyonik PCL nanopartiküllerin ortalama partikül büyüklüğü yaklaşık 10 nm artmış, anyonik ve katyonik mePEG-PCL nanopartiküllerde ise yaklaşık 13-23 nm'lik bir azalış gerçekleşmiştir. Bu değerler göz ardı edilebilecek kadar düşük değerlerdir. Formülasyonların zeta potansiyellerindeki değişim incelendiğinde ise anyonik formülasyonlarda 2-4 mV artış, katyonik formülasyonlarda ise 5-14 mV'luk bir azalış gözlenmiştir. Bununla birlikte 1 aylık süre sonunda tüm nanopartiküllerin zeta potansiyelinin ± 30 mV arasında olduğu görülmüştür. Ayrıca tüm formülasyonlar için ortalama partikül büyüklüğü ve zeta potansiyellerinde belirgin bir değişim olmamıştır. Buradan yola çıkılarak tüm formülasyonların 1 aylık süre zarfında stabil olarak kaldığı söylenebilir. Bu da uygulama süresi boyunca nanopartiküllerin agregasyon oluşturmada ilacı salabileceklerinin göstergesidir.

Anyonik ve katyonik (kitosan kaplı ve kaplı olmayan) PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin görüntüleme çalışmaları Bölüm 3.2.4.4. de özetlendiği gibi taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile gerçekleştirilmiştir. SEM görüntüleri ile elde edilen tüm formülasyonların şekli küresel ve düzgün yüzeyledir. Ayrıca elde edilen ortalama partikül büyüklükleri Malvern Zetasizer cihazı ile ölçülen değerler ile uyum göstermektedir. Farklı çalışma gruplarının PCL ve mePEG-PCL nanopartikülleri üzerine yapılan görüntüleme çalışmalarında da buna benzer sonuçlar elde edilmiştir [118, 119].

5.4. İlaç Yükleme Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Anyonik ve katyonik PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin ilaç yükleme etkinliğinin belirlenmesi Bölüm 3.2.4.5.'de özetlendiği gibi gerçekleştirilmiş, %EE ve %LC değerleri hesaplanarak sonuçlar Bölüm 4.3.5.'de verilmiştir. Yapılan etkinlik çalışmalarında kitosan kaplı formülasyonlar kaplı olmayan formülasyonlara kıyasla daha yüksek %EE ve %LC değerlerine sahiptir. Kitosan kaplı PCL nanopartikülleri kitosan kaplı olmayan PCL nanopartiküllere kıyasla %15'lik, kitosan kaplı mePEG-PCL nanopartikülleri kitosan kaplı olmayan mePEG-PCL nanopartiküllere kıyasla %30'luk daha yüksek ($p < 0,05$) %EE değerine sahiptir.

Kitosan ile kaplama nanopartiküllere pozitif özellik kazandırmaktadır. Ön formülasyon çalışmaları sırasında formülasyonlar ile eşit miktarda Doseksel

içeren ilaç çözeltisinin zeta potansiyeli ölçülmüş ve Dosetakselin zeta potansiyelinin -14 mV olduğu görülmüştür. Dosetaksel gibi anyonik ilaçlar kitosan kaplı nanopartikül ile elektrostatik etkileşime girebilir ve daha yüksek enkapsüle veya adsorbe olabilirler. Bu nedenle nanopartikülleri kitosan ile kaplama %EE değerini anyonik nanopartiküllere kıyasla artırdığı düşünülmektedir [71, 106].

PCL nanopartiküllere kıyasla mePEG-PCL nanopartiküllerinin enkapsülasyon etkinliğinin daha yüksek olduğu bulunmuştur. Önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi mePEG-PCL nanopartikülleri amfifilik polimerlerdir ve bu özellikleri sayesinde hazırlama işlemi sırasında hızlı ve spontane bir şekilde nanopartiküller oluşmaktadır. Nanopartikül oluşumu sırasında dosetaksel gibi hidrofobik ilaçların PCL' a kıyasla daha iyi enkapsüle edildiği düşünülmektedir. PCL ve dosetaksel üstüne yapılan çalışmalarda genellikle %65-71 %EE elde edilmiş [114, 134], mePEG-PCL nanopartikülleri üstüne yapılan çalışmalarda ise %80-90 %EE elde edilmiştir [110, 118]. Bu tez kapsamında hazırlanan mePEG-PCL nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliği literatürde gösterildiği kadar yüksek değildir. Bunun nedeninin mePEG-PCL polimerindeki PCL'nin M_n değerindeki farklılık olduğu düşünülmektedir. Literatürde genellikle yüksek PCL M_n değerine sahip mePEG-PCL kopolimerleri ile çalışılmış buda yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilmesine neden olmuş olabilir. mePEG-PCL nanopartiküllerinin %EE değeri literatürdeki kadar yüksek olmamasına karşın genel olarak PCL nanopartiküllerinden yüksektir bu sonuç da literatürle uyumludur.

5.5. *In vitro* Etkin Madde Salım Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Anyonik ve katyonik PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin *in vitro* ilaç salım profili Bölüm 3.2.4.6.'da anlatıldığı gibi yapılmış ve sonuçlar Bölüm 4.3.6.'da verilmiştir. Dosetaksel gibi hidrofobik ilaç yüklü PCL ve mePEG-PCL nanopartikülleri ile yapılan çalışmalarda genellikle uzun süreli bir salım profili elde edilmektedir [110, 114, 118]. Buna karşın ilk 1 saat içinde ilacın büyük bir kısmını salıdığı çalışmalar da vardır [113]. Bölüm 2.7.'de özetlendiği gibi PCL'nin parçalanma süresi oldukça uzundur; bu nedenle PCL nanopartiküllerinin içine enkapsüle edilen ilaçların salım hızının daha yavaş olması beklenir. Ancak ilaç nanopartiküle adsorbe edilir ise salım süresi PCL'nin parçalanma süresinden etkilenmez ve çok daha kısa sürer.

Bu çalışma kapsamında hazırlanan kitosan kaplı ve kaplı olmayan PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllerinin büyüklüğü 70-270 nm arasında değişmektedir. Bu boyuttaki nanopartiküller oldukça geniş bir yüzey alanına sahiptir. Yüzey alanındaki artış salım hızını artırmaktadır. Bu durum salım hızının yüksek olmasının bir nedeni olabilir. Sink koşulların sağlanması için kullanılan Tween® 80 çözeltisi de ilacın çözünürlüğünü artırdığı için salım'ın hızlanmasına neden olmuş olabilir. Ayrıca ilacın büyük bir kısmı nanopartiküle adsorbe olarak yüklendiği bu nedenle 1 saat içinde %80 den fazlasını saldırdığı düşünülmektedir.

5.6. *In vitro* Sitotoksikite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

In vitro sitotoksikite çalışmaları dâhilinde L-929 fare fibroblast hücre hattı ve RG-2 sıçan glioma hücre hatları kullanılmış. Boş formülasyonların güvenilirliği Amerikan Farmakopesinde (USP) polimerik sistemler için verilen standart sitotoksikite tayin yöntemi olan L-929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. İlaç yüklü ve boş nanopartiküllerin sitotoksik etkinliğinin belirlenmesi için ise RG-2 hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hattı *in vitro* çalışmalarda glioblastoma multiforme için iyi bir modeldir [117].

In vitro güvenilirlik çalışmalarında 48 saat boyunca uygulanan formülasyonların tamamında en az % 90'lık bir hayatta kalma oranı görülmüştür. Bu oran formülasyonların L-929 hücreleri üzerine belirgin bir sitotoksik etkisinin olmadığını göstermektedir. Bu sonuçlardan yola çıkarak hazırlanan formülasyonlar DOC'in taşınması için oldukça güvenilirdir ve herhangi bir sitotoksik etki yapmaksızın DOC'in çözünürlüğünü sağlamaktadır.

Dosetakselin glioma hücreleri üstüne etkisinin incelenmesi amacı ile farklı konsantrasyonlardaki ilaç çözeltisi %1 DMSO içeren DMEM içinde çözünmüş ve RG-2 hücrelerine uygulanmıştır. Literatürde farklı glioma hücreleri [134-136] üzerine dosetakselin etkinliğinin incelendiği çalışmalar olmakla birlikte RG-2 üzerine yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez kapsamında DOC'in RG-2 hücreleri üzerine etkisi ilk kez incelenmiştir. 48 saat sonunda DOC konsantrasyonundaki artışına bağlı olarak (1µM konsantrasyonunda deneysel hata kaynaklı bir sapış göstermiş olduğu düşünülmektedir) hayatta kalan hücre sayıları birbirleri ile yakın sonuçlar vermesine karşın bir azalış söz konusudur. 48 saatin

sonunda en düşük hücre sayısı (%48.5) 500 nM'lık konsantrasyonda bulunmuştur. Bu nedenle *in vitro* etkinlik çalışmaları için 500 nM'a eşdeğer ilaç içeren formülasyonların denenmesine karar verilmiştir.

In vitro etkinlik çalışmalarında 24 ve 48 saat boyunca uygulanan ilaç yüklü formülasyonların tamamı eşit miktarda ilaç içeren DOC çözeltisi ile kıyaslanmıştır. Her iki zaman aralığında da tüm formülasyonlar için DOC çözeltisinden daha yüksek hücre ölümü gerçekleşmiştir. En başarılı formülasyon beklendiği gibi CS-mePEG-PCL nanopartiküllerinde (24 saat için %34, 48 saat için %60 hücre ölümü) elde edilmiştir. Dozetaksel Bölüm 2.6.2.'de anlatıldığı gibi hücrelerin mikrotübül fonksiyonunu etkileyerek mitotik aktivitelerini bozar ve hücre ölümlerine neden olur. RG-2 hücrelerinin *doubling* süresi yaklaşık 20 saattir [137]. Bu nedenle sitotoksik etkisini ancak 20 saatin sonunda göstermeye başlamaktadır. 24 saat sonundaki etkinin düşük olması bu nedendir ve 48 saat sonundaki veriler daha güvenilirdir.

In vitro sitotoksosite çalışmaları tüm formülasyonların DOC'in çözünürlüğünü sağlayan çözücülere kıyasla daha güvenilir bir şekilde DOC'i taşıdığını göstermektedir. Buna ek olarak tüm formülasyonlar DOC'in etkinliğini artırmıştır. formülasyonlar birbiri ile karşılaştırıldığında mePEG-PCL nanopartiküllerinin PCL nanopartiküllerinden daha etkili olduğu, kitosan ile kaplanan formülasyonların ise kaplanmayan formülasyonlara kıyasla daha başarılı olduğu görülmüştür. Özellikle CS-mePEG-PCL nanopartikülleri DOC'in etkinliğini DOC solüsyonuna kıyasla %12 oranında anlamlı bir artış ($p < 0,05$) göstermiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında glioma tedavisinde kullanılmak üzere dosetaksel yüklü katyonik ve anyonik nanopartiküllerin formülasyonu geliştirilmiştir.

- Nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesinde 2 farklı polimer (PCL ve mePEG-PCL) kullanılmış ve ön formülasyon çalışmaları ile en uygun formülasyonlar belirlenmiştir.
- Ön formülasyon çalışmaları ile polimer konsantrasyonu, organik faz/sulu faz oranı, sürfaktan konsantrasyonu gibi parametrelerin formülasyonların ortalama partikül büyüklüğüne belirgin bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Hazırlama metodunun ise partikül büyüklüğünü belirgin bir oranla etkilediği görülmüş ve nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanan formülasyonlarda daha düşük partikül büyüklüğü elde edilmiştir.
- Kitosan ile kapamanın her iki polimer ile hazırlanan anyonik nanopartikülleri katyonik hale getirdiği buna karşın partikül büyüklüğünü de artırdığı tespit edilmiştir.
- Kısa süreli fiziksel stabilite çalışmalarında DOC yüklü anyonik ve katyonik nanopartiküllerin 30 gün boyunca herhangi bir agregasyon oluşturmadan stabil bir şekilde kalabildiği gözlenmiştir.
- Taramalı elektron mikroskobu görüntülemeleri ile tüm formülasyonların dairesel ve düzgün bir yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir.
- Enkapsülasyon etkinliği çalışmaları sonucunda tüm formülasyonların %60'ın üstünde enkapsülasyon etkinliğine sahip olduğu ve kitosan ile kaplama işleminin enkapsülasyon etkinliğini artırdığı, özellikle mePEG-PCL nanopartiküllerin %95'lik enkapsülasyon etkinliği ile DOC'i oldukça yüksek oranda taşıdıkları gözlenmiştir.
- Tüm formülasyonların hızlı bir ilaç salım profili gösterdikleri ve taşıdıkları ilacın %80'ini 75 dakika içinde saldıkları görülmüş, bunun nedeni olarak ilacın büyük bir kısmının nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe olduğu düşünülmüştür.

- *In vitro* güvenilirlik çalışmaları sonucunda tüm nanopartikül formülasyonlarının DOC'in taşınmasında güvenilir olduğu ve L-929 hücreleri üzerine herhangi bir sitotoksik etkisi olmadığı tespit edilmiştir.
- RG-2 hücreleri üzerine yapılan hücre kültürü çalışmaları ile dosetakselin bu hücreler üzerine etki gösterdiği ve hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir.
- *In vitro* etkinlik çalışmaları sonucunda tüm nanopartikül formülasyonlarının DOC'in etkisini artırdığı ve RG-2 hücreleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür.
- *In vitro* etkinlik çalışmaları kitosan ile kaplanmış nanopartiküllerin kaplanmayan nanopartiküllere kıyasla daha başarılı olduğunu göstermiştir ve en başarılı formülasyonun CS-mePEG-PCL olduğu görülmüştür.

Glioma tedavisinde en yaygın kullanılan tedavi yöntemi cerrahi müdahaledir. Kemoterapi ve radyoterapinin yeterince etkili olmaması ve beyinin diğer organlara kıyasla çok daha ulaşılmaz bir organ olması nedeni ile kısa dönemde bu durumun değişeceği pek mümkün görülmemektedir. Bu nedenle özellikle glioblastoma multiforme gibi agresif beyin tümörü türlerinin tedavisinde, cerrahi müdahale sırasında uygulanacak tedavi edici sistemlerin geliştirilmesi ihtiyaç vardır. Bu alanda ilaç yüklü tampon sistemler umut vadetmektedir. Bu tez kapsamında dosetakselin glioma hücreleri üzerine etkinliği gösterilmiştir. Dosetakselin en büyük dezavantajı çözücü kaynaklı toksisitesidir. Dosetakselin çözünürlüğünü sağlayan çözücüler tedavi sırasında yan etkiler göstermekte ve tedavinin yarıda bırakılmasına neden olmaktadır. Bu tez ile DOC güvenilir bir şekilde PCL ve mePEG-PCL nanopartiküllere yüklenmesi sağlanmış ve toksik etkisi olmaksızın ilacın çözünürlüğü gerçekleştirilmiştir. Ayrıca geliştirilen formülasyonlar sayesinde ilacın etkinliği de artırılmıştır. *In vitro* çalışmalar göz önünde tutulduğunda geliştirilen formülasyonlar glioma tedavisi için umut vadetmekte ve *in vivo* çalışmalara geçilmesi için uygunluk göstermektedir. *In vivo* çalışmalar için geliştirilen bu nanopartikül formülasyonları biyoparçalanır bir tampon ile hazırlanarak deney hayvanlarına verilebilir ve etkinlikleri incelenebilir. Böylece cerrahi müdahale sırasında tümörün çıkartıldığı bölgeye uygulanan ve bölgede

kalan kanser hücrelerini ortadan kaldıran yeni bir tampon sistem geliştirilmiş olur. Geliştirilecek olan böyle bir sistemin glioma multiforme tedavisinde tedavi etkinliğini artıracığı ve düşük olan hasta yaşayabilirliğini yükselteceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. National Cancer Institute, 2009, What You Need To Know About Brain Tumors, National Cancer Institute Rockville, 1-22p.
2. Shier, D., Butleri J., Lewis, R., 2012, Hole's Essentials of Human Anatomy & Physiology 11. Edition, McGraw-Hill, ISBN 978-0-07-337815-2, New York, 213-220p.
3. Brodal, P., 2004, The Central Nervous System Structure And Function 3. Edition, Oxford University Press, ISBN 0-19-516560-8, New York, 3-25, 66-102p.
4. Campbell, N.A., Reece, J.B., 2006, Biyoloji (6. baskı)(çev: Prof. Dr. Aşkın Tümer), Palme Yayınları, ISBN: 0-8053-6624-5, Ankara, 1022-1053s.
5. National Cancer Institute, 2012, National Cancer Institute: What is Cancer, <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>
6. Ruddon, R.W., 2007, Cancer Biology 4. Edition, Oxford University Press, 978-0-19-517543-1, New York, 3-16p.
7. National Cancer Institute, 2006, What You Need To Know About Cancer, National Cancer Institute Rockville, 2-3p.
8. National Cancer Institute, 2012, National Cancer Institute: Understanding Cancer Series, <http://cancer.gov/cancertopics/understandingcancer>
9. The Association for International Cancer Research funds, 2012, Cancer Info, <http://www.aicr.org.uk/CancerBasics.stm>
10. Cavenee, W. K., and White, R. L., 1995, The genetic basis of cancer, Scientific American, 272, 72-79p.
11. American Cancer Society, 2011, Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition, American Cancer Society Atlanta, 1-10p.
12. American Cancer Society, 2012, Cancer Facts & Figures 2012, American Cancer Society Atlanta, 1-12p.
13. Ali-Osman, F., 2005, Brain Tumors, Humana Press, ISBN 1-59259-843-9, New Jersey, 3-7p.
14. National Brain Tumor Society, 2006, Understanding Brain Metastases: A Guide for Patient and Caregiver, National Brain Tumor Foundation, California, 1-14p

15. Louis, D.N., Ohgaki, H., 2007, The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, *Acta Neuropathol*, 114, 97-109.
16. Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health Brain Tumor, http://www.hopkinsmedicine.org/neurology_neurosurgery/specialty_areas/brain_tumor/diagnosis/brain-tumor-grade.html
17. American Brain Tumor Association, 2012, Brain Tumor Facts, <http://www.abta.org/news/brain-tumor-fact-sheets/>
18. Iacob, G., Dinca, E.B., 2009, Current data and strategy in glioblastoma multiforme, *Journal of Medicine and Life*, 15, 2(4), 386-393.
19. American Brain Tumor Association, 2012, Brain Tumor Facts, <http://www.abta.org/understanding-brain-tumors/pediatric-tumors/>
20. National Cancer Institute, 2012, Surveillance Epidemiology and End Results, <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/brain.html>
21. Brat, D.J., Mapstone, T.B. (2003) Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. *Ann Intern Med*, 138 (8), 659-668.
22. Brown, J.M., Giaccia, A.J., 1998, The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res*, 58 (7), 1408-1416.
23. American Brain Tumor Association, 2012, Understanding Brain Tumor, <http://www.abta.org/understanding-brain-tumors/>
24. DeAngelis, L.M., 2001, Brain Tumors, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 344, 2, 114-123.
25. American Brain Tumor Association, 2012, About Brain Tumors: a Primer for Patients and Caregivers, American Brain Tumor Association, Chicago, 5-77p.
26. National Cancer Institute, 2012, Adult Brain Tumors Treatment, <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/adultbrain/Patient>
27. Mayfield Clinic, 2012, Craniotomy, <http://www.mayfieldclinic.com/PE-Craniotomy.htm>
28. Wastphal, M., Tonn, J.-C., Ram, Z., 2003, Local Therapies for Glioma Present Status and Future Developments, Springer-Verlag/Wien, 3-211-40355-8, Wien, 31-34p.

29. Leibel, S.A., Sheline, G.E., 1987, Radiation therapy for neoplasms of the brain, *J. Neurosurg.*, 66, 1-22.
30. Lesniak, M.S., Langer R., Brem H., 2001, Drug Delivery to Tumors of the Central Nervous System, *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 1, 210–216.
31. Tomita, T., 1991, Interstitial chemotherapy for brain tumors: review, *Journal of Neuro-Oncology*, 10, 57-74.
32. Pardridge, W.M., 1997, Drug Delivery to the Brain, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 17, 713-731.
33. Pardridge, W.M., 2007, Drug Targeting to the Brain, *Pharmaceutical Research*, 24, 9, 1733-1744.
34. Koo, Y.-E.L., Reddy, G.R., Bhojani, M., Schneider, R., Philbert, M.A., Rehemtulla, A. et al., 2006, Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplateforms. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1556-1577.
35. Wolinsky, J.B., Colson Y.L., 2012, Grinstaff M.W., Local drug delivery strategies for cancer treatment: Gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *Journal of Controlled Release*, 159, 14–26.
36. Garcia-Garcia E., Andrieux K., Gilb S., Couvreur P., 2005, Colloidal carriers and blood–brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain?. *International Journal of Pharmaceutics*, 298, 274-292.
37. Wang, P.P., Frazier J., Brem, H., 2002, Local drug delivery to the brain, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 987-1013.
38. Neuwelt, E., Abbott, N.J., Abrey, L., Banks, W.A., Blakley, B., Davis, T., Engelhardt, B., Grammas, P., Nedergaard, M., Nutt, J., Pardridge, W., Rosenberg, G.A., Smith, Q., Drewes, L.R., 2008, Strategies to advance translational research into brain barriers, *The Lancet Neurology*, 7, 84-96.
39. Fleming, A.B., Mark, W., 2002, Pharmacokinetics of the Carmustine Implant. *Clin Pharmacokinet*, 41, 6, 403-419.
40. Dyke, J.P., Sanelli, P.C., Voss, H.U., Serventi, J.V., Stieg, P.E., Schwartz, T.H. et al., 2007, Monitoring the effects of BCNU chemotherapy Wafers (Gliadel) in glioblastoma multiforme with proton magnetic resonance spectroscopic imaging at 3.0 Tesla. *J Neurooncol*, 82, 103-110.
41. Ringe, K., Walz, C.M., Sabel, B.A., 2004, Nanoparticle Drug Delivery to the Brain. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 7, 91-104.

42. Immordino, M.L., Brusa, P., Arpicco, S., Stella, B., Dosio, F., Cattel, L., 2003 Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel. *J Control Release*, 91, 3, 417-429.
43. Davson, H., 1976, The Blood-Brain Barrier, *The Journal of Physiology*, 255, 1, 1-28.
44. Janzer, R.C., 1993, The Blood-Brain Barrier: Cellular Basis, *J. Inher. Metab. Dis*, 16, 639-647.
45. Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health Open Courseware, <http://www.core.org.cn/mirrors/jhsph/ocw.jhsph.edu/imageLibrary/index.cfm/go/il.viewImageDetails/resourceID/980FB154-A136-6408-103DAD1F6132B37B/index.htm>
46. Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006, Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier, *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 41-53.
47. Ballabh, P., Braun, A., Nedergaard M., 2004, The blood–brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications, *Neurobiology of Disease*, 16, 1-13.
48. Groothuis, D.R., 2000, The blood-brain and blood-tumor barriers: A review of strategies for increasing drug delivery, *Neuro-Oncology*, 45-59.
49. Cosolo, W.C., Martinello, P., Louis W.J., Christophidis N., 1988, Blood-brain barrier disruption using mannitol: time course and electron microscopy studies. *The American journal of physiology*, 256, 443-447.
50. Wong, H.L., Wu, X.Y., Bendayan, R., 2012, Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 686-700.
51. Sattler, K.D., 2011, *Handbook of Nanophysics 7: Nanomedicine and Nanorobotics*. CRC Press, ISBN 978-1-4200-7546-5, Washington, D.C, 29/1-29/12, 35/1-35/15p.
52. Torchilin, V.P., 2000, Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*, 11, 2, 81-91.
53. Luo, Y., Prestwich, G.D., 2002, Cancer-targeted polymeric drugs. *Curr Cancer Drug Targets*, 2, 3, 209-226.
54. Reddy, L.H., 2005, Drug delivery to tumours: recent strategies. *J Pharm Pharmacol*, 57, 10, 1231-1242.

55. Fang, J., Nakamura, H., Maeda, H., 2011, The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect, *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 3, 136-151.
56. Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. 2007, *Nature Nanotechnology*, 2, 751-760.
57. National Nanotechnology Initiative, <http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>
58. Jain, K.K., 2008, *The Handbook of Nanomedicine*, Humana Press, 978-1-60327-318-3, New Jersey, 1-9, 119-160, 204-231.
59. Bandyopadhyay, A.K., 2008, *Nano Materials*, New Age International Limited Publishers, 978-81-224-2321-1, New Delhi, 1-2.
60. Sanchez, F., Sobolev, K., 2010, Nanotechnology in concrete – A review, *Construction and Building Materials*, 24, 2060–2071.
61. Farokhzad, O.C., Langer, R., 2006, Nanomedicine: Developing smarter therapeutic and diagnostic modalities, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1456-1459.
62. National Institutes of Health, <http://ospa.od.nih.gov/documents/policy/InnovativemedicalResearchattheMolecularScale.pdf>
63. Pathak, Y., Thassu, D., K., 2009, *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*, Informa Healthcare, 978-1-4200-7804-6, New York, 1-31.
64. Kumar, M.N.V., 2008, *Handbook of Particulate Drug Delivery Volume 1: Materials and Technologies*, American Scientific Publishers, 978-1-58883-124-8, California, 10-25.
65. Bei, D., Meng, J., Youan, B.B., 2010, Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises. *Nanomedicine (Lond)*, 5, 9, 1385-1399.
66. Gürsoy, A.Z., 2002, *Kontrollü Salım Sistemleri, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği*, 975-97725-0-7, İstanbul, 65-86s.
67. Soppimatha, K.S., Aminabhavia, T.M., Kulkarnia, A.R., Rudzinski, W.E., 2001, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, *Journal of Controlled Release*, 70, 1-20.

68. Brigger, I., Dubernet, C., Couvreur, P., 2002, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 631-651.
69. Kingsley, J.D., Dou, H., Morehead, J., Robinow, B., Gendelman, H.E., Destache, C.J., 2006, Nanotechnology: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1, 340–350.
70. Storm, G., Belliot, S.O., Daemen, T., Lasic, D.D., 1995, Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17, 31-48.
71. Bilensoy, E., 2010, Cationic nanoparticles for cancer therapy. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 7, 6, 1-15.
72. Lu, X., Wang, Q.-Q., Xu, F.-J., Tang, G.-P., Yang, W.-T., 2011, A cationic prodrug/therapeutic gene nanocomplex for the synergistic treatment of tumors. *Biomaterials*, 32, 4849-4856.
73. Erdoğar, N., Mungan, A., Bilensoy, E., 2010, Preparation and characterization of cationic nanoparticles loaded with mitomycin c by double emulsion and ionotropic gelation techniques. *Journal of Controlled Release*, 148, e74-e84.
74. Gürsoy, A.Z., 2004, *Farmasötik Teknoloji Temel konular ve dozaj şekilleri* (Yayın No: 2), *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, İstanbul*, 105-107, 251s.
75. Guenard, D., Voegeléin-Gueritte, F., Potier, P., 1993, Taxol and Taxotere: Discovery, Chemistry, and Structure-Activity Relationships, *Acc. Chem. Res.*, 26, 160-167.
76. Verweij, J., Clavel M., Chevalier B., 1994, Paclitaxel (Taxol™) and docetaxel (Taxotere™): Not simply two of a kind, *Annals of Oncology*, 5, 495-505.
77. Sampath P., Rhines L.D., DiMeco F., Tyler B.M., Park M.C., Brem H., 2006, Interstitial Docetaxel (Taxotere): Novel Treatment for Experimental Malignant Glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 80, 1, 9-17.
78. Moes, J., Koolen, S., Huitema, A., Schellens, J., Beijnen, J., Nuijen, B., 2012, Development of an oral solid dispersion formulation for use in low-dose metronomic chemotherapy of paclitaxel, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Early Online.

79. Wu, J., Shen, Q., Fang, L., 2012, Sulfobutylether- β -cyclodextrin/chitosan nanoparticles enhance the oral permeability and bioavailability of docetaxel, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Early Online, 1–10.
80. Miller, M.L., 2000, Chemistry and Chemical Biology of Taxane Anticancer Agents, *The Chemical Record*, Vol. 1, 195–211.
81. Ojima, I., Geney, R., Ungureanu I.M., Dansu, L., 2002, Medicinal Chemistry and Chemical Biology of New Generation Taxane Antitumor Agents, *IUBMB Life*, 53, 269–274.
82. Panchagnula, R., 1998, Pharmaceutical aspects of paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*, 172, 1-15.
83. Rowinsky, E.K., Donehower, R.C., 1995, Paclitaxel (Taxol). *The New England Journal of Medicine*, 332, 15, 1004-1014.
84. Grant, D.S., Williams, T.L., Zahaczewsky, M., Dicker, A.P., 2003, Comparison of Antiangiogenic Activities Using Paclitaxel (Taxol) And Docetaxel (Taxotere). *Int. J. Cancer*, 104, 121–129.
85. Baker, J., Ajani, J., Scotte, F., Winther, D., Martin, M., Apro, M.S., Minckwitz, G., 2009, Docetaxel-related side effects and their management, *European Journal of Oncology Nursing* 13, 49-59.
86. National Institutes of Health DailyMed, <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=45e6dce4-92e2-4ad1-bf11-bbcefb753636>
87. National Institutes of Health DailyMed, <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/lookup.cfm?setid=b35e3633-8893-4b0b-af1e-92e342557199>
88. T.C. Sağlık Bakanlığı İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, <http://www.ieg.gov.tr/Showing.aspx?q=dosetaksel&lang=tr-TR&process=search>
89. Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W., 2010, The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century, 2010, *Progress in Polymer Science*, 35, 1217–1256.
90. Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A., 2004, Poly-epsilon-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International Journal of Pharmaceutics*, 278 (1), 1-23.

91. Gad, S.C., 2008, *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*, Wiley-Interscience, ISBN 978-0-470-25958-0, New Jersey, 544-545s.
92. Schubert, S., Delaney, J.T., Schubert, U.S., 2011, Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid), *The Royal Society of Chemistry Soft Matter*, 7, 1581-1588.
93. Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S. ve diğ erleri., 2000, 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18, 301-313.
94. Choi, C., Chae, S.Y., Kim, T.-H., Jang, M.-K., Cho, C.S., Nah, J.-W., 2005, Preparation and Characterizations of Poly(ethylene glycol)-Poly(ϵ -caprolactone) Block Copolymer Nanoparticles. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 26 (4), 523-528.
95. Zhou, S., Deng, X., Yang, H., 2003, Biodegradable poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene glycol) block copolymers: characterization and their use as drug carriers for a controlled delivery system, *Biomaterials* 24 (2003) 3563–3570.
96. Felt, O., Buri, P., Gurny, R., 1998, Chitosan: A Unique Polysaccharide for Drug Delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24 (11), 979-993.
97. Tiyaboonchai, W., 2003, Chitosan Nanoparticles : A Promising System for Drug Delivery. *Naresuan University Journal*, 11 (3), 51-66.
98. Wang, J.J., Zeng, Z.W., Xiao, R.Z., Xie, T., Zhou, G.L., Zhan, X.R. et al., 2011, Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int J Nanomedicine*, 6, 765-774..
99. Sinha, V.R., Singla, A.K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S., 2004, Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *International Journal of Pharmaceutics*, 274, 1-33.
100. Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., Chiellini, E., 2011, Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in polymer science*, 36, 981-1014.

101. Rinaudo, M., 2006, Chitin and chitosan: properties and applications, *Prog. Polym. Sci.*, 31, 603-632.
102. Dutta, P.K., Dutta, J., Tripathi, V.S., 2004, Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications, *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63, 20-31.
103. Agnihotri, S.A., Mallikarjuna, N.N., Aminabhavi, T.M., 2004, Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 100, 5 -28.
104. Hasegawa, M., Yagi, K., Iwakawa, S., Hirai, M., 2001, Chitosan Induces Apoptosis via Caspase-3 Activation in Bladder Tumor Cells. *Cancer Science*, 92 (4), 459-466.
105. Seferian, P.G., Martinez, M.L., 2000, Immune stimulating activity of two new chitosan containing adjuvant formulations. *Vaccine*, 19 (6), 661-668.
106. Mazzarino, L., Travelet, C., Ortega-Murillo, S., Otsuka, I., Pignot-Paintrand, I., Lemos-Senna, E. et al., 2012, Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 370 (1), 58-66.
107. FDA Guidance For Industry, Bioanalytical Method Validation, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>
108. Niopas, I., Daftsios, A.C., 2003, Determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: validation and application to pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal*, 32, 6, 1213-1218.
109. van Zoonen, P., van't Klooster, H.A., Hoogerbrugge, R., Gort, S.M., van de Wiel, H.J., 1998, Validation of analytical methods and laboratory procedures for chemical measurements. *Arh Hig Rada Toksikol*, 49, 4, 355-370.
110. Zheng, D., Li, D., Lu, X., Feng, Z., 2010, Enhanced antitumor efficiency of docetaxel-loaded nanoparticles in a human ovarian xenograft model with lower systemic toxicities by intratumoral delivery. *ONCOLOGY REPORTS* (23), 717-724.
111. Leroueil-Le Verger, M., Fluckiger, L., Kim, Y.I., Hoffman, M., Maincent, P. 1998, Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agent. *Eur J Pharm Biopharm*, 46 (2), 137-143.

112. Shao, J., Zheng, D., Jiang, Z., Xu, H., Hu, Y., Li, X. et al., 2011, Curcumin delivery by methoxy polyethylene glycol–poly(caprolactone) nanoparticles inhibits the growth of C6 glioma cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 43 (4), 267-274.
113. A.-L. Le Roy Boehm, R.Z., H. Fessi., 2000, Poly epsilon-caprolactone nanoparticles containing a poorly soluble pesticide: formulation and stability study. *Journal of Microencapsulation*, 17 (2), 195-205.
114. Mei, L., Zhang, Y., Zheng, Y., Tian, G., Song, C., Yang, D. et al., 2009, A Novel Docetaxel-Loaded Poly (epsilon-Caprolactone)/Pluronic F68 Nanoparticle Overcoming Multidrug Resistance for Breast Cancer Treatment. *Nanoscale Res Lett*, 4 (12), 1530-1539.
115. Cirpanli, Y., Allard, E., Passirani, C., Bilensoy, E., Lemaire, L., Calis, S. ve diğ erleri. (2011) Antitumoral activity of camptothecin-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model. *Int J Pharm*, 403 (1-2), 201-206.
116. Malvern instrument
http://www.malvern.com/labeng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm
117. Barth, R.F.,Kaur, B., 2009, Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol*, 94 (3), 299-312.
118. Liu, Q., Li, R., Zhu, Z., Qian, X., Guan, W., Yu, L. et al, 2012, Enhanced antitumor efficacy, biodistribution and penetration of docetaxel-loaded biodegradable nanoparticles. *Int J Pharm*, 430 (1-2), 350-358.
119. Zheng, D., Li, X., Xu, H., Lu, X., Hu, Y.,Fan, W., 2009, Study on docetaxel-loaded nanoparticles with high antitumor efficacy against malignant melanoma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 41 (7), 578-587.
120. Muthu, M.S., Kulkarni, S.A., Xiong, J.,Feng, S.S., 2011, Vitamin E TPGS coated liposomes enhanced cellular uptake and cytotoxicity of docetaxel in brain cancer cells. *Int J Pharm*, 421 (2), 332-340.
121. Hu, K., Cao, S., Hu, F.,Feng, J., 2012, Enhanced oral bioavailability of docetaxel by lecithin nanoparticles: preparation, in vitro, and in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*, 7, 3537-3545.
122. Liu, Q., Li, R.T., Qian, H.Q., Yang, M., Zhu, Z.S., Wu, W. et al., 2012, Gelatinase-stimuli strategy enhances the tumor delivery and therapeutic

- efficacy of docetaxel-loaded poly(ethylene glycol)-poly(varepsilon-caprolactone) nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 7, 281-295
123. Peracchia, M.T., Gref, R., Minamitake, Y., Domb, A., Lotan, N., Langer, R. (1997) PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics. *Journal of Controlled Release*, 46, 223-231.
 124. Limayem Blouza, I., Charcosset, C., Sfar, S., Fessi, H., 2006, Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *Int J Pharm*, 325 (1-2), 124-131.
 125. Li, R., Li, X., Xie, L., Ding, D., Hu, Y., Qian, X. et al., 2009, Preparation and evaluation of PEG-PCL nanoparticles for local tetradrine delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 379, 158-166.
 126. Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A., 2010, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 385, 113-142
 127. Wei, X.W., Gong, C.Y., Gou, M.Y., Fu, S.Z., Guo, Q.F., Shi, S. et al., 2009, Biodegradable poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene glycol) copolymers as drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 381 (1), 1-18.
 128. Khayata, N., Abdelwahed, W., Chehna, M.F., Charcosset, C., Fessi, H., 2012, Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: from laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *Int J Pharm*, 423 (2), 419-427.
 129. Cheng, J., Teply, B.A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F.X. et al., 2007, Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, 28 (5), 869-876.
 130. Chorny, M., Fishbein, I., Danenberg, H.D., Golomb, G., 2002, Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *Journal of Controlled Release*, 83 (3), 389-400.
 131. Win, K.Y., Feng, S.S., 2005, Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26 (15), 2713-2722.

132. Hans, M.L., Lowman A.M., 2002, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6 (4), 319-327.
133. Muller, R.H., Jacobs, C., Kayser, O., 2001, Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47 (1), 3-19.
134. Ma, Y., Zheng, Y., Zeng, X., Jiang, L., Chen, H., Liu, R. et al., 2011, Novel docetaxel-loaded nanoparticles based on PCL-Tween 80 copolymer for cancer treatment. *Int J Nanomedicine*, 6, 2679-2688.
135. Lee, E., Kim, H., Lee, I.H., Jon, S., 2009, In vivo antitumor effects of chitosan-conjugated docetaxel after oral administration. *J Control Release*, 140 (2), 79-85.
136. Gajbhiye, V., Jain, N.K., 2011, The treatment of Glioblastoma Xenografts by surfactant conjugated dendritic nanoconjugates. *Biomaterials*, 32 (26), 6213-6225.
137. Aas, A.T., Brun, A., Blennow, C., Stromblad, S., Salford, L.G., 1995, The RG2 rat glioma model. *J Neurooncol*, 23 (3), 175-183.

EKLER

EK-1: Poster Tebliđleri

CRS NORDIC CHAPTER MEETING



Icelandair Hotel Reykjavik Natura

June 3 – 5, 2012

Core-shell polycaprolactone nanoparticles for rat glioma model: formulation development and characterization

Cem Varan^a, Erem Bilensoy^{a,b}

^aDept. of Nanotechnology and Nanomedicine, Hacettepe University, 06800, Ankara, Turkey

^bDept. of Pharmaceutical Technology, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey

Polycaprolactone (PCL), an FDA approved polymer for therapeutic use, has been utilized for the development of drug delivery systems because of its nontoxic and biodegradable properties [1]. The aim of this study was to design nanocarriers for anticancer drugs using polycaprolactone and its derivatives with anionic or cationic properties. For this reason, main formulations which were developed are; PCL nanospheres (NS), MePEG-PCL NS, chitosan coated PCL NS and chitosan coated MePEG-PCL NS with the latter two formulations possessing positive surface charge.

All NS were prepared by the nanoprecipitation or double emulsion (W/O/W) techniques. For nanoprecipitation; polymer (1mg) dissolved in different solutions (acetone, ethanol, acetonitrile, DCM) (1ml) was added to ultrapure water (2ml)(containing or not; %0,5 w/v PF68 as surfactant; %0,025 w/v chitosan as cationic coated) under magnetic stirrer. Organic solvent was evaporated under vacuum. For double emulsion; polymer (30mg) was dissolved in 6ml DCM. Ultrapure water (1ml containing %1 w/v PF68) was added to this organic solution under magnetic stirrer. This emulsion was added to ultrapure water (20ml %1w/v PF68, %0,1w/v PVA; chitosan 0,05w/v for cationic NS) and W/O/W emulsion was obtained. Organic solvent was evaporated under vacuum.

Mean diameter of NS formulations were found to be between 65 and 490nm. Zeta potential values are between -17 to +48 mV. MePEG-PCL NS prepared according to nanoprecipitation method were the smallest nanoparticles for both anionic (65nm; PDI=0,1; ZetaPotential=-7mV) and cationic (89nm; PDI=0,3; ZetaPotential=+32mV) formulations. According to this study, coating with chitosan or using the double emulsion method increased particle size. Nevertheless, nanoparticles with favorable *in vitro* properties for tumor therapy and cellular interaction were obtained with different techniques.

References

1. Sinha VR, Bansal K, et al. Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview; International Journal of Pharmaceutics 2004; 278:1-23



HACETTEPE UNIVERSITY

NANOTR VIII

8th NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY CONGRESS

25-29 JUNE 2012

ANKARA-TURKEY

www.nanotr8.com



IANM
INTERNATIONAL ACADEMY OF NANOMEDICINE
3RD WORLD CONGRESS
NANOMED 2012

[Abstract:0689][PP-279][D-1 Targeting Delivery System]

Polycaprolactone nanoparticles for rat glioma model: influence of formulation parameters on the particle size and zeta potential

C. Varan¹, E. Bilensoy²

¹Department of Nanotechnology and Nanomedicine, Hacettepe University, 06800, Ankara, Turkey

²Department of Pharmaceutical Technology, Hacettepe University, 06100 Ankara, Turkey;

Department of Nanotechnology and Nanomedicine, Hacettepe University, 06800, Ankara, Turkey

Treatment of brain tumors is one of the most challenging problems. Conventional therapy (surgery, radiotherapy and chemotherapy) is inadequate to treatment of malignant glioma which is the most common brain tumor. The development of novel drug delivery systems is necessary and nanoparticles are promising in this field. Nanoparticle-based drug delivery systems are prepared with synthetic and natural polymers. Their surface properties can be modified for enhance to cellular penetration with cationic coat. Polycaprolactone, which is one of the synthetic polymers, is used for nanoparticle preparation. It is a biodegradable, biocompatible and non-toxic polymer approved by FDA for therapeutic use. Chitosan, which is produced commercially by deacetylation of chitin, is a linear polysaccharide. It contains cationic groups and has antitumor effect. The aim of this study was to formulate and characterize polycaprolactone nanospheres coated with chitosan and investigate the effect of formulation parameters on the physical properties of nanospheres. For this reason poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and its derivative (Poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) methyl ether) (Me-PEG PCL) were used as polymer, Pluronic F-68 as surfactant, chitosan as cationic coater and main formulations which were developed are; PCL nanospheres, MePEG-PCL nanospheres, chitosan-coated PCL nanospheres and chitosan-coated MePEG-PCL nanospheres with the latter two formulations possessing positive surface charge. Furthermore, effects of formulation parameters (polymer concentration, surfactant concentration and ratio of organic to aqueous phase) on particle size and zeta potential of formulations were examined.

Poly(ϵ -caprolactone) and Poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) methyl ether nanospheres were prepared according to the nanoprecipitation method. Briefly, polymer (PCL or MePEG PCL) (0,5; 1 or 2 mg) dissolved in acetone (1 ml) under moderate heating. This organic solution was added to ultrapure water (1; 2 or 4 ml), which was contained Pluronic F-68 (% 0, % 0,25, % 0,50, % 1 or % 2 w/v) as surfactant and chitosan (% 0, % 0,025 or % 0,05) as cationic coater, under magnetic stirrer. In this way, nanoparticles were spontaneously obtained. Organic solvent was evaporated under vacuum. Formulations were filtered through a 0.45 μ m pore sized filter to eliminate the polymer aggregates. Mean diameter were measured by dynamic light scattering and zeta potential were measured by zetasizer (Malvern Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK.).

Mean diameter of nanospheres were found to be between 65 nm and 255 nm. Zeta potential values are between - 28,7 mV to + 48 mV. Formulations which were prepared with MePEG PCL as polymer have significantly smaller particle size than PCL formulations. The smallest particle sizes were obtained with MePEG PCL formulations (% 0,50 w/v Pluronic F68; %0,1 w/v polymer concentration in organic solution and 1:2 v/v organic phase/aqueous phase ratio) for both anionic (65,74nm; PDI: 0,195 and zeta potential: - 7,82 mV) and cationic (additionally %0,025 w/v chitosan) (89,09 nm; PDI: 0,399 and zeta potential: + 32,5 mV) formulations. Increasing of surfactant concentration weren't notably effective on particle size but it reduced absolute value of zeta potential. Low polymer concentration (%0,05 w/v) and ration of aqueous (1:1) reduced particle size and absolute value of zeta potential. Even though coating with chitosan significantly increased zeta potential to positive values, particle size was effectively increased too. Our study proved that polycaprolactone and its derivatives are quite suitable for development of nanoparticles and their zeta potential can be changed with chitosan coating. They seem be a potential nanoparticle-based drug delivery system for glioma treatment with their favorable properties.

Keywords: Chitosan, Glioma, Poly(ϵ -caprolactone)

iPTS

2012
Tradition
since 1982



HACETTEPE UNIVERSITY
FACULTY OF PHARMACY
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY



16th

**International
Pharmaceutical
Technology
Symposium**

In memory of Prof. Dr. Nurşen Ünlü

September 10 - 12, 2012
The Marmara Hotel
Antalya - Turkey

Smart Technologies for Drug Delivery

Special Regulatory Session

- Drug delivery for cancer using smart technology
- Medical Devices in the area of drug delivery
- Ocular drug delivery using smart technology
- New approaches from the view of industry
- Fixed dose combination and co-packaged drug products
- Value added generics or super generics
- Molecular repurposing

Electronic Book

www.ipts-hacettepe.org

P 60

Docetaxel Loaded Core-Shell Polycaprolactone Nanoparticles: Formulation Development and Characterization

Cem Varan¹, Erem Bilensoy^{1,2}

¹Hacettepe University, Institute of Pure and Applied Sciences, Division of Nanotechnology and Nanomedicine, Ankara

²Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, Ankara

Introduction

Brain tumor is an abnormal growth of neoplastic cells within the brain or the central spinal canal. In the United States, it is estimated that 22,910 men and women will be diagnosed with and 13,700 men and women will die of primary brain tumor in 2012. Moreover, primary brain tumor is the most common solid tumor among childhood cancers (1). Treatment of brain tumors is one of the most challenging problems. Conventional therapy (surgery, radiotherapy and chemotherapy) is inadequate to treatment of malignant glioma which is the most common primary brain tumor. Cell culture studies showed that chemotherapy drugs (like docetaxel) are effective against glioma cell lines. However, the same effect didn't occur at in vivo studies due to limitation of blood-brain barrier and non-specificity of the potentially toxic drugs (2). The development of novel drug delivery systems is necessary and nanoparticles are promising in this field. Nanoparticle-based drug delivery systems are prepared with synthetic and natural polymers. Their surface properties can be modified for enhance to cellular penetration with cationic coat.

Polycaprolactone, which is one of the synthetic polymers, is used for nanoparticle preparation. It is a biodegradable, biocompatible and non-toxic polymer approved by FDA for therapeutic use (3). Chitosan, which is produced commercially by deacetylation of chitin, is a linear polysaccharide. It contains cationic groups and has antitumor effect. The aim of this study was to design docetaxel-loaded nanoparticles using Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and its derivatives with anionic or cationic properties. For this reason, main formulations which were developed are; PCL nanospheres (NS), Poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) methyl ether (MPEG-PCL) NS, chitosan coated PCL NS and chitosan coated MPEG-PCL NS with the latter two formulations possessing positive surface charge. Docetaxel was used as a model anticancer drug which is reported to be effective against malignant glioma (2).

Materials and Methods

Materials

Chitosan (Protasan® G 113, Mw < 200 kDa, deacetylation degree 75–90%) (CS) was purchased from FMC Biopolymers (Norway). Pluronic® F-68 (PF68), Acetone and Acetonitrile were supplied by Sigma Chemicals Co. (USA). Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (Mn: 80,000) and Poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) methyl ether (MPEG-PCL) (PEG Mn: 5,000; PCL Mn: 5,000) were purchased from Aldrich (St. Louis, MO, USA). Docetaxel (DOC) (purity 97%) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Ultrapure water obtained from Millipore Simplicity 185 Ultrapure Water System (Millipore, France)

249

Preparation of nanoparticles

Poly(ϵ -caprolactone) and Poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) methyl ether nanospheres were prepared according to the nanoprecipitation method. Briefly, polymer (PCL or MePEG PCL) was dissolved in acetone (0,1 w/v) under moderate heating. This organic solution was added to ultrapure water (1:2 v/v), containing chitosan (0,025 w/v) (for cationic nanoparticles) under magnetic stirrer. In this way, nanoparticles were spontaneously obtained. Organic solvent was evaporated under vacuum. Formulations were filtered through a 0.45 μ m pore sized filter to eliminate the polymer aggregates.

Characterization

Mean diameter were measured by dynamic light scattering and zeta potential were measured by zetasizer (Malvern Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK).

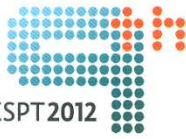
Validation

Chromatographic separation was achieved using a C18 column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase consisted of 30/70 ultrapure water/acetonitrile. The flow rate was set to

Book of Abstracts

.....

The 9th Central European Symposium
on Pharmaceutical Technology
with focus on Nanopharmaceuticals
and Nanomedicine



CESPT2012

September 20-22, 2012
Dubrovnik, Croatia

Docetaxel-loaded cationic core-shell polycaprolactone nanoparticles designed for rat glioma model

Cem Varan¹, Erem Bilensoy²

¹Nanotechnology and Nanomedicine Division, Institute of Science, Hacettepe University, Ankara, Turkey. ²Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Hacettepe University, Ankara, Turkey.

KEYWORDS

docetaxel; nanoparticle; glioma; polycaprolactone; mPEG-PCL

INTRODUCTION

Docetaxel is a chemotherapeutic agent [1]. Cell culture studies showed that docetaxel is effective against glioma cell lines [2]. However, the same effect didn't occur at *in vivo* studies due to limitation of blood-brain barrier [2]. Nanoparticles are promising to overcome this problem. Polycaprolactone is a biodegradable polymer approved by FDA [3]. The aim of this study was to formulate and characterize drug loaded anionic and cationic nanospheres. For this reason poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and methoxypolyethyleneglycol-block-polycaprolactone(mPEG-PCL) were used as polymers, docetaxel was used as drug and main formulations which were developed are; PCL nanospheres, mPEG-PCL nanospheres, chitosan-coated PCL nanospheres and chitosan-coated mPEG-PCL nanospheres. Nanospheres were prepared by the nanoprecipitation or double-emulsion. For nanoprecipitation; polymer dissolved in different solutions was added to ultrapure water (containing or not surfactant and chitosan as cationic coated). Solvent was evaporated under vacuum. For double-emulsion; polymer was dissolved in DCM. Ultrapure water (containing PF-68) was added to this organic solution under magnetic stirrer. This emulsion was added to ultrapure water (containing or not surfactant and chitosan as cationic coated). Solvent was evaporated. For drug-loaded nanospheres; docetaxel was added to organic phase at both methods. Docetaxel encapsulation efficiency and release profile was determined along with other *in vitro* properties.

RESULTS & DISCUSSION

It was found that mean diameter of nanospheres with different formulation parameters varied between 65 and 490 nm and zeta potential values were between -17 to +48 mV. mPEG-PCL nanospheres were prepared according to nanoprecipitation (acetone:water 1:2 V/V) (65 nm particle size; -7 mV zeta potential; PDI = 0.1) have the smallest particle size. Among cationic nanoparticles the smallest particle size was found that mPEG-PCL nanospheres were prepared according to same method (coating with chitosan) (89 nm particle size; +32 mV zeta potential; PDI = 0.3). This study showed that polymer type, solvent, preparation method and coating process with chitosan affected particle size and zeta potential significantly. In addition, coating with chitosan or double emulsion method significantly increased particle size. These technological parameters should be carefully optimized prior to *in vivo* studies. Our work proved that polycaprolactone and its derivatives nanoparticles seem to be a potential drug delivery system of docetaxel for glioma treatment with encapsulating and changing its surface properties. In conclusion polycaprolactone nanoparticles are good candidates for further evaluation in animal studies.

REFERENCES

- [1] Bissery, M.C. et al. (1991) Experimental antitumor activity of taxotere (RO 56976, NSC 628503): a taxol analogue. *Cancer Res* 51: 4845-4852.
- [2] Sampath, P. et al. (2007) Interstitial docetaxel (Taxotere[®]): a novel treatment for experimental malignant glioma. *J Neuroonco* 80: 9-17.
- [3] Sinha, V.R. et al. (2004) Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int J Pharm* 278: 1-23.

PP18



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Cem Varan

Doğum Yeri : İstanbul

Doğum Yılı : 1987

Medeni Hali : Bekâr

Elektronik Posta: varancem@hacettepe.edu.tr

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise 2001 – 2005 Maltepe Kadir Has Anadolu Lisesi

Lisans 2005 – 2010 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce