

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEMİK METASTAZLARININ TEDAVİSİNDE ETKİLİ
NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ, OPTİMİZASYONU VE İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Ecz. Serhat KOZLU

**Farmasötik Teknoloji Doktora Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2017

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KEMİK METASTAZLARININ TEDAVİSİNDE ETKİLİ
NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ, OPTİMİZASYONU VE İN VİTRO
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Ecz. Serhat KOZLU

**Farmasötik Teknoloji Doktora Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN**

**ANKARA
2017**

**Kemik Metastazlarının Tedavisinde Etkili Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi,
Optimizasyonu ve *In vitro* Değerlendirilmesi**

Dr. Ecz. Serhat KOZLU

Bu çalışma 17.05.2017 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Teknoloji Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ

Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL

Ankara Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. İmran VURAL

Hacettepe Üniversitesi

Üye:

Doç. Dr. Yeşim AKTAŞ

Erciyes Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Tarih

07 Haziran 2017

Diclehan

Prof. Dr. Diclehan ORHAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.** (Bu seçenikle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir)
- **Tezimin/Raporumun 09.06.2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.** (Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)
- **Tezimin/Raporumun.....tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**
- **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

09.06.2017

Dr. Ecz. Serhat KOZLU

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Yılmaz apan danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.



Dr. Ecz. Serhat KOZLU

TEŞEKKÜR

Akademik hayatımın tüm aşamalarında desteğiyle yanımda olan, engin deneyimi ve bilim insanı kişiliği ile bana kazandırdıkları için saygı değer hocam ve tez danışmanım Sayın **Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN**'a, doktora tezim süresince bilimsel çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için anabilim dalının her türlü olanağını sağlayan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı başkanı Sayın **Prof. Dr. Sema ÇALIŞ**'a, tez izleme komitesinde yer alarak bu çalışmanın şekillenmesinde çok değerli katkı ve yönlendirmeleri bulunan Sayın **Prof. Dr. Nilüfer YÜKSEL**'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca zamansız bir şekilde aramızdan ayrılan anabilim dalımız eski başkanı **Prof. Dr. Nurşen ÜNLÜ**'yü saygı ve şükranlarımla anıyorum.

Profesyonel çalışma hayatımda kazandırmış olduğu vizyonun ve bilimsel yönlendirmelerinin yanı sıra; doktora çalışmalarım sırasında sağlamış olduğu maddi ve manevi destek için, Gen İlaç ve Sağlık Ürünleri genel müdür yardımcısı **Uzm. Ecz. M. Ahmet ŞENCAN**'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasının başlangıç aşamalarında kimyasal temelinin yorumlanması konusundaki yardımları için **Prof. Dr. Olgun GÜVEN**'e ve hücre kültürü çalışmalarımda sağlamış olduğu destek için **Prof. Dr. İmran VURAL**'a teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ecz. Adem ŞAHİN'e ve **Dr. Ecz. Seçil TOKTAŞ**'a yol arkadaşlıkları ve doktora çalışmam sürecindeki destekleri için özel olarak teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım süresince aynı laboratuvarı paylaştığımız, emekleri ile yanımda olan **Dr. Ecz. Kıvılcım ÖZTÜRK**, **Dr. Ecz. Tuğba GÜLSÜN**, **Ecz. Sedenay AKBAŞ**, **Yük. Kim. Müh. Gözde ULTAV**'a ve **Dr. Ecz. Yağmur AKDAĞ** teşekkür ederim.

Gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmalarındaki bilimsel destekleri için Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez araştırma laboratuvarı çalışanlarına, in vivo hayvan deneyleri için **Prof. Dr.ERCÜMENT KARASULU** ve Ege Üniversitesi ARGEFAR Faz Öncesi Klinik Araştırmalar Laboratuvarı ekibine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren; anneme, babama ve kardeşime en derin teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Kozlu, S., Kemik Metastazlarının Tedavisinde Etkili Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi, Optimizasyonu ve *In Vitro* Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2017. İnsidansı yüksek olan (meme ve prostat kanseri) kanserlerde sıklıkla görülen kemik metastazları hastanın hayat kalitesini belirgin derecede düşürmekte ve hastanın kaybıyla sonuçlanan ciddi komplikasyonlara neden olmaktadır. Kemiğe metastaz yapmış meme kanseri tedavisinde yüksek dozda kullanılan kemoterapötiklerden olan doksorubisin, başta kardiyotoksisite olmak üzere ciddi yan etkileri nedeniyle kullanım kısıtlaması bulunan bir moleküldür. Son yıllarda yapılan ve kardiyak yan etkileri nedeniyle sonuçlandırılmayan klinik çalışmalar sayesinde, doksorubisin ile anti enflamatuar bir ilaç olan selekoksibin sinerjik etki gösterdiği bilinmektedir. Bu tez kapsamında bu iki etkin maddeye ait sinerjik etkiyi ve spesifik olarak bir dokuda ilaç konsantrasyonunun artmasını sağlayacak bir taşıyıcı sistemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla taşıyıcı sistem olarak PLGA nanopartikülleri, hedeflendirme ligandı olarak kemik dokusunda yer alan kalsiyum iyonları ile şelat yapma özelliği olan alendronat, etkin madde olarak ise doksorubisin ve selekoksib kullanılmıştır. Öncelikle insan meme kanseri hücrelerinde sinerjik etkinin gözlemlendiği optimum doz tespit edilmiş, tespit edilen optimum dozun deney tasarımı ile nanopartiküller içerisine yüklenmesi sağlanmıştır. Elde edilen optimize nanopartiküller partikül boyutu, elektron mikroskopisi görüntüleri, yüzey yükü, salım profili anlamında karakterize edilmişlerdir. Karakterize edilen nanopartiküllerin etkinlikleri ise *in vitro* ortamda kalsiyum bağlama kapasitesi, hidroksiapatit afinitesi, *in vitro* sitotoksisite ve hücre içine alım görüntülemeleri ile; *in vivo* olarak da Balb/c fareler üzerinde yapılan biyodağılım çalışmaları ile test edilmişlerdir. Tasarlanan nanopartiküler sistemin, etkin maddeyi istenilen doz oranında taşıyan ve kemik dokusuna afinitesi olan nanopartiküler taşıyıcı bir sistem olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: PLGA nanopartikül, Alendronat kaplama, Doksorubisin ve Selekoksib kombinasyonu, kemiğe ilaç hedeflendirme

ABSTRACT

Kozlu, S., Formulation Development, Optimisation and *In Vitro* Evaluation of Nanoparticles Effective to Bone Methastasis, Hacettepe University Institute of Health Sciences Department of Pharmaceutical Technology Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2017.

Bone metastasis that is often seen on patient with high incidence cancers (egg. breast and prostate) because important complication that lowers the quality of life and even ended with death. Doxorubicin is one of the chemotherapeutics using for the treatment of breast cancer metastasis on bone has some limitation due to its adverse effects primarily cardiotoxicity. In recent years it is known that doxorubicin and celecoxib have synergistic effect. There are some clinical trials that had to be stopped due to adverse effect to other organs. Within this study it is aimed to develop a nanocarrier system that leads the synergic effect of these molecules and promote increasing of drug concentration in the specified tissue. Thus, PLGA nanoparticles has chosen as carrier system, alendronate as targeting ligand due to its chelating properties with calcium ions in bone tissue, doxorubicin and celecoxib have chosen as the active pharmaceutical ingredients. Metastatic breast cancer has chosen as the model disease. At first step, the optimum dose that shows synergic effect is investigated with human breast cancer cell line. The determined optimum synergic dose is incorporated into nanoparticles by the help of statistical experimental design tools. Optimized nanoparticles were characterized with particle size, electron microscopy images, surface charge and *in vitro* release characteristics. The characterized particles' affinity to bone tissue has been investigated with *in vitro* calcium binding capacity assay, hydroxyapatite binding affinity assay and *in vitro* cell cytotoxicity and uptake studies. Moreover *in vivo* biodistribution study has been performed with Balb/c mice.

It is founded that; the developed nanoparticular system is promising with ability to carry the drugs at desired dose ratio and with affinity to bone tissue.

Key Words: PLGA Nanoparticles, Alendronate coating, Doxorubicin and Celecoxib combination, drug targeting to bone

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hedef Hastalık-Kanser	3
2.1.1. Meme Kanseri	5
2.1.2. Kemik Metastazları	6
2.1.3. Kanser Tedavisinde Mevcut Yaklaşımlar	8
2.1.4. Hedeflendirilmiş Tedavi	10
2.2. Doksorubisin	12
2.2.1. Selekoksisib-Doksorubisin Kombinasyon Denemeleri	14
2.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler	16
2.3.1. İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Kanser Tedavisindeki Yeri	19
2.3.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	21
2.3.3. Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Polimerler	25
2.3.4. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Polimeri	27
2.4. Nanopartikül Üretim Yöntemleri	30
2.4.1. Hedeflendirme	35
2.5. Formülasyon Optimizasyonu	37
2.5.1. Plackett-Burmann Deney Tasarımı	37
2.5.2. Box Behnken Deney Tasarımı	37
2.6. Kemik - Genel Bilgiler	39
2.6.1. Kemiğin Yapısı ve Görevi	39
2.6.2. Kemiğe İlaç Hedeflendirme Stratejileri	40

2.7.	Bisfosfonatlar	41
2.7.1.	Alendronat	42
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	44
3.1.	Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler	44
3.2.	Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar	46
3.3.	Miktar Tayininde Kullanılan Analitik Yöntem	48
3.3.1.	Kullanılan Ekipman ve Kromatografik Sistem Şartları	48
3.3.2.	Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyon Parametreleri	48
3.4.	Nanopartiküllerin Hazırlanması	51
3.4.1.	Başlangıç Formülasyonu Deneme Çalışmaları	51
3.4.2.	Etkin Madde Yüklü Olmayan Nanopartiküllerin Hazırlanması	51
3.4.3.	Etkin Madde Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması	51
3.4.4.	Alendronat Kaplı Nanopartiküllerin Hazırlanması	52
3.5.	Formülasyon Optimizasyonu	54
3.5.1.	Kritik Formülasyon Parametrelerinin Belirlenmesi	54
3.5.2.	Formülasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	55
3.6.	Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	58
3.6.1.	Partikül Büyüklüğü Ölçümü	58
3.6.2.	Zeta Potansiyeli Ölçümü	60
3.6.3.	Yükleme Kapasitesi Ölçümü	60
3.6.4.	<i>In vitro</i> Etkin Madde Salım Çalışmaları	60
3.6.5.	³¹ P-NMR Spektroskopik Analizi	61
3.6.6.	Geçimlilik Çalışmaları	61
3.7.	<i>In vitro</i> Afinite Testleri	62
3.7.1.	Kalsiyum Bağlanma Testi	62
3.7.2.	Hidroksiapatit Afinite Testi	62
3.8.	<i>In vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	63
3.8.1.	Etkin Madde Kombinasyon Sitotoksikite Çalışması	63
3.8.2.	Nanopartiküllerin Sitotoksik Aktivitesini Belirlenmesi	63
3.8.3.	Hücre İçine Alım Çalışmaları	64
3.9.	<i>In vivo</i> Biyodağılım Çalışması	65
3.9.1.	Canlı Hayvanda Görüntüleme Çalışması	66
3.9.2.	<i>Ex vivo</i> Organ Dağılım Çalışması	66
4.	BULGULAR	67
4.1.	Analitik Metod Validasyonu	67

4.2	Etkin Madde Kombinasyonu Sitotoksosite Çalışması	70
4.3.	PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Kritik Formülasyon Parametrelerinin Belirlenmesi	72
4.4.	Formülasyon Parametrelerinin Optimizasyonu	79
4.5.	Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	86
4.5.1.	FTIR Analizleri	86
4.5.2	³¹ P-NMR Spektroskopik Analizi	88
4.5.3	Partikül Büyüklüğü Dağılımı	88
4.5.4.	Atomik Kuvvet Mikroskopisi ve TEM	90
4.5.5.	Yüzey Yükü	91
4.5.6.	<i>In vitro</i> İlaç Salımı	92
4.6.	Sitotoksosite ve <i>In vitro</i> Hücre İçine Alım Çalışmaları	96
4.7.	<i>In Vivo</i> Biyodağılım Çalışması	98
4.7.1.	<i>Ex Vivo</i> Biyodağılım Çalışması	99
5.	TARTIŞMA	100
5.1.	Optimum Doz Kombinasyonu Tespit Çalışmaları	100
5.2.	PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması	102
5.3.	Kritik Parametrelerin Belirlenmesi ve Formülasyon Optimizasyonu	103
5.4.	Partikül Büyüklüğü Dağılımı	104
5.5.	Yüzey Yükü	105
5.6.	<i>In vitro</i> İlaç Salımı	106
5.7.	<i>In vitro</i> Bağlanma Özelliklerinin Araştırılması	107
5.8.	Hücre içine Alım ve Sitotoksitenin Değerlendirmeleri	109
5.9.	<i>In vivo</i> biyodağılım çalışmaları	110
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	112
7.	KAYNAKLAR	114
8.	EKLER	
	EK-1: Hayvan deneyleri yerel etik kurul onayı	
	EK-2: Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	
9.	ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

µg	Mikrogram
AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
ALD	Alendronat
Aln(-)NP	Alendronat kaplı olmayan nanopartiküller
Aln(+)NP	Alendronat kaplı nanopartikül
BBD	Box-Behnken Design
BP	Bisfosfonat
BS3	Bis(sülfosüksinimidil)suberat
COX	Siklooksijenaz
CXB	Selekoksib
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOX	Doksorubisin
DSC	Diferansiyel tarama kalorimetresi
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EPR	Permeasyon ve retansiyon etkisi
ER	Östrojen reseptörü
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	Fourier transform infrared spektroskopisi
HA	Hidroksiapatit
HCl	Hidroklorik asit
HER-2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
ICG	İndosiyanin yeşili
ICH	Uluslararası harmonizasyon komitesi <i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IFN	İnterferon
LOD	Deteksiyon limiti

LOQ	Kantitasyon limiti
MA	Molekül ağırlığı
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 (İnsan meme kanser hücresi)
MDA-MB-231	MD Anderson Cell Lines Project -231 (İnsan meme kanser hücresi)
mL	Mililitre
N	Normal
nm	Nanometre
NMR	Nükleer magnetik rezonans
NP	Nanopartikül
NSAİ	Nonsteroidal antienflamatuvar ilaç
PACA	Polialkilsiyano akrilat
PBCA	Polibütülsiyano akrilat
PBD	Plackett Burmann Tasarımı
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
Pca	Prostat kanseri
PCS	Foton korelasyon spektroskopisi
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol
PGA	Poli(glikolik) asit
PGI₂	Prostaglandin I ₂
PgR	Progesteron reseptörü
PLA	Polilaktik asit
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PTFE	Politetrafloroetilen
PVA	Polivinil alkol
RES	Retikülo-endotelyal sistem
rpm	Dakika başına devir
RSD	Relatif standart sapma
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SS	Standart sapma

TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
Tg	Camsı geçiş sıcaklığı
THF	Tetrahidrofur
UV	Morötesi
VK	Varyasyon katsayısı
WST-1	Kararlı (dayanıklı) tetrazolium tuzu

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları.	4
2.2. Primer dokudan ayrılıp kemiğe metastaz yapan hücrelerin izlediği yolak.	7
2.3. Kemik metastazlı hastada tedavi yaklaşım şeması.	9
2.4. Doksorubisin molekülünün açık kimyasal formülü.	12
2.5. Doksorubisinin ortamın pH değerine göre partiyon katsayısı ve iyonizasyon derecesindeki değişiklikleri.	13
2.6. Selekoksib molekülünün açık kimyasal formülü.	14
2.7. PLGA degradasyon yolağının gösterimi.	27
2.8. Emülsifikasyon difüzyon yönteminde proses adımları ve sistem değişkenleri.	31
2.9. Nanopresipitasyon yönteminde proses basamakları ve sistem değişkenleri.	33
2.10. Bisfosfonatların ilaç hedeflendirme stratejilerinde kullanımları.	42
3.1. DLS dinamik ışık saçılımı ile partikül boyutu ölçüm çalışma ilkesinin şematik gösterimi.	58
3.2. AFM nin çalışma ilkesinin şematik gösterimi.	59
3.3. WST 1 hücre canlılık test prosedürü ve esası.	65
3.4. IVIS canlı hayvan görüntüleme cihazı ve hayvan anestezi aparatı.	66
3.5. Hayvanların <i>in vivo</i> görüntülenme esnasında konumlandırılmaları.	67
4.1. Doksorubisine ait HPLC kalibrasyon doğrusu.	69
4.2. Selekoksibe ait HPLC kalibrasyon doğrusu.	69
4.3. Salım ortamına (a), PLGA 502H polimer çözeltisine (b) ve etkin maddelere ait (c) kromatogramlar	70
4.4. Yalnızca selekoksib ya da doksorubisin çözeltisi uygulanmış olan MCF-7 hücrelerinde % canlılık oranı değerleri.	71
4.5. Farklı konsantrasyonlarda selekoksib ve doksorubisin çözelti kombinasyonları uygulanmış olan MCF-7 hücrelerinde % canlılık oranı değerleri.	72
4.6. Doksorubisin yükleme kapasitesi üzerine etkili olan parametrelerin standardize pareto grafiği.	74
4.7. Doksorubisin yükleme kapasitesi üzerine sekiz farklı faktörün etki şekillerini gösteren temel etki grafiği.	75

4.8.	Selekoksisib yükleme kapasitesi üzerine etkili olan parametrelerin standardize pareto grafiği.	75
4.9.	Selekoksisib yükleme kapasitesi üzerine sekiz farklı faktörün etki Şekillerini gösteren temel etki grafiği.	76
4.10.	Ortalama partikül boyutu üzerine etkili olan parametrelerin standardize pareto grafiği	77
4.11.	Ortalama partikül boyutu üzerine sekiz farklı faktörün etki Şekillerini gösteren, temel etki grafiği.	78
4.12.	PDI ve zeta potansiyeli üzerine faktörlerin istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını gösteren pareto grafikleri.	79
4.13.	Formülasyonda yer alan PLGA konsantrasyonu ve DOX miktarının, nanopartiküllerin doksorubisin yükleme kapasitesi üzerine etkisini gösteren kontur grafiği.	83
4.14.	Formülasyonda yer alan PLGA konsantrasyonu ve CXB miktarının, nanopartiküllerin selekoksisib yükleme kapasitesi üzerine etkisini gösteren kontur grafiği.	84
4.15.	Formülasyonda yer alan PLGA konsantrasyonun, nanopartiküllerin ortalama partikül boyutuna etki eden tek parametre olduğunu gösteren kontur grafiği.	85
4.16.	FTIR spektrumları.	88
4.17.	PLGA nanopartikülüne ve ALN(+)-PLGA Nanopartiklne ait ³¹ P-NMR spekturmları.	89
4.18.	PLGA NP formülasyonuna ait DLS ile elde edilen partikül boyutu dağılım grafiği.	90
4.19.	PLGA nanopartiküllere ait atomik kuvvet mikroskobu lm.	91
4.20.	PLGA Nanopartiküllere ait TEM görüntüleri.	92
4.21.	PLGA - ALE NP formülasyonuna ait salım grafiği (pH 4,5).	93
4.22.	PLGA - ALE NP formülasyonuna ait salım grafiği PBS (pH 7,4).	94
4.23.	Nanopartikül formülasyonlarına ait kalsiyum geri kazanım yüzdeleri	95
4.24.	Hidroksiapatit kristallerinin a) alendronat kaplı b) alendronat kaplı olmayan nanopartiküller ile inkübasyonu sonrasında floresan mikroskobunda alınmış görüntüleri	96
4.25.	Nanopartikül süspansiyonlarının ve etkin madde zeltilerinin MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkisi	97
4.26.	24 saatlik inkübasyon sonrasında MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri	98
4.27.	Balb/c hayvanlarda 6 saat sonrası nanopartikül görüntüleri	99
4.28.	Balb/c hayvanlarda 6 saat sonrası çıkartılmış ve yıkanmış organlara ait floresan görüntüler	100

5.1.	Nanopresipitasyon tekniği ile nanopartiküllerin oluşum mekanizmasının şematik gösterimi	104
5.2.	Nanopartikül üretiminde etkili olabileceği düşünölen proses ve formölasyon parametreleri	105
5.3.	Bisfosfonatlar ile gerçekleştirilen hedeflendirme yaklaşımları	108
5.4.	Geliştirilen kemiğe ilaç taşıyıcı sistemin şematik gösterimi.	109

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Alendronat Kaplama Çalışmalarında Kullanılan Nanopartikül ve Aln oranları	52
3.2. Plackett-Burman ve Box-Behnken Tasarımlarında Kullanılan Bağımsız Değişkenler	55
3.3. Plackett-Burman Tasarımı Deney Matrisi ile oluşturulan 12 formülasyon	56
3.4. Box-Behnken Tasarımı Deney Matrisi ile oluşturulan 15 formülasyon	58
3.5. Plackett-Burman ve Box-Behnken Deney Tasarımlarından Elde Edilen Yanıt Değerler	58
4.1. HPLC Analiz Metoduna ait sistem uygunluk parametreleri.	68
4.2. Etkin maddelere ait analitik metod linearite parametreleri	68
4.3. Selekoksib ve Doksorubisin'in analitik yöntemine ait doğruluk ve kesinlik parametreleri	70
4.4. Plackett-Burman Tasarımı Uygulanan Formülasyonlarda Bağımlı Değişkenlere Ait Sonuçlar	73
4.5. Box-Behnken Tasarımı Uygulanan Formülasyonlarda Bağımlı Değişkenlere Ait Sonuçlar	81
4.6. Faktörlere ait hesaplanan korelasyon katsayıları ve <i>p</i> değerleri tablosu	82
4.7. Optimizasyon sonrası elde edilen formülasyonda beklenen ve ölçülen yanıt değişkenler	86
4.8 Alendronat ile kaplama öncesi ve sonrası partikül boyutu ve yüzey yükü değişimi	90

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en yüksek ölüm nedeni arasında yer almaktadır. Araştırmacılar açısından uzunca bir süredir çok yönlü tedavi yaklaşımları incelenmiş olmakla birlikte hala güncelliğini koruyan bir araştırma konusudur. Primer tümörlerin yanı sıra tümörlü hücrelerin başka dokulara taşınarak yeni odaklar oluşturması, hastalık tedavisini daha karmaşık yaklaşımlara yönlendirmektedir. Bu yeni odaklardan bir tanesi de kanser hücrelerinin kemiğe sıçraması ve burada çoğalması yoluyla oluşan kemik metastazlarıdır.

İnsidansı yüksek kanser vakalarında (meme ve prostat kanseri gibi) sıklıkla görülen kemik metastazları, hastanın kaybıyla sonuçlanan ciddi komplikasyonlara neden olmaktadır. Kemik metastazları kemikten köken almayıp primer bir tümörün kemiğe yayılması ile oluşmaktadır.

Hemen hemen her kanser türü kemik metastazı yapsa da meme ve prostat kanserleri kemiğe en sık metastaz yapan kanser türlerindedir. Meme kanserinden ölen hastaların radyolojik bulguları incelendiğinde hastaların yaklaşık % 70'inde iskelet metastazları görülmüştür. İstatistiksel çalışmalara göre meme kanserinde hastalığın ilerleyen dönemlerinde kemik metastazı gerçekleşme oranı %85'lerdedir. Meme kanserinin en sık görülen kanser türlerinden olması ve gelişen kemik metastazlarının genellikle tedavi edilemez olması ciddi klinik belirtilerle hasta kaybına ve tedavi maliyetinde önemli bir artışa neden olmaktadır. Bu çalışma kapsamında model hastalık olarak meme kanseri ve kemiğe metastazları incelenmiştir.

Kemik metastazlarının tedavisinde kullanılabilecek ilaçların, diğer dokularda yan etki oluşturmadan kemik dokusuna istenilen miktarda ulaştırılamaması bu metastazların tedavisini sınırlamaktadır. Son zamanlarda nanopartiküllerin pasif ve aktif hedeflendirilebilme özellikleri kullanılarak kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir. Nanoteknoloji kullanılarak geliştirilen ilaçlar piyasada yer almaya başlamasına rağmen; kemik metastazlarının teşhis ve tedavisinde yapılan çalışmalar henüz başlangıç aşamasındadır.

Doksorubisin, çoklu metastatik odaklar nedeniyle cerrahi tedavinin genellikle mümkün olmadığı meme kaynaklı metastatik kemik tümörlerinde, uzun yıllardır kullanılan kemoterapötik ajanlardan bir tanesidir. Uzun yıllardır kanser tedavisinde

kullanılan bir moleküldür. Nanoteknoloji ile formüle edilecek kadar değerli bir molekül olup, piyasada farklı nano taşıyıcı sistemler ile kullanıma sunulmuştur. Lipozomal formları ile bu durum kısmen aşılmış olsa bile, doksorubisin göstermiş olduğu kardiyotoksisite nedeniyle kullanımını kısıtlanan bir ilaç konumundadır. Bu denli çok araştırma yapılmış olması sebebiyle tez kapsamında etkin madde olarak kullanılmıştır.

Diğer taraftan pek çok klinik öncesi ve klinik çalışmada, selekoksib gibi spesifik siklooksijenaz 2 (COX-2) inhibitörlerinin, doksorubisinin de içlerinde bulunduğu kemoterapötik ilaçların etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir.

Doksorubisinin daha düşük dozda uygulanabilmesi amacıyla selekoksib ile kombine edilmesi ve tümör hücrelerine eş zamanlı etki etmesinin sağlanmasıyla, kullanılan sitotoksik ilaç miktarını en aza indirerek yan etkileri azaltmak, tek bir enjeksiyonla sinerjik etki gösteren iki molekülü aynı anda uygulayabilmek ve kanser hücrelerinde gelişen direnci aşabilmenin mümkün olması öngörülmüştür.

Bu hedefe ulaşabilmek için kalite tasarımı ile deney planlaması gerçekleştirilmiş, öncelikle formülasyon parametreleri irdelenmiş ve etki düzeylerine göre sınıflara ayrılmışlardır. Etkili olduğu tespit edilen parametreler ile ileri düzey araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak istenilen doz oranına ve partikül boyutuna sahip nanopartiküllerin elde edilebilmesini sağlayan bir modelleme yapılmıştır.

Elde edilen partiküllerin fizikokimyasal yönden *in vitro* karakterizasyonu ve hücreler ile *in vitro* düzeyde etkileşimlerinin incelenmesi sonrasında hedeflendirme etkinlikleri hem *in vitro* ortamda hem de canlı hayvanlar üzerinde test edilmiştir. İlerleyen bölümlerde detayları ile bahsedilen çalışma sonucunda gelecekte ileri düzey araştırmalara temel oluşturulabilecek, kontrol edilebilir, etkin ve umut vadeden taşıyıcı polimerik bir sistem geliştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

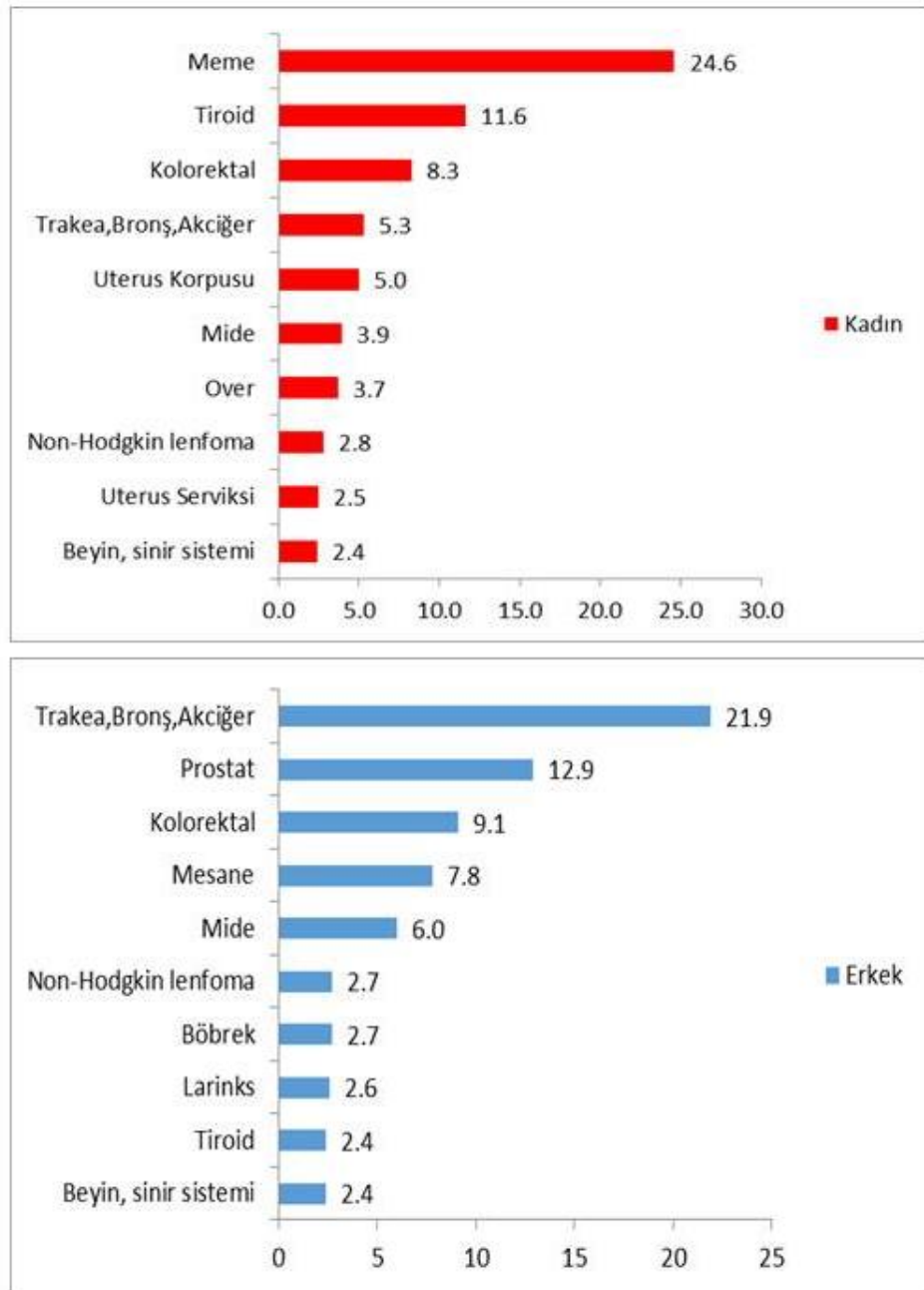
2.1. Hedef Hastalık - Kanser

Çok hücreli organizmalarda hücreler kendi hücre içi çalışma sistemlerini düzenlemelerinin yanısıra aynı zamanda, diğer hücreler ile sürekli bir iletişim içinde olmak ve bu hücrelerden alınan sinyalleri koordine etmek suretiyle tüm organizmanın da düzenli çalışmasına olanak sağlarlar. Mutasyon gibi bazı moleküler bozukluklar, hücreler arasındaki bu düzenli koordinasyonun bozulmasına sebep olur. Normal bir organizmadaki hücreler her gün bu mutasyonlara maruz kalmakta ve eğer bu mutasyon hücreye önemli bir yarar sağlamayacaksa hücrelere özgü özel koruma sistemleri tarafından elimine edilmektedir (1).

Kanser; koruma mekanizmalarını aşan mutasyonlar ile hücrenin kontrolsüzce büyümesi ve çoğalması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, hücre yığınının meydana gelen ve tümör denilen bir yapının oluşmasına neden olur. Bazı tümörler kansere neden olmaz; çünkü bunlar vücudun diğer taraflarına yayılmadıkları gibi, buldukları bölgeden kolayca uzaklaştırılabilir ve genellikle de nüksetmezler. Bu tümörler “benign tümör” olarak adlandırılan tümörlerdir. Bununla birlikte; “malign tümör” olarak adlandırılan; yakın dokulara invazyon yapabilen ve odak noktadan ayrılıp vücudun diğer yerlerine yayılan (metastaz yapabilen) tümörler de kanseröz tümörlerdir (2).

Hücre türüne ve kaynaklandığı organa göre farklı şekilde isimlendirilen birçok kanser tipi bulunmaktadır. Örneğin; epitel dokudan kaynaklanan kanserler karsinoma olarak adlandırılırken, immün sistemden kaynaklanan kanserler de lenfoma veya miyeloma olarak adlandırılmaktadır (1).

Türkiye Halk Sağlığı kurumu tarafından 2017 yılında yayınlanan kanser istatistiklerine göre (2014 yılı) erkeklerde en sık gözlenen ve yaşa göre standardize hızı en yüksek olan kanser türleri trakea, bronş, akciğer ve prostat kanseriyken; kadınlarda ise en yüksek oranda gözlenen türler meme ve tiroid kanserleridir (Şekil 2.1.) (3).



Şekil 2.1. Erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (3).

Kanser, tek bir hastalık olarak düşünülmekten ziyade, kontrolsüzce çoğalmış hücrelerin neden olduğu hastalıklardan oluşan kompleks bir durum olarak düşünülmektedir. Günümüzde; tüm dünyadaki hastalıklardan kaynaklı ölümlerde kanser ikinci sırada yer almaktadır ve tedavisi için daha karmaşık tedavi yaklaşımları geliştirilmektedir (4).

2.1.1. Meme Kanseri

Her yıl yaklaşık 1,4 milyon kadın meme kanserinden etkilenmektedir ve bu durum meme kanserinin, ülkemizde olduğu gibi dünyada da kadın popülasyonunda sık görülen hastalıkların başında yer almasına neden olmaktadır (5). Hastalığın teşhisi, sağlık hizmetleri uygulamasının çok önemli bir basamağını oluşturmaktadır ve erken teşhis çok önemlidir. Hastaların çok büyük bir kısmına cerrahi işlem uygulanmakta ve birçoğuna da sonrasında sitotoksik kemoterapi ve hormon tedavisi başlanmaktadır (5).

Klinikte çok farklı tiplerde meme kanseri görülür ve her birinde farklı tedavi yolları izlenmektedir. Östrojen reseptörü (ER), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER-2), progesteron reseptörü (PgR) vb. farklı reseptörlerin tümör hücrelerindeki varlıkları hastalığın tedavisinde izlenecek yol hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. ER veya PgR pozitif tümörlü hastalarda genellikle anti östrojenik tedavi uygulanırken; HER-2 reseptörünün baskın olduğu tümörleri taşıyan hastalarda da antiHER-2 tedavisi uygulanmaktadır. Her üç reseptörü de taşımayan tümörlü hastalara (üçlü negatif hastalar) ise, sadece kemoterapi uygulaması yapılabilmektedir (5).

Meme kanseri teşhisinin gün geçtikçe artmış olmasına rağmen, bu hastalıktan dolayı meydana gelen ölüm oranında da azalma sağlanmıştır. Bu durum büyük olasılıkla kadınlardaki farkındalığın artmış olması, toplum temelli taramaların yaygınlaşması ve tedavi olanaklarının gelişmiş olmasından kaynaklanmaktadır (6).

Araştırma merkezlerinde ve üniversitelerde ise meme kanseri araştırmaları oldukça yoğunlaşmış olup çoğunlukla birkaç hücre hattı ile sürdürülmektedir. Bunlardan sitotoksikite çalışmalarında en sık kullanılanları MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarıdır. Literatürde bu hücre hatları ile yapılan sitotoksikite çalışmalarına birçok örnek gösterilmiştir (7, 8).

2.1.2. Kemik Metastazları

Primer tümörün bulunmuş olduğu dokudan ayrılan kanser hücrelerinin, vücudun farklı yerlerine taşınması durumu metastaz; bu hücrelerin kemik dokusuna taşınarak yerleşmesi durumu da kemik metastazı olarak isimlendirilmektedir. Dolayısıyla kemik metastazları, kemikten köken almayan tümör hücresinin kemiğe sıçraması ile oluşmaktadır (9). Bir kanser hücresinin primer odaktan ayrılıp kemikte metastatik bir tümör oluşturuncaya kadar izlediği yol Şekil 2.2.'de şematik olarak gösterilmiştir.

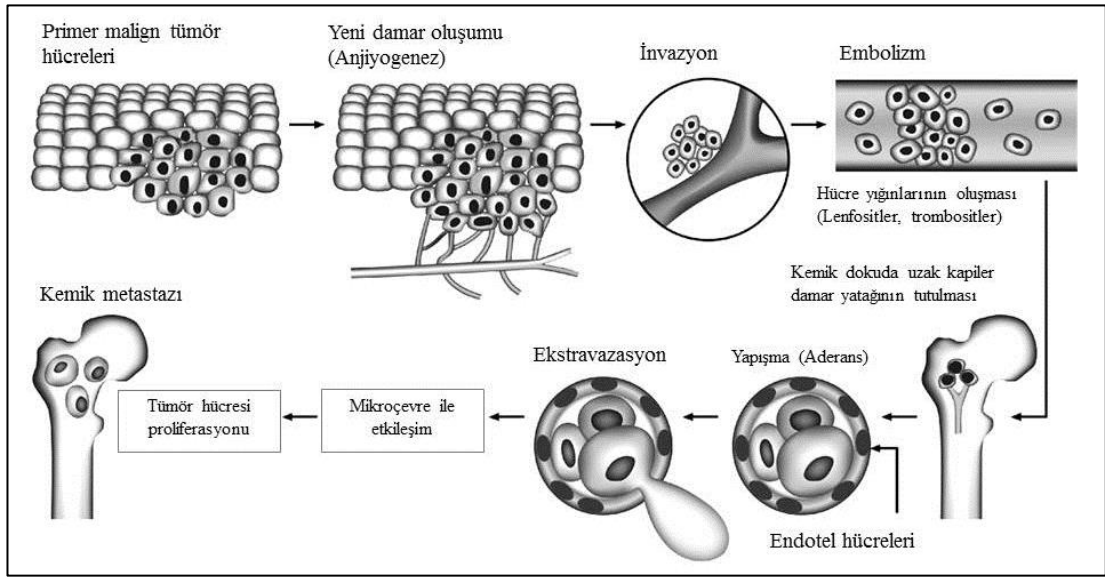
Bunun yanında, kemikten köken alan primer kemik tümörleri de mevcut olmakla birlikte bu tümörler; kemik metastazları ile aynı şeyi ifade etmemektedir ve nadir görülen kanser türleri arasında yer almaktadır. Kemik dokusu, kapiler ağının geniş ve kan akımının yavaş olmasından dolayı tümör hücrelerinin büyümesi için elverişli bir ortam yaratmaktadır. Kemik metastazları öncelikle ve sıklıkla lumber vertebralarda görülürken, daha sonra sırasıyla torasik ve servikal vertebralarda da görülmektedir (10).

İskelet metastazlı hastaların temel şikayeti; ani, hızlı bir şekilde artan ve dinlenme ile geçmeyen ağrıdır. Hastaları uykudan uyandıracak kadar şiddetli gece ağrıları, kemik metastazına spesifik olmamakla birlikte; metastatik kemik hastalıklarının önemli belirtileri arasında yer almaktadır. Öte yandan; bazı lezyonlar (%25) ağrısız bir ilerleme gösterebilir ve ancak kemik taraması veya radyografi sonrasında klinik olarak teşhis edilebilir (9, 11).

Kemik metastazının görülme sıklığı ve kemik kanserlerinin prognozu, çeşitli kanser türlerine göre farklılık göstermektedir. Örneğin; kemiğe metastaz, kadınlarda en çok meme kanserlerinde görülürken, erkeklerde ise akciğer ve prostat kanserlerinde görülmektedir. Meme ve prostat kanserlerinde görülen her üç metastazdan ikisi kemiklere gerçekleşirken; akciğer, tiroid ve böbrek kanserlerinde ise her üç metastazdan biri kemiklere olmaktadır (12).

Kemik metastazları birçok kanserde hastalığın genel prognozu açısından çok önemli bir faktör iken, erken tespit edilmesi ve uygun tedavinin yapılması durumunda, hastanın sağ kalımını ve yaşam kalitesini olumlu yönde etkilemektedir. (12).

Günümüzde kanser tedavisini zorlaştıran çok büyük bir sorun olan metastaz, kanser hücrelerinin oluştukları primer odaktan ayrılarak vücudun başka bölgelerine sıçramasını ve o bölgede yayılmasını ifade eder. Kanser teşhisi konulan hastaların çoğunda metastaz çoktan gerçekleşmeye başlamıştır. Örneğin, akciğer kanseri teşhisi konulan hastaların %80'inde metastaz görülmektedir. Genel itibariyle; tüm kanser çeşitlerinde metastatik kanser teşhisi konulan hastaların sadece beşte biri, 5 yıldan daha fazla yaşayabilmektedir (13).



Şekil 2.2. Primer dokudan ayrılıp kemiğe metastaz yapan hücrelerin izlediği yolak (13).

Her ne kadar kanser tedavisi günümüzde gelişme göstermiş olsa da, hala pek çok ilaç terapötik dozda metastatik bölgelere ulaşamamakta ve dolayısıyla, kullanılan bu ilaçların kanser tedavisindeki etkinlikleri konusunda kısıtlamalar bulunmaktadır (14).

Büyük ve iyi damarlanma göstermiş tümörlere karşı etkin tedavi yöntemleri olmakla birlikte; aynı tedavi yöntemleri, küçük ve geniş dağılım göstermiş kötü huylu tümörlerde yetersiz kalabilmektedir. Dolayısıyla, kanser tedavisinin daha efektif olabilmesi için yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda; her geçen gün ilerleyen ve kullanım alanı genişleyen nanoteknoloji, etkin maddelerin belirli bir bölgeye yönlendirilmesi ve hedeflendirilmesi konularında önemli rol oynamakta ve böylece metastatik kanserlerde etkili bir tedavi olanağı

sağlayabilmektedir (15-17).

Nanoteknolojinin ilaç teknolojisindeki uygulamalarında farklı sorunlar ortaya çıkmış olsa da, bu sorunlar klinikteki diğer ilaçların karşılaştığı sorunlarla benzerdir. Bununla birlikte, nanoteknolojinin uygulandığı bazı ilaç etkin maddeleri, diğerlerine göre oldukça üstün özelliklere kavuşmuştur. Örneğin; lipozom enkapsülasyonu yapılmış doksorubisin, ovaryum kanseri ve kaposi sarkoma hastalarında sıklıkla kullanılmaktadır ve enkapsüle edilmemiş doksorubisinin yol açtığı kardiyotoksisiteye karşı da üstünlük göstermektedir (18).

Günümüzde klinikte kullanılan nanoterapötik sayısı her geçen gün artmaktadır ve bu nanoterapötiklerin metastatik bölgelere hedeflenmesi, bu bölgelerin daha erken ve etkili bir şekilde teşhis edilmesini sağlaması gibi özellikleri de gün geçtikçe daha çok gelişmektedir (19).

Örneğin metastatik meme kanserinde kullanılan paklitaksel içeren protein nanopartiküllerinin, tümör hücrelerine etkilerinin arttığı gözlenmiştir (20). Demir eksikliğine bağlı anemide kullanılan demir oksit nanopartiküllerinin de, erken faz lenf metastazı gösteren prostat ve testis kanseri hastalarında etkili olduğu gösterilmiştir (21, 22).

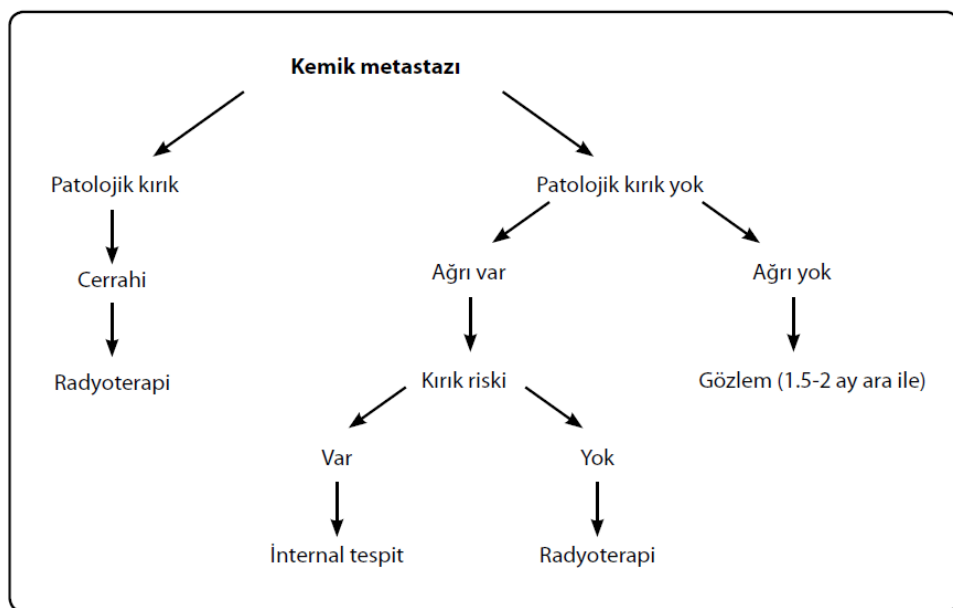
2.1.3. Kanser Tedavisinde Mevcut Yaklaşımlar

Kanser hücrelerini organizmadan uzaklaştırmak ve bu hücrelerin yayılmalarını mümkün olduğunca engellemek için çok çeşitli tedavi yolları bulunmaktadır. Uygulanacak tedavide, tümörün cinsi ve lokasyonu, kanserin evresi ve hastanın genel sağlık durumu önemli rol oynamaktadır. Günümüzde kanser tedavisi temelde 5 başlık altında toplanmıştır: cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, immunoterapi ve hedeflendirilmiş terapi (2).

Cerrahi

Tümör, invazyon yapmayıp belirli bir bölgede sınırlı kalarak vücudun diğer taraflarına yayılmamışsa cerrahi müdahale ile uzaklaştırılabilir. Bu durumda tümörün tipi ve kanserin hangi fazda olduğu çok önemlidir. Cerrahi, belirli sabit bir tümör kitlesinin olduğu hematolojik olmayan kanserlere uygulanır ve böylece tümör kitlesiyle birlikte çevre dokular da alınarak bölge temizlenmiş olur. Son yıllarda

cerrahi operasyonlar için robotik cerrahinin kullanımı da oldukça gelişmiştir. Çıkarılan tümör kitlesi patolojik olarak analiz edildikten sonra hastanın tedavisi için kemoterapi veya radyoterapi uygulamasına gerek olup olmadığına karar verilir. Genellikle cerrahi diğer uygulamalardan önce uygulanır fakat bazı durumlarda tümör kitlesinin cerrahiden önce küçültülmesi gerekebilmektedir. Bu durumda; cerrahiden önce diğer işlemler uygulanarak tümör kitlesinin nispeten küçültülmesi sağlanır (23). Kemik metastazlı hastalarda ise tercih edilen yaklaşım genellikle kemik kırığı gözleendiği zaman cerrahi müdahaleye başvurmak şeklindedir (Şekil 2.3.) (24).



Şekil 2.3. Kemik metastazlı hastada tedavi yaklaşım şeması (24).

Radyoterapi

Kanser hücrelerinin öldürülmesi için iyonize radyasyonun kullanılmasıdır. Sadece uygulandığı bölgeye etkisi vardır. X ışınları gibi iyonize radyasyon kullanılarak tümör hücrelerinin genetik materyaline zarar verilir ve böylece büyümeleri inhibe edilir (25).

Radyoterapide vücuda dışarıdan X ışınları verilerek uygulanabildiği gibi tümör bölgesine radyoaktif maddenin enjekte edilmesiyle de uygulanabilir. Radyoterapi uygulamasında tümör kitlesinin çevresindeki sağlıklı dokular da ışınlara maruz kalmaktadır. Bununla birlikte; sağlıklı dokular bu ışınların etkilerine karşı

kendilerini onarabilme kabiliyetine de sahiptir.

Radyoterapi meme, beyin ve akciğer kanseri gibi solid tümörlü kanserlerde ve ayrıca lösemi ve lenfoma gibi hematolojik kanserlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Kanserli dokunun tipi ve doku içindeki tümörün lokasyonu, radyoterapinin uygulanmasına karar verilmesinde ve dozunun ayarlanmasında önemli rol oynamaktadır (23, 25).

Kemoterapi

Kemoterapi, tedavide sitotoksik/antikanser olarak nitelendirilen ilaçların kullanıldığı tedavi tipidir. Bu ilaçlar DNA replikasyonunu engellemek, DNA ile şelat oluşturmak veya oksidatif hasar meydana getirmek suretiyle tümör hücrelerinde öldürücü etki gösterirler. Çoğu ilaç, bölünen tümörlü hücelere hızlıca hedeflenerek etkisini gösterir. Bu ilaçların bölünmekte olan sağlıklı hüceleri de hızlı bir şekilde etkilemesiyle kemoterapide gözlenen yan etkiler ortaya çıkar. Kemoterapötik ilaçlar oral veya intravenöz olarak verilebilir (23).

İmmunoterapi

İmmunoterapide, hastanın bağışıklık sistemi hücrelerinin tümör hücrelerine karşı daha iyi mücadele edebilmesi için uyarılması ve güçlendirilmesi söz konusudur. Çeşitli biyolojik ve kimyasal ajanlar kullanılmaktadır (23).

2.1.4. Hedeflendirilmiş Tedavi

Hedeflendirilmiş tedavi, 2000'li yıllarda bazı kanser türleri için kullanılmaya başlanmıştır. Bu tedavide kullanılan ajanlar, kanser hücrelerinde regülasyonu bozulmuş proteinlere karşı hedeflendirilmiş ve bu hedeflere özgü olan ajanlardır. Tirozin kinaz inhibitörleri (imatinib) ve monoklonal antikorlar (trastuzumab) hedeflendirilmiş tedavide kullanılan ilaçlara örnek verilebilir (26).

Moleküler hedeflendirmeden farklı olarak başka bir hedeflendirme yaklaşımı ise etkin maddelerin nano sistemler içerisine yüklenmesidir. Nanopartiküllerin metastatik bölgeye hedeflendirilmesi 2 basamakta gerçekleşmektedir. Birincisi nanopartikülün metastazın olduğu organ veya organlara doğru yönlendirilmesini kapsarken; ikincisi ise doğru organa iletilmiş olan nanopartikülün, bu organdaki

kanserli hücreleri bulması ve bu hücrelerdeki spesifik hücre içi yerlere bağlanmasını kapsamaktadır (27, 28).

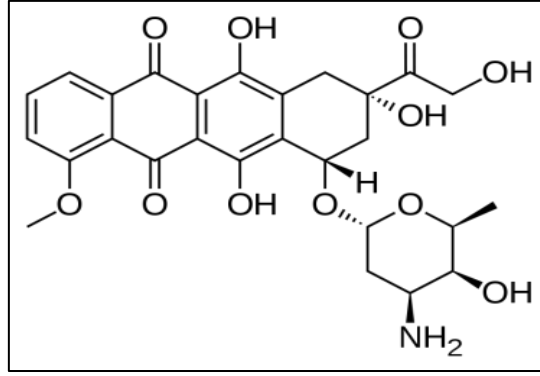
Partikül büyüklüğü, yüzey yükü, fiziksel ve kimyasal özellikler ile ilacın uygulanma yolu gibi faktörler nanopartiküllerin spesifik bir organa hedeflendirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu faktörlerin, nanopartiküllerin biyodağılımı ve hedeflenmesi üzerine etkilerini araştırmak için birçok çalışma yapılmıştır (17, 27).

Sonuç olarak, yaşamı tehdit edici metastazlar sıklıkla beyin, akciğer, karaciğer, lenf ve kemiklerde gerçekleşmektedir; dolayısıyla bu organlar üzerine nanopartikülleri hedeflendirme çalışmaları çok büyük önem taşımaktadır (29).

Kanser tedavisine yönelik birçok çalışma yapılmasına rağmen kemik metastazlarının tedavisinde sınırlı düzeyde başarı sağlanabilmiştir. Kanser hücrelerinde gelişen ilaç direnci ve kemik dokusuna istenilen konsantrasyonda ilaç ulaştırılamaması tedaviyi sınırlayan faktörler olmaktadır (30, 31).

2.2. Doksorubisin

Doksorubisin antrasiklinler adı verilen bir etkin madde grubuna ait bir moleküldür. Antrasiklinler birçok farklı kanser tipinin tedavisinde kullanılan oldukça etkili bir etkin madde grubudur (32). İlk antrasiklinler 1960'lı yıllarda *Streptomyces peucetius* isimli toprak bakterisinin ürettiği pigmentlerden izole edilmiştir (33). İlk izole edilen antrasiklinler daunorubisin ve doksorubisindir. Her iki antrasiklin de yapısında bir şeker grubu ve aglikan bir grup içermektedir. Aglikan grup kinon-hidrokinon, bir metoksi substituenti ve karbonil içeren bir yan zincir yapısına komşu tetrasiklik bir halkaya sahiptir (33).



Şekil 2.4. Doksorubisin molekülünün açık kimyasal formülü.

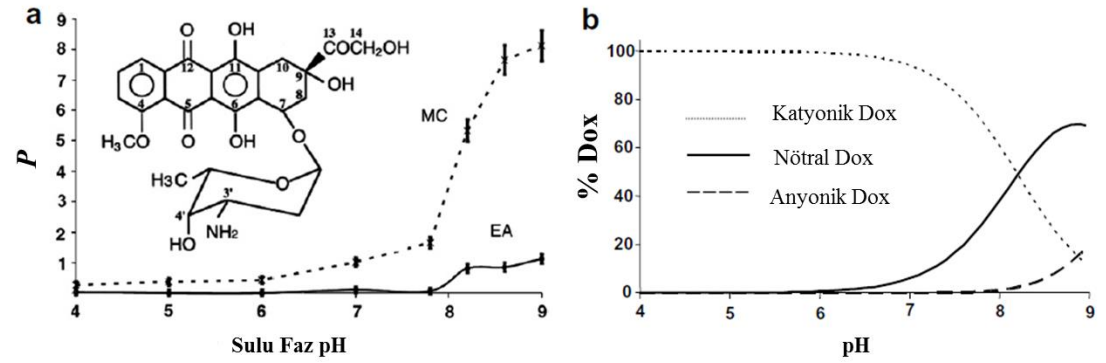
Doksorubisin, antineoplastik olarak sıklıkla kullanılan bir moleküldür. Doksorubisinin yüksek etkinliğinin aksine tedaviyi takiben gözlenen kardiyotoksisite diğer yan etkilerinin arasında en önemlisidir. Ayrıca antrasiklinlerin alopesia, kemik iliği supresyonu ve oral ülserlere neden olma eğilimleri de söz konusudur (34).

Spesifik olmayan ilaç dağılımı sonucu gözlenen bu toksisite tablosu kemoterapinin yarıda bırakılmasına ve başarıyla sonuçlanamamasına neden olabilmektedir (35). Kanser hücrelerinin daha spesifik olarak öldürülebilmesi için daha yoğun bir odaklanma gerekmektedir. Doksorubisin ile ilgili olarak çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Böylelikle sağlıklı dokuların ilaca maruziyetlerinin minimize edilmesi amaçlanmıştır (36).

Doksorubisin, molekül yapısında iyonize olabilen iki fenol grubu ve bir amin grubu içermektedir. Bu gruplar sebebiyle ortamın pH değeri doksorubisin molekülünün iyonizasyonunu ve polaritesini değiştirmektedir. Doksorubisinin nötral

formu sulu fazdan organik faza ekstrakte edilebilir (37-39). Şekil 2.5'te sunulmuş olan grafikte doksorubisinin metilen klorür ve etil asetat içerisinde artan pH ile birlikte çözünürlüğündeki artış, pH değişimiyle birlikte molekülün iyonizasyon değişimi ile birlikte gösterilmektedir.

Doksorubisin, yan zincirinde terminal grup olarak primer bir alkole sahip iken daunorubisin bir metil grubuna sahiptir. Yan zincirde yer alan bu farklılık iki farklı etkin maddenin aktiviteleri üzerine etkilidir. Doksorubisin genellikle çocukluk çağı solid tümörleri ve meme kanserinin tedavisinde kullanılırken, daunorubisin akut lenfoblastik ve miyeloblastik lösemide kullanılmaktadır (40).



(a) Metilen klorür ve etil asetat içinde çözülmüş Doksorubisinin (Dox) sulu faz pH sına karşı partisyon katsayısı (P). Sulu fazdaki ilk Dox konsantrasyonu $8,5 \times 10^{-5}$ M. Sıcaklık : 25 °C. Denge Süresi: 24 h.
(b) pH'a karşı doksorubisinin iyonizasyon durumu.

Şekil 2.5. Doksorubisinin ortamın pH değerine göre partisyon katsayısı ve iyonizasyon derecesindeki değişiklikleri (41).

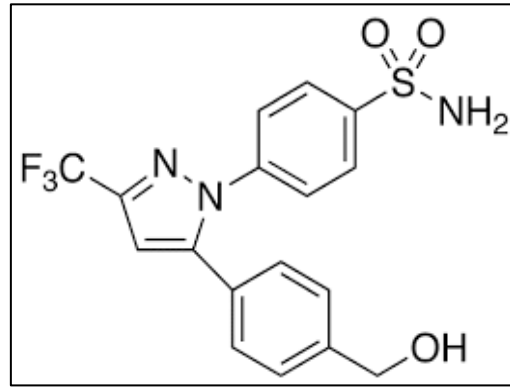
Doksorubisin bu tez çalışmasında kullanılacak etkin maddelerden bir tanesidir. Anti tümör aktivitesi diğer antrasiklinlere benzer şekildedir. DNA'ya interşelasyon yaparak nükleik asit sentezinin inhibisyonu, membran özelliklerinin bozulması, serbest radikal oluşumuyla makro moleküllerin hasara uğratılması, lipid peroksidasyonunun tetiklenmesi ve topoizomeraz II enziminin inhibe edilmesi ile DNA kırılmasının başlatılması yolaklarını içeren kombine etki mekanizması ile etkinliğini göstermektedir (42, 43).

Belirtilen bu multifaktoriyel etki mekanizmasından kaynaklandığı düşünülen kardiyotoksisite, doksorubisinin kullanımını kısıtlayan en temel faktördür. Bu denli ciddi bir kardiyotoksik yan etki profili olmasına rağmen, doksorubisin günümüzde

hala birçok anti tümör bileşik için iyi bir kombine tedavi ajanı olup geniş kullanım alanına sahip kemoterapötik olma özelliğini devam ettirmektedir (40).

2.2.1. Selekoksib-Doksorubisin Kombinasyon Denemeleri

Epidemiyolojik çalışmalar ve hayvan deneyleriyle non steroidal anti enflamatuar ilaçların (NSAİ) kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri gösterilmiş fakat etki mekanizmaları henüz net olarak açıklanamamıştır (44). Yapılan çalışmalarda, NSAİ'ların kanser hücrelerinin çoğalmasını siklooksijenaz enzimlerini (COX) inhibe ederek önledikleri düşünülmektedir. Ancak antiproliferatif etkinin siklooksijenaz inhibisyonundan bağımsız olabileceğini öne süren çalışmalar da vardır (45). NSAİ ilaçların kanser tedavisinde kombine tedavilerde yerini alması amacıyla klinik çalışmalara hız verilmiştir (46, 47).



Şekil 2.6. Selekoksib molekülünün açık kimyasal formülü.

Fakat NSAİ ilaçların uzun süre kullanılmasıyla beraber oluşabilecek birçok yan etki de gösterilmiştir. Siklooksijenaz-2 (COX-2)'nin seçici bir inhibitörü olan selekoksibin prostat kanseri (PCa) hücrelerinde PGI₂ sentezini inhibe ettiği ve sitotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (48). Ayrıca meme kanseri hücrelerinde sahip olduğu sitotoksikiteyi artırıcı etkisi de literatürde gösterilmiştir (49). NSAİ ve spesifik COX-2 inhibitörlerinin kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonunun nasıl etki göstereceğini araştırmaya yönelik çalışmalarda selekoksib ile birlikte doksorubisin veya vinkristinin kullanımının sinerjik etki gösterdiği bulunmuştur (50, 51).

Yan etkiler nedeniyle sonlandırılan faz II (NCT00061893, NCT00494338) çalışmalarında selekoksibin kombine kullanımıyla elde edilecek kazanımlar, yan

etkiler nedeniyle kısıtlanmaktadır (52, 53).

Kanser tedavisindeki tüm gelişmelere rağmen metastatik bölgeye ilacın yeterince ulaştırılmaması sorununun, nano ilaç geliştirilmesi yaklaşımları ile aşılabileceği düşünülmekte ve konuyla ilgili birçok araştırma grubu çalışmaktadır.

2.3. Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Daha etkin ilaç taşıyıcı sistemler geliştirebilmek için nanoteknoloji günümüzde dikkat çekici özelliğini korumaya devam etmektedir. Bu doğrultuda araştırmacılar tarafından inorganik ve metalik yapıların yanısıra, sentetik ve biyolojik makro molekülleri veya fosfolipitleri kullanan farklı yapılarda partiküler ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (54). Uzatılmış, kontrollü ve hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler ise partiküllerin yüzeylerinin modifiye edilmesiyle elde edilmekte ve taşıyıcı sistemlere katkı değer sağlamaktadır (55).

Nanopartiküller, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan; büyüklükleri nanometre boyutunda olan, çözünmüş, enkapsüle edilmiş ve/veya adsorbe olmuş etkin maddeyi kontrollü bir şekilde salan katı kolloidal partiküller olarak tanımlanmaktadır. Tanımda 100 nm'nin altındakilerin 'nano'partiküller olduğu belirtilmesine rağmen tatmin edici bir yükleme sağlayabilmek için 100 nm'den daha büyük partiküllere ihtiyaç duyulmaktadır (54). Nanopartiküller hazırlanış yöntemlerinin bir sonucu olarak mikro yapılarındaki farklılıklar sebebiyle, konuyla ilgili temel kaynaklarda nanoküre ve nano kapsül olmak üzere temel iki gruba ayrılarak tanımlanmışlardır (56).

Nanokapsüllerde etkin madde polimerik bir zarf ile çevrelenmiştir. Nanokürelerde ise etkin madde polimerik matriks içerisinde homojen şekilde dağılmıştır. Nanopartiküler bir sistemin ilaç taşıyıcı olarak kullanılması; ilacın hedeflenme ile istenilen bölgeye daha yüksek konsantrasyonda yönlendirilmesi, kontrollü olarak salınması, diğer nanoyapılara göre daha stabil olmaları, taşıyıcı polimerin fizyolojik ortamda farklı hızlarda parçalanabilir şekilde seçilebilmesi ve parçalanma ürünlerinin toksik olmaması ve sterilize edilebilmeleri gibi bir takım üstünlüklere sahiptir (56).

Nanotıp kapsamında çoğunlukla anti kanserojen ilaçların, anti enflamatuar ilaçların, antiparaziter etkin maddelerin nanopartiküllere yüklenmesine yönelik araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bunlarla birlikte beyin, akciğer, karaciğer, göz, kolon gibi spesifik organlara ilaç taşınımında, transdermal uygulamalarda, peptid yapıli ilaçların taşınmasında ve görüntüleme sistemlerinde kullanılmaktadırlar (56).

Etkin ilaç taşıyıcı sistem olarak biyoparçalanabilir nanopartiküllerin geliştirilmesi araştırmacılar arasında son yıllarda ilgi çeken bir konu olmuştur (57-

59). İlaç taşınmasında nanopartiküllerin kullanılmasının avantajları, onların iki temel özelliğinden kaynaklanmaktadır. İlk olarak; nanopartiküller, küçük partikül boyutları sayesinde küçük kapillerlerden geçerek kolaylıkla penetre olup hücrelerin içine girebilirler ve böylece, hedef bölgede etkili ilaç akümülyasyonunu sağlarlar (60-65). Bir diğer özellik ise, nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan biyoparçalanabilir materyallerin, günler ve haftalar sürebilecek periyotlarda hedef dokuda kontrollü ilaç salımını sağlayabilmesidir (66-69). Kanser tedavisinin etkinliği, mümkün olan en az sayıda sağlıklı hücreyi etkileyerek, tedavinin kanser hücrelerine hedeflenmesi ve onları öldürme yeteneği ile ilgilidir.

Hastaların tedavi süresince yaşam kalitesi ve yaşam beklentisindeki değişikliğin derecesi tedavinin hedeflenme yeteneği ile doğrudan ilişkilidir. Günümüzdeki kanser tedavisinde kullanılan moleküllerin gösterebildikleri tek seçicilik özelliği, kemoterapötik ilaçların doğası ile ilgili olarak, belirli tipteki kanser hücreleri üzerinde sağlıklı hücrelere göre daha yoğun bir biçimde etki göstermesidir (70). Bu şiddetli ilaçların yüksek dozlarda sistemik olarak uygulanmasında bazı yan etkiler meydana gelmektedir. Doksorubisin başlığında da belirtildiği üzere, bazen bu yan etkilerin yoğunluğundan dolayı, ilaçların kanseri tamamen ortadan kaldırma şansı varken hastaların tedaviyi bırakmak zorunda kaldığı durumlar rapor edilmiştir (70).

Bu gibi durumlarda, hem aktif hem de pasif hedeflendirme stratejilerinde kullanılan nanopartiküllerin bir diğer avantajı daha ortaya çıkmaktadır. Nanopartiküller; sağlıklı hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki göstermeden, tedavide kullanılan moleküllerin kanser hücreleri içindeki konsantrasyonunu arttırarak yan etkilerin en aza inmesini sağlarlar (71, 72). Bununla birlikte; ilaç direnci, kemoterapötik ajanların terapötik etkinliğini sınırlayıcı büyük bir engel olarak ortaya çıkmaktadır. İlaç direnç mekanizmalarının da NSAİ ilaçların kombine ilaç kullanımı ile aşılabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (73).

Nanopartiküllerin bu sayılanların dışında diğer avantajları ise şu şekilde sıralanabilir;

- Sterilize edilebilmeleri mümkündür. Kullanılan polimerin camsı geçiş sıcaklığı göz önünde bulundurularak termal yöntemlerle, filtrasyonla veya radyasyonla sterilize edilebilirler (74).

- Fizyolojik ortamla uyumlu (biyouyumlu) ve işlevini tamamladıktan sonra parçalanabilir polimerler seçilerek üretimlerinin yapılabilmesi ve ayrıca, polimere göre değişmekle birlikte toksik olmayan yıkım ürünlerine sahip nanopartiküllerin hazırlanması mümkündür (75-77).

- Oral yolla kullanılan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler ile etkin maddenin stabilite, salım ve biyoyararlanım parametreleri iyileştirilebilir (78-80).

-Nanopartiküllerin polimerik yapıları, etkin maddenin tümör hücrelerine hedeflendirilmesine ve kontrollü salımının yapılmasına olanak tanır. Hedeflenen dokuya ulaşmasının ardından, etkin maddenin günler ve haftalar sürebilecek periyotlarda salınmasını sağlarlar (81, 82).

- Hedeflendirme yapılacak dokuya özgü moleküler yapıları tanıyan spesifik ligandların, nanopartiküllerin yüzeyine yerleştirilmesi ile etkin maddenin lokalize edilmesi mümkün olmaktadır (83),

- Değişik kolloidal taşıyıcı sistemlerle karşılaştırıldıklarında, üretimlerinden hastaya uygulanmasına kadar geçen sürede ve uygulama sonrasında biyolojik sıvılarda daha stabil yapıdadırlar (84).

- Doku, hatta ötesinde hücre selektif bir tedavi stratejisi amaçladıkları için uygulanan etkin maddelerin, özellikle sitotoksiklerin, sağlıklı organ ve dokular üzerindeki toksik etkilerini en aza indirirler (85).

- Üretim teknikleri çok çeşitlilik göstermektedir. Bu sayede farklı fizikokimyasal özelliklere sahip etkin maddeler ile formülasyonların tasarlanabilmesi ve üretimleri mümkündür (86).

- Kullanım öncesi seyreltilmek üzere (genellikle liyofilizasyon ile) kurutulmuş nanopartiküller, ilacın katı dozaj formunda, uzun süre stabil kalmasına olanak tanımaktadır (86).

Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), en çok kullanılan biyoparçalanabilir polimer olarak karşımıza çıkmaktadır (87). Konvansiyonel PLGA sistemleri kullanılarak molekül ağırlığı, terminal fonksiyonel grup ve laktid/glikolit oranı gibi PLGA yapısında farklılıklar yaratacak değişik faktörlerin etkileri araştırılmıştır. Düşük molekül ağırlığı, polimerin degradasyon (88) ve ilaç salım hızını artırırken (68); laktid oranındaki artış, degradasyon ve buna bağlı olarak ilaç salım hızını azaltmaktadır (89, 90).

Serbest karboksil grubu (-COOH) taşıyan ve daha hidrofilik olan PLGA, karboksil grubu esterleşmiş PLGA'ya kıyasla daha hızlı hidroliz olur. Bu tip polimerler; üretim kolaylığı, çok yönlü polimer karakteristikleri ve insanlara uygulanabilmeleri için FDA onaylı olmaları gibi birçok olumlu özelliğe sahiptirler (58). Bu polimerler, peptid ve protein yapısına sahip moleküllerin taşınması, kimyasal ve enzimatik bozunmaya karşı korunması ve kontrollü salınmalarının sağlanabilmesi için üzerinde sıklıkla çalışılan polimerlerdir (91).

Paklitaksel gibi suda çözünürlük sorunu olan ve fakat klinik etkinliği nedeniyle vazgeçilemeyen etkin maddelerin parenteral formülasyonlarında çeşitli yardımcı çözücüler ve sürfaktanlar kullanılmaktadır. Bazı durumlarda ise baz formundan tuz formuna geçiş veya iyonize olabilen gruplar varsa pH ayarlaması yapılarak etkin maddelerin çözünürlüğünün artırılmasına yönelik çalışma ve araştırmalar yapılmaktadır. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması ile bu yaklaşımlara gerek kalmaksızın hasta uyuncunun yüksek ve yardımcı madde kaynaklı yan etki profilinin düşük olduğu formülasyonların geliştirilebilmesi mümkün olmuştur (92-95).

Diğer taraftan kanda kalış süresi uzatılmış, biyoyumlu ve biyoparçalanabilir, hedeflendirilerek vücut içerisinde istenilen bölgede akümüle olma özelliğine sahip, salım süresi ve partikül boyutu kontrol edilebilir ilaç taşıyıcı sistemlerin halihazırda çözüme kavuşmamış bir takım problemleri bulunmaktadır (96, 97).

2.3.1. İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Kanser Tedavisindeki Yeri

Kanser tedavisinde kullanılan nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, özellikle hidrofobik yapıli sitotoksik etkin maddelerin enkapsüle edilmesiyle hedef neoplastik dokudaki antitümoral etkinliklerinin arttığını, doku ve hücre dağılım profillerinin de aktif ve pasif hedeflendirmenin kombinasyonuyla kontrol edilebildiğini göstermektedir (98).

Kemoterapide ilaç moleküllerinin mümkün olduğunca kanser hücrelerine odaklanıp hedeflenmesi ve sağlıklı hücreler üzerindeki yan etkilerinin en aza indirilmesi, tedavinin başarılı olabilmesi için şarttır. Bu durum ayrıca; hastanın yaşam süresi ve kalitesinin artırılması açısından da son derece önemlidir.

Tümör, kapiler vasküler yapılanması sağlıklı dokudan farklı olarak endoteller

arası boşluklar içermektedir. Bu bozuk damar yapılanması sebebiyle kapiler geçirgenliği tümör bölgelerinde artmış olup bu durum artmış permeasyon ve retansiyon (EPR) etkisi olarak nitelendirilmektedir. Normal kapillerlerden daha geçirgen olan tümör dokusu yakınlarına gelen nanopartiküller, bu bölgede ektravasküler kompartmana çıkarak seçici şekilde akümüle olabilmektedir. Nanopartiküllerin sahip oldukları boyutlar EPR etkisi ile tümör dokusuna hedeflendirilmelerine olanak sağlamaktadır (99, 100). Bu özellikleri sayesinde normal dokularda daha az birikerek kanda daha uzun süre kalabilmekte ve diğer dokuların sitotoksik ajana maruziyetini azaltabilmektedir.

Neoplastik hücreler normal hücrelerden çeşitli yönlerden farklılaşmaktadırlar. Bunlardan bir tanesi de artmış olan endositik aktivite olup, nanopartiküllerin kanser hücrelerine girişinin sağlıklı hücrelere göre daha yüksek oranda olmasını sağlamaktadır (101, 102).

Etkin maddenin nanopartiküler sistem içerisinde kontrollü salınabilir olması ise başka bir avantajıdır. Genellikle dar terapötik indekse sahip olan antineoplastik ajanların hedef tümör dokuda uzun süre etki göstermesi sağlanarak tedavi etkinliğinin artırılabilceğinin mümkün olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (103, 104).

2.3.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda incelenen etkinliği değiştirebilecek kritik temel parametreler; nanopartiküllerin büyüklükleri ve dağılımları, morfolojik görünüşleri ve şekilleri, zeta potansiyelleri, yükleme etkinliği, yükleme kapasitesi, etkin madde polimer etkileşimleri ve etkin madde salım hızı olarak sıralanmaktadır (105).

Yükleme Etkinliği ve Yükleme Kapasitesi

Seçilen üretim metodu, kullanılan polimer, organik faz, stabilizör/sümfaktan tipi ve miktarları etkin maddenin başarılı bir şekilde nanopartiküllere yüklenebilmesinde öncelikli bir öneme sahiptir (106).

Nanopartiküler sistemlere başarılı bir şekilde etkin maddenin enkapsüle edilebilirliği genel olarak kullanılan etkin maddenin başta çözünürlük olmak üzere çeşitli fizikokimyasal özelliklerine, seçilen çözücülere ve kullanılan polimerin özelliklerine bağlıdır (106, 107).

İlaç yüklü nanopartiküllerde ilaç yükleme kapasitesi doğrudan ya da dolaylı olarak hesaplanabilmektedir. Doğrudan hesaplama yönteminde nanopartiküle yüklenmeyen serbest ilaç ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra nanopartiküller parçalanarak enkapsüle edilen ilaç miktarının tayini yapılır ve başlangıçta kullanılan ilaç miktarına göre yüzdesi hesaplanır. Dolaylı hesaplama yönteminde ise nanopartikül formülasyonu hazırlandıktan sonra oluşan nanopartiküller ortamdan uzaklaştırılır ve ortamdaki serbest ilacın tayini yapılır. Serbest ilaç miktarı kullanılan ilaç miktarından çıkartılır böylelikle yüklenmiş ilaç miktarı dolaylı olarak hesaplanmış olur (67).

Partikül Büyüklüğü Analizi

Partikül büyüklükleri ve büyüklük dağılımları nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler için de diğer kolloidal yapıli sistemler gibi, sistemin in vitro ve in vivo performanslarını etkileyen temel faktörlerdir (108).

Nanopartiküllerin dolaşımdan ekstrasvasküler alana geçişleri, hücre membranları ile olan etkileşimleri ve fizyolojik bariyerlerden penetrasyonlarını

etkileyen ana faktörlerden bir tanesi partikül büyüklüğüdür. Sahip oldukları küçük partikül boyutları nanopartiküllerin daha büyük yüzey alanına sahip olmalarını sağlar, bu da diğer taşıyıcı sistemlere nanopartiküllerin üstünlüklerindedir. Diğer taraftan artan yüzey alanı nanopartiküllerden etkin madde salımını etkileyen önemli parametrelerdendir (109, 110).

Nanopartiküler sistemlerin, partikül büyüklük dağılımları polidispersite indeksi (PDI) veya SPAN değerleri ile ifade edilmektedir. PDI, partikül çapının log normal dağılım genişliği ile tanımlanmaktadır ve nanopartiküllerin tekdüzeliğini kantitatif olarak ölçmektedir. SPAN değeri ise $D_{90}-D_{10}/D_{50}$ ifadesi ile hesaplanmakta olan güncel nano teknolojik ilaç taşıyıcı sistemlere ait ruhsatlandırma kılavuzlarında yer alan bir ifadedir (111).

Nanopartiküllerin büyüklükleri ve partikül boyut dağılımları, günümüzde en yaygın olarak dinamik ışık saçılımı esasıyla çalışan foton korelasyon spektroskopisi (PCS) ile tespit edilmektedir. Bununla birlikte; morfolojik özellikleri ve şekillerinin tayini ancak taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) gibi ileri tekniklerle gerçekleştirilebilmektedir. Bu görüntüleme teknikleri kısıtlı sayıda partikülün mikroskop ekranında örneklenebilmesi ve bu partiküllerin boyutunun sistematik olarak tespit edilebilmesi için görüntü işleme tekniklerine ihtiyaç duyulması sebebiyle, ortalama partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımında DLS/PCS esas kabul edilmektedir (112, 113).

Zeta Potansiyel Analizi

Zeta potansiyel değeri, kolloidal partiküllerin birbirleriyle ve karşılaşacakları biyolojik membran ve diğer endojen komponentlerle etkileşimlerini incelemek için kullanılan yüzey karakterizasyon parametresidir. Nanopartiküllerin sahip oldukları yüzey yükleri hem vücuttaki dağılımlarını etkilemekte hem de hücreler tarafından tutulmalarında rol oynamaktadır. Uygulama öncesinde ise süspende partiküllerin agregasyon oluşumu açısından kontrol edilmesi gerekli olan bir parametredir (114).

Elektroforetik foton korelasyon spektroskopisinin esasında, partikül elektriksel bir alana maruz kaldığında, kendi yüküne ters yükteki elektroda doğru hareket etmektedir. Bu hareketlilik bir süre devam ettikten sonra zamanla partikülün

sürüklenme hızı sabitlenmekte ve elde edilen bu sabit hızın elektrik alanına oranı elektroforetik hareketliliği yani mobiliteyi vermektedir. Bir nanopartikülün sahip olduğu zeta potansiyel değeri bu esasa dayanılarak ölçüm cihazlarının internal fonksiyonları yardımıyla belirlenmektedir (114).

Şekil ve Yüzey Morfolojisi

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin şekil morfolojileri yüzey yapıları, küresel, kübik, çubuk yapılarda olmaları nanopartiküllerden etkin madde salımını ve nanopartiküllerin hücrelerle etkileşimini etkileyen önemli parametrelerden bir tanesidir (115). Nano boyuttaki kolloidal sistemlerin şekil ve yüzey morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM), transmasyon elektron mikroskobu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) gibi çeşitli mikroskobik tekniklerle görüntülenebilmektedir. Bu tekniklerin kullanılabilirliği kolloidal sistemin özelliklerine göre değişkenlik gösterir. Bu açıdan görüntüleme tekniğinin seçiminde kolloidal taşıyıcı sistemin yapısal özellikleri büyük bir öneme sahiptir.

Formülasyon Bileşenleri Arasındaki Geçimlilik Çalışmaları

Diğer tüm dozaj formlarında olduğu gibi nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde de etkin madde-polimer etkileşmesi çok sık karşılaşılan problemler arasındadır. Bu durumun belirlenebilmesi ancak etkin madde ile polimer arasındaki etkileşimin incelenmesi ile mümkün olabilmektedir (116-118).

Polimer-etkin madde etkileşiminin belirlenebilmesi için kullanılan diğer bir analiz yöntemi, fourier dönüşümlü infrared spektroskopisidir (FTIR). Bu yöntemde; hazırlanan nanopartikül formülasyonlarındaki etkin madde varlığı, etkin maddenin taşıdığı ana fonksiyonel grupları ifade eden absorpsiyon bantları aracılığıyla izlenebilmektedir. Nanopartikül formülasyonlar diferansiyel tarama kalorimetresi ile yapılan çalışmaların desteklenmesi amacıyla gerçekleştirilen, aynı amaçla yapılan bir analiz olmakla birlikte nanopartiküler sistemlere yönelik araştırmaların çoğunda geliştirilen nanopartiküllerin yüzey kimyasının tayininde kullanılmaktadır (118).

***In Vitro* Salım Hızı Tayini**

Uygulanan etkin maddelerin organizmada gösterdikleri terapötik etki, zamana karşı kan dolaşımındaki serbest etkin madde konsantrasyonu eğrisi altındaki alan ile tayin edilebilmektedir. *In vitro* çözünme hızı deneyleri, tampon veya plazma gibi bir ortam içerisindeki polimerik nanopartiküllerden birim zamanda açığa çıkan etkin madde miktarının belirlenmesi esasına dayanmakta ve geliştirilen taşıyıcı sistemin *in vivo* ortamdaki davranışı hakkında bilgi vermektedir. Ancak bu noktada, *in vivo* ortam çevresel koşullarının burada yer alan çeşitli enzimlerin varlığı dolayısıyla farklı olması ve partiküllerin nano boyutta bulunmaları dozaj şeklinin *in vivo* davranışının *in vitro* olarak gözlenenden farklı olmasına yol açabilmektedir (97, 119). Nanopartiküler sistemlerden etkin maddenin açığa çıkış şeklinin belirlenebilmesi için muhtemel uygulama yolu göz önüne alınarak, çeşitli ortamlarda *in vitro* çözünme hızı deneyleri yapılmaktadır. Kullanılan polimerik materyalin özelliklerine bağlı olarak nanopartiküler sistemlerden etkin maddenin salımı diyaliz torbası tekniği, ters diyaliz torbası tekniği, difüzyon hücresi modeli, düşük basınçta ultrafiltrasyon yöntemi, ultrasantrifüj ayırma tekniği gibi çeşitli yöntemlerle incelenmektedir (106, 107).

2.3.3. Nanopartikül Hazırlamada Kullanılan Polimerler

Nanopartikül hazırlanmasında kullanılan polimerler farklı sistematikler ile aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadırlar:

- Elde edildikleri kaynaklara göre; doğal ve sentetik,
- Moleküler yapılarına göre; hidrofilik ve hidrofobik,
- Organizmaya uygulandıktan sonraki durumlarına göre ise; biyoparçalanabilir ve biyoparçalanabilir olmayan polimerler

Kullanılacak olan polimer seçiminde önemli iki nokta; etkin maddenin fizikokimyasal özelliği ve seçilen üretim metodudur (120). Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin üretiminde; tercih edilen üretim metoduna ve kullanılan etkin madde ile polimerik materyalin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak farklı yaklaşımlarda bulunmaktadır. Etkin madde, sentetik veya doğal bir polimerden hazırlanmış nanopartikülün içine hapsedilerek ya da nanopartikülün yüzeyine adsorbe ettirilerek polimer-etkin madde bileşimi hazırlanabilmektedir. Çoğunlukla enkapsülasyon ve yüzeye adsorbsiyon mekanizmaları aynı anda gerçekleşir, temel olan yüklenme şekli salım kinetiğinin esasını oluşturur. Polimer en basit tanımıyla, çok sayıda monomer birimin düzenli bir şekilde tekrar etmesi ve birbirleriyle kovalan bağlarla bağlanması sonucu oluşturduğu yüksek molekül ağırlığına sahip bileşiklerdir. Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan polimerler de genel itibarıyla; biyolojik olarak parçalanabilen doğal ve sentetik polimerler ile biyolojik olarak parçalanamayan polimerler olarak sınıflandırılabilir (121, 122).

Biyoparçalanabilir polimerlerin en önemli üstünlükleri degradasyon ürünlerinin genellikle vücuttan kolay uzaklaştırılabilen toksik olmayan maddeler olmasıdır. Bununla birlikte ticari ölçekte üretimlerde kullanımlarının ve üretim esnasındaki manipülasyonlarının zor olması, saflaştırma ve tekdüze üretiminin sağlanabilmesinde de sorunlu noktaların bulunabilmesi söz konusudur. Genel olarak doğal polimerler; proteinik yapıdakiler ve polisakkaritler olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadırlar. Albumin, jelatin ve kollajen gibi protein bazlı polimerlerin başlıca dezavantajları ise; bu polimerlere karşı gelişen antijenik yanıtlardır (120, 121).

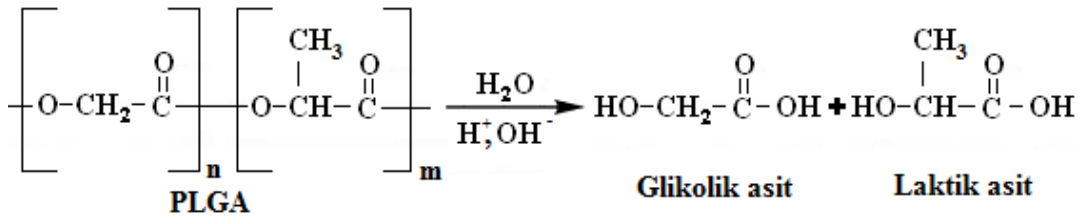
Biyoparçalanır sentetik polimerler ise; molekül büyüklüğü, yük dağılımı, hidrofobisite değişiklikleri ile istenilen özelliklere göre sentezlenebilmeleri, fazla miktarda ve yüksek saflıkta üretilibilmeleri, farklı serileri arasında tekdüze

tekrarlanabilir özelliğe sahip olmaları, hazırlama ve saklama koşulları boyunca stabilitelerini korumaları gibi üstünlüklerinden dolayı nanopartikül formülasyonlarının hazırlanmasında oldukça tercih edilen polimerik materyallerdir. Bu üstünlüklerinin yanı sıra sentetik polimerler, immünojenik özellik taşımadıkları için kullanım güvenilirlikleri daha yüksektir (122).

Biyolojik olarak parçalanmayan polimerler ise vücutta doğal olarak uzun yıllar parçalanmayan polimerlerdir. Bu nedenle başlıca dezavantajları, kronik toksisite problemleridir.

2.3.4. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Polimeri

Poli(laktik-ko-glikolik asit), iki farklı monomerin (laktik asit ve glikolik asit) polimerizasyonu sonucu oluşmaktadır. Polimerizasyonda yer alan monomerlerin farklı oranlarda karıştırılmasıyla; fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikleri farklı, ayrıca farklı molekül ağırlığına da sahip PLGA polimerleri elde edilmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanılan PLGA'ların farklı özelliklerine bağlı olarak, kontrollü ilaç salımı gerçekleştirilebilmektedir (123). Degredasyonunda ise Şekil 2.7.'de de belirtildiği gibi, hidrolitik reaksiyonla yeniden monomerler oluşmaktadır (124).



Şekil 2.7. PLGA degredasyon yolağının gösterimi (124).

Polimerizasyonda yer alan monomer bileşenlerinin molar oranlarına bağlı olarak PLGA'nın kristal yapısı değişmektedir. Poli glikolik asit (PGA) oranı % 70'den az olan PLGA kopolimerleri amorf olmakla birlikte, diklorometan ve etil asetat gibi organik çözücülerde de kolaylıkla çözünebilmektedirler. PGA, hidrofilik bir yapıya sahip olduğu için hücre içi koşullarda çok kolay çözünürken; poli laktik asit (PLA) ise yan zincirinde fazladan bir metil grubu taşıdığı için daha hidrofobiktir ve bu nedenle PGA'ya göre çok daha uzun sürede çözünüp bozunmaktadır (125).

Dolayısıyla, kopolimerin molekül ağırlığına ve laktik asit : glikolik asit oranına bağlı olarak PLGA'nın sudaki parçalanma özelliği değişmektedir. Parçalanma oranı, yüksek glikolik asit içeriği ve düşük molekül ağırlığı ile artmaktadır (126, 127).

PLGA, fizyolojik ortamda inert ve biyouyumlu olması ve biyolojik olarak toksik olmayan metabolitlere parçalanabilmesi nedeniyle yeni ilaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla kullanılan, FDA tarafından onaylanmış bir biyopolimerdir. Yağda ve suda çözünen etkin maddelerin nanopartiküler sistemlerde taşınması için PLGA kopolimerleri ile hazırlanmış sistemler son derece uygundur (128).

PLGA kopolimeri vücutta laktik asit ve glikolik asit monomerlerine ayrılarak sitrik asit döngüsüne girmekte ve böylece metabolize olarak karbondioksit (CO₂) ve suya (H₂O) parçalanmaktadır (124, 128).

Etkin maddenin PLGA nanopartiküllerden salımı, polimerin hidrolizi ile başlayarak dört basamakta gerçekleşmektedir. İlk aşamada suyun difüzyonu meydana gelmekte ve ikinci aşamada ise asidik uç gruplara sahip oligomerler hidroliz reaksiyonunu otokatalizleyerek hidrolizi hızlandırmaktadır. Üçüncü aşamada, oligomerler nanopartikülden dışarıya difüze olurken su molekülleri de oluşan boşluklardan difüze olarak oligomerlerin difüzyonunu arttırmaktadır. Etkin madde salımındaki belirgin artış bu aşamada meydana gelmektedir. Dördüncü ve son aşamada ise; polimerik matriksin daha fazla gözeneğe sahip bir yapıya dönüşmesiyle parçalanma daha yavaş ve homojen bir şekilde ilerlemektedir (129, 130).

PLGA polimeri, çeşitli laktik asit/glikolik asit molar oranlarında hazırlanabilmektedir. Polimer zincirindeki laktik monomerinin glikolik izomerine olan molar oranı, polimer zincirinin doğrusallığı ve kristalizasyon derecesi, polimerin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) değeri ve molekül ağırlığı; polimerin biyolojik olarak parçalanma hızını etkileyen faktörlerdir. Polimerin molekül ağırlığı ve laktik:glikolik molar oranı değiştirilerek PLGA'nın biyolojik ortamdaki parçalanma süresi ve salım profili değiştirilebilmektedir (131).

Bu genellemelerin yanı sıra PLGA 50:50 kopolimeri en hızlı biyolojik parçalanmaya uğrayan kopolimer olduğu gösterilmiştir (132). Bu yapı farklılığı, geliştirilecek dozaj şekline beklenen amaca göre polimer seçiminin çeşitlendirilmesini sağlamaktadır. PLGA kopolimerinin kristal özelliği, polimerin mekanik dayanıklılığını, şişme özelliğini, hidrolize uğrama kapasitesini ve parçalanma hızını direkt olarak etkilemektedir. Polimerin kristal özelliği de kopolimer zincirindeki laktik ve glikolik asidin tipine ve molar oranına göre değişmektedir (133).

PLGA kopolimeri organizmada sulu ortamda ester bağlarının kırılması ile hidrolitik degradasyona uğrar ve toksik olmayan hidroksikarboksilik asitlere parçalanır. Oluşan bu asitler de Krebs siklusu aracılığıyla karbondioksit ve suya metabolize olarak idrarla atılırlar. *In vitro* ortamda da benzer şekilde PLGA sulu ortamda ester bağlarının kırılması ile hidrolitik degradasyona uğrayarak parçalanır.

Suyun, kopolimerin içine girişi polimerin parçalanma hızından daha hızlı gerçekleştiği için PLGA'nın parçalanması homojen (bulk) erozyon mekanizması ile gerçekleşmekte (134, 135) ve bu durum polimerin hidrofilik yapısından kaynaklanmaktadır.

PLGA sulu ortam içindeyken polimerin yapısına su girişi olmakta ve ester bağları hidrolitik olarak kırılarak zincir bölünmesi meydana gelmektedir. Bu şekilde polimerin molekül ağırlığı önemli ölçüde azalırken kütle kaybı ise oluşmamaktadır. Zamanla molekül ağırlığındaki kayba bağlı olarak kütle kaybı da oluşmaya başlamakta ve çözünür özellikteki oligomerik ve monomerik ürünler oluşmaktadır. Oluşan bu yapılar parçalanmaya devam ederken yüzeye doğru da hareket etmekte ve bu şekilde polimerik yapı tamamen degrade olmaktadır (136-138).

2.4. Nanopartikül Üretim Yöntemleri

Literatürde ve temel kitaplarda bildirilen birçok hazırlama metodu mevcuttur. Hazırlama yönteminin seçimi, kullanılan polimerin yapısına ve etkin maddenin çözünürlük özelliğine göre belirlenmektedir. Nanopartikül hazırlama yöntemleri olarak ilk çalışmalarda, monomerlerin çeşitli ortamlarda *in situ* polimerizasyonuna dayanan yöntemler kullanılmıştır. Günümüzde ise, tam olarak karakterize edilmiş, önceden sentezlenmiş polimer veya doğal makro moleküllerin dispersiyonuna dayalı yöntemler geliştirilmiştir. Nanopartikül hazırlama yöntemleri aşağıda kısaca sıralanmıştır.

Polimerizasyon Yöntemi

Bu yöntemde, sulu çözelti içinde nanopartiküller sağlamak için monomerler polimerize olur. Etkin madde, polimerizasyon ortamında çözündürülerek ya da polimerizasyon tamamlandıktan sonra nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe ettirilerek yüklenir. Daha sonra stabilize edici ajanları uzaklaştırmak için, nanopartiküller saflaştırılır ve sürfaktan içermeyen izotonik ortamda yeniden süspande edilir. Bu teknikle poli(alkil siyano akrilat) (PACA) ve poli(bütül siyanoakrilat) (PBCA) nanopartikülleri hazırlanmıştır (139).

Yüzeyler arası Polimerizasyon Yöntemi

Bu yöntemde monomerin ara yüzeyde polimerleşmesi sonucu nanopartiküller oluşur. Dış faz olarak yüzey etkin madde ve organik çözücü içeren emülsiyon yüksek devirde karıştırılır. Bu emülsiyona polimeri oluşturacak monomer çözeltisi eklenir. Oluşan nanopartiküller santrifüjle ayrılarak yıkanır ve liyofilize edilir (140).

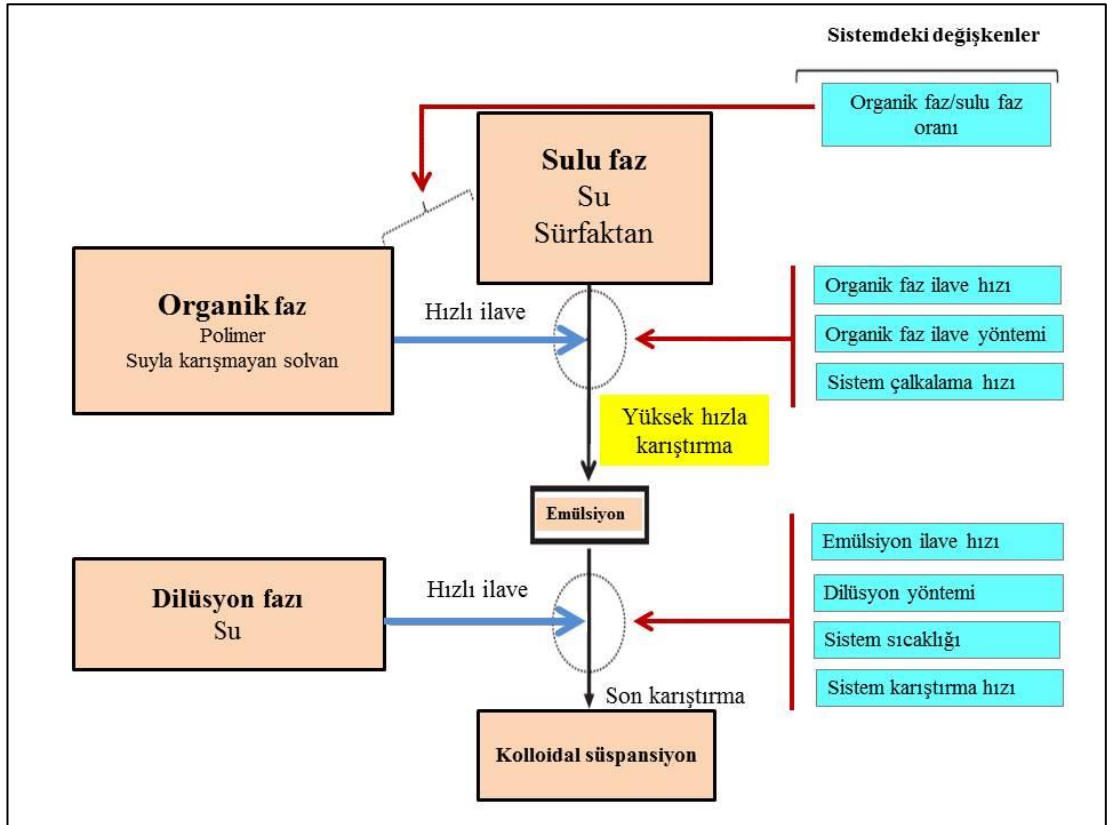
Misel Polimerizasyonu

Devamlı fazı organik fazın oluşturduğu bu yöntemde, suda yüksek çözünürlüğe sahip monomerler, düşük partiyon katsayıları nedeniyle misellerden organik faza difüze olamazlar. Suda çözünen monomer çözeltisi, yüzey etkin maddeler yardımıyla hidrofobik fazda dağıtılır ve miseller elde edilir (140).

Polimerizasyon başlatıcısı olarak kullanılan X-ışını, IR ışını gibi bir enerji yardımıyla katı tanecikli kolloidal bir sistem elde edilir ve ultrasantrifüj ile nanopartiküller ortamdandan ayrılır (140).

Emülsiyon Oluşturma / Çözücü Difüzyon Yöntemi

Bu yöntemin esası, suda çözünmeyen etkin madde ile polimerin ortak çözüldükleri bir organik çözücüde çözüldürülmesi ve yüzey etkin madde içeren sulu ortama karıştırılarak ilave edilmesidir. Son yıllarda PLGA nanopartikülleri bu yöntemle hazırlanmışlardır (141-143). Şekil 2.8.'de gösterildiği üzere bu yöntem parametrik olarak daha kontrol edilebilir olmakla birlikte; birçok aşama ve birçok işlem parametresi içermektedir (144).



Şekil 2.8. Emülsifikasyon difüzyon yönteminde proses adımları ve sistem değişkenleri (144).

Çift Emülsiyon ve Solvan Buharlaştırma Yöntemi

Emülsiyon ve çözücü buharlaştırma yönteminin en temel eksikliği suda çözünebilir hidrofilik yapıdaki etkin maddelerde kullanılmamasıdır. Hidrofilik yapıdaki etkin maddenin enkapsülasyonunu sağlayabilmek için geliştirilmiş olan çift emülsiyon tekniğinde; etkin maddeyi içeren sulu fazın sürekli karıştırma altında organik bir çözücüde çözülmüş olan polimer çözücüsüne ilave edilmesiyle Y/S tipinde bir emülsiyon elde edilir. Elde edilen bu emülsiyon, ikinci bir sulu faz içerisine ilave edilerek Y/S/Y yapısında bir emülsiyon elde edilmesi sağlanır. Sonrasında organik çözücü uzaklaştırılarak (difüzyon-buharlaştırma) nanopartiküller elde edilir (145-147).

Bu yöntemde; hidrofilik etkin madde miktarı, stabilizör ve polimer konsantrasyonları, sulu faz hacmi, karıştırma hızı ve süresi nanopartiküllerin karakteristiklerine etki edebilecek parametrelerdir (148).

Nanoçöktürme Yöntemi

Nanoçöktürme yönteminde; polimer, su ile karışabilir organik çözücüde çözüldürüldükten sonra sulu faz üzerine eklenir ve homojenize edilir. Daha sonra organik çözücü uzaklaştırılarak nanopartiküller elde edilir (149). Bu yöntemin avantajları, tek aşamada hızlı bir şekilde nanopartikül oluşumuna olanak vermesi ve uygulama açısından basit bir yöntem olmasıdır.

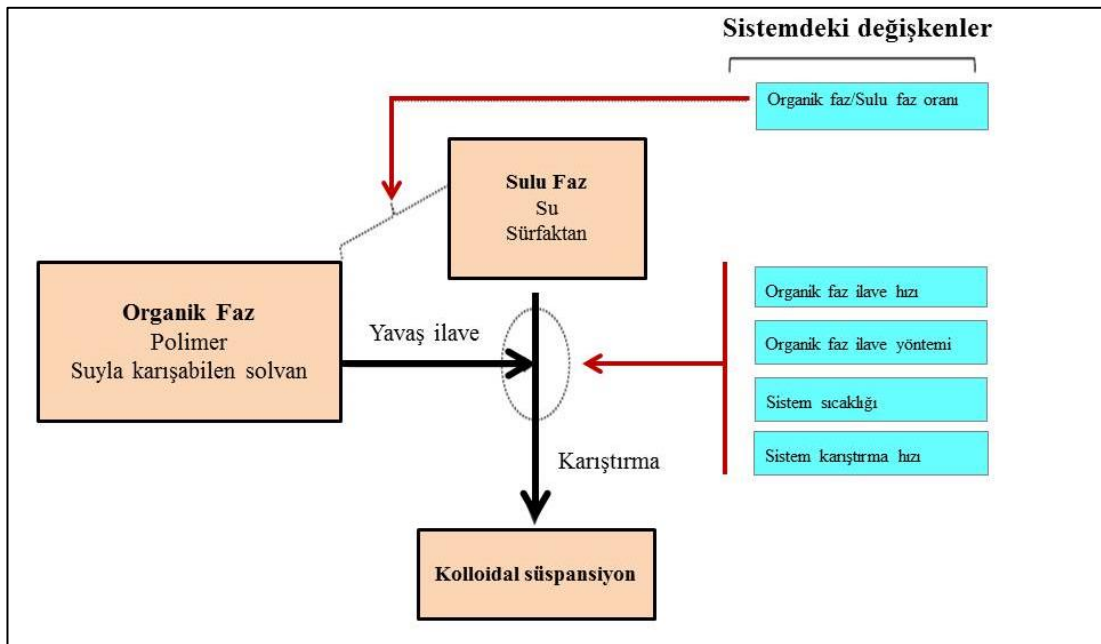
Bu yöntemde uygulanabilmesi için birbiri ile karışabilen iki çözücüye ihtiyaç vardır. Etkin madde ve polimer, çözen faz (*solvent*) diye isimlendirilen ilk fazda çözülmeli; çözmeyen faz (*antisolvent*) diye isimlendirilen ikinci fazda ise çözünmemelidir. Nanoçöktürme; polimer çözeltisinin, çözmeyen faza (ikinci faz) ilave edildiğinde polimerin hızlı bir şekilde katılaşması ile meydana gelmektedir (150).

Polimerin çökmesi; içinde bulunduğu çözücünün, karışan faza difüze olması ile gerçekleşmektedir. Nanoçöktürme; genellikle PLGA, selüloz türevleri ve polikaprolakton gibi polimerler ile dar bir dağılım aralığında ve 10-300 nm büyüklüğündeki nanopartiküllerin hazırlanmasına imkan tanımaktadır. Nanoçöktürme yöntemi; sisteme yüksek enerjinin verildiği, yüksek karıştırma hızları, ultrasonikasyon veya yüksek sıcaklıkların kullanıldığı bir yöntem olmadığı için

protein yapısını bozabilecek koşulları barındırmamaktadır (151).

Etil alkol veya asetonunda çözünebilir ve ayrıca indometazin gibi suda zor çözünen etkin maddelerin yüklenmesi bakımından çok uygun olan nanoçöktürme yöntemi, sürekli faza etkin madde geçişini minimuma indirerek yüksek yüklenme (enkapsülasyon) etkinliğini sağlamaktadır. Diğer yandan, nanopresipitasyon yöntemi kullanılarak suda çözünen etkin maddelerin yüklenmesi ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar umut vericidir. Örneğin; etkin madde molekülünün iyonizasyonunu ve dolayısıyla sudaki çözünürlüğünü azaltan dış faz pH'nın optimumuna getirilmesi ile prokain hidroklorür etkin bir şekilde nanopartiküllere yüklenmiştir (152, 153).

Hidrofilik etkin maddelerin enkapsülasyonunun sağlanmasına yönelik olarak nanoçöktürme yönteminin optimize edilmesinin amaçlandığı başka bir çalışmada, polimerik nano taşıyıcıları hazırlamak üzere solvan ve antisolvan fazın yapısı, organik/sulu faz hacim oranı ve polimer konsantrasyonunun partikül büyüklüğüne olan etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada çözücü olmayan faz olarak farklı alkol tipleri kullanıldığında, metanol ve etanole kıyasla propanol ile en yüksek parçacık büyüklüğüne ulaşıldığı; çözücü/çözücü olmayan faz hacim oranının anlamlı şekilde partikül büyüklüğünü etkilemediği; çok yüksek konsantrasyondaki polimerin ise nano boyutta partikül oluşumunu engellediği bildirilmiştir (154).



Şekil 2.9. Nanopresipitasyon yönteminde proses basamakları ve sistem değişkenleri (144).

Emülsiyon Solvan Uçurma Yöntemi

Nanopartikül üretiminde en sık kullanılan yöntemlerden biridir ve temelde iki aşamadan oluşur. İlk aşama polimer çözeltisinin sulu (genellikle sürfaktan içeren) fazda emülsifikasyonudur. İkinci aşamada ise, polimerin çözücüsü olarak kullanılan organik çözücü, sulu faz üzerinden difüze olarak uçurulur ve organik çözücünün uzaklaşması ile nanoküre yapısındaki nanopartiküllerin oluşumu gerçekleşir. Oluşan nanopartiküller ultrasantrifüj ile toplanarak kalıntı polimer, stabilizer, sürfaktan veya yüklenmemiş etkin maddeden uzaklaştırılırlar (8).

Yöntem endüstriyelleştikçe yüksek basınçlı emülsifikasyon ve çözücü uçurma yöntemi olarak modifiye edilmiştir (155). Partikül boyutu işlem parametrelerinin kontrol edilmesiyle değiştirilebilir. Çoğunlukla hidrofobik yapılı yağda çözünebilen etkin maddelerde tercih edilmekle birlikte ölçek büyütme açısından bir takım kısıtlamalar da taşımaktadır (69).

2.4.1. Hedeflendirme

Hedeflendirme; etkin maddenin vücutta istenilen bölgeye, organa, dokuya veya hücreye gönderilebilmesidir. Bu durumda, ilaç bütün vücuda dağılmadan sadece etki etmesi istenen bölgeye gidebilmekte (156) ve böylece çok düşük ilaç miktarları ile terapötik etki sağlanarak ilaçların yan etkileri önlenmektedir. Nanopartiküllerin hedeflendirilmeleri pasif ve aktif olmak üzere iki şekilde olmaktadır:

Pasif Hedeflendirme

Partiküllerin ortalama partikül boyutu ve partikül şekilleri, pasif hedeflendirme stratejisinin temel esasıdır. Organlara doğal dağılım mekanizması ile gerçekleşir ve partiküllerin büyüklüklerine bağlı olarak farklı dokularda birikir. Partiküller sahip oldukları partikül boyutlarına göre farklı dokularda akümüle olmaktadır. Pasif hedeflendirme yaklaşımı çoğunlukla ayırım mekanizmalarının bulunduğu karaciğer, böbrek ve akciğer gibi organlara yapılmaktadır (157). Bununla birlikte kanserli dokunun bozulan damarlanma düzeninden (EPR) yararlanılarak da pasif hedeflendirme gerçekleştirildiği durumlar söz konusudur (157, 158). Normal damar yapısından geçemeyen nanopartiküller tümör dokusunun bozulmuş olan damarlarından geçerek tümör çevresinde birikir ve seçici bir ilaç taşınımı sağlarlar.

Nanopartiküllerin intravenöz olarak verildiklerinde, RES hücrelerinin fazla olduğu karaciğer, dalak, kemik iliğinde; deri altı ve kas içine verildiklerinde ise; böbrek ve barsaklarda yoğunlaştıkları, idrar ve feçes yoluyla atıldıkları gösterilmiştir. Bu amaçla pek çok çalışmada, taşıyıcı sistemlerin, RES hücreleri tarafından tutulmalarını engellemek için yüzeyleri PEG ile kaplanmış ve dolaşımda kalış süreleri uzatılmıştır (156, 159).

Aktif Hedeflendirme

Bu hedeflendirme şeklinde, ilacın hedef bölgeye yönlendirilebilmesi için nanopartiküler taşıyıcı sistem, hedef bölgedeki reseptörlerle birleşebilen spesifik bir molekülle kaplanır. Bu moleküller başlıca, küçük moleküller, monoklonal antikolar

ve bazı glikoproteinlerdir. Monoklonal antikorların antijen bağlayan bölgelerinden nanopartiküllere adsorbe olmaları, *in vivo* ilaç hedeflendirme çalışmalarında önemli rol oynamaktadır. Monoklonal antikorlar ile kaplanmış nanopartiküller, *in vitro* koşullarda da kanserli hücelere karşı hedeflendirilmede başarılı olmaktadır. Antikorun nanopartiküllere kovalan bağlarla bağlanmasının, serum proteinleri ile yer değiştirmelerini önlediği için etkili olduğu gösterilmiştir (160). Yapılan çalışmalarda avidin-biyotin kompleksine dayanarak, hedefli nanopartiküller geliştirilmiştir (55, 161).

2.5. Formülasyon Optimizasyonu

2.5.1. Plackett-Burmann Deney Tasarımı

Geleneksel şekilde süregelen deney tasarım yaklaşımlarının avantajları olduğu gibi bir takım dezavantajları da vardır. Daha detaylı bir analiz yaklaşımı olmasına rağmen, deneyin her aşamasında yalnız bir faktörü değiştirerek diğer tüm faktörleri sabit tutmak, değişken sayısının fazla olduğu durumlarda yapılması gereken deney sayısının çok fazla olmasını gerektirmektedir (162, 163).

Ayrıca konvansiyonel tasarımlar yalnızca temel etkiye odaklanır, ancak faktörler arası etkileşimlerin yanıt değişkenler üzerine etkileri de önemli bir parametredir. İstatistiksel deney tasarımlarında amaç, daha düşük sayıda deney ile daha fazla veri elde edebilmektir. Ürün optimizasyonu geleneksel tasarımlarda olduğu gibi istatistiksel tasarımlarda da gelişmiş grafikler ve veri kestirim metotları ile mümkündür (162, 164, 165).

Literatürde deney sayısını azaltmaya yönelik geliştirilmiş ve literatür çalışmalarında benimsenmiş çok sayıda tasarım modeli mevcuttur. Plackett-Burmann da bu tasarımlardan biridir ve çok sayıdaki değişkenin etkili ya da etkisiz olarak sınıflandırılmasında tercih edilen birinci dereceden bir tasarımdır (91, 166). Nanopartiküler sistem tasarımlarında da araştırmacılar tarafından son yıllarda daha sık kullanılan bir yöntemdir (52, 167, 168).

2.5.2. Box Behnken Deney Tasarımı

Box-Behnken deney tasarımı bir yüzey cevap metodolojisidir ve cevap değişkenlerinin optimize edilmesi amacıyla az sayıda faktör söz konusu olduğunda tercih edilmektedir (169). Bu tasarım ikinci dereceden bir model olup deney kombinasyonları kübik modelin kenarları ve kenarların orta noktalarından oluşmaktadır (170).

Bu tasarımda tüm faktörler üç düzey almaktadır. Her bir deneyde iki faktör uç değer alırken (düşük veya yüksek) bir faktör her zaman orta düzey almaktadır. Böylece, bu tasarım üç düzeyli bir tam faktöriyel tasarımın alt kümesi olmaktadır (171). Faktör kombinasyonlarında aynı anda tüm faktörler uç değerler almadığı için deneylerin fiziksel olarak yapılması açısından Box-Behnken deney tasarımı

literatürde tanımlanmış diğer tasarımlara göre avantajlıdır. Faktör sayısının artması ile deney sayısı da artmaktadır. Literatürde Box-Behnken deney tasarımının kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (172-177).

2.6. Kemik-Genel Bilgiler

2.6.1. Kemiğin Yapısı ve Görevi

Kemik dokusu, vücudu oluşturan dokular arasında en sert olup yaşayan ve gelişen, canlıda temel anlamda vücudu taşıyan dokudur. Ayrıca, organizmanın kalsiyum depolarıdır. Kalsiyum miktarı, kemiğin tipine ve bulunduğu bölgeye göre farklılık gösterir. Yüksek oranda kalsiyum içerdiklerinden dolayı daha sert bir yapıya sahip olmalarına rağmen, kıkırdak dokusundan farklı olarak bir damar sistemine de sahiptir. Kemik dokusunda farklı tipte hücreler (osteositler, osteoblastlar, osteoklastlar) ve hücrelerarası kısmı dolduran organik madde (matriks) bulunmaktadır (178).

Sağlıklı kemik dokusunun devamlılığı, kemik matriks formasyonundaki rezorbsiyon ve mineralizasyon arasındaki dengeye bağlıdır. Normal kemik fizyolojisinde yaşlı ve fonksiyonu olmayan kemik, osteoklastlar (yıkımdan sorumlu) tarafından rezorbe edilirken; osteoblastlar (yapımdan sorumlu) tarafından da yeni kemik oluşumu gerçekleştirilir. Osteositler, matriksin kavitelelerinde yerleşim gösterir (179).

Sağlıklı bir kemiğin toplam ağırlığının %30'a yakını matriksten, geri kalanı ise inorganik tuzlardan oluşur. Kemiğin organik matriksi, yüksek oran kollajen liflerden meydana gelmektedir ve bu kollajen liflerin fonksiyonu, kemiğin kırılma direncini azaltarak gerilme direnci sağlamaktır. Kollojenden geriye kalan organik kısım ise hücrelerarası sıvı, kondroitin sülfat ve hiyaluronik asit gibi proteoglikanlardan oluşur. Kemikte mineraller hidroksiapatit (HA) kristalleri halinde; kemik matriksine depolanan başlıca kalsiyum ve fosfattan $[Ca_5(OH)(PO_4)_3]$ oluşmaktadır (180).

Son yıllarda testosteron, siklosporin A ve antikanser ilaçların uzayan etkili sistemlerini hazırlamak için, ilaç taşıyıcı sistem olarak HA mikropartikülleri kullanılmıştır. Genellikle implante edilen bu sistemlerin kemiğe yerleştirildikten sonra uzun süreli salım sağlayarak etkinliğini göstermesi amaçlanmıştır (181-184).

Kemik dokusunda oluşan atıklar ve ulaşması beklenen tedavi edici moleküller, kalsiyum temelli inorganik matriksten kolaylıkla geçemez. Canlı kemik dokusunu oluşturan osteositler ve kan kapillerleri arasında kanalikül adı verilen

küçük kanalcıklar yer alır. Bu kanalcıklar içerisinde bulunan osteositlerin sitoplazmik uzantıları, kemiğin canlı dokusunun kapiller ve birbirleri ile iletişimde olmalarını sağlar (185).

2.6.2. Kemiğe İlaç Hedeflendirme Stratejileri

Kemiğe ilaç hedeflendirme stratejileri de pasif ve aktif olmak üzere iki başlık altında toplanmıştır. Pasif hedeflendirme; polimerik, lipozomal veya dendrimerik taşıyıcı sistemle enkapsüle edilen ilaçlarla yapılır. EPR etkisi olarak bilinen etkiyle nanopartiküllerin tümörlü dokuda geçirgen damar dokusu ve bozulmuş lenf dokusu nedeniyle tümörde toplanması yoluyla olur. Aktif hedeflendirme yaklaşımı ise spesifik doku veya organa etkin konsantrasyonda ilaç taşımaya mümkün kılmaktadır (30).

Kemik mineralize bir matriksten oluşması nedeniyle kemiğin yapısında bulunan bir madde olan hidroksiapatite hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi aktif hedeflendirmeyi sağlayabilmektedir. İn organik yapıya hedeflendirme için çeşitli moleküller kullanılmaktadır.

Osteoporoz tedavisinde etkin olarak kullanılan bisfosfonatlar (BP) da, hedeflendirmede kullanılan moleküllerden bir tanesidir. Ayrıca bisfosfonatlar tümör hücrelerinin hayatta kalmasını, çoğalmasını, tutunmasını ve taşınmasını azaltmaktadır (186).

HA kristalleri sadece diş ve kemik gibi sert dokularda bulunduğu için hedeflendirme için uygun bir odak olmaktadır. Literatürde bisfosfonat türleri ile yapılan hedeflendirmeye birçok örnek gösterilmiştir (187, 188).

Tetrasiklin, kalsein ve bisfosfonatlar kemiğin ana yapısı olan HA'ye güçlü afiniteleri ile bilinirler. Ancak, BPlar diğer gruplara oranla daha yüksek afinite göstermesi, fonksiyonel grupları ile polimerlerle reaksiyonlara girerek moleküllere kolayca bağlanabilmesi ve kendilerinin de tedavi edici etkilerinin olması gibi nedenlerle diğerlerinden ayrılmışlardır (189).

2.7. Bisfosfonatlar

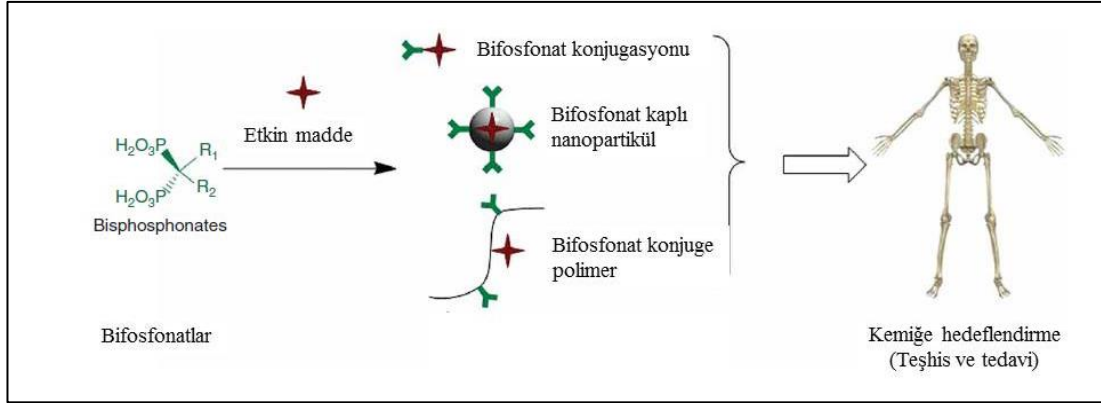
Bisfosfonatlar (BP), inorganik pirofosfatlara benzer yapıda olan sentetik bileşiklerdir. Birbirlerine fosfoester ile bağlı iki fosfat grubundan oluşurlar. Bu yapı onları hidrolize karşı dayanıklı hale getirir (189, 190). İlk olarak, 19. yüzyılın ortalarında formüle edilmiş ve kalsiyum karbonatın çökmesini önlemek amacıyla tekstil, gübre ve yağ sanayiinde boruların içerisinde kullanılmıştır. Kemik rezorbsiyonunu inhibe etmek gibi biyolojik etkileri daha sonra gösterilmiştir (190).

BPlar azot içeren ve azot içermeyen olmak üzere iki gruba ayrılırlar BPlar, fizyolojik dozlarda kullanıldıklarında sadece kemiğe etki ederler. Bunun nedeni kemiğe olan spesifik afiniteleridir. Yeni oluşan kemikte ve osteoklastların etrafında çökelişirler. Dolaşımdaki yarı ömürleri çok kısadır ancak kemik dokusunda 10 yıldan fazla kalabilirler. BPlar kemik üzerine çeşitli mekanizmalarla etki ederler (191).

BPlar, metabolize olmadıkları için kemik içerisinde çok uzun süre yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Günümüzde osteoporoz tedavisi ve maligniteye bağlı gelişen hiperkalseminin tedavisi olarak 2 temel endikasyonda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Kanser metastazına bağlı kan kalsiyum seviyesinin yükselmesi durumunun tedavisinde, BP uygulaması sık kullanılan bir yöntem olup, iskelete sıçrama sonucu oluşan komplikasyonların görülme sıklığını azaltır (192, 193).

Maligniteye bağlı hiperkalsemi tedavisinde BP uygulaması temel bir yöntemdir ve ayrıca iskelet metastazlarının tedavisinde iskelet komplikasyonlarının insidansını azaltırlar. BPların kemiğe olan spesifik afiniteleri göz önüne alınarak, kemik hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere kemiğe hedefli pek çok formülasyon geliştirilmiştir (192, 193).

Bisfosfonatların iskelet sistemine hedeflendirmede kullanılmasında uygulanan yaklaşımlar şematik olarak Şekil 2.10'da sunulmuştur. Bisfosfonatlar doğrudan ilaç molekülüne kovalan bağlanarak bir ön ilaç haline getirilebilmekte, içerisinde tedavi edici ilaç molekülünü taşıyan taşıyıcı bir sistem üzerine kaplanmasıyla yada çoklu fonksiyonel grubu olan polimerlerin farklı bölgelerine hem etkin madde hem de hedeflendirici bisfosfonatın bağlanması ile hedeflendirme şekilleri mevcuttur (194).



Şekil 2.10. Bisfosfonatların ilaç hedeflendirme stratejilerinde kullanımları (194).

Uludağ ve ark.(195-197), sıçanlarda yaptıkları *in vivo* çalışmalar sonucunda, BP ile konjuge ettikleri proteinler ile sadece protein içeren çözeltileri kıyaslamışlar, konjuge proteinlerin kemiğe yüksek afinite göstermeleri nedeniyle kemik yapımını 10 kat fazla hızlandırdıklarını ortaya koymuşlardır. Yapılan çalışmalar, BP ile bağlanan antikanser ilaçların, kemik metastazları üzerine klasik formülasyonlardan daha etkili olduğunu göstermiştir.

Zhang ve ark. (198, 199), hazırladıkları polimer-BP konjugatları ile modifiye edilmemiş polimerlerin, HA ile afinite çalışmalarını kıyaslamışlar ve BPlar ile kemige hedeflemenin başarılabilirdiği sonucunu bulmuşlardır.

2.7.1. Alendronat

Alendronat (ALD) azot içeren bisfosfonatlar grubundan olup, bu grubun kemik kaybını önlemenin dışında, kemiğin güçlenmesini de sağlayan ilk ilacıdır. BP yapısında yapılan küçük değişiklikler, her bir bileşiğin fizikokimyasal, biyolojik, terapötik ve toksikolojik karakteristiklerinde önemli bireysel değişikliklere neden olur. ALD, kemik rezorpsiyonunu ilk jenerasyon ilaç olan etidronata göre daha güçlü bir şekilde inhibe eder (200).

Deneysel hayvan çalışmalarında ALD'nin anti rezorpsiyon gücü, pamidronat'tan 100 kat ve etidronat'tan 1000 kat daha fazladır. İnsanlarda, 10 mg ALD'nin tümöre bağlı kemik hastalığında ortaya çıkan hiperkalsemiyi azaltmadaki etkinliği, yaklaşık 1500 mg etidronat'a eşdeğerdir. ALD, klinikte postmenopozal kadınlarda görülen osteoporozun ve Paget hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır.

Hiperkalseminin tedavisindeki etkinliği de araştırılmaktadır (200, 201).

Alendronat kemikte HA'e bağlanır ve özellikle kemik rezorpsiyonu yapan hücreler olan osteoklastların aktivitesini inhibe eder (201). Osteoklastların birikmesi ve birbirlerine bağlanmalarıyla herhangi bir etkileşme göstermez. Kemiklerin rezorpsiyonu kemikle temas halindeki osteoklastların rezorpsiyon yapan pürüzlü kenarları aracılığı ile olur. Alendronat özellikle osteoklastların altındaki bu rezorpsiyon bölgelerinde lokalize olarak rezorpsiyona engel olur. Alendronatın aktivitesi, matriksin içine gömülene değin yaklaşık 3 hafta kadar devam eder. Buna rağmen alendronat yıllarca HA'e bağlı kalır. Hayvan çalışmaları alendronatın kemik dönüşümünü (*turnover*) azalttığını göstermiştir.

Alendronatın HA'e olan afinitesinden faydalanılarak kemiğe hedefli formülasyonlar tasarlanması araştırmalarda dikkat çeken bir konu haline gelmiştir. Choi ve Kim (202), hazırladıkları PLGA nanopartiküllerinin yüzeyini alendronat (hedefleyici ajan) ve PEG (hidrofilik ajan) ile modifiye etmişler, yaptıkları *in vitro* çalışmalar sonucunda; alendronat içeriğinin artmasıyla HA yüzeyine adsorbe olan nanopartikül miktarının arttığını ve PEG zincir uzunluğunun alendronat aktivitesini etkilediğini bulmuşlardır.

Pano ve ark. (203) ise farklı molekül ağırlıklarında hidroksi propil metakrilamit-alendronat konjugatları hazırlayarak kemiğe hedefli yeni bir sistem hazırlamışlar ve 50-100 kDa arasında molekül büyüklüğüne sahip olanlar ile farelere uygulanan formülasyonlarda optimum hedefleme sağlandığını bulmuşlardır (201, 204).

Burada belirtilen bilgiler ışığında, gerçekleştirilen bu tez çalışması kapsamında doksorubisin ve selekoksibin tedavi edici ilaç molekülleri olarak, PLGA'in nanopartikül polimeri olarak, alendronatın ise hedeflendirici molekül olarak seçildiği bir taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Deney tasarımı modellerinden yararlanılarak elde edilen optimum formülasyon *in vitro* ortamda kalsiyum ve hidroksiapatit afinite testleri ile ve sitotoksisite çalışmaları ile incelenmiştir. *In vivo* olarak ise hayvanlardaki organ dağılımı açısından değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmaların metodolojisi ve elde edilen bulgular sırasıyla ilerleyen bölümlerde sunulmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal/Biyolojik Maddeler

Madde	Marka
Aseton	Sigma Aldrich A.B.D.
Asetonitril	Sigma Aldrich A.B.D.
Bakır Sülfat	Sigma Aldrich A.B.D.
DMSO	Sigma Aldrich A.B.D.
Doksorubisin hidroklorür	Hisun Pharma,
Etanol	Sigma Aldrich, A.B.D.
FBS	Lonza, İsviçre
Glasiyal asetik asit	Sigma Aldrich A.B.D.
ICG	Sigma Aldrich A.B.D.
L-glutamin	Lonza İsviçre
NaCl	Merck, Türkiye
Nitrik asit	Sigma Aldrich A.B.D.
Penisilin-Streptomisin	Lonza İsviçre
pH 7,4 Tris tampon	Sigma Aldrich A.B.D.
PLGA 502 H	Sigma Aldrich A.B.D.
PLGA 503 H	Sigma Aldrich A.B.D.
PVA	Sigma Aldrich, A.B.D.
Selekoksisib	Santa Cruz Biotech , A.B.D.
Tetrahidrofuran	Sigma Aldrich A.B.D.

Trietil amin	Sigma Aldrich A.B.D.
Tripsin EDTA	Lonza İsviçre
Yüksek Glukozlu DMEM	Lonza, İsviçre
WST-1 Reagent	Sigma Aldrich A.B.D.

3.2. Kullanılan Cihaz ve Ekipmanlar

Cihaz/Yazılım	Marka/Program Adı
Atomik Kuvvet Mikroskobu	Veeco, A.B.D. (ODTU Merkez Laboratuvarı)
Çizim yazılımları	ChemDraw 15, SketchUP2016
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	Variomag Telesystem, Almanya
Floresan Mikroskop	Leica, Germany
FTIR Cihazı	Bruker, A.B.D.
Hassas Terazı	Mettler Toledo, İsviçre
HPLC Kolonu	GL Sciences, Japonya
In vivo Görüntüleme Sistemi	Perkin Elmer IVIS Lumina, A.B.D. (Ege Üniversitesi, ARGEFAR)
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	IKA, Almanya
İnkübatör	Sanyo, Japonya
İstatistik yazılımı	Minitab 16
Laminar hava akımlı kültür kabini	Faster, İtalya
Lcsolutions Yazılımı	Shimadzu, Japonya
Liyofilizatör	Jouan, Danimarka
Mikropipetler	Ependorf, Almanya
Manyetik Rezonans Spektrometresi	AVANCE III 400 MHz Bruker, A.B.D. (Giresun Üniversitesi, GRUMLAB)
Modüler Prominence Seri HPLC sistemi	Shimadzu, Japonya
Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Ölçüm Cihazı	Malvern Instruments, İngiltere
Resim düzenleme yazılımı	ImageJ, Image Plus,

Rotovapor	IKA, Almanya
Ultra Santrifüj Aleti	Hermle Z383 K, Almanya
Termostatlı Yatay Çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Transmisyon Elektron Mikroskobu	FEI Company, Hollanda (ODTU Merkez Laboratuvarı)
Ultra Saf Su Sistemi	Milipore, A.B.D.
UV spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Vorteks	IKA, Almanya

3.3. Miktar Tayininde Kullanılan Analitik Yöntem

3.3.1. Kullanılan Ekipman ve Kromatografik Sistem Şartları

Doksorubisin ve selekoksib moleküllerinin analizi için izokratik RP-HPLC metodu geliştirilmiş ve ICH gerekliliklerine göre valide edilmiştir. Etkin maddelerin *in vitro* koşullardaki kantitatif yükleme kapasitesi analizlerinde ve hazırlanan nanopartiküllerden etkin madde salım çalışmalarında Shimadzu Prominence Seri modüler, HPLC sistemi kullanılmıştır. Cihaz dörtlü mobil faz pompa sistemi, otomatik örnekleyici, ısıtıcı/soğutucu kolon fırını ve floresan dedektör (RF20A) segmentinden oluşmaktadır.

Analiz yönteminde hareketli faz olarak trietilamin ile pH 3.0'e ayarlanmış %1 (h/h) asetik asit içeren ultrasaf su ve asetonitril (60:40, h:h) karışımı kullanılmıştır. Sabit faz olarak ise Inertsil ODS 3 C₁₈ (250m x 4.6 mm, 5 µm partikül büyüklüğü) içeren kolon tercih edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL ve akış hızı 1 mL / dak olarak ayarlanmıştır. Analiz esnasında kolon sıcaklığı 25°C olarak ayarlanmıştır. Deteksiyonda ise floresans dedektör kullanılarak, ilk on dakika eksitasyon dalga boyu 480 nm ve emisyon dalga boyu 590 nm olarak ayarlanarak doksorubisin piki gözlenmiş olup, analizin ikinci kısmında ise eksitasyon dalga boyu 240 nm ve emisyon dalga boyu 380 nm olarak ayarlanarak selekoksib saptanmıştır. Sonuçlara ait integrasyon işlemleri LCsolutions Software yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Kullanılan Analitik Yöntemin Validasyon Parametreleri

Etkin maddelerin *in vitro* miktar tayin yönteminin validasyonuna yönelik olarak yapılan bu çalışmada doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik), özgünlük ve duyarlılık gibi analitik validasyon parametreleri ayrı ayrı incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak yorumlanmıştır. Analitik yöntem validasyonu, ICH Q2 (R1) analitik metod validasyonu kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler ve grafiklerin çizimi için Microsoft Office 2010 Excel programı kullanılmıştır (205, 206).

Sistem Uygunluğu

Sistem uygunluk testi kromatografik sistemin performansını değerlendirmek için 5 µg/ml konsantrasyonda doksorubisin ve selekoksib standart çözeltisi kullanılarak yapılmıştır ($n = 6$).

Özgünlük

Analitik yöntemin amaçlanan bileşen veya bileşenleri tayin edebilme yeteneği olup sayısal bir değeri bulunmamaktadır. Özgünlük her iki etkin maddenin cevap oluşturduğu aralık ve dalga boyları için incelenmiştir.

Analizi yapılan etkin maddenin yanıt verdiği zamanda başka bir bileşige ait yanıt yoksa yöntem **özgün** olarak değerlendirilmektedir. Dolayısıyla analiz edilen bileşige ait cevap, ortamda bulunabilecek diğer formülasyon bileşenlerinin olası cevaplarından kaynaklanabilecek girişimden uzak olmalıdır.

Özgünlük parametresinin kontrolü amacıyla; etkin madde içermeyen formülasyona ait salım ortamları analiz edilerek aynı retansiyon zamanında çıkışan piklerin varlığı incelenmiştir.

Duyarlılık

Analiz yönteminin duyarlılığının belirlenmesine yönelik olarak kantitasyon/ölçüm limiti (LOQ) ve deteksiyon limitleri (LOD) incelenmiştir.

LOD analiz yöntemi uygulanırken elde edilen kromatogramlardaki sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon bulunarak LOQ ve benzer bir şekilde sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon tespit edilerek LOD belirlenmiştir.

Doğrusallık ve Aralık

Doğrusallık, beklenen çalışma konsantrasyonunu içerecek şekilde (1-11µg/mL) aralıkta, farklı konsantrasyonlardaki madde çözeltisinin oluşturacağı pik alanları arasında doğrusal bir ilişki olup olmadığının tespitidir.

Seçilen konsantrasyon aralığında artan konsantrasyon ile doğru orantılı olarak artan pik alanının arasındaki ilişkinin doğrusal olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bu

amaçla artan konsantrasyonlarda hazırlanan kalibrasyon noktaları üzerinden analiz yapılmış ve elde edilen pik alanları bu konsantrasyonlara karşı doğrusal regresyona tabi tutulmuştur. Sonuçta kalibrasyon denklemi ve bu denklemin tanımlayıcılık katsayısı hesaplanmıştır

Doğruluk

Geliştirilen analitik yöntem ile elde edilen verilerin, gerçek konsantrasyona benzerliğinin ispatlanması amacıyla yapılmaktadır. Seçilen üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek konsantrasyon) (1, 5 ve 11 µg/mL) hazırlanan etkin madde çözeltileri HPLC ile analiz edilerek sonuçların gerçek değerlere olan yakınlıkları incelenmiştir.

Keskinlik

Keskinlik geliştirilen analiz yöntemi ile ardışık şekilde yapılan ölçümler arasındaki beklenen benzerliğin test edilmesidir. Çalışma aralığı içerisinde bulunan üç farklı konsantrasyonda (1, 5 ve 11 µg/mL) örnekler, birbiri ardına analiz edilir ve sonuçlar aritmetik ortalama ve relatif standart sapma hesaplanarak değerlendirilmektedir.

Keskinlik parametresi temelde iki parametre üzerinden incelenmektedir:

Tekrarlanabilirlik

Aynı laboratuvar, aynı personel ve aynı ekipman kullanılarak gerçekleştirilen ölçümlerde uyum ve uygunluğunun incelenmesidir. Tekrarlanabilirliğin gösterilmesi için 3 farklı konsantrasyon (1, 5 ve 11 µg/mL) seçilerek 6 defa ardışık ölçümler yapılmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi yapılarak relatif standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Tekrar Elde Edilebilirlik

Geliştirilen analitik yöntemin farklı analiz günlerinde güvenilirliğinin test edilmesi için yapılmaktadır. Etkin maddelerin 3 farklı konsantrasyondaki (1, 5, 11 µg/mL) çözeltilerinden 2 farklı günde HPLC analizi yapılarak elde edilen değerlerin standart sapma ve varyasyon katsayıları hesaplanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.4. Nanopartiküllerin Hazırlanması

3.4.1. Başlangıç Formülasyonu Deneme Çalışmaları

Başlangıçta hangi organik çözücü kullanılarak nanopartikül üretimi yapılacağına dair bir ön çalışma gerçekleştirilmiştir. Polimer olarak PLGA seçilmiş olan organik faz sistemi olarak ise aseton, tetrahidrofur (THF) ve dimetilsülfoksit (DMSO) denemesi yapılarak, partikül boyutu ve etkin maddelerin yüklenme oranları açısından değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda sonraki işlemlerde polimer çözücüsü organik faz olarak aseton kullanılmıştır.

3.4.2. Etkin Madde Yüklü Olmayan Nanopartiküllerin Hazırlanması

Nanopartiküller (NP) solvan değişim esasına göre oluşum sağlayan nanopresipitasyon yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Polimer, su ile karışabilen bir organik solvan olan asetonda çözündürülür ve manyetik karıştırıcıda poli vinil alkolün (PVA) sudaki çözeltisi üzerine damla damla eklenerek karıştırılır. Asetonun suyla karışması ve PLGA'in çözünürlük değerinin düşmesi ile nanopartiküller oluşur. Nanopartiküller aseton su karışımında disperse halde iken aseton rotavapor ile vakum uygulanarak ortamdan uzaklaştırılır. Asetonun uzaklaşmasını takiben nanopartiküller (24.000 g, 30 dakika) santrifüjlenerek toplanır. PVA'nın ve nanopartikül oluşturmamış polimer kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla partiküller bir kez ultra saf su ile yıkanılır ve tekrar disperse edilirler. Elde edilen nanopartikül dispersiyonu vakit kaybetmeksizin dondurulur ve 48 saat süresince liyofilizasyon yolu ile suyu uzaklaştırılarak kurutulur.

3.4.3. Etkin Madde Yüklü Nanopartiküllerin Hazırlanması

Etkin madde olarak kullanılan Doksorubisin HCl suda çözünürlüğü yüksek oldukça hidrofilik bir moleküldür. Doksorubisin HCl'in PLGA'in çözündürüldüğü organik faz olan asetonda çözünürlüğünün sağlanabilmesi için ilk olarak 0.01 N NaOH çözeltisi ile 1 dakika inkübe edilmiştir (207). Etkin maddenin non iyonik halde olduğu alkali çözeltisi PLGA'nın asetondaki karışımına eklenmiştir. Selekoksisib ise organik çözücülerde çözünürlüğü yüksek bir moleküldür ve aseton çözeltisi içerisine herhangi bir ön işleminden geçirilmeden, doğrudan ilave edilmiştir.

Dokсорubisin, selekoksib ve PLGA'in asetondaki çözeltisi manyetik karıştırıcıda damla damla PVA çözeltisi üzerine ilave edilmiştir. İşlem sonrasında vakum altında aseton uzaklaştırılmıştır. Nanopartiküller 24.000g de 30 dakika santrifüjlenerek toplanmıştır. Santrifüj tüpünde toplanan nanopartiküller, kalıntı maddeleri uzaklaştırmak için ultrasaf su ile yıkanmıştır. Sonrasında nanopartikül süspansiyonu dondurulmuş ve liyofilizasyon ile 48 saat süresince kurutulmuştur. Karakterizasyon çalışmaları suda yeniden disperse edilen nanopartiküller kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. Alendronat Kaplı Nanopartiküllerin Hazırlanması

Alendronat kaplı nanopartiküller ise aynı nanopresipitasyon metodunun modifiye edilmesi ile üretilen aktive edilmiş nanopartiküllerden elde edilmiştir. Benzer şekilde polimer ve etkin maddelerin çözündürülmüş olduğu aseton, PVA'nın bis(sülfosüksinimidil)subarat (BS3) içeren sudaki çözeltisine damla damla ilave edilmiştir. Organik çözücü olan aseton ortamdan vakum altında uzaklaştırılmış ve nanopartiküller 24.000g'de 30 dakika boyunca santrifüjlenerek toplanmıştır. Nanopartikül daha önce belirtildiği şekilde yıkanmış ve liyofilizasyon ile kurutulmuştur.

Tablo 3.1. Alendronat Kaplama Çalışmalarında Kullanılan nanopartikül ve alendronat oranları

Formülasyon Kodu	NP:ALE Oranı (a/a)
NP-ALE-A	1: 0,5
NP-ALE-B	1:0,7
NP-ALE-C	1:1,0
NP-ALE-D	1:1,5
NP-ALE-E	1:2,0

Liyofilizasyon sonrasında tartılmış miktar nanopartikül ultrasaf suda disperse edilip ve eşit hacimdeki alendronat çözeltisi ile karıştırılarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Tablo 3.1’de gösterilen farklı oranlarda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. 30 dakika sonrasında 100 μ L pH 7,4 Tris tamponu ilave edilerek kaplama operasyonu sonlandırılmıştır. Nanopartiküller kaplanmamış alendronattan santrifüjlenerek ayrılmışlardır. Supernatantta yer alan alendronat miktarı kompleksleştirme prosedürü sonrasında (1,5mM CuSO₄, 1,5mM HNO₃). 235 nm’de spektrofotometrik olarak UV spektrofotometre ile tespit edilmiştir (208). Supernatantta yer alan alendronat miktarı toplam alendronattan çıkartılarak nanopartikül yüzeyine yerleşen alendronat miktarı hesaplanmıştır.

3.5. Formülasyon Optimizasyonu

3.5.1. Kritik Formülasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Formülasyon parametrelerinin etki düzeylerini belirleyebilmek ve ileri analizlere etkili olan parametreler ile devam edebilmek için; kritik kalite parametrelerine etkisi olabileceği düşünülen sekiz formülasyon parametresi iki seviyeli bir Plackett-Burmann tasarımı ile incelenmiştir. Formülasyon parametrelerine ait düşük ve yüksek değerlerin seçiminde, ön formülasyon çalışmalarında yapılan denemeler ve literatür bilgisi rol almıştır. Seçilmiş olan formülasyon faktörleri, faktörlere ait değerler ve kodlar Tablo 3.2.'de belirtilmiştir.

Seçilen parametrelerin incelenmesi için Minitab16 (Minitab Inc.; State College, PA, ABD) yazılımı kullanılarak randomize bir çalışma matrisi oluşturulmuştur. Rastgele sıralamayla üretilen toplam 12 farklı formülasyonun yanıt değerlerinin ölçülmesi ve istatistiksel değerlendirmenin yapılması ile, etkili olan parametreler ve etki düzeyleri saptanmıştır (Tablo 3.3.).

Tablo 3.2. Plackett-Burman ve Box-Behnken Tasarımlarında Kullanılan Bağımsız Değişkenler

Plackett-Burman Dizayını	Düşük Seviye	Yüksek Seviye	Birim
X ₁ : Dox Miktarı	2	4	mg
X ₂ : Cxb Miktarı	5	10	mg
X ₃ : PLGA Miktarı	30	100	mg
X ₄ : Organik Faz Hacmi	2	5	mL
X ₅ : PVA Konsantrasyonu	0,5	1	%
X ₆ : PLGA MA	7-17	24-38	kDa
X ₇ : Karıştırma Hızı	500	100	rpm
X ₈ : Damlatma Hızı	1	2	dps (damla/saniye)

Box-Behnken Dizayını	Düşük Seviye	Orta Seviye	Yüksek Seviye	Birim
x ₁ : Dox Miktarı	2	3	4	mg
x ₂ : Cxb Miktarı	5	7,5	10	mg
x ₃ : PLGA Konsantrasyonu	15	32,5	50	mg/mL

Formülasyonlar 3 tekrarlı olacak şekilde üretilmiş ve analiz edilmişlerdir. Araştırılan kritik kalite parametreleri Yükleme Kapasitesi-Dox (%) (Y_1), Yükleme kapasitesi-Cxb (%) (Y_2) ve ortalama partikül büyüklüğü (nm) (Y_3) olarak belirlenmiştir. Bu yanıtların yanı sıra PDI ve zeta potansiyeli değerleri de ölçülmüştür.

Plackett Burmann tasarımı ile amaçlanan temel nokta formülasyon üzerine etkili parametrelerin hangileri olduğunu tespit edebilmektir. İleri değerlendirme analizleri ise yüzey cevap metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş olup bir sonraki bölümde açıklanmıştır.

Tablo 3.3. Plackett–Burman Tasarımı Deney Matrisi ile Oluşturulan 12 Formülasyon

Formülasyon Kodu	X ₁ (mg)	X ₂ (mg)	X ₃ (mg)	X ₄ (mL)	X ₅ (%)	X ₆ (kDa)	X ₇ (rpm)	X ₈ (dps)
PB 01	4	5	100	2	0,5	7-17	1000	2
PB 02	4	10	30	5	0,5	7-17	500	2
PB 03	2	10	100	2	1	7-17	500	1
PB 04	4	5	100	5	0,5	24-38	500	1
PB 05	4	10	30	5	1	7-17	1000	1
PB 06	4	10	100	2	1	24-38	500	2
PB 07	2	10	100	5	0,5	24-38	1000	1
PB 08	2	5	100	5	1	7-17	1000	2
PB 09	2	5	30	5	1	24-38	500	2
PB 10	4	5	30	2	1	24-38	1000	1
PB 11	2	10	30	2	0,5	24-38	1000	2
PB 12	2	5	30	2	0,5	7-17	500	1

3.5.2. Formülasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Plackett Burmann tasarımı kullanılarak en etkili parametreler tespit edildikten sonra, kritik formülasyon değişkenleri yüzey cevap analiz yöntemine göre tekrar detaylı olarak analiz edilmişlerdir. Plackett Burmann tasarımı sonrasında istenilen yanıtlar için kritik formülasyon parametreleri olarak formülasyona giren doksorubisin miktarı, selekoksib miktarı, PLGA miktarı ve organik faz hacmi olarak tespit edilmiştir. İleri irdelemede incelenen parametre sayısını minimize ederek aynı

sayıda deney ile daha kesin, daha kabul edilebilir kestirim sağlayabilmek açısından PLGA miktarı ve organik faz hacmi parametrelerinin bir fonksiyonu olarak PLGA konsantrasyonu üçüncü kritik parametre olarak belirlenmiştir. Bu amaçla üç faktörlü ve üç seviyeli Box Behnken Dizayn (BBD) matrisi oluşturularak nanopartikül formülasyonu uygulanmıştır. Bu doğrultuda 3 değişkenin ve seviyelerinin etkilerinin incelendiği 15 formülasyon ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Tasarımda faktörlerin ana etkileri, faktörlerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin etkileri ve faktörlerin kendileri ile olan ikinci derece etkilerinin yanıt değişkenler üzerinde gerçekleştirdikleri değişiklikler incelenmiş ve istatistiksel olarak analiz edilmişlerdir. Yanıt değişken olarak Yükleme Kapasitesi-Dox (%) (Y_1), Yükleme Kapasitesi-Cxb (%) (Y_2) ve ortalama partikül büyüklüğü (nm) (Y_3) ölçülmüştür. Hazırlanan formülasyonlara ait yüzey yükü-zeta potansiyeli ve PDI değerleri de ölçülmüş olup optimizasyon tasarımına enkorporasyon edilmemişlerdir. Bu iki yanıt üzerine anlamlı derece etkili olan formülasyon parametresi tespit edilememiştir. Bu iki parametre polimer tipi, kullanılan etkin maddeler ve üretim metoduna bağlı değişebilecek parametreler olup bu çalışma amacı dâhilinde incelenmemişlerdir.

BBD oluştururken kullanılan yüksek ve düşük değerler Plackett-Burmann tasarımında kullanılan değerlerin aynısı olarak seçilmiştir. Orta değerler ise bu iki değerlerin orta noktası olarak belirlenmiştir. PLGA miktarı ve organik faz hacmi parametreleri bir arada değerlendirilerek PLGA konsantrasyonu olarak incelenmiş ve organik faz hacmi 2 mL olarak sabitlenmiştir. PLGA konsantrasyonunun alt ve üst değerleri de yine PBD'da kullanılan miktarlar ile aynı olacak şekilde seçilmiştir. Bağımsız değişkenlere ait değerler ve kodları Tablo 3.1 de sunulmuştur.

Yanıt faktörlerinden her biri aşağıdaki non-lineer eşitlikte belirtilmiş olan üssel bir polinomial model ile örtüştürülmüştür.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_4x_1x_2 + \beta_5x_1x_3 + \beta_6x_2x_3 + \beta_7x_1^2 + \beta_8x_2^2 + \beta_9x_3^2$$

Eşitlikte, Y cevap değişkeni temsil ederken; x_1 , x_2 , x_3 bağımsız değişkenlere ait ana etkileri; x_1x_2 , x_1x_3 , x_2x_3 bağımsız değişkenlerin birbirleriyle etkileşimlerinden kaynaklanan etkileri ve x_1^2 , x_2^2 , x_3^2 ise faktörlerin üssel etkisini ifade etmektedir. β_0 eşitlik sabiti ve $\beta_1 - \beta_9$ ise faktörlere ait regresyon katsayılarını ifade etmektedir.

Tablo 3.4. Box-Behnken Tasarımı Deney Matrisi ile oluşturulan 15 formülasyon

Formülasyon Kodu	x ₁ (mg)	x ₂ (mg)	x ₃ (mg/mL)
BB 01	2	10	32,5
BB 02	4	10	32,5
BB 03	2	7,5	50
BB 04	4	7,5	15
BB 05	2	5	32,5
BB 06	2	7,5	15
BB 07	3	7,5	32,5
BB 08	3	7,5	32,5
BB 09	3	10	15
BB 10	3	7,5	32,5
BB 11	3	10	50
BB 12	4	7,5	50
BB 13	4	5	32,5
BB 14	3	5	50
BB 15	3	5	15

Diğer taraftan PBD tasarımında etkileri istatistiksel olarak anlamsız bulunan, BBD matrisinde yer alan formülasyonların üretimi gerçekleştirilirken, geriye kalan 4 proses değişkeni sabitlenmiştir. (Polimer molekül ağırlığı: 7-17 Da, PVA konsantrasyonu:%0,5, Karıştırma hızı: 1000rpm, Damlatma hızı: 1 damla/saniye)

Faktörlere ve yanıt değişkenlere ait polinomial eşitlikler oluşturulduktan sonra ise formülasyon optimizasyonu Minitab yazılımında yer alan optimizasyon aracı ile gerçekleştirilmiştir. Yazılım tarafından oluşturulan optimum formülasyon ileri karakterizasyon çalışmaları için kullanılmıştır.

Tablo 3.5. Plackett-Burman ve Box-Behnken Deney Tasarımlarından Elde Edilen Yanıt Değerler

Kod	Yanıt	Birim
Y ₁	: Yükleme Kapasitesi-Dox	%
Y ₂	: Yükleme Kapasitesi-Cxb	%
Y ₃	: Ortalama Partikül Boyutu	nm
Y ₄	: Zeta Potansiyeli	mV
Y ₅	: Poli Dispersite İndeksi	-

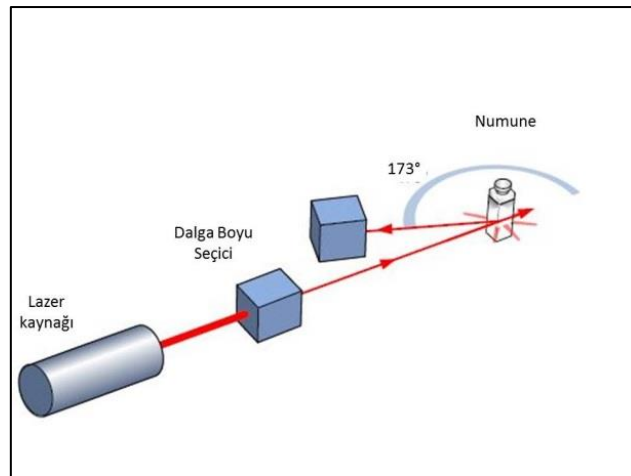
3.6. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.6.1. Partikül Büyüklüğü Ölçümü

Nano boyutlu partiküllerin partikül büyüklük ve dağılım ölçümlerinde farklı yöntemler kullanılmakla birlikte, hidrodinamik çap bilgisini veren foton korelasyon spektroskopisi-dinamik ışık saçılımı yöntemi en sık kullanılan yöntemlerdendir. Bu yönteme ilave olarak mikroskopik yöntemler de ölçülen değerlerin kontrolü ve başka bir yöntemle desteklenmesi amacıyla kullanılmaktadırlar. (TEM, SEM, AFM)

Dinamik Işık Saçılımı

Nanopartiküllerin partikül boyutunun ölçümü, bu amaçla sıklıkla kullanılan, dinamik ışık saçılımı esasıyla çalışan Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., İngiltere) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihazın ölçüm prensibi doğrultusunda, 173° geri yansıyan açıda sinyal toplanarak ölçüm yapılmıştır. Partikül boyutu ölçümü liyofilize edilmiş nanopartiküllerin ultrasaf su içerisinde otomatik pipet yardımıyla disperse edilerek, tek kullanımlık partikül boyutu ölçüm küvetleri ile 25°C 'de yapılmıştır. Her numune üç kez ölçülerek z-ortalama (ortalama partikül boyutu) değerleri ve polidispersite indeksleri (PDI) bu üç ölçüm üzerinden hesaplanmıştır. Ortalama değerler ve partikül boyut dağılımının bir göstergesi olan PDI değerleri Zetasizer Software 7.11 (Malvern Instruments Ltd., İngiltere) yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. DLS Dinamik Işık Saçılımı ile partikül boyutu ölçüm çalışma ilkesinin şematik gösterimi.

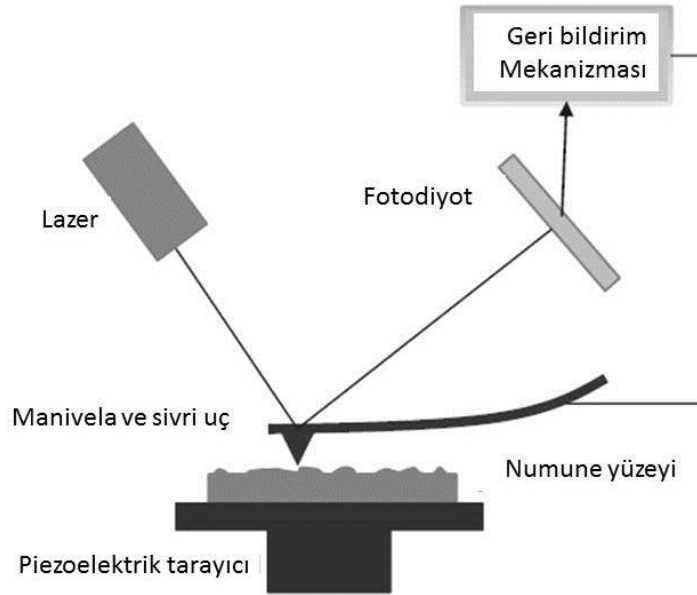
Geçirmeli Elektron Mikroskobisi (TEM)

Nanopartiküllere ait TEM görüntüleri FEI Tecnai, G² Spirit BioTwin (CTEM, USA) elektron mikroskobu ile alınmıştır.

Ultrasaf su içerisinde disperse edilen nanopartiküller, karbon kaplı bakır grid (300 mesh, Ø 3 mm) üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmışlardır. Görüntüler 120kV güçte alınmıştır.

Atomik Kuvvet Mikroskobisi

Nanopartiküllerin şekilsel ve yüzeysel özelliklerini incelemek için atomik kuvvet mikroskopisinden yararlanılmıştır. Çalışmada Veeco MultiMode (Plainview, ABD) mikroskobu kullanılmıştır. Görüntüleme öncesinde 1 damla nanopartikül süspansiyonu 1 x 1cm boyutunda cam yüzey üzerine spin kaplama prosesi ile sabitlenmiş ve yayılmıştır. Oda sıcaklığında Numune kuruduktan sonra, analizler gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 AFM nin çalışma ilkesinin şematik gösterimi (209).

3.6.2. Zeta Potansiyeli Ölçümü

Zeta potansiyeli kolloidal parçacıkların yüzey yüküne dair önemli bir parametre olup, kolloidal yapının stabilitesi açısından kritik bir değerdir. Analizler Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., İngiltere) cihazı ile tek kullanımlık kıvrımlı kapiler elektroforez hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Liyofilize partiküller ölçüm öncesinde utrasaf su içerisinde süspande edilmiştir ve örneklerin tümü için zeta potansiyeli üç defa ölçülmüştür. Ölçümler her örnek için üç kez tekrar edilerek ortalama değerler kullanılmıştır.

3.6.3. Yükleme Kapasitesi Ölçümü

Yükleme kapasitesi nanopartikül içine enkapsüle edilmiş etkin madde miktarının liyofilize formda elde edilmiş nanopartikülün toplam ağırlığına oranı şeklinde hesaplanmıştır. Bu amaçla tartılan nanopartiküller 2 mL DMSO içerisinde çözündürüldükten sonra, 0,22 µm politetrafloroetilen (PTFE) şırınga filtresinden süzöldükten sonra HPLC analiz sistemi ile analizi gerçekleştirilmiştir. Her bir analiz üç kez tekrarlanmış olup, yükleme kapasitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Yükleme Kapasitesi (\%)} = \frac{\text{NP içine enkapsüle edilmiş ilaç miktarı}}{\text{Tartılmış olan liyofilize NP miktarı}} \times 100$$

3.6.4. *In vitro* Etkin Madde Salım Çalışmaları

Etkin maddelerin kanda serbestleşme kinetiklerini simüle edebilmek amacıyla, *in vitro* ortamda gerçekleştirilen ilaç salım çalışmalarında nanopartiküller PBS pH 7,4 ortamında endorf tüpler içerisinde disperse edilmiş ve çalkalamalı su banyosunda inkübe edilmişlerdir. Banyo sıcaklığı 37°C ve çalkalama hızı 100 rpm olarak ayarlanmıştır. Belirlenmiş zaman noktalarında, tüpler santrifüjlenerek (24.000g, 30 dak) örnekler alınmıştır. Üst fazdan alınan örnekler ilaç salım hızını tespit edebilmek için daha önce belirtilmiş olan HPLC sistemi ile analiz edilmiştir.

3.6.5. ³¹P-NMR Spektroskopik Analizi

PLGA nanopartiküllere ve alendronat kaplı PLGA nanopartiküllere ait ³¹P-NMR spektrumları AVANCE III 400 MHz nükleer manyetik rezonans spektrometresi (Bruker, Biospin) ile alınmıştır. Örnekler d₆-DMSO içerisinde 40 mg/mL konsantrasyonda çözülerek analize alınmıştır.

3.6.6. Geçimlilik Çalışmaları

Nanopresipitasyon işlemi esnasında etkin maddelerin birbirleriyle ve PLGA ile oluşabilecek olası etkileşimlerini değerlendirmek için formülasyonda yer alan maddelerin ve hazırlanan nanopartiküllerinin FTIR spektrumları alınmıştır. Spektrumlar ALPHA FTIR spektrometre ile (Bruker; Massachusetts, ABD) ile alınmıştır. Ölçümler 4000-400 cm⁻¹ frekans aralığı gerçekleştirilmiştir.. Örnekler herhangi bir hazırlama işlemine tabi tutulmadan, doğrudan ATR ekipmanı ile analiz edilmişlerdir.

3.7. *In vitro* Afinite Testleri

3.7.1. Kalsiyuma Bağlanma Testi

Kalsiyum kemik inorganik yapısını oluşturan temel mineral konumundadır. PLGA ve Aln(+)PLGA nanopartiküllerinin kalsiyuma bağlanma kapasiteleri daha önce literatürde belirtilmiş olan bir metotla incelenmiştir (208, 210). Yöntemin esası nanopartikül süspansiyonunun Ca^{+2} içeren bir ortamda inkübe edilmesi ve sonrasında bağlanmamış Ca^{+2} miktarının titrimetrik olarak tayin edilmesine dayanmaktadır. Bu amaçla 0,05mEq Ca^{+2} /mL konsantrasyonda standart kalsiyum çözeltisi ultrasaf su içerisinde hazırlanmış ve nanopartikül süspansiyonu ile manyetik karıştırıcıda 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler 10 dakika 24.000g de santrifüjlenmiştir. Böylelikle nanopartikül yüzeyine bağlanan Ca^{+2} varsa nanopartiküller ile çökmesi beklenmiştir. Supernatant önce 1N KOH ile pH değeri 10'a ayarlanmıştır. Üzerine 1 mL 0.025 M EDTA ve kalsein indikatörü ilave edilmiştir. Kalsein indikatörü kahverengi-turuncu bir renk oluşumu sağlamıştır. Sonrasında örnekler standart Ca^{+2} çözeltisi ile yeşil-sarı renk oluşumuna kadar geri titre edilmiştir. Nanopartikül üzerine bağlanan kalsiyum miktarı başlangıçta eklenen kalsiyum miktarından üst fazın titrasyonu ile elde edilen serbest kalsiyum miktarının çıkartılması ile hesaplanmıştır. Ölçümler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.7.2. Hidroksiapatit Afinite Testi

Alendronat kaplı nanopartiküllerin hidroksiapatit kristallerine bağlanma eğilimleri ise floresan mikroskopi yöntemi ile test edilmiştir. Etkin madde yüklü alendronat kaplı olan yada kaplı olmayan nanopartiküller hidroksiapatit süspansiyonu ile inkübe edilmiş, santrifüjlenmiş ve sonrasında ultrasaf su ile yıkanmışlardır (188, 211). Bu işlem sonrasında nanopartiküllere bağlanan hidroksiapatit kristalleri cam bir yüzey üzerine yayılmış ve floresans mikroskop altında incelenmişlerdir (212).

3.8. *In vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

3.8.1. Etkin Madde Kombinasyon Sitotoksosite Çalışması

Etkin madde kombinasyon sitotoksosite çalışmalarında insan meme kanser hücresi hattı olan MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara 5×10^3 hücre 100 μ L tamamlanmış Dulbecco's Modified Eagle besi ortamı içerisinde (DMEM) olacak şekilde ekilmiş 5% CO₂ at 37°C koşulunda 24 saat inkübe edilmiştir. Tamamlanmış DMEM besi ortamı bazal ortama % 10 (h/h) sığır bovin serum albumin, 50 U/mL penisilin, 50 μ g/mL streptomisin ve 2 mM L-Glutamin eklenerek hazırlanmıştır. .

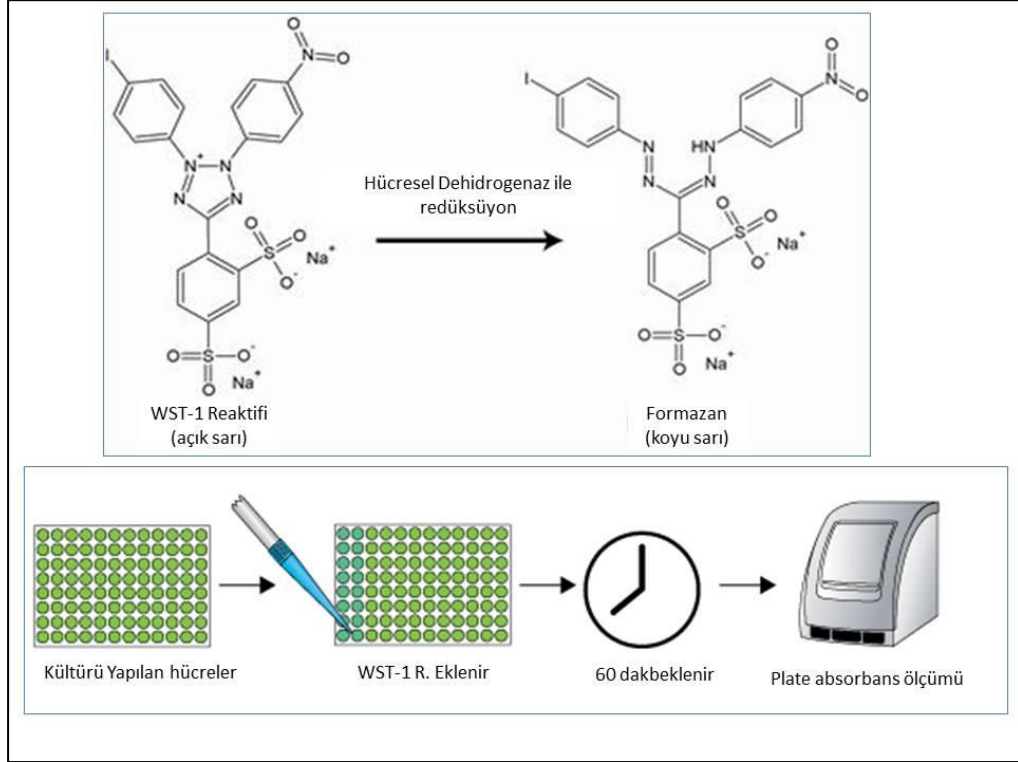
İnkübasyon sonrasında sitotoksosite testi için, hücrelerin besi ortamı farklı konsantrasyonlarda Dox ve Cxb veya her ikisinin kombinasyonunu içeren 100 μ L tamamlanmış besi yeri ile değiştirilmiştir. Dox DMEM ortamında serbest çözünürlük göstermiştir. Cxb ise DMEM ile seyreltilmeden önce dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Seyreltmeler besiyeri ortamındaki DMSO konsantrasyonu % 0,5 (h/h)'i geçmeyecek şekilde gerçekleştirilmiştir.

48 saatlik inkübasyon süresi sonrasında hücrelerdeki canlılık/ölüm oranı değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı üzerine Dox, Cxb ve kombinasyonların etkisi, WST-1 hücre canlılık testi ile gerçekleştirilmiştir. analiz edilecek olan kuyucukların üzerine bu amaçla %10 WST-1 reaktifi ilave edilmiştir ve inkübasyon sonrasında 440nm'de plate okuyucu ile absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. Nanopartiküllerin Sitotoksik Aktivitesini Belirlenmesi

Formülasyonlara ait hücre sitotoksosite çalışmaları da MCF-7 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler daha önce tanımlandığı şekilde 96 kuyucuklu plakalar üzerine aynı yoğunlukta ve aynı besiyeri ortamı kullanılarak ekilmiştir. Yeterli hücre büyümesi sağlandıktan sonra besi yeri ortamı PLGA NP, Ale(+)-PLGA NP, ayrı ayrı ve birlikte Dox ve Cxb çözeltileri, PLGA NP (Dox+Cxb) veya Ale(+)-PLGA NP (Dox+Cxb) içeren 100 μ L hücre kültürü ortamı ile değiştirilmiştir.

48 saatlik inkübasyon sonrasında nanopartikül süspansiyonlarının ve diğer çözeltilerin hücre canlılığı üzerine etkileri WST-1 hücre canlılık testi ile incelenmiştir. %10 konsantrasyondaki WST-1 reaktifi (10µL/100µL) hücre kuyucukları üzerine eklenmiş ve inkübasyon sonrasında kuyucuklarda gözlenen absorbans değerleri plate okuyucu ile 440nm’de ölçülmüştür.



Şekil 3.3 WST 1 hücre canlılık test prosedürü ve esası.

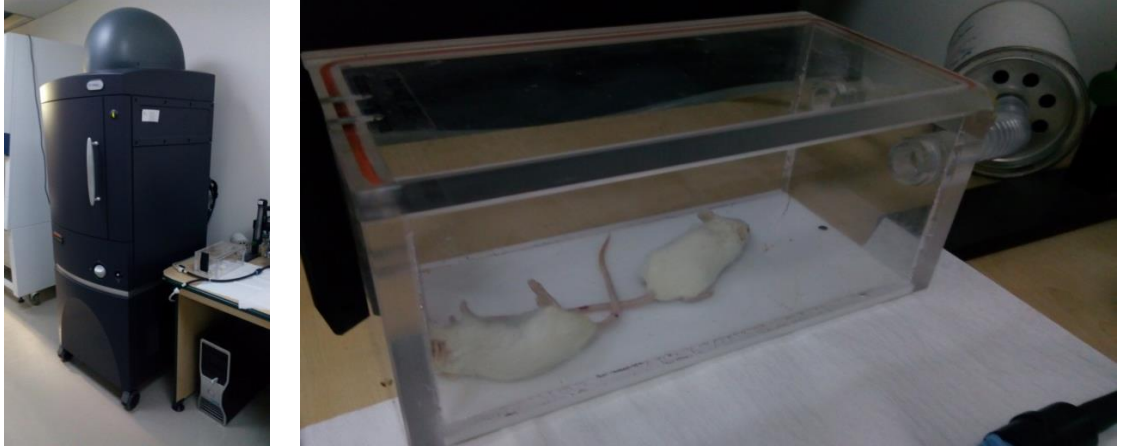
3.8.3. Hücre İçine Alım Çalışmaları

Nanopartiküllerin hücre içine alımları ve alendronat kaplamasının buna etkisi ise paralel şekilde MCF-7 hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler nanopartikül süspansiyonu ile inkübe edildikten sonra, PBS pH 7,4 ile yıkanmışlar ve 24 saat sonrasında floresans mikroskopunda görüntülenmişlerdir. Alendronat kaplı ve kaplı olmayan her iki nanopartikül grubuna sitotoksite oluşturmayacak konsantrasyonda etkin madde yüklenerek etkin maddelerin otofloresans özelliğinden yararlanılması amaçlanmıştır.

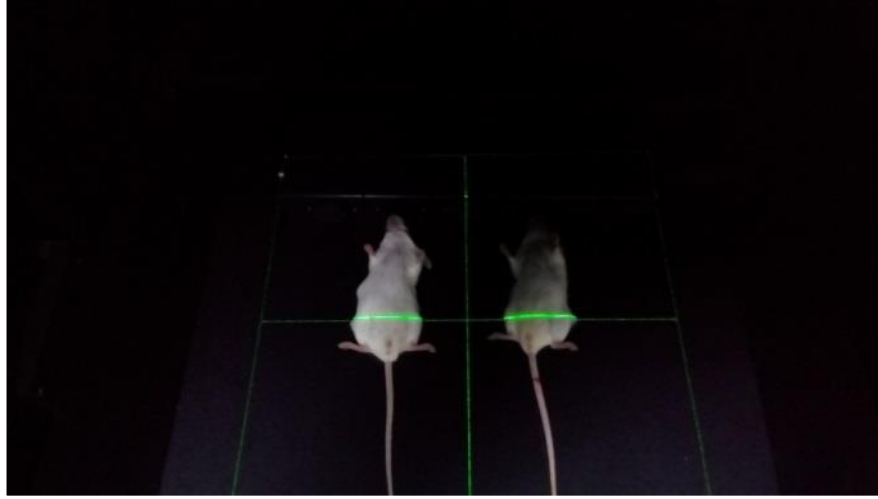
3.9. *In vivo* Biyodağılım Çalışması

3.9.1. Canlı Hayvanda Görüntüleme Çalışması

PLGA NP ve Ale(+)*PLGA* NP'lerinin *in vivo* ortamda kemik hedeflendirme kapasiteleri floresan bir boya olan indosiyanin yeşil ile gözlenmiştir. Çalışma Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınarak gerçekleştirilmiştir (Ek-1, Ek-2). 25-30g ağırlığında Balb/c ırkı dişi fareler kullanılmıştır. Hayvanlar iki çalışma grubuna bölünmüş, ilk gruba 200 μ L PBS'te disperse edilmiş PLGA NP verilirken diğer gruba aynı hacimde Ale(+)*PLGA* NP verilmiştir. Enjeksiyonlar intraperitoneal olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. IVIS Canlı hayvan görüntüleme cihazı ve hayvan anestezi aparatı.



Şekil 3.5. Hayvanların in vivo görüntülenme esnasında konumlandırılmaları.

Enjeksiyondan sonra hayvanların yem ve suya erişimi serbest bırakılmıştır. Enjeksiyon ve görüntüleme işlemleri anestezi altında yapılmış olup anestezi olarak İzofluran kullanılmıştır. Başlangıç konsantrasyonu %4, idame konsantrasyonu ise %1,5 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın tamamlanmasının ardından farelere anestezi altında servikal dislokasyon ile ötenazi işlemi uygulanmıştır.

3.9.2. *Ex vivo* Organ Dağılım Çalışması

Nanopartikül uygulanan hayvanlar 6 saat sonrasında izofloran anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilmişlerdir.

Temel organları (kalp, karaciğer, dalak, böbrek, kemik (femur)) çıkartılmış ve IVIS Lumina görüntüleme sisteminde nanopartiküllere yüklü floresans boyaya ait sinyal şiddeti eksitasyon 430nm, emisyon 820nm dalga boyunda görüntülenmiştir.

Bu bölümde sıralanan analizler gerçekleştirilmiş olup ilgili sonuçlar 4. Bölüm olan bulgular kısmında sunulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Analitik Metod Validasyonu

Tekrar eden 6 enjeksiyondan elde edilen etkin maddelere ait alanların değerlendirilmesi sonrasında; her iki etkin maddeye ait kuyruklanma faktörleri 2.0'den küçük teorik plaka sayıları 2000'den büyük tespit edilmiştir. Sistem tekrarlanabilirliğinde beklenen alanlara ait bağıl standart sapma (RSD) değerinin %1'den küçük olması şartı da sağlanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1 HPLC Analiz Metoduna ait sistem uygunluk parametreleri.

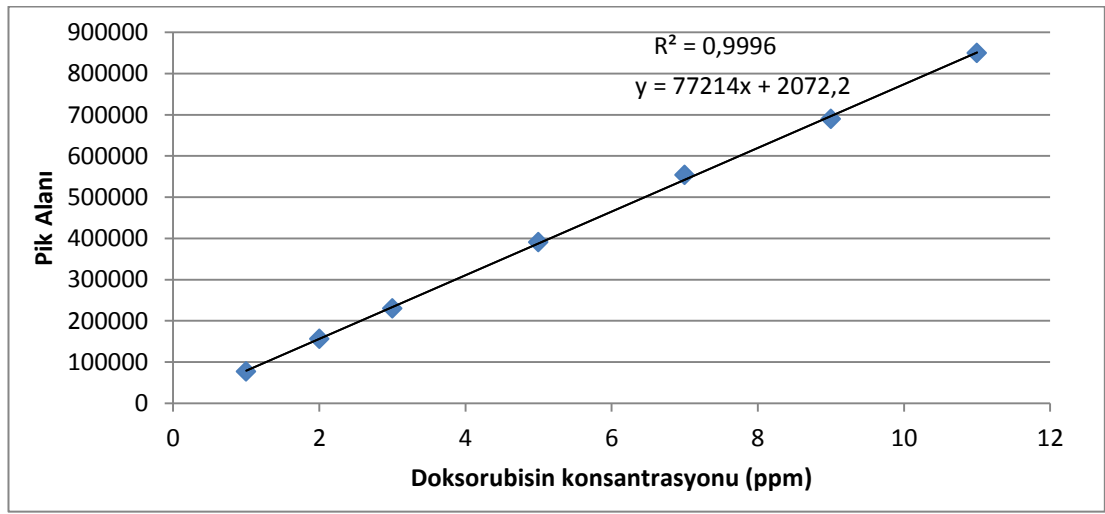
Parametre	Dokso rubisin	Selekoksisib
Kuyruklanma faktörü	0,97	1,07
Teorik Plaka Sayısı	2739	2157
RSD (%)	%0,9	%1,0

Etkin maddelerin kromatogramları, salım ortamları ile ve PLGA çözelti enjeksiyonu ile kıyaslanmıştır. Salım ortamında yer alan tampon tuzlarından ya da nanopartikül formülasyonundan herhangi bir girişim olmadığı tespit edilmiştir.

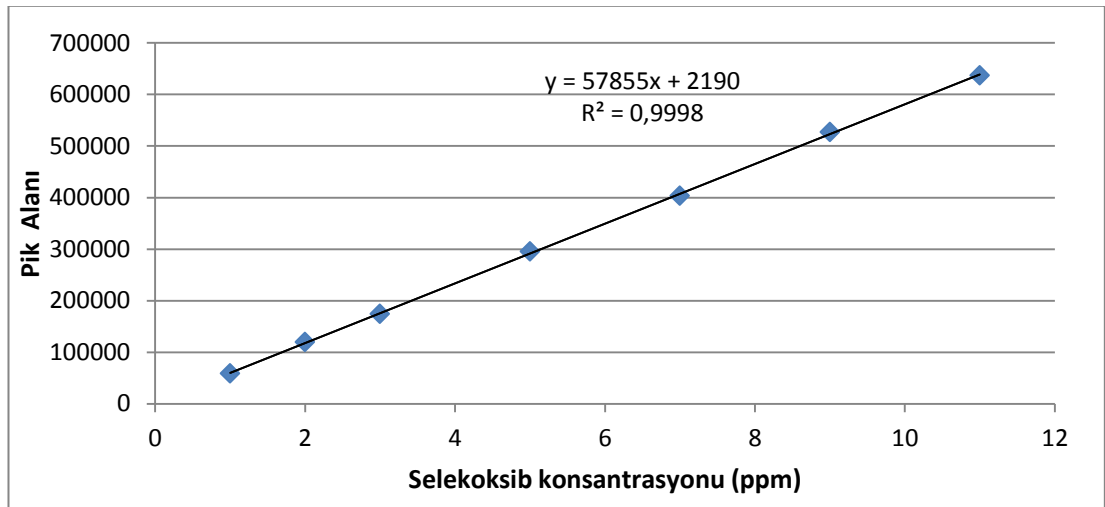
Tablo 4.2. Etkin maddelere ait analitik metod linearite parametreleri

	Dokso rubisin	Selekoksisib
Doğru denklemi	$y = 77214x + 2072.2$	$y = 57855x + 2190$
Standart hata (intersept)	4579.8	2378.1
Standart hata (eğim)	711.5	369.5
Regresyon katsayısı	0.9996	0.9998
Linearite aralığı (µg/mL)	1-11	1-11
Linearite nokta sayısı	7	7
LOD (ng/mL)	7	13
LOQ (ng/mL)	14	19

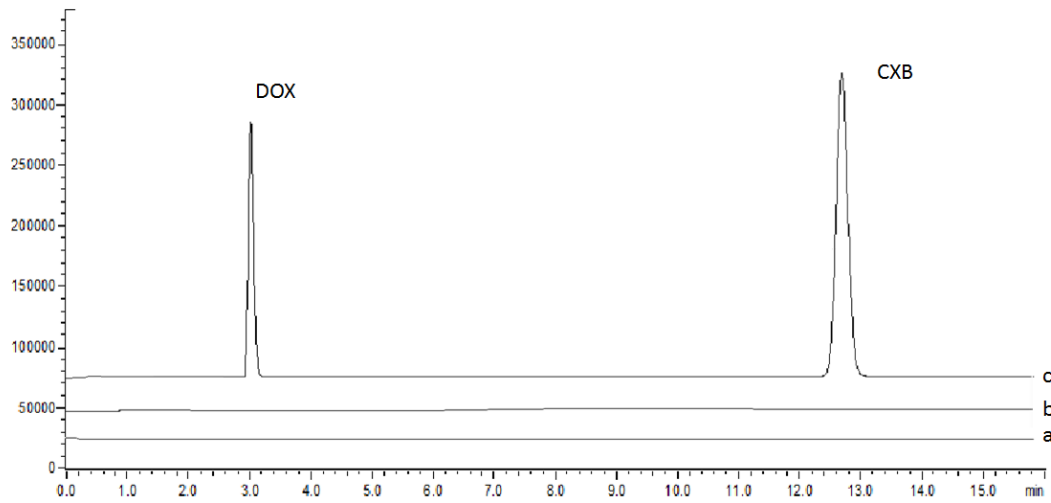
Kalibrasyon doğruları için, hazırlanan stok çözeltilerden 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11 μ g/mL konsantrasyondaki standart çözeltiler hazırlanarak analiz edilmişlerdir. Enjekte edilen çözeltilerden elde edilen pik alanları hesaplanmış ve regresyon analizine tabi tutularak lineer bir denklem oluşturulmuştur. Doksorubisin için, korelasyon katsayısı $r^2 = 0,9996$ ve doğru denklemi $y = 77214x + 2072,2$ olarak bulunmuştur. % y-intersept değerleri 1 μ g/mL haricinde % 2,0 den küçük olarak bulunmuştur. Selekoksisib için doğru denklemi $y = 57855x + 2190$ ve korelasyon katsayısı $r^2=0,9998$ olarak bulunmuştur. Her iki etkin madde analizi için de doğrusallık elde edilmiştir (Şekil 4.1., 4.2) (Tablo 4.2.).



Şekil 4.1. Doksorubisine ait HPLC kalibrasyon doğrusu.



Şekil 4.2. Selekoksisibe ait HPLC kalibrasyon doğrusu.



Şekil 4.3. Salım ortamına (a), PLGA 502H polimer çözeltisine (b) ve etkin maddelere ait (c) kromatogramlar.

Analitik yöntemin doğruluğu ve kesinliği tekrarlanabilirlik ve tekrar edilebilirlik parametreleri ile incelenmiş; bağıl standart sapma değerleri %2'nin altında ve geri kazanım değerleri kılavuzlara uygun şekilde %98-102 aralığındadır. Geliştirilen yöntemin validasyonunda doğruluk ve kesinlik parametrelerini sağladığı tespit edilmiştir. (Tablo 4.2.). Piklere ait retansiyon süreleri doksorubisin için 3,1 dakika, selekoksib için ise 12,8 dakika olarak bulunmuştur (Şekil 4.3.)

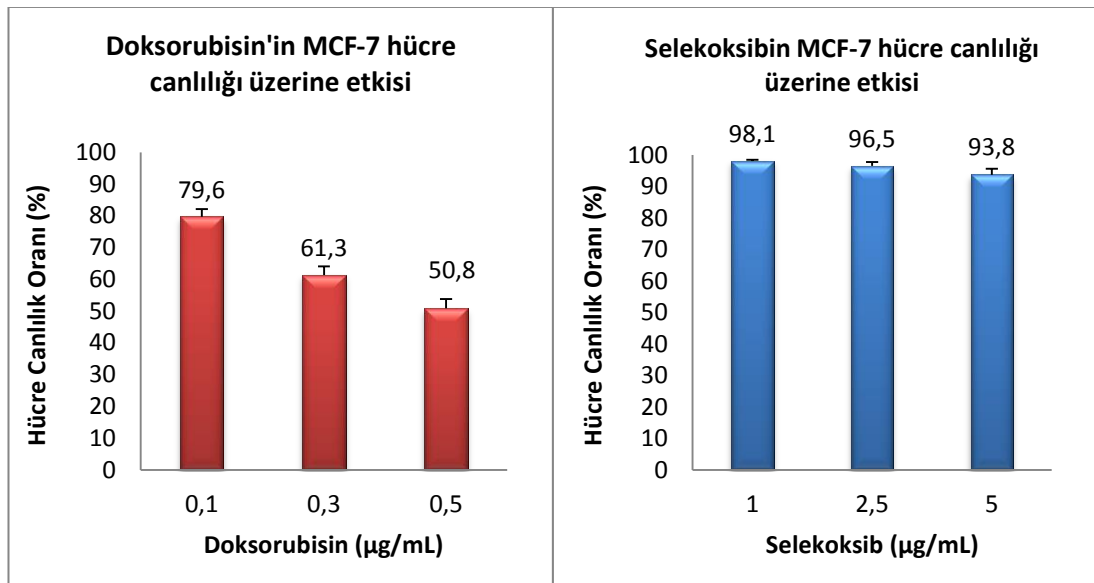
Tablo 4.3. Selekoksib ve Doksorubisin'in analitik yöntemine ait doğruluk ve kesinlik parametreleri (n=3)

	Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Gün İçi		Günler Arası	
		Geri Kazanım (%)	%RSD	Geri Kazanım (%)	%RSD
Doksorubisin	1	101,3	1,6	98,7	1,5
	3	98,7	1,1	99,6	0,5
	9	100,6	0,3	101,1	0,1
Selekoksib	1	99,2	1,4	101,2	1,2
	3	101,8	0,9	98,4	1,0
	9	98,9	1,0	101,9	0,4

4.2. Etkin Madde Kombinasyonu Sitotoksisite Çalışması

Selekoksisib ve doksorubisinin sinerjik etkisi hem farklı hücre hatlarında *in vitro* sitotoksisite çalışmaları ile hem de hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. (46-48). Çalışma kapsamında ise en belirgin sinerjik etkinin hangi doz oranında gözlemlendiği MCF-7 hücreleri ile test edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılık testi WST-1 analizi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre selekoksisibin sitotoksisite yüzde değerleri doksorubisinden daha düşüktür. Selekoksisib on kat fazla konsantrasyonda uygulanmış olmasına rağmen bu durum değişiklik göstermemiştir.

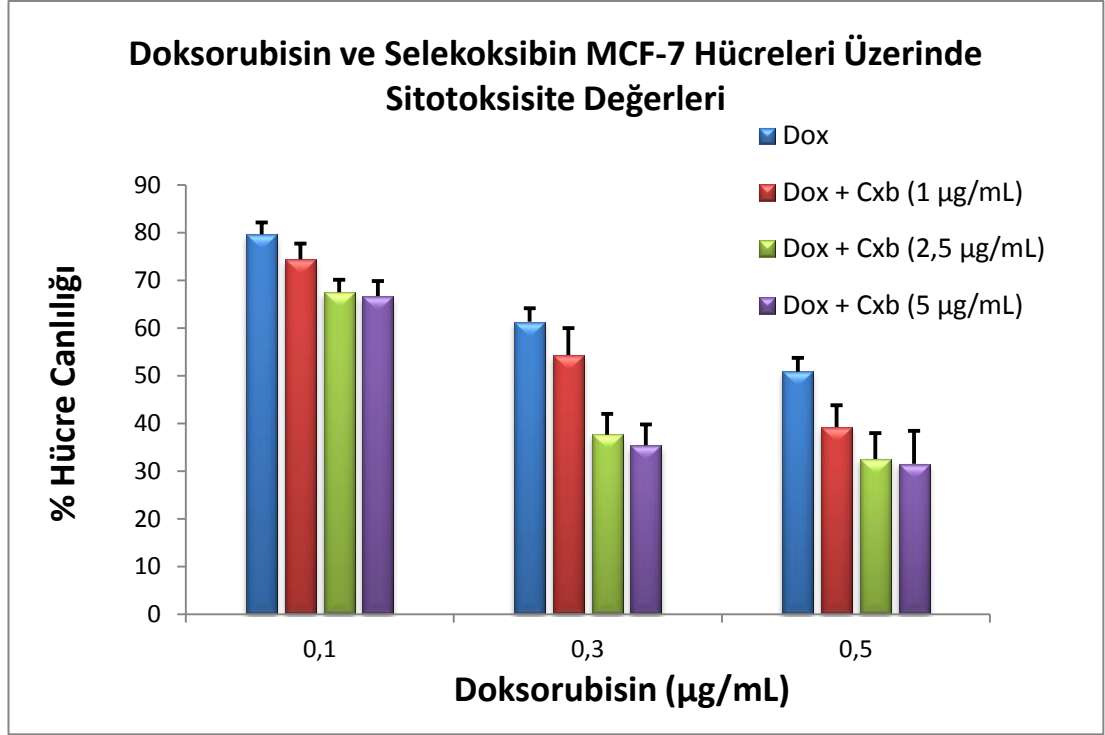
Yalnızca selekoksisib uygulanan hücrelerde canlılık oranı 1 µg/mL, 2,5µg/mL ve 5µg/mL konsantrasyonlar için sırasıyla %98,1, %96,5 ve %93,8 olarak bulunmuştur. Yalnızca doksorubisin çözeltisinin uygulandığı hücrelerde ise canlılık oranı yüzde olarak; 0,1 µg/mL, 0,3µg/mL ve 0,5µg/mL konsantrasyonlar için sırasıyla %79,7 %61,3 ve %50,8 olarak tespit edilmiştir. (Şekil 4.4)



Şekil 4.4. Yalnızca selekoksisib ya da doksorubisin çözeltisi uygulanmış olan MCF-7 hücrelerinde % canlılık oranı değerleri.

Selekoksisib ve doksorubisinin farklı konsantrasyonlardaki kombinasyon denemelerinden elde edilen hücre canlılık yüzdesine ait sonuçlar ise Şekil 4.5.'te sunulmuştur. Bu sonuçlara göre farklı doksorubisin konsantrasyonlarında selekoksisibin 2,5µg/mL ve 5µg/mL ilavesi arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$). Doksorubisin çözeltisine selekoksisib ilavesi

ile elde edilen en belirgin farklılık ise 0,3 μ g/mL doksorubisin ve 2,5 μ g/mL selekoksib kombinasyonunda gözlenmiştir. 0,3 μ g/mL doksorubisin ve 2,5 μ g/mL selekoksibin ayrı ayrı oluşturdukları sitotoksosite değerleri ayrı ayrı toplandığında % 42,1 elde edilirken bir aradayken oluşturdukları yüzde sitotoksosite değerleri % 61,2 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda selekoksib ve doksorubisin çözelti kombinasyonları uygulanmış olan MCF-7 hücrelerinde % canlılık oranı değerleri.

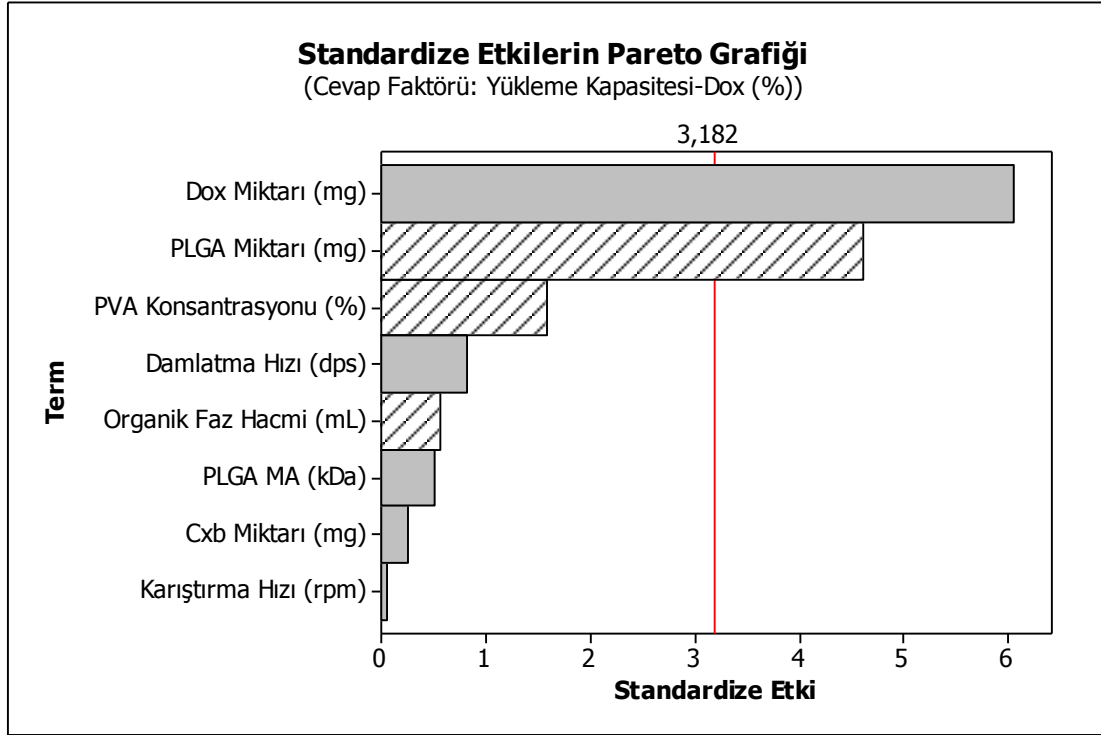
4.3. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Kritik Formülasyon Parametrelerinin Belirlenmesi

Sekiz farklı formülasyon parametresi Plackett-Burmann Deneysel tasarımı kullanılarak 2 seviyeli, 12 deneyli bir tasarım matrisiyle test edilmiştir. Hazırlanan formülasyona ait elde edilen sonuçlar Tablo 4.6.'te sunulmuştur. Verilerin analiz edilmesinde ana etki grafiklerinden ve pareto grafiklerinden yararlanılmıştır.

Tablo 4.4. Plackett–Burman Tasarımı Uygulanan Formülasyonlarda Bağımlı Değişkenlere Ait Sonuçlar.

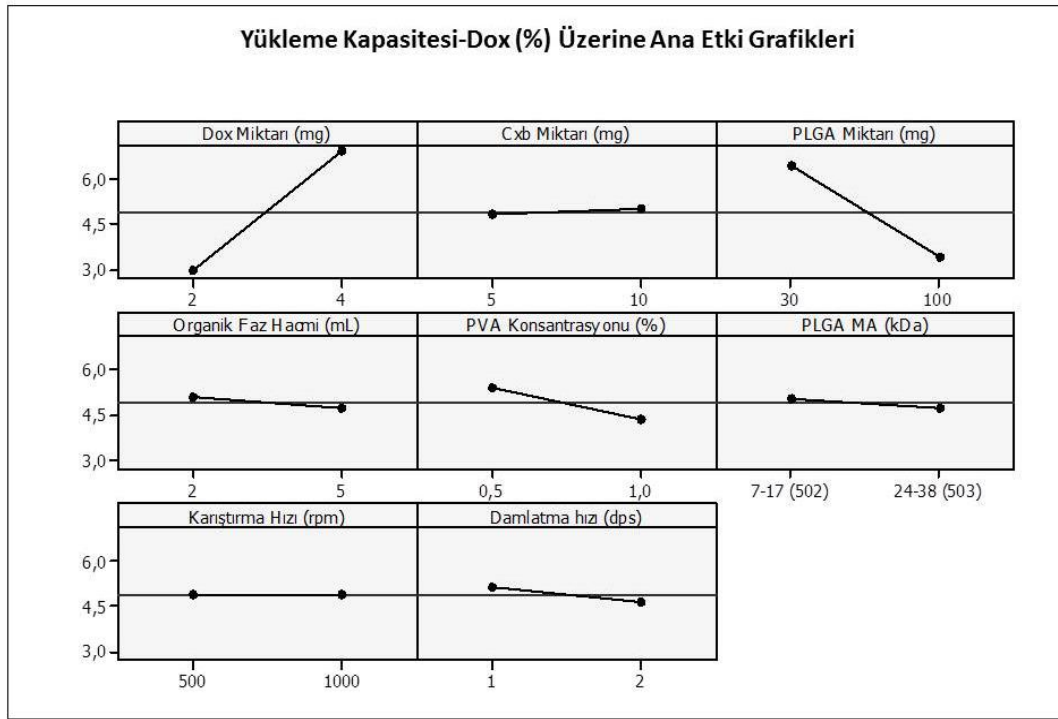
Formülasyon Kodu	Y ₁ (%)	Y ₂ (%)	Y ₃ (nm)	Y ₄ (mV)	Y ₅
PB 01	5,3	5,1	272,3	-15,8	0,214
PB 02	8,5	14,2	164,7	-13,9	0,173
PB 03	0,7	6,7	293,5	-13,4	0,156
PB 04	5,6	4,9	197,6	-14,2	0,245
PB 05	8,4	12,2	162,6	-15,9	0,287
PB 06	5,6	6,5	268,4	-15,8	0,204
PB 07	2,1	8,3	172,5	-14,2	0,167
PB 08	1,2	4,7	187,4	-15,2	0,284
PB 09	2,6	5,8	156,8	-15,9	0,211
PB 10	7,9	6,1	194,3	-16,5	0,237
PB 11	4,7	15,3	176,8	-17,9	0,151
PB 12	6,4	8,7	169,4	-17,5	0,223

Doksorubisin yükleme kapasitesi (Y₁) üzerine en etkili olan iki parametre Doksorubisin miktarı (X₁) (p=0,009) ve PLGA polimer miktarı (X₃) (p=0,019) olarak gözlenmiştir. Varyans analizi sonucuna göre ana etkilerin *p* değeri 0,06 olarak, *R*² değeri ise 0,9537 olarak tespit edilmiş olup test edilen modele belirgin bir uygunluk göstermektedir.

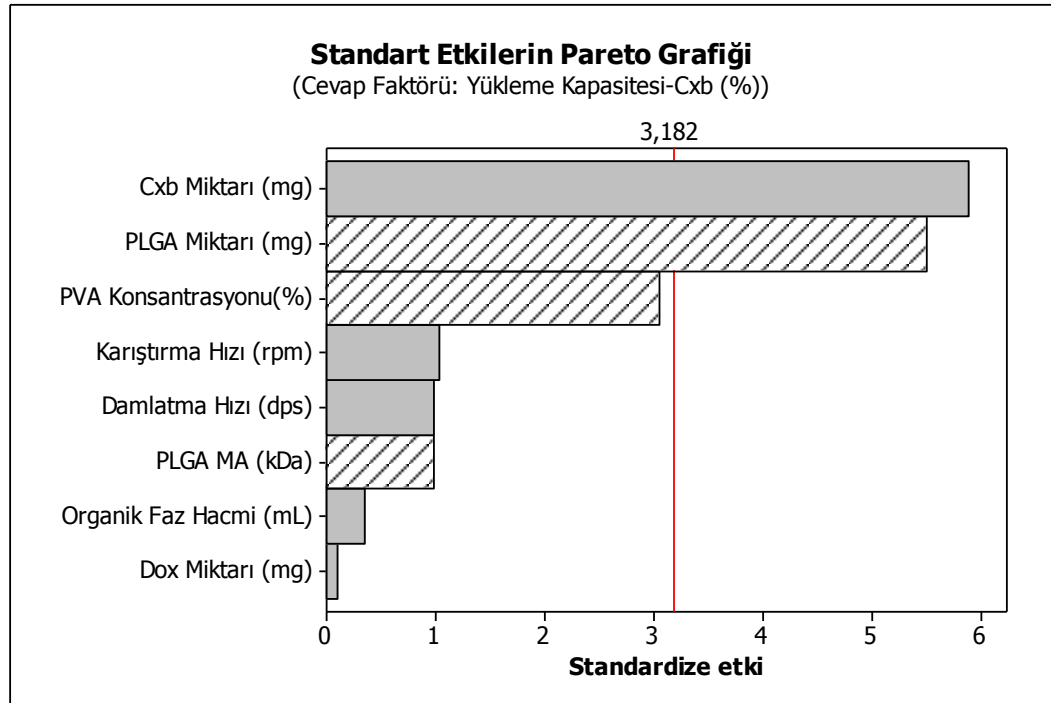


Şekil 4.6. Dokсорubisin yükleme kapasitesi üzerine etkili olan parametrelerin standardize pareto grafiği (Gri renkli sütunlar +, çizgili sütunlar – etkiyi ifade etmektedir).

Dokсорubisin miktarındaki artışın dokсорubisin yükleme kapasitesi üzerinde artışa, PLGA miktarındaki artışın ise düşüŖe neden olduğu ve iki faktörün de benzer düzeyde etkili olduğu pareto grafiğinden de görölmektedir. (Şekil 4.6, Şekil 4.7)

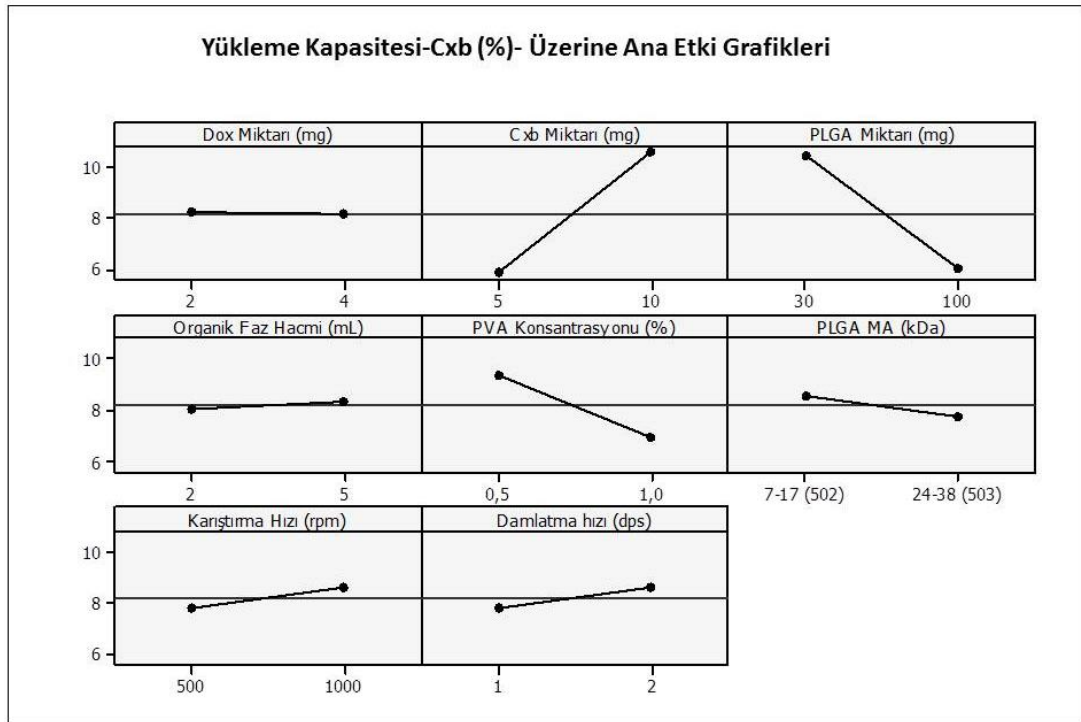


Şekil 4.7. Dokсорubisin yükleme kapasitesi üzerine sekiz farklı faktörün etki şekillerini gösteren, temel etki grafiği.

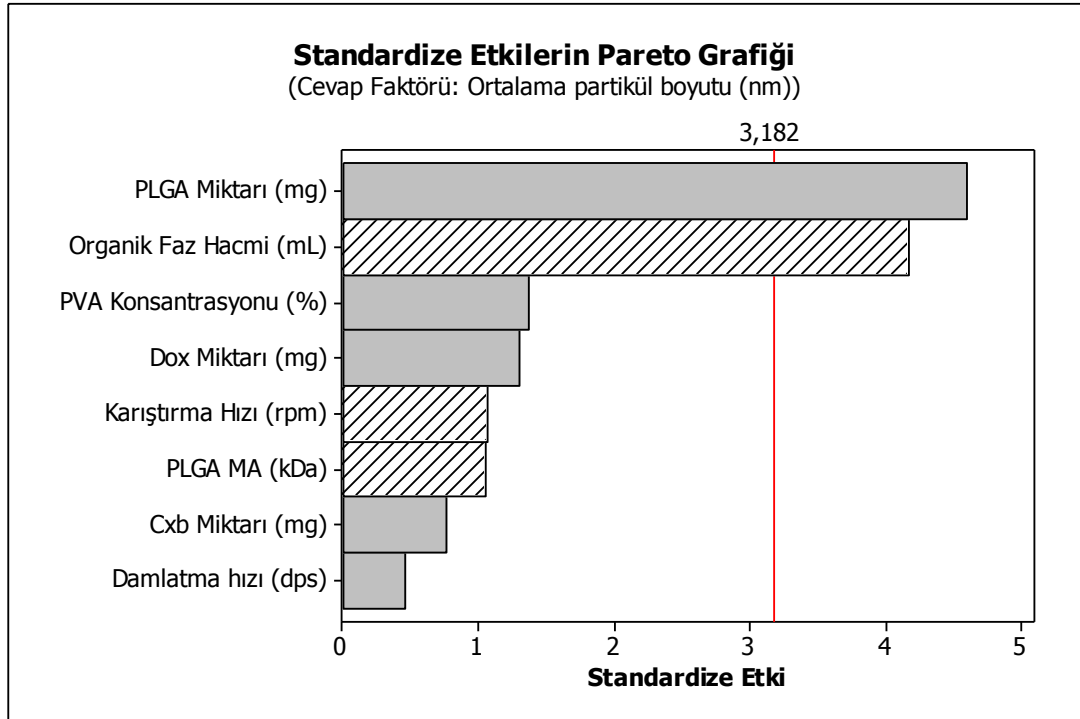


Şekil 4.8. Selekokсib yükleme kapasitesi üzerine etkili olan parametrelerin standardize pareto grafiği.

Selekoksisib yükleme kapasitesi (Y_2) üzerine ise selekoksisib miktarı (X_2) ($p=0,010$) ve PLGA polimer miktarı (X_3) ($p=0,012$) etkili olan parametrelerdir. Doksorubisin yükleme kapasitesine benzer şekilde etkin madde (Cxb) miktarının artması yükleme kapasitesini arttırırken, PLGA miktarının artması yükleme kapasitesi değerini azaltmaktadır. (Şekil 4.8.) Varyans analizinin sonucu olarak p değeri 0,044 ve R^2 değeri 0,9627 olarak tespit edilmiştir. Temel etkilerin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ve model uygunluğunun yüksek olduğunu göstermektedir. (Şekil 4.9.)

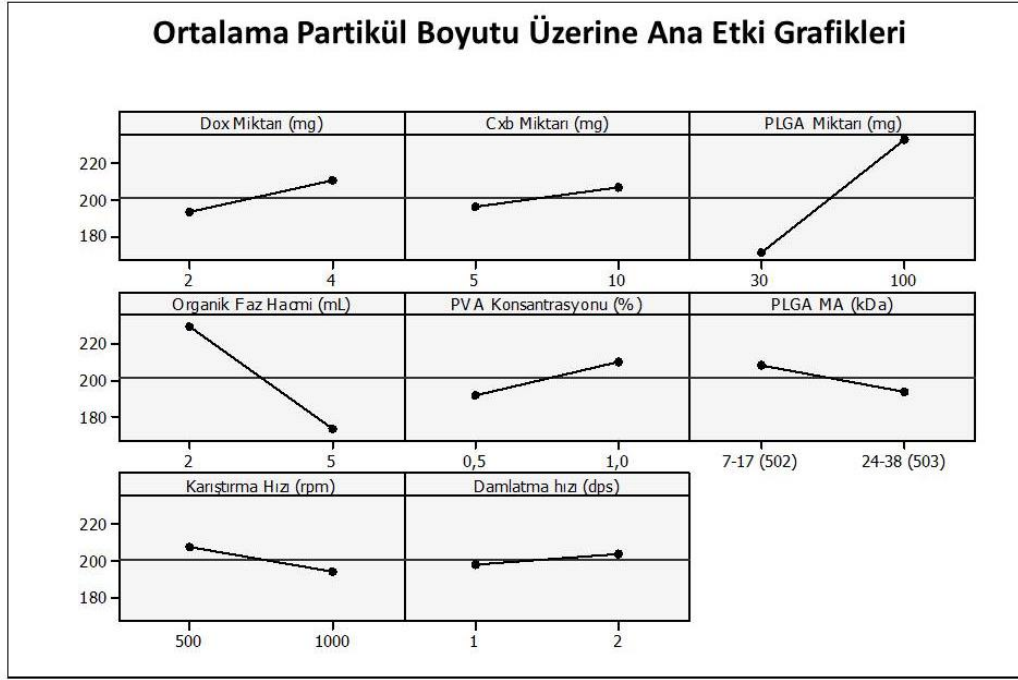


Şekil 4.9. Selekoksisib yükleme kapasitesi üzerine sekiz farklı faktörün etki şekillerini gösteren, temel etki grafiği.

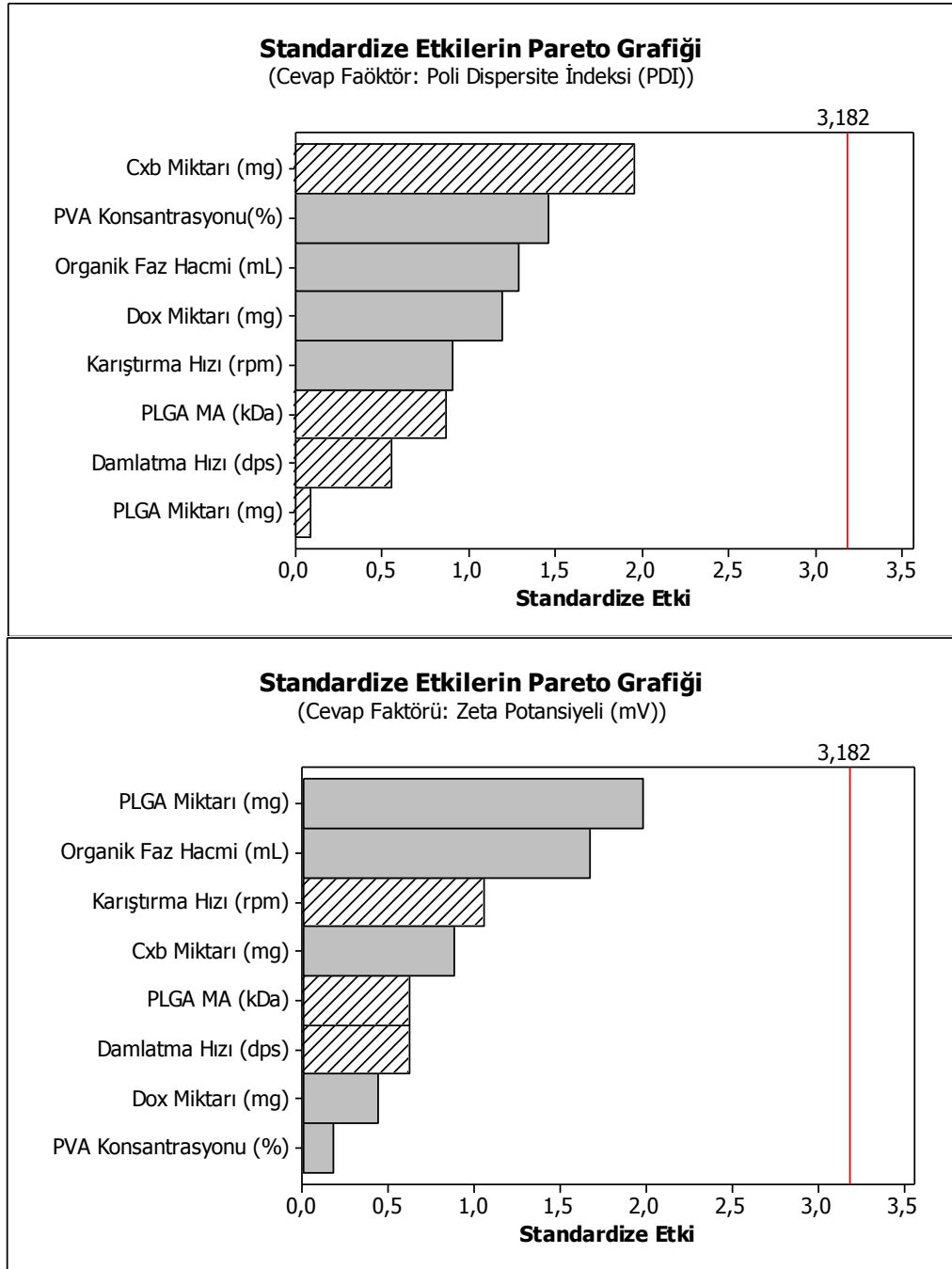


Şekil 4.10. Ortalama partikül boyutu üzerine etkili olan parametrelerin standardize pareto grafiği (Gri renkli sütunlar +, çizgili sütunlar – etkiyi ifade etmektedir).

Ortalama partikül boyutu (Y_3) sonuçları incelendiğinde ise; en etkili iki faktörün sırasıyla PLGA miktarı (X_3) ($p=0,019$) ve organik faz hacmi (X_4) ($p=0,025$) olduğu gözlenmiştir. Varyans analizine göre ana etkilerin p değeri 0,092 ve R^2 değeri 0,9375 bulunmuştur (Şekil 4.10., Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Ortalama partikül boyutu üzerine sekiz farklı faktörün etki şekillerini gösteren, temel etki grafiği.



Şekil 4.12. PDI ve zeta potansiyeli üzerine faktörlerin istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını gösteren pareto grafikleri.

PDI ve zeta potansiyeli değerleri için yapılan ölçüm ve istatistiksel değerlendirmelerde ise, test edilen formülasyon parametrelerinin hiçbirinin anlamlı düzeyde bir farklılık oluşturmadıkları tespit edilmiş olup faktörlerin istatistiksel düzeyde anlamlı olmasa da yanıt faktörler üzerinde olan etkileri Şekil 4.12.'de sunulmuştur. Etkileyen herhangi bir anlamlı faktör olmamasına rağmen Box-

Behnken tasarımı ile hazırlanan formülasyonlarda da bu iki yanıt ölçülmeye devam edilmiştir.

Plackett-Burmann tasarımı çoğunlukla temel etkili faktörlerin tespit edilmesini ve kritik kalite parametreleri üzerine belirgin etkisi olmayan faktörlerin elimine edilerek daha detaylı araştırma, belirlenen faktörler kullanılarak BBD ile yapılmıştır.

4.4. Formülasyon Parametrelerinin Optimizasyonu

PBD ile kritik olarak belirlenen cevap değişkenler üzerinde en etkili olan formülasyon/proses faktörleri seçilmiş ve detaylı irdeleme cevap yüzey analizi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 3 faktörlü ve 3 seviyeli BBD matrisi oluşturulmuştur. Toplam 15 formülasyon denemesi ile etkili olduğu tespit edilmiş olan faktörlerin etki şekilleri incelenmiştir.

Faktörlerin temel etkileri, birbirleriyle olan etkileşimlerinden kaynaklanan etkileri ve üssel etkileri değerlendirilmiştir. Üretilen formülasyonlara ait yanıt değerler Tablo 4.5.'te sunulmuştur. Kritik proses parametrelerine ait katsayılar, istatistiksel kıyaslamaları olarak regresyon analizlerinden elde edilen p değerleri ile birlikte Tablo 4.6.'da sunulmuştur. İstatistiksel değerlendirme yapılırken p değeri 0,05 den küçük olan faktörlerin, % 95 güven aralığı içerisinde etkisinin anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

Tablo 4.5. Box-Behnken Tasarımı Uygulanan Formülasyonlarda Bağımlı Değişkenlere Ait Sonuçlar

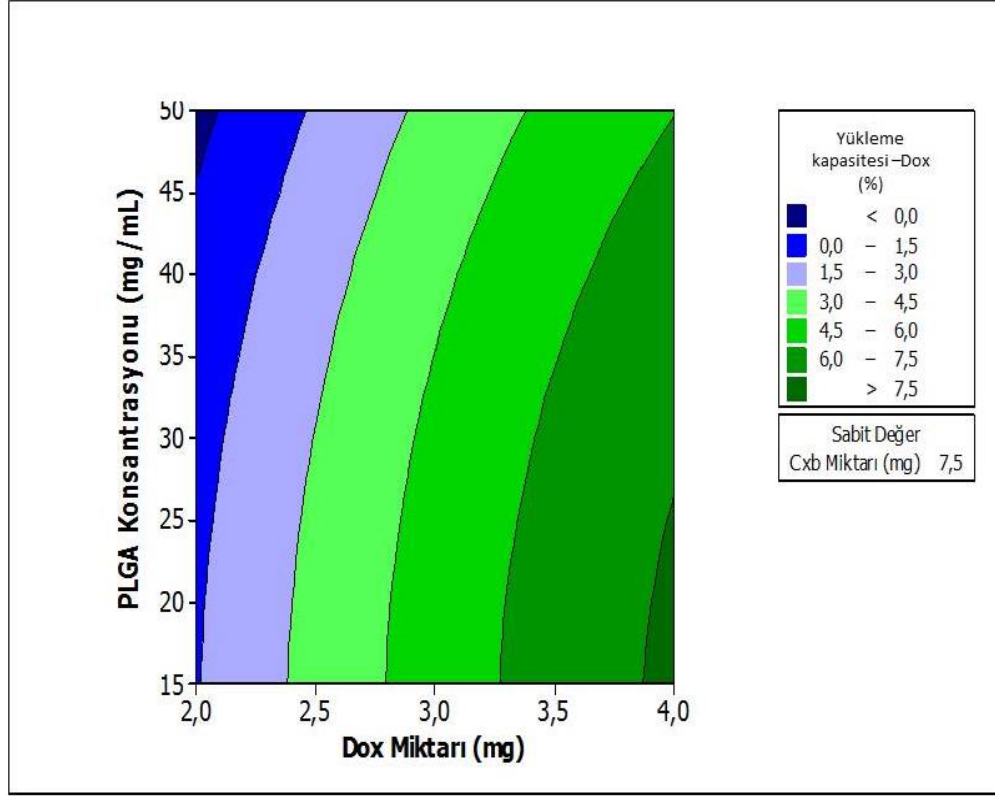
Formülasyon Kodu	Y₁ (%)	Y₂ (%)	Y₃ (nm)	Y₄ (mV)	Y₅
BB 01	0,7	12,1	210,2	-14,3	0,176
BB 02	7,3	11,9	209,2	-16,4	0,206
BB 03	0,6	7,5	245,6	-15,4	0,147
BB 04	7,9	10,3	173,2	-12,3	0,195
BB 05	0,7	6,7	218,5	-13,7	0,201
BB 06	0,9	10,1	178,2	-17,5	0,206
BB 07	4,3	7,9	199,2	-16,4	0,153
BB 08	4,6	8,2	206,2	-14,5	0,189
BB 09	5,2	14,9	169,6	-13,7	0,192
BB 10	5,1	7,8	198,4	-14,1	0,213
BB 11	3,2	10,8	262,4	-12,8	0,235
BB 12	5,4	7,4	254,6	-15,8	0,227
BB 13	7,6	6,4	189,4	-16,4	0,153
BB 14	3,2	4,7	265,4	-12,9	0,211
BB 15	5,6	7,3	175,3	-14,6	0,196

Tablo 4.6. Faktörlere ait hesaplanan korelasyon katsayıları ve *p* değerleri tablosu

	Yükleme Kapasitesi-Dox % (Y ₁)		Yükleme Kapasitesi-Cxb % (Y ₂)		Ortalama Partikül Boyutu (nm) (Y ₃)	
	Katsayı	<i>p</i> değeri	Katsayı	<i>p</i> değeri	Katsayı	<i>p</i> değeri
β ₀ (sabit)	-12,673	<0,001	12,955	<0,001	309,148	<0,001
<i>x</i> ₁ (Dox Miktarı)	7,983	<0,001	-2,111	0,792	-31,688	0,337
<i>x</i> ₂ (Cxb Miktarı)	-0,029	0,605	-0,811	<0,001	-21,791	0,914
<i>x</i> ₃ (PLGA Konsantrasyonu)	0,104	0,002	-0,117	<0,001	-0,785	<0,001
<i>x</i> ₁ <i>x</i> ₂	-0,030	0,752	0,010	0,928	2,810	0,167
<i>x</i> ₁ <i>x</i> ₃	-0,031	0,058	-0,004	0,780	0,200	0,458
<i>x</i> ₂ <i>x</i> ₃	0,002	0,675	-0,009	0,200	0,015	0,883
<i>x</i> ₁ ²	-0,596	0,051	0,354	0,238	0,142	0,976
<i>x</i> ₂ ²	0,001	0,986	0,152	0,015	0,866	0,285
<i>x</i> ₃ ²	-0,001	0,174	0,002	0,115	0,038	0,052

Doksorubisin yükleme kapasitesi değerlendirildiğinde doksorubisin miktarı, PLGA konsantrasyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunan temel etkilerdir (*p*<0,05). PBD kapsamında hazırlanan formülasyonlara ve orda elde edilen sonuçlara paralel bir şekilde; formülasyonda Dox miktarının artması ile doksorubisin yükleme kapasitesi yüzde olarak artmakta, formülasyonda kullanılan PLGA konsantrasyonunu artması ile ise nanopartikül ağırlığına oranla içerdiği doksorubisin oranı yüzde olarak düşmektedir. Daha baskın olan etkinin Dox miktarı olduğu Şekil 4.13.'te verilmiş olan kontur grafiğinden de görülmektedir. Doksorubisin miktarının karesi ve bu iki faktörün birlikte etkisi (*x*₁*x*₃) ise oldukça küçük *p* değerlerine sahip ve formülasyon üzerinde etkili olmasına rağmen istatistiksel anlamda etkili kabul edilmemişlerdir (sırasıyla *p*=0,051, *p*=0,058). Doksorubisin yükleme kapasitesi için yazılım tarafından oluşturulan, ikinci derece polinomial modele ait kestirim denklemi aşağıdaki şekildedir (*r*²=0,9899);

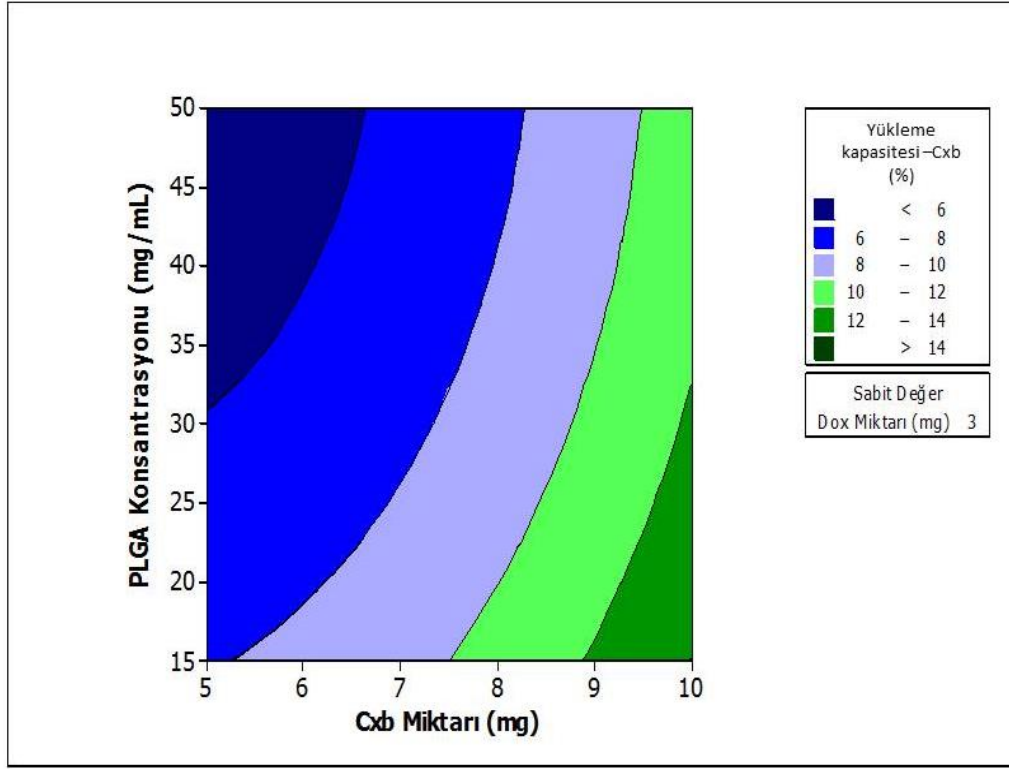
$$Y_1 = -12,673 + 7,983x_1 - 0,029x_2 + 0,104x_3 - 0,030x_1x_2 - 0,031x_1x_3 + 0,002x_2x_3 - 0,596x_1^2 + 0,001x_2^2 - 0,001x_3^2$$



Şekil 4.13. Formülasyonda yer alan PLGA konsantrasyonu ve Dox miktarının, nanopartiküllerin dokсорubisin yükleme kapasitesi üzerine etkisini gösteren kontur grafiği.

Selekoksisib yükleme kapasitesi cevap yüzey analizi ile değerlendirildiğinde ise; selekoksisib miktarı ve PLGA konsantrasyonunun selekoksisib yükleme kapasitesi üzerine etkili olan iki parametre olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Bu cevapta Cxb miktarının kuadratik etkisi de istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip bulunmuştur ($p = 0,015$). (Şekil 4.14.) Selekoksisib miktarındaki artış selekoksisib yükleme kapasitesinde artışa neden olurken, PLGA miktarındaki artış için durum tam tersidir. Selekoksisib yükleme kapasitesi kestirimi için oluşturulan polinomial ikinci derece denklem aşağıdaki şekildedir ($r^2 = 0,9879$);

$$Y_2 = 12,955 - 2,111x_1 - 0,811x_2 - 0,117x_3 + 0,010x_1x_2 - 0,004x_1x_3 - 0,009x_2x_3 + 0,354x_1^2 + 0,152x_2^2 + 0,002x_3^2$$

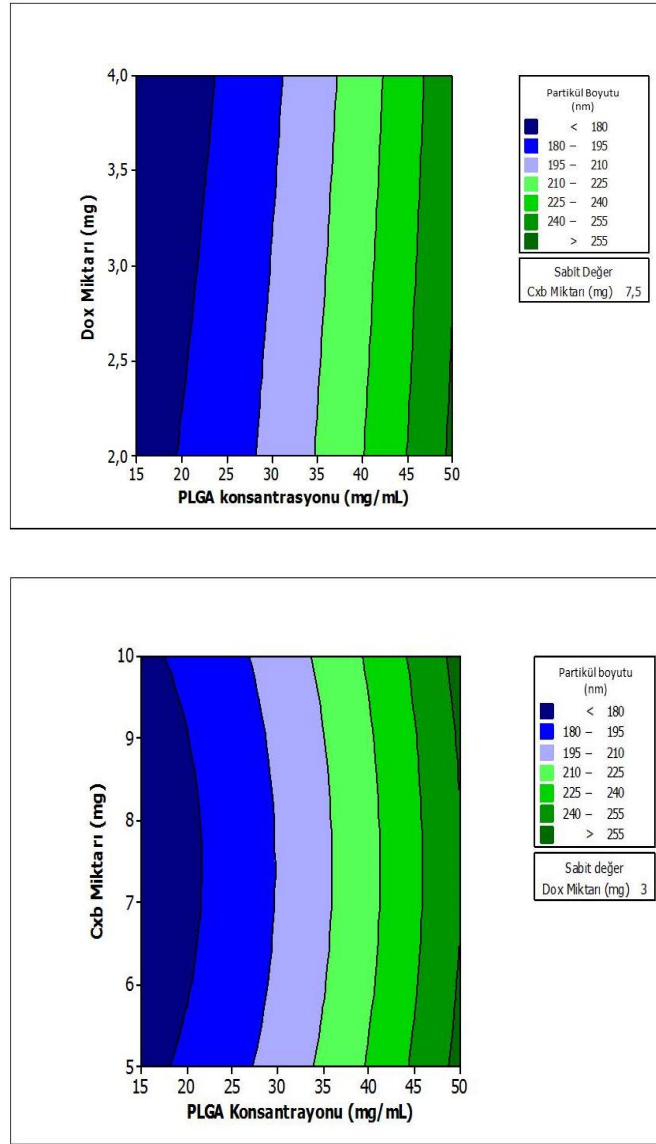


Şekil 4.14. Formülasyonda yer alan PLGA konsantrasyonu ve Cxb miktarının, nanopartiküllerin selekoksib yükleme kapasitesi üzerine etkisini gösteren kontur grafiği.

Yapılan analizler sonucunda, hazırlanan nanopartiküllerin ortalama partikül boyutuna etki eden tek faktörün ise yalnızca PLGA konsantrasyonu olduğu ($p < 0,001$) diğer formülasyon ve proses parametrelerinin partikül boyutu üzerinde anlamlı bir etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

PLGA konsantrasyonunu kuadratik etkisi de partikül boyutu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ($p = 0,052$). Bunun haricinde etkili olan hiçbir faktör tespit edilememiştir. Bu durum kontur grafiklerinin yapısından da anlaşılmaktadır (Şekil 4.15.). Ortalama partikül boyutunun tahmini için oluşturulan ikinci derece polinomial denklem formülü ise aşağıdaki şekildedir ($r^2 = 0,9987$) ;

$$Y_3 = 309,148 - 31,688x_1 - 21,791x_2 - 0,785x_3 + 2,810x_1x_2 + 0,200x_1x_3 + 0,015x_2x_3 + 0,142x_1^2 + 0,866x_2^2 + 0,038x_3^2$$



Şekil 4.15. Formülasyonda yer alan PLGA konsantrasyonun, nanopartiküllerin ortalama partikül boyutuna etki eden tek parametre olduğunu gösteren kontur grafiği.

MCF-7 insan meme kanseri hücre hattında gerçekleştirilen doz optimizasyon çalışması sonrasında, Dox:Cxb doz oranının 0,3:5 olarak hücrelere iletilmesiyle sinerjik etkinin en yüksek oranda gözlemlendiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu oranı elde edebilmek için tasarım sınırları göz önünde bulundurularak, doksorubisin yükleme kapasitesi %1,5 ve selekoksib yükleme kapasitesi olarak %12,5 hedeflenmiştir. Aynı zamanda optimizasyon dizaynına partikül boyutunun minimizasyonu da ilave edilmiştir. (Şekil 4.15.)

Minitab yazılımı kullanılarak oluşturulan optimizasyon grafiğinin sonucuna göre hedeflenen formülasyonun elde edilebilmesi için gerekli olan formülasyon parametreleri şu şekildedir;

Dox miktarı: 2,1 mg,

Cxb miktarı: 9,5 mg

PLGA konsantrasyonu 22,1 mg/mL

Aseton hacmi: 2mL

Polimer molekül ağırlığı: 7-17 Da,

PVA konsantrasyonu:%0,5,

Karıştırma hızı: 1000rpm,

Damlatma hızı: 1 damla/saniye

İstenebilirlik fonksiyonu (*desirability*) değerleri incelendiğinde Cxb yükleme kapasitesine ait değer $d=0,97$ olarak, Dox yükleme kapasitesine ait değer $d=0,83$ ve ortalama partikül boyutuna ait değer $d=0,61$ olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.7. Optimizasyon sonrası elde edilen formülasyonda beklenen ve ölçülen yanıt değişkenler

Cevap Değer	Ölçülen Sonuç	Tahmin Edilen	Fark	Hata (%)
Yükleme Kapasitesi-Dox (%)	1.42	1.48	-0.06	-4.2
Yükleme Kapasitesi -Cxb (%)	13.45	12.49	0.96	7.1
Ortalama Partikül Boyutu (nm)	196.6	183.9	12.7	6.5

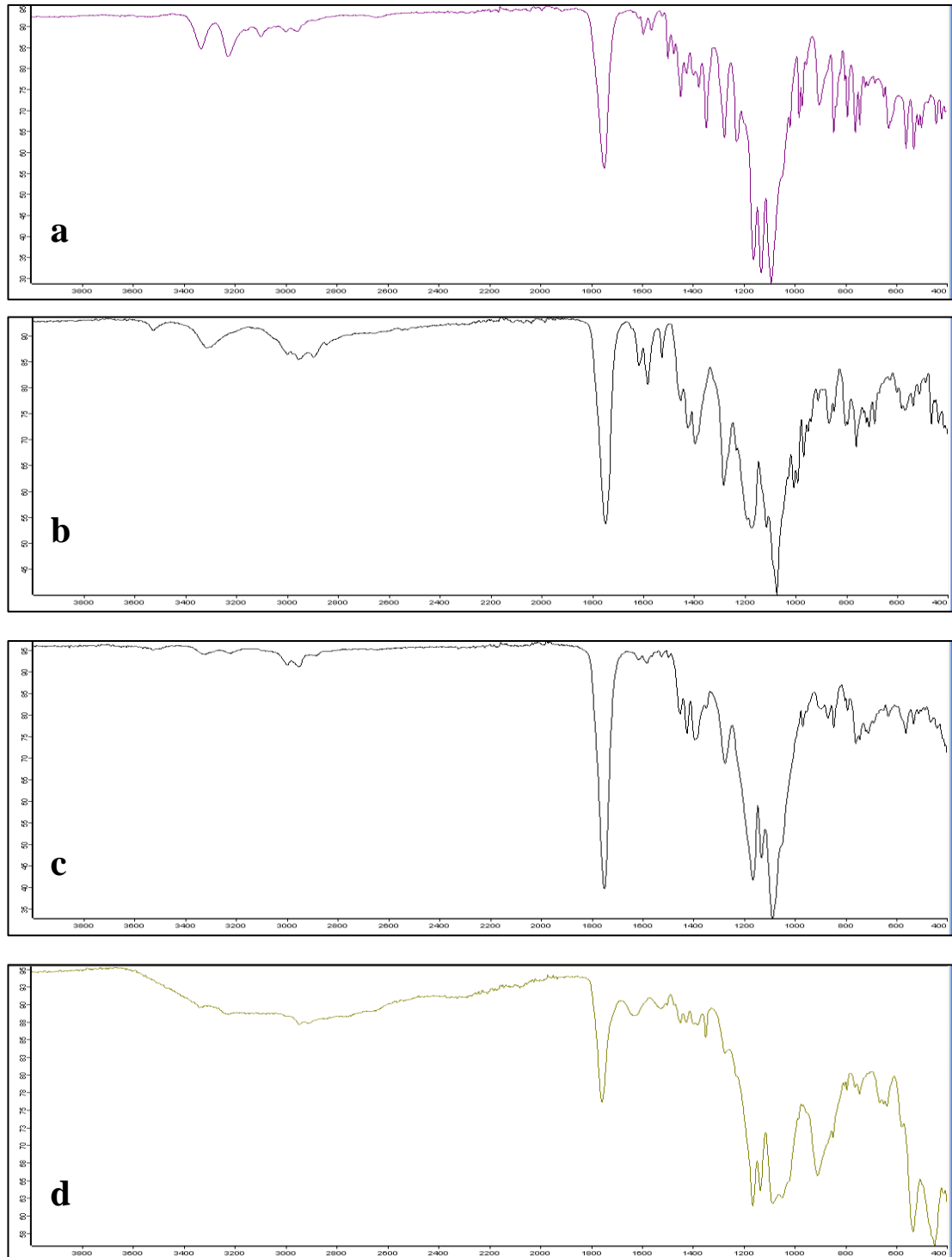
Optimizasyon aracı ile elde edilen formülasyon parametreleri kullanılarak yapılan nanopartikül üretimlerinde ise %10'dan daha küçük hata değerleri ile hedeflenen kritik formülasyon parametrelerin elde edilebildiği gözlenmiştir. (Tablo 4.7)

4.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Optimizasyon çalışmaları sonrasında elde edilen nanopartiküllerin daha detaylı karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İncelenen kritik temel parametreler; nanopartiküllerin büyüklükleri ve dağılımları, morfolojik görünümleri ve şekilleri, zeta potansiyelleri, yükleme kapasitesi, kaplama etkinliği ve etkin madde salım hızı olarak sıralanmaktadır. Partikül büyüklüğü için temel yöntem olarak DLS seçilmiş olup ölçümler AFM ve TEM ile doğrulanmıştır. Yüzey yükü için elektroforetik DLS metodu kullanılmıştır. Nanopartikülden ilaç salımı iki farklı pH a sahip ortamda 37°C’de gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin alendronat ile kaplanmaları ise FTIR ve ³¹P-NMR analizi ile incelenmiştir.

4.4.1. FTIR Analizleri

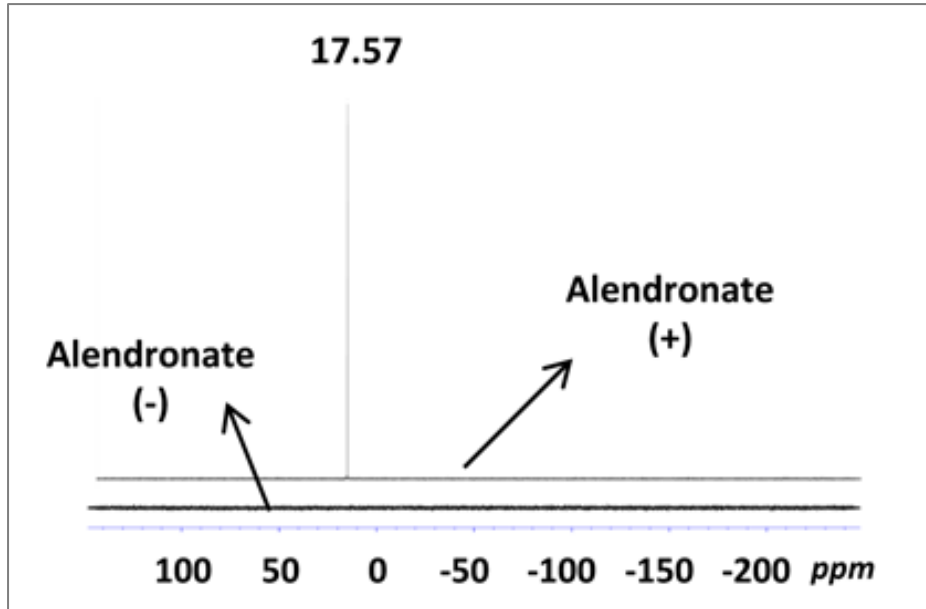
Etkin maddelerin, kaplı olmayan etkin madde yüklü nanopartiküllerin ve alendronat ile kaplanmış etkin madde yüklü nanopartiküllerin FTIR spektrumları alınmıştır. Şekil 4.16.’da sunulan spektrumlar incelendiğinde alendronat kaplanmış olan nanopartiküllerde, yüzeyde yer alan alendronattan kaynaklı olduğu düşünülen 3500cm⁻¹ belirgin, yaygın, karakteristik, hidroksil piki gözlenmiştir.



Şekil 4.16. FTIR Spektrumları a) Selekoksib, b) Dokсорubisin, c) PLGA NP d) Ale(+)-PLGA NP.

4.4.2. ^{31}P -NMR Spektroskopik Analizi

Alendronat moleküler yapısında; PLGA, Dox, Cxb ve PVA'dan farklı olarak fosfor atomu içeren fosfonat grupları barındırmaktadır. Bundan dolayı ^{31}P -NMR spektroskopisi kaplanmış olan nanopartiküllerin yapısında alendronat bulunduğunun kanıtlanması amacıyla kullanılmıştır. Etkin madde içeren PLGA nanopartikülleri ve etkin madde içeren alendronat kaplı PLGA nanopartikülleri ile elde edilen spektrumlar Şekil 4.17.'de gösterilmektedir. PLGA nanopartiküllerinin spektrumunda herhangi bir pik gözlenmezken Aln(+)PLGA nanopartiküllerinde, yüzeyinde bulunan alendronata ait karakteristik singlet fosfor piki 17,569 ppm de gözlenmiştir.



Şekil 4.17. PLGA nanopartikülüne ve ALN(+)PLGA nanopartikülüne ait ^{31}P -NMR spektrumları.

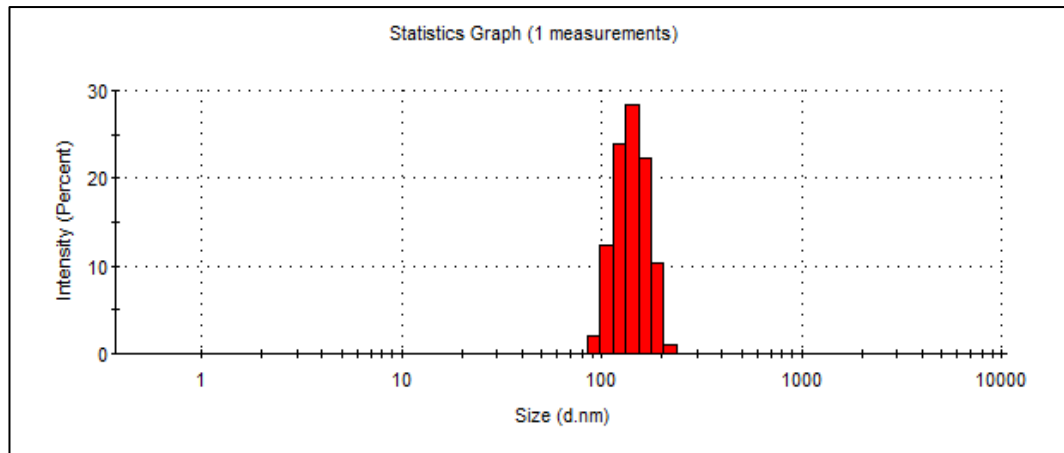
4.4. 3. Partikül Büyüklüğü Dağılımı

Elde edilen nanopartiküllere ait partikül boyutu ölçümleri öncelikle dinamik ışık saçılımı yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ortalama partikül büyüklüğü ve partikül boyut dağılımının bir ölçütü olan poli dispersite indeks (PDI) değerleri Malvern Zetasizer yazılımı ile hesaplanmıştır. Plackett-Burmann tasarımında elde edilen

partikül boyutu değerleri 156,8 nm ile 293,5nm arasında değişirken, BBD tasarımında hazırlanan formülasyonlara ait PB değerleri ise 173,2nm ile 265,4nm arasında değişiklik göstermektedir. Her iki tasarımdan elde edilen sonuçların tümü ise Tablo 4.3. ve Tablo 4.4’te sunulmuştur.

Tablo 4.8. Alendronat ile kaplama öncesi ve sonrası partikül boyutu ve yüzey yükü değişimi

Formülasyon Kodu	Ortalama Partikül Boyutu (nm)	Poli Dispersite İndeksi	Zeta Potansiyeli (mV)
PLGA NP	194,3±5,2	0,186±0,026	-16,3±2,7
Aln(+) PLGA NP	206 ± 7,3	0,263 ± 0,047	-25,6±6,1

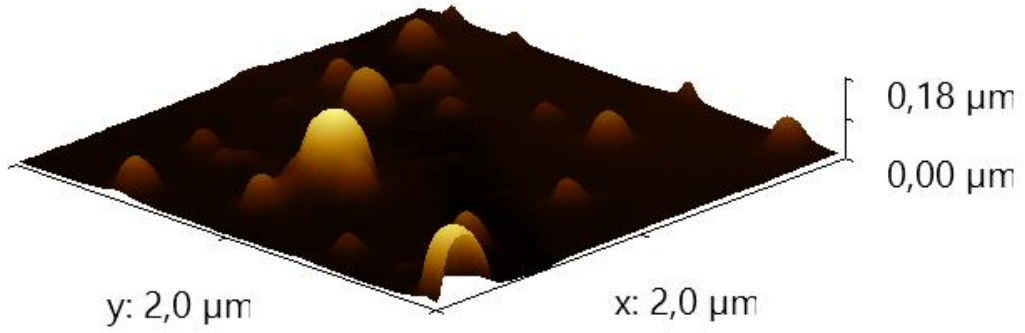


Şekil 4.18. PLGA NP formülasyonuna ait DLS ile elde edilen partikül boyutu dağılımı grafiği.

Tasarım sonucunda elde edilen optimize formülasyonda ise alendronat ile kaplama öncesi ve sonrasında elde edilen partikül boyutu değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). (Tablo 4.8.)

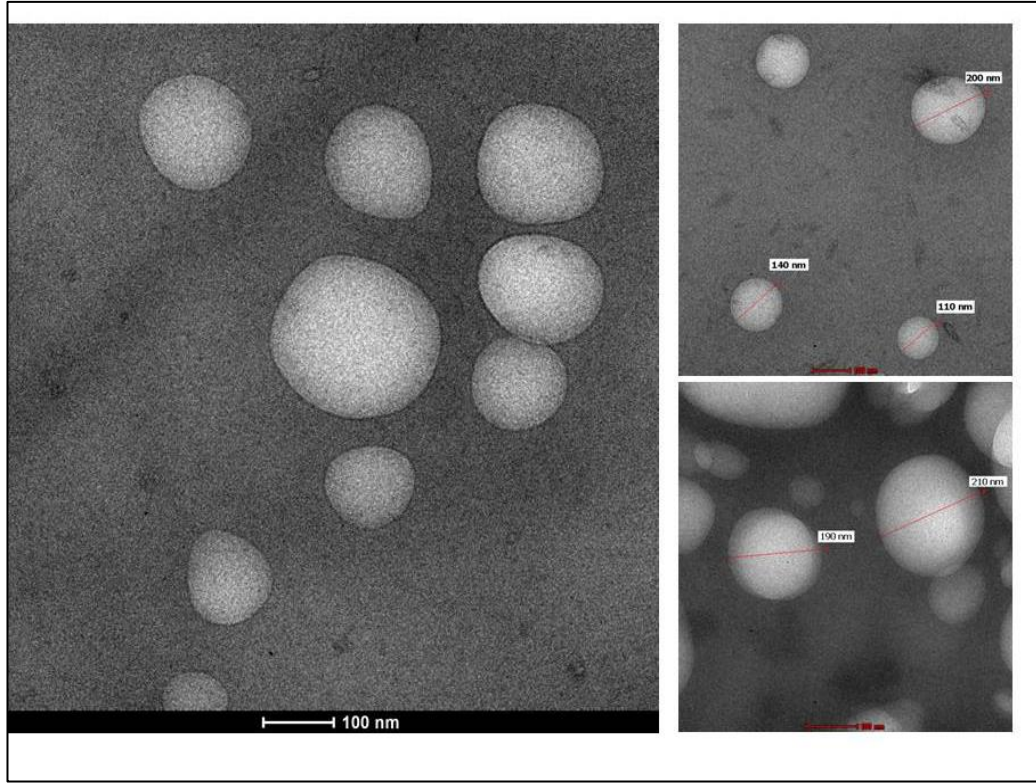
4.4.5. Atomik Kuvvet Mikroskobisi ve TEM

Atomik kuvvet mikroskobu görüntüleme işlemi ile spin döndürme yöntemi ile kurutulmuş nanopartiküllerden elde edilen görüntülere göre nanopartiküllerin küresel ve pürüzlülük oranı düşük yüzey yapısında oldukları gözlenmiştir. (Şekil 4.19.) elde edilen sonuçlar dinamik ışık saçılımı ile elde edilen sonuçların sonuçları destekler niteliktedir. Alendronat kaplanmış ve kaplanmamış nanopartiküller arasında AFM görüntülerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 4.19. PLGA Nanopartiküllere ait atomik kuvvet mikroskobu ölçümü.

Şekil 4.20.'de sunulan TEM fotoğrafları da AFM görüntülerini destekler niteliktedir. Küresel ve yüzey pürüzlülüğü düşük nanopartiküller elde edilmiştir.



Şekil 4.20. PLGA Nanopartiküllere ait TEM görüntüleri.

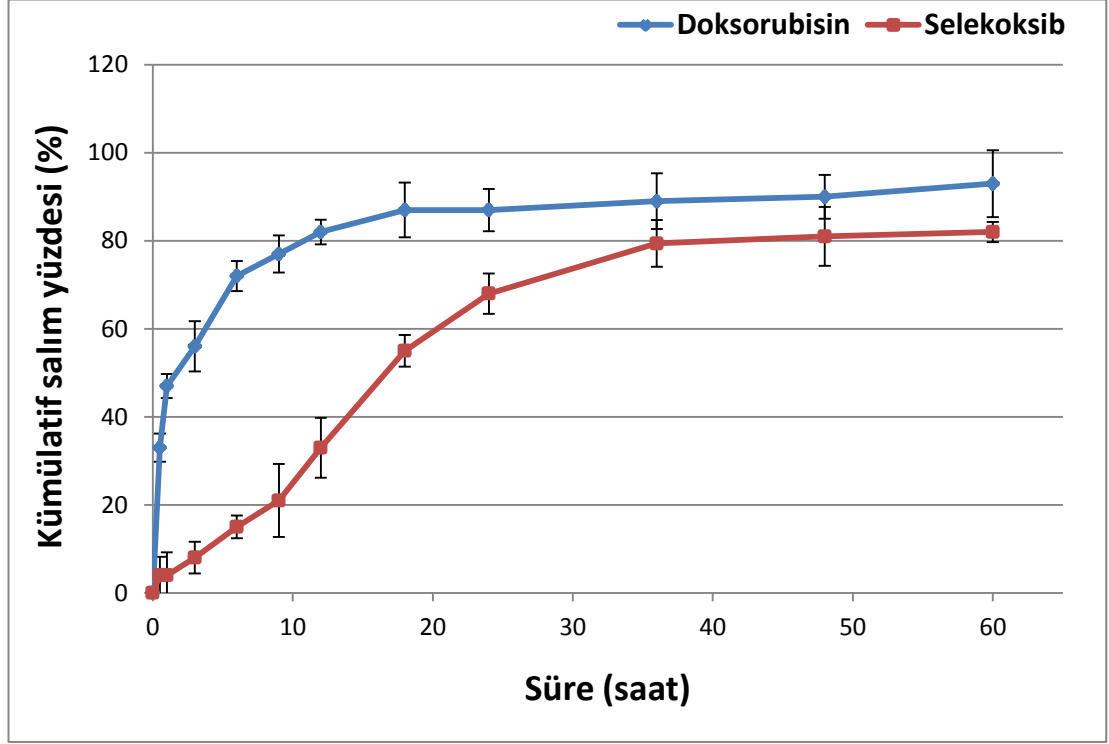
4.4.3. Yüzey Yükü

Nanopartiküllerin yüzey yükleri ultrasaf su içerisinde disperse edilmiş nanopartiküllerin zeta potansiyelleri ölçülerek tespit edilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerde zeta potansiyeli değerleri, PPD kapsamında hazırlanan formülasyonlarda zeta potansiyeli değeri -13,4mV ile -17,9mV arasında değişmekteyken, BBD kapsamında hazırlanan formülasyonlarda ise benzer şekilde -12,3mV ile -17,5mV arasında değişiklik göstermiştir.

Diğer taraftan alendronat kaplaması öncesinde ve sonrasında yapılan zeta potansiyeli ölçümleri, kaplamanın partikül yüzey yükünü anlamlı derecede değiştirdiğini göstermiştir ($p < 0,05$). Diğer parametreler açısından optimize edilmiş nanopartikül formülasyonuna ait zeta potansiyeli değeri -16,3 mV iken, alendronat ile kaplanması sonrasında -25,6mV olarak tespit edilmiştir. (Tablo 4.8)

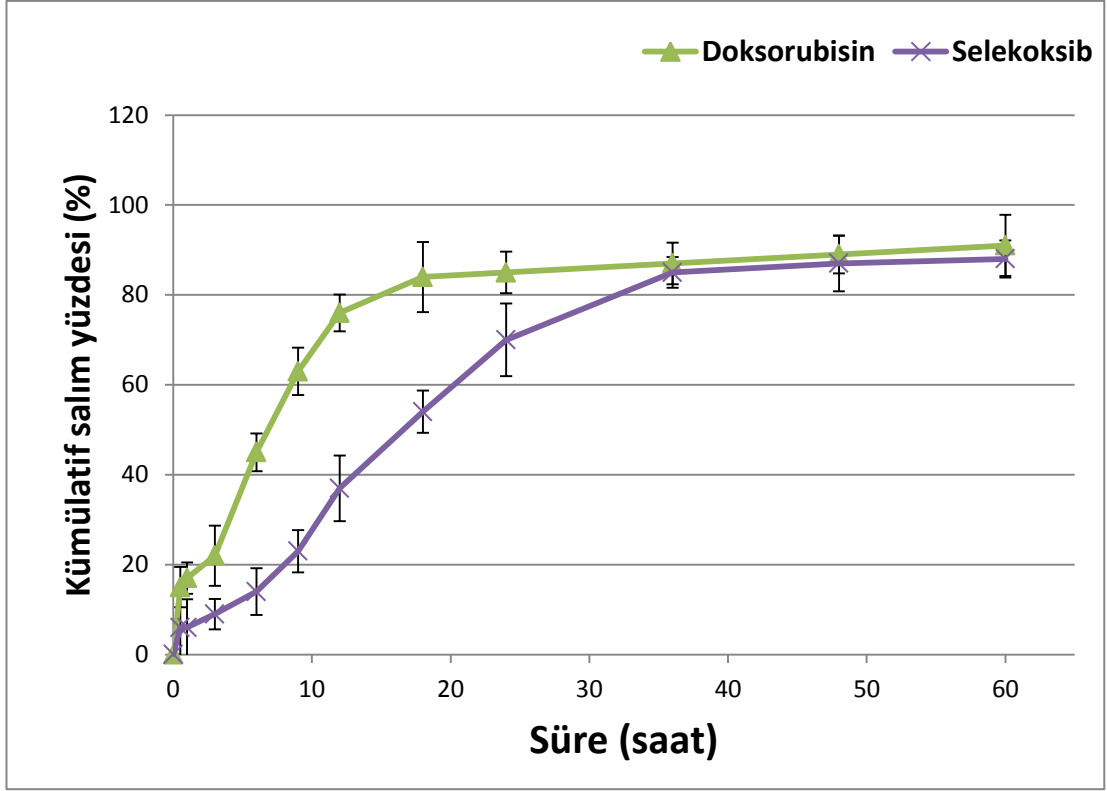
4.4.4. *In vitro* İlaç Salımı

Hazırlanan nanopartikül formülasyonundan Dox ve Cxb'in *in vitro* ortamda salım hızları pH7,4 PBS ve pH 4,5 ortamlarında test edilmiştir.



Şekil 4.21. PLGA-ALE NP Formülasyonuna Ait Salım Grafiği (pH 4,5) (n=6).

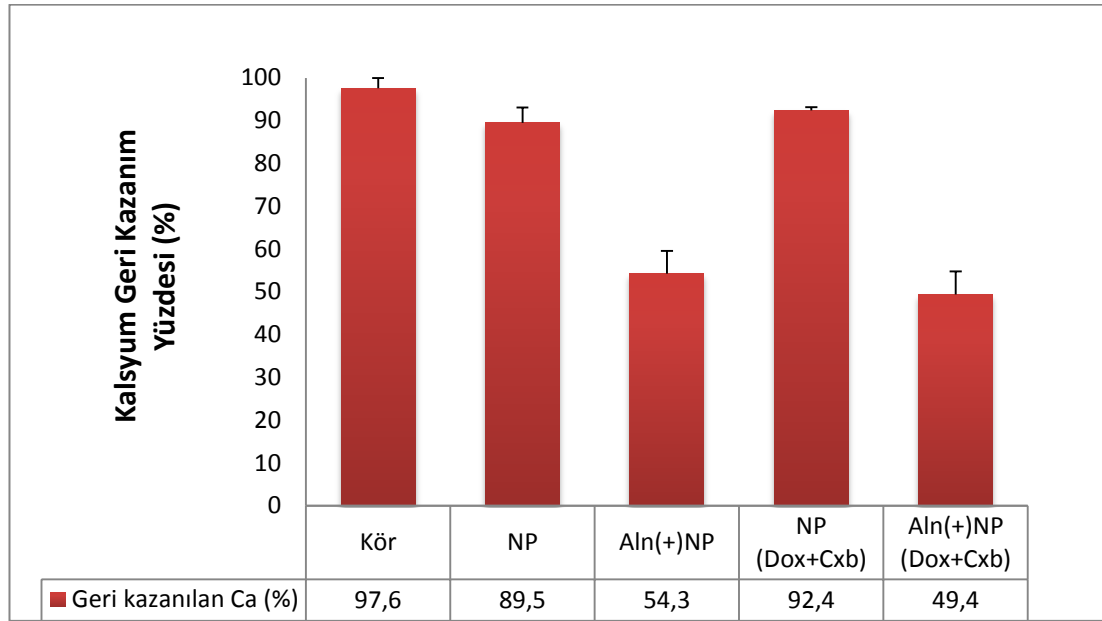
pH 4,5'te doksorubisin %45 üzerinde bir ön salım (burst release) göstermiş olup sonrasında yüklenen dozun %90'dan fazlasının taşıyıcı sistemden 18 saat içerisinde serbestleştiği gözlenmiştir. Selekoksib salımı ise 36 saat içerisinde maksimum %80'lik bir salım profili göstererek platoya ulaşmıştır. (Şekil 4.21.)



Şekil 4.22. PLGA ALE NP Formülasyonuna Ait Salım Grafiği PBS (pH 7,4) (n=6).

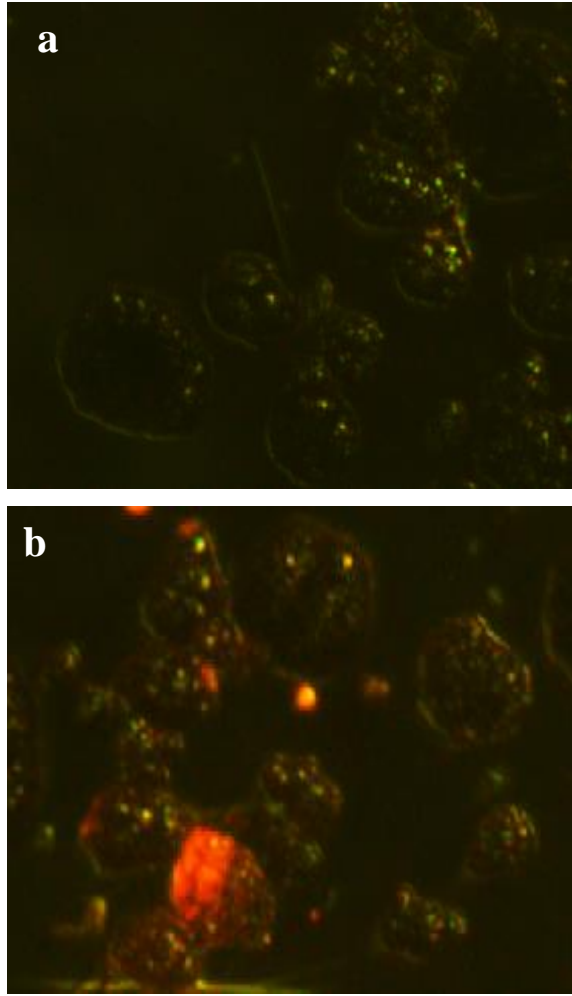
pH 7,4'te doksorubisinin salım hızı pH 4,5'ta göstermiş olduğuna kıyasla daha yavaş olup 24 saat içerisinde salım tamamlanmıştır. İlk birkaç saat içerisinde %20 civarında bir ön salım (*burst release*) gerçekleşmiştir. Selekoksib salımında ise pH etkili bir değişiklik oluşmamıştır ve salım 36 saat içerisinde tamamlanmıştır. (Şekil 4.22.)

Gerçekleştirilen kalsiyum bağlanma kapasitesi testinde, geri titrasyon yolu ile elde edilen sonuçlara göre Aln(+)NP ler (% 45,7), alendronat kaplı olmayan nanopartiküllere (%10,5) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fazla bağlanma eğiliminde tespit edilmişlerdir ($p < 0,005$). Etkin madde yüklenmesi ise Aln(+)NP lerin bağlanma eğiliminde bir değişikliğe neden olmamıştır (% 50,6). Sonuçlar Şekil 4.23.'te detaylı olarak sunulmuştur



Şekil 4.23. Nanopartikül formülasyonlarına ait kalsiyum geri kazanım yüzdeleri.

Hidroksiapatit kristallerinin alendronat kaplı ve kaplı olmayan nanopartiküller ile inkübasyonu sonrasında, floresans mikroskop altında görsel inceleme yapılmıştır. İncelemede Aln(+)NP HA kristalleri etrafında kümelendikleri ve bu bölgedeki floresan intensitenin artmasını sağladıkları gözlenmiştir. Alendronat kaplı olmayan nanopartiküllerde ise görece çok daha düşük intensite ve karanlık bir görünüm elde edilmiştir. Şekil 4.24.'te sunulmuş olan bu görsel çalışma kalsiyum bağlanma kapasitesi sonuçlarını destekler nitelik taşımakta olduğu için önemlidir.

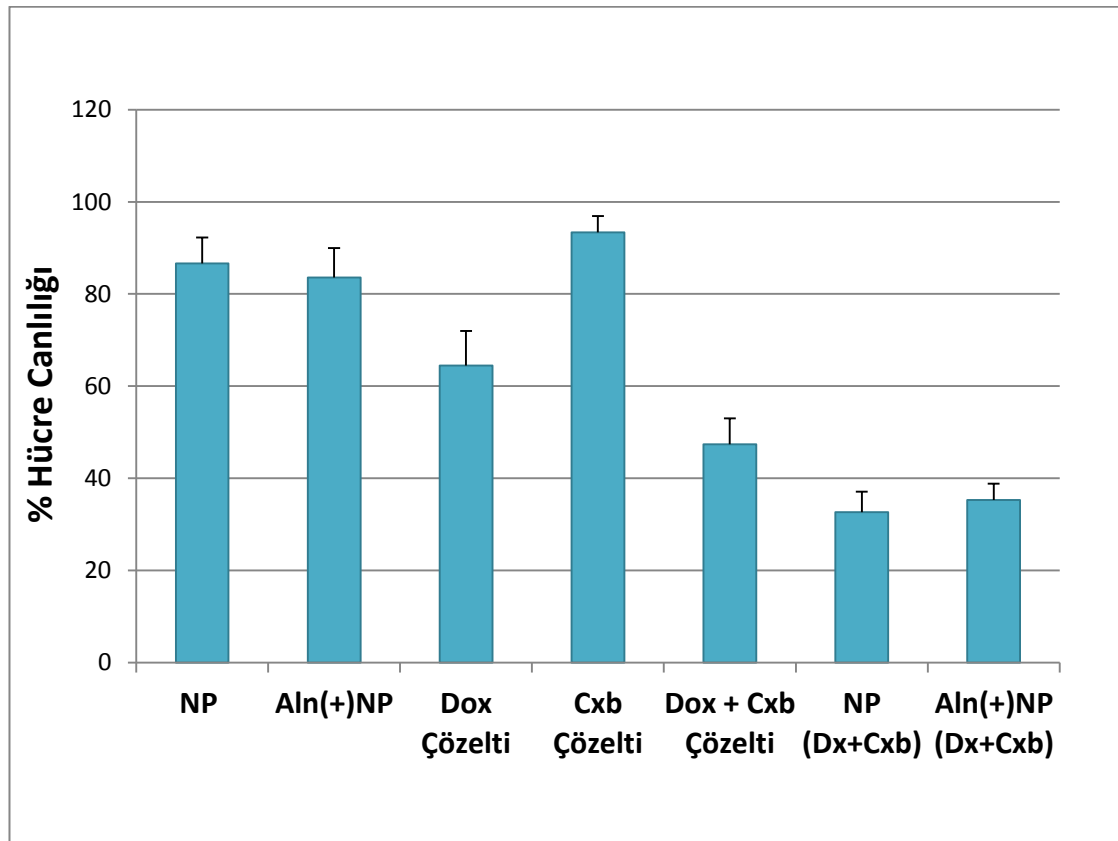


Şekil 4.24. Hidroksiapatit kristallerinin a) alendronat kaplı olmayan b) alendronat kaplı nanopartiküller ile inkübasyonu sonrasında floresan mikroskopunda alınmış görüntüleri.

4.6. Sitotoksosite ve İn vitro Hücre İçine Alım Çalışmaları

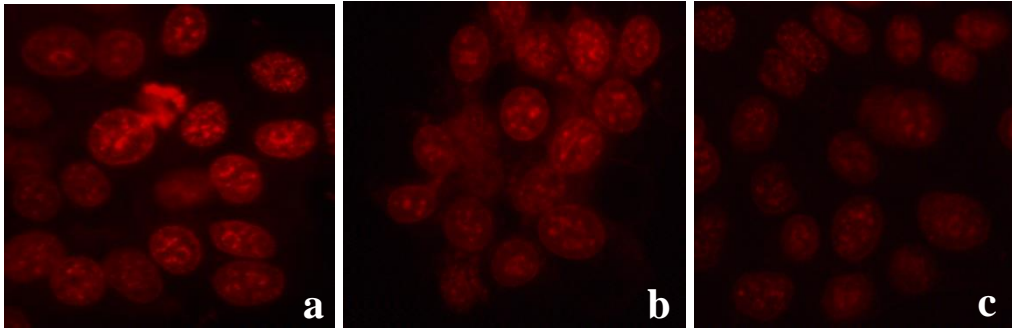
Nanopartikül süspansiyonlarının ve etkin madde çözeltilerinin hücreler üzerine gösterdikleri sitotoksosite düzeyleri MCF-7 hücreleri kullanılarak, WST-1 canlılık testi ile gerçekleştirilmiştir.

Nanopartikül süspansiyonlarının ve etkin madde çözeltilerinin hücreler ile 48 saatlik inkübasyonu sonucunda hücrelerin canlılık oranları ölçülmüştür. Sonuçlar PLGA nanopartiküllerinin sitotoksosite değerlerinin kontrol grubundan anlamlı farklılık göstermediğini ($p>0.05$), alendronat kaplamanın nanopartiküllerin sitotoksitesini üzerine bir etkisinin olmadığı ($p<0.05$) gösterilmiştir. Dox, Cxb ve ikisinin kombinasyonunu içeren çözelti ise doz belirleme çalışmalarındaki benzer sonuçlar göstermiştir. Etkin maddelerin enkapsülasyonu nanopartiküllerin sitotoksitesini üzerine anlamlı bir artışa neden olurken ($p<0.05$), alendronat kaplanması bu artış miktarını değiştirmemiştir. (Şekil 4.25.)



Şekil 4.25. Nanopartikül Süspansiyonlarının ve etkin madde çözeltilerinin MCF-7 hücre canlılığı üzerine etkisi.

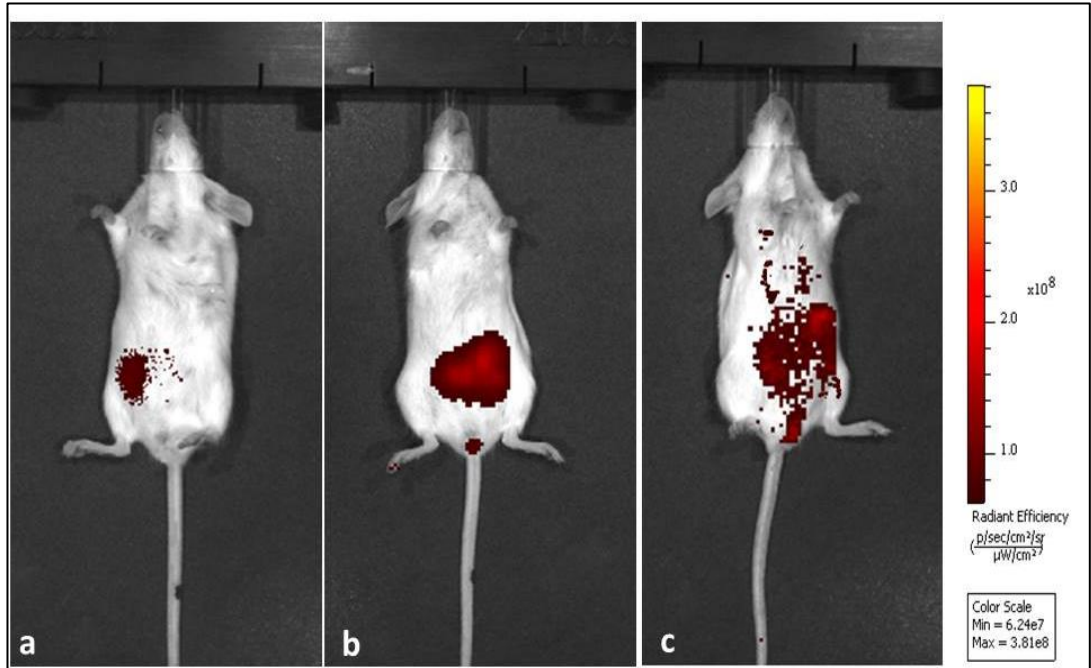
Hücre içine alım çalışmaları için de etkin madde çözeltileri veya nanopartiküller ile inkübe edilmiş MCF-7 hücreleri izotonik sodyum klorür çözeltisi ile yıkandıktan sonra floresan mikroskobu ile görüntülenmişlerdir. 24 saatlik inkübasyon sonrasında elde edilen hücre görüntülerine göre; enkapsüle edilmeyen etkin madde çözeltileri uygulanan hücrelerde intensite değerleri kaplanmış yada kaplanmamış nanopartiküller ile inkübe edilen hücelere kıyasla daha düşüktür. Değerlendirme kalitatif olarak gruplar arasındaki floresan intensitenin kıyaslanmasıyla gerçekleştirilmiştir. (Şekil 4.26.)



Şekil 4.26. 24 saatlik inkübasyon sonrasında MCF-7 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri a) NP b) Aln(+)NP c) Çözelti.

4.7. In Vivo Biyodağılım Çalışması

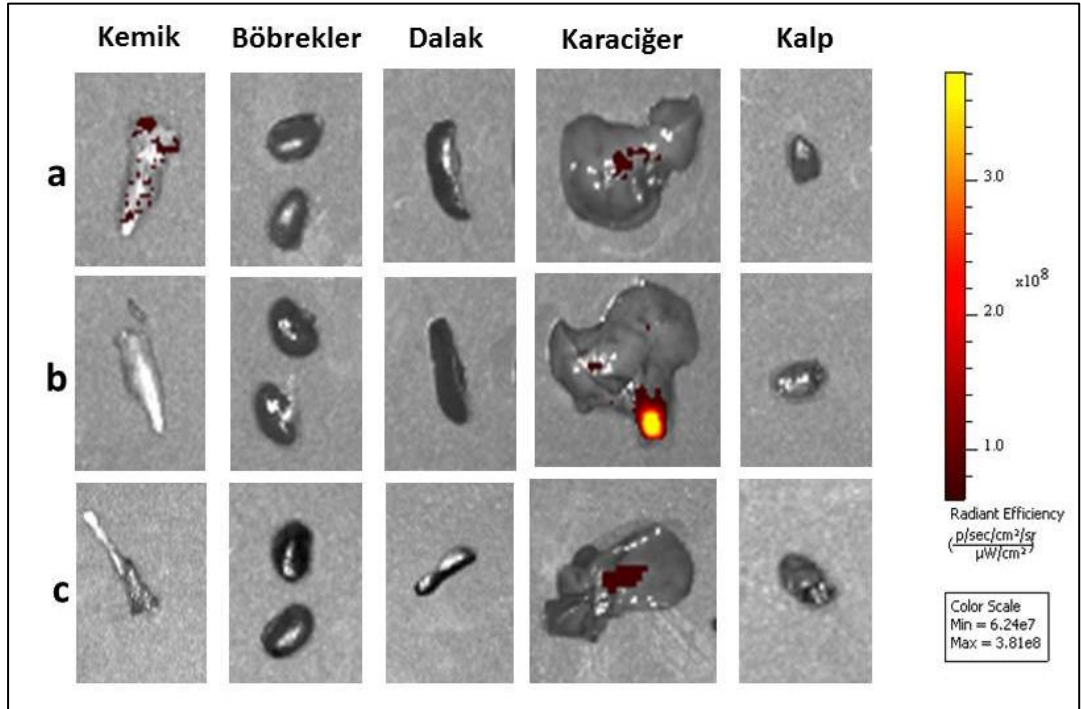
Balb/c ırk, 6-8 haftalık dişi farelerde yapılan in vivo biyodağılım çalışması IVIS görüntüleme sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyondan 6 saat sonra Aln(+)-NP ve An(-)-NP uygulanan hayvanlar canlı haldeyken görüntüleme sistemi ile görüntülenerek, nanopartiküllerin vücut içinde dağılımları gözlenmiştir. 6 saat sonunda elde edilen fotoğraflar Şekil 4.26. da sunulmuştur. Çözelti grubu hızlı bir şekilde vücuttan ıtrah edilirken nanopartiküllerin daha uzun süre intensitelerini korudukları gözlenmiştir. Alendronat kaplı olmayan nanopartiküller yoğunluklu olarak karaciğer bölgesinde lokalize olurken, alendronat kaplı nanopartiküller ise diğer dokularda da bir dağılım göstermişlerdir. (Şekil 4.27.)



Şekil 4.27. Balb/c hayvanlarda 6 saat sonrası nanopartikül görüntüleri (a. ICG çözelti grubu, b. ICG yüklü PLGA nanopartikül grubu, c. ICG yüklü Ale(+)-PLGA nanopartikül grubu).

4.7.1. Ex Vivo Biyodağılım Çalışması

In vivo biyodağılım çalışması sonrasında hayvanlar anestezi altında serebral dislokasyon ile sakrifiye edilmişlerdir. Sonrasında hayvanlara ait organlar çıkartılmış ve serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra IVIS sisteminde görüntülenmiştir. Elde edilen görüntülerde çözelti grubunda ve alendronat kaplı olmayan nanopartiküllerde karaciğerde lokalizasyon gözlenmişken ve özellikle dikkat çekici bir şekilde femur kemik dokusunda floresan intensite gözlenmiştir. (Şekil 4.28.)



Şekil 4.28. Balb/c hayvanlarda 6 saat sonrası çıkartılmış ve yıkanmış organlara ait floresan görüntüler (a. ICG yüklü Ale(+)-PLGA nanopartikül uygulanan hayvana ait organ görüntüleri, b. ICG yüklü PLGA nanopartikül uygulana hayvana ait organ görüntüleri, c. ICG çözeltisi uygulanan hayvana ait organ görüntüleri).

5.TARTIŞMA

5.1.Optimum Doz Kombinasyonu Tespit Çalışmaları

Literatürde selekoksibin ve doksorubisinin sinerjik etki gösterdiğini bildiren birçok çalışma mevcuttur (46-48). Non steroid anti enflamatuar ilaçların ve selektif siklooksijenaz-2 (Cox-2) enzim inhibitörlerinin anti tümör etkinliği artırıcı özelliği meme, kolorektal, akciğer, pankreas, prostat kökenli olan çeşitli kanser hücrelerinde test edilmiştir (213). Gözlenen sinerjik etkiyle ilgili çeşitli mekanizma yorumları mevcut olmasına rağmen en temel yaklaşım selekoksib ile sitotoksik etkin maddenin hücre dışına taşınımını sağlayan p glikoproteinlerin inhibe edilmesi yönündedir. Bu iki etkin maddenin sinerjik antikanser etkileri aynı zamanda MCF-7 hücreleri üzerinde de gösterilmiştir (214). Gözlenen sinerjik etkinlik selekoksibin, meme kanser hücreleri üzerinde çoklu ilaç direncinin gelişim mekanizmaları üzerine etki ettiği yönünde değerlendirilmiştir. Bu çalışmada mevcut deney ortamında en uygun dozun tespit edilmesi için doz kombinasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bununla amaçlanan aynı etkinliğin daha düşük doksorubisin dozu ile sağlanabileceği optimum doz kombinasyonunu tespit etmektir ve nanopartikül içerisine yüklenecek etkin madde doz oranını belirleyebilmektir. Hücreler üzerine etkin maddelerin çözeltileri eklenmiş ve 48 saat sonra hücre canlılıkları WST-1 testi ile kontrol edilmiştir. Canlılık testi ile MCF-7 hücre canlılığı üzerine; doksorubisinin ve selekoksibin farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin ne şekilde etki ettiğini göstermek amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre selekoksib çözeltisi, doksorubisinden neredeyse 10 kat daha fazla konsantrasyonda uygulansa dahi daha az sitotoksisite göstermiştir. Bu durum etkin maddelerden beklenen esas farmakolojik etki ile uyumlu bir sonuçtur. Doksorubisin DNA'ya şelasyon yaparak hücrenin ölümünü tetikleyen bir sitotoksik ilaç iken, selekoksib ise hücrelerdeki enflamatuar cevabın sebebi olan Cox-2 enziminin selektif inhibitörüdür.

Bununla birlikte kombinasyon denemelerinden elde edilen sonuçlar bu kadar öngörülebilir sonuçlar değildir. 0,1µg/mL, 0,3µg/mL ve 0,5µg/mL konsantrasyonlardaki doksorubisin çözeltileri, 2,5 µg/mL, 5µg/mL ve 10µg/mL konsantrasyonlardaki selekoksib çözeltileri ile sırayla kombine hale getirilmişlerdir.

Doksorubisinin farklı konsantrasyonlarda uygulandığı üç farklı grupta da

selekoksibin belli bir konsantrasyondan sonra artışı sitotoksik etkiyi etkilememektedir. Elde edilen bulgulara göre, 5µg/mL ve 10µg/mL selekoksib içeren gruplar arasında anlamlı bir sitotoksikite farkı bulunmamaktadır ($p < 0,05$). Bu durum sinerjik etkinin selekoksibin sitotoksik etkisinden değil de, doksorubisinin sitotoksik etkisini uzatıcı/arttırıcı etkisinden kaynaklandığı yönündeki görüşleri de destekler niteliktedir. Literatürde daha önce gerçekleştirilen MCF-7 hücrelerinin kullanıldığı çalışmalarda elde edilen gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre, doksorubisin (0,05µg/mL) ile birlikte selekoksibin (10µM) de ilave edildiği hücrelerde yalnızca doksorubisine (0,05µg/mL) maruz kalan hücelere kıyasla belirgin şekilde MDR1 mRNA ekspresyonu inhibisyonu gerçekleşmiştir (214). Bu inhibisyonu kanser hücrelerinin doksorubisin gibi sitotoksik etkin maddelere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmalarından birinin devre dışı bırakılmasını ve sitotoksik etkin maddenin daha düşük dozda etkisini gösterebilmesini sağlamaktadır. Benzer sonuçlar farklı hücre hatlarında ve in vivo çalışmalarda da gözlenmiştir (215).

Doksorubisin direnç yollarının inhibisyonunun doygunluğa ulaşması sonucunda selekoksib konsantrasyonundaki belirli dozdan sonraki artış, sitotoksikite sonuçları üzerinde anlamlı etki göstermemektedir.

0,5 µg/mL konsantrasyondaki doksorubisin çözeltisinde ise doksorubisinin daha yüksek oranda gözlenen sitotoksik etkisi, selekoksib ile oluşan sinerjik etkiyi gölgeleyen düzeydedir. Beklenen (kombinasyonun içeriğindeki doksorubisin ve selekoksibin ayrı ayrı sitotoksikite değerleri) ve gözlenen sitotoksikite değerleri incelendiğinde en yüksek farklılığın 0,3 µg/mL doksorubisin + 5 µg/mL selekoksib kombinasyonunda gözlendiği tespit edilmiştir. Etkin madde çözeltilerinin kombinasyondaki dozda MCF-7 hücre hattında gösterdikleri bireysel sitotoksikite değerlerinin toplamı % 42,14 iken, kombine çözeltide gözlenen sitotoksikite değeri %61,17 olmuştur. Bu doz oranı 3:50 (Dox:Cxb) nanopartikül formülasyon dizaynında hedef olarak seçilmiş ve optimizasyon çalışmaları bu doğrultuda gerçekleştirilmiştir. Literatürdeki farklı hücre hatları kullanan çalışmalarda da sonuçlar benzer şekilde bulunmuştur (48-51, 215).

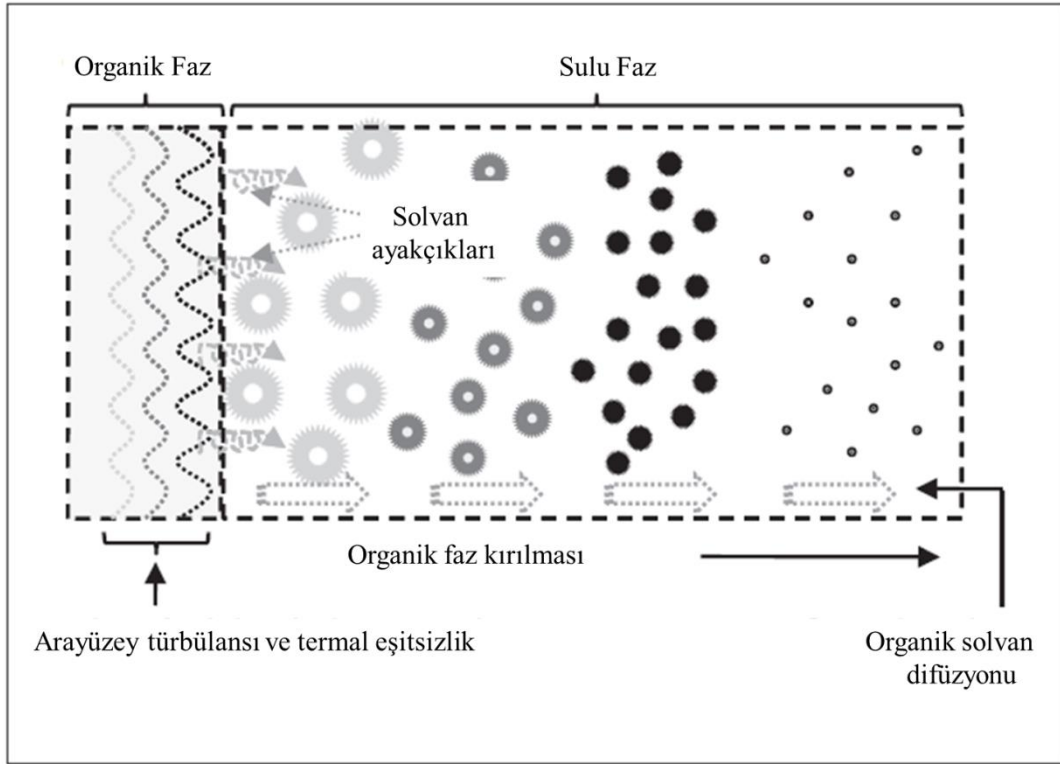
5.2. PLGA Nanopartiküllerin Hazırlanması

Literatürde polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında tezin genel bilgiler kısmında da belirtilen çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında ise nanopartiküller nanopresipitasyon tekniği ile hazırlanmışlardır. Su ile karışabilen bir organik solvan içerisinde polimer çözülür ve çözelti suya ilave edilir. Suda çözünmeyen polimer ise etrafında organik faz molekülleri ile birlikte su moleküllerinin de bulunmasıyla çöker ve nanopartikül süspansiyonu oluşur. Oluşum mekanizması Şekil 5.1.'de şematize olarak gösterilmiştir. Tekniğin esası polimerik parçacıkların anti solvan tekniğine göre çökmeleridir. Çalışmada bulunduğu sınıf ve literatür çalışmaları değerlendirilerek aseton organik faz olarak seçilmiştir. Partiküller asetonda çözündürülen PLGA'nın sulu faza damla damla ilavesi esnasında elde edilmiştir. Hızlı nanopartikül oluşumu ve yüksek enerji gerektirmeyen bir metod olmasına rağmen partikül boyutu açısından uzo bölgesi adı verilen belirli bir aralıkta partiküllerin oluşabilmesine olanak tanımaktadır (216-218).

Tez çalışmasının amacı olan kemik dokusuna hedeflendirme yaklaşımı literatürde farklı yollarla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardan bazıları şu şekildedir: Wang ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada nanopartiküllerin üretiminde kullanılan PLGA polimeri ile hedeflendirme ajanı olan tetrasiklin türü antibiyotiklerin graft polimer haline getirilerek kullanılmış ve elde edilen sistemin etkinlikleri in vitro ve in vivo olarak incelenmiştir (219). Bir diğer çalışmada ise Jiang ve arkadaşları hedeflendirici ajan olarak asidik bir oligopeptid olan poli aspartik asit kullanmışlardır. Nanopartiküllerin üretiminde PLGA polimeri kullanmış olup, in vitro hücre kültürü ve afinite çalışmaları ile geliştirdikleri sistemin etkinliğini göstermişlerdir (220). Bu çalışma kapsamında hedeflendirme ajanı olarak nanopartiküllerin kaplamasında kullanılan bir bisfosfonat türevi olan alendronat, primer amin içeren uç grupları ile etkileşimin yüksek olması amacıyla karboksilik asit ucuna sahip olan PLGA polimer türevi tercih edilmiştir.

Literatür çalışmalarına benzer şekilde kullanılan polimerde laktik ve glikolik asit oranları 50:50 olup bu oran diğer PLGA türevlerine göre daha yüksek hızda degradasyon olanağı sağlamıştır (186, 211, 219, 221). Tasarlanan sistemde öncelikli amaç her iki etkin maddeyi de hedeflenen dokuya gittikten sonra kısa süre içerisinde

içeriğinden dışarı çıkartması şeklindedir.

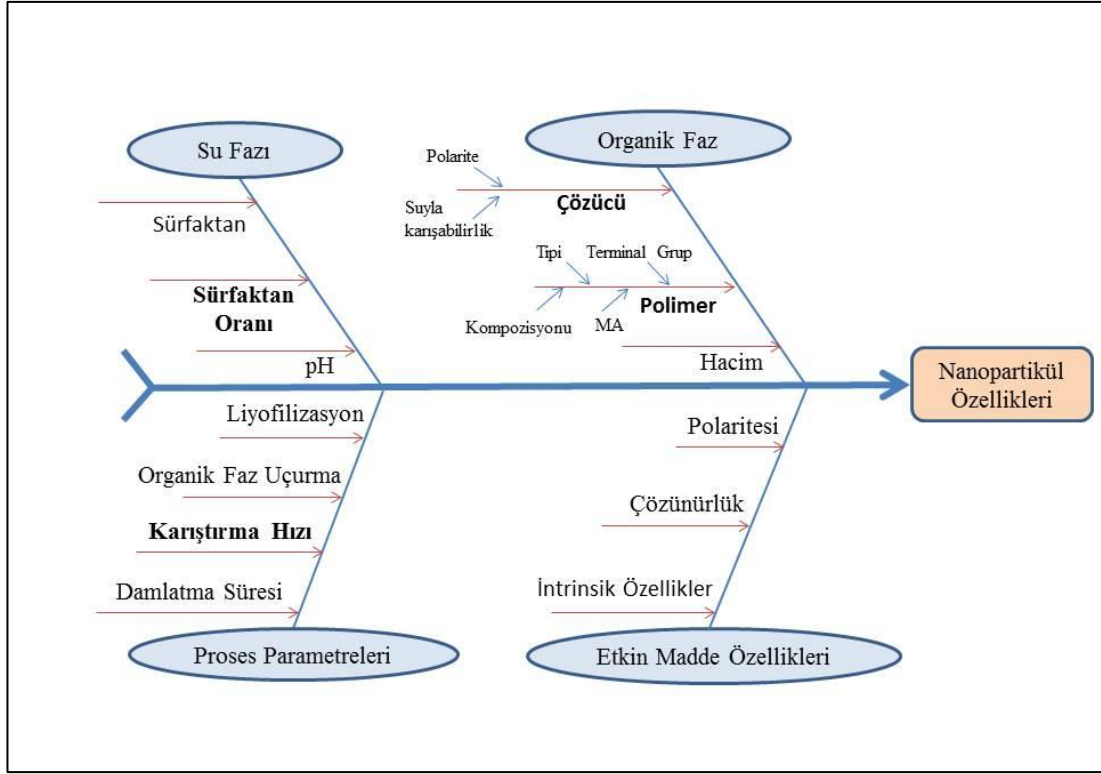


Şekil 5.1. Nanopresipitasyon tekniği ile nanopartiküllerin oluşum mekanizmasının şematik gösterimi (144).

Nanopartiküllerin alendronat ile kaplama prosesi esnasında nanopartiküllerin alendronat ile hangi oranda inkübe edilmeleri gerektiği, artan konsantrasyonlarda alendronat çözeltileri kullanılarak belirlenmiştir. Alendronat kaplama prosesinde alendronatın suda çözünen türevi olan alendronat sodyum kullanılmıştır. Artan alendronat ilaveleri sonrasında kaplanma oranı bir noktaya kadar artmış ve bir noktadan sonra sabitlenmiştir.

5.3. Kritik Parametrelerin Belirlenmesi ve Formülasyon Optimizasyonu

Öncelikli olarak nanopartiküllerin üretimine etki edebilecek parametreler Şekil 5.2.'de de belirtildiği üzere gruplanmışlardır. Literatürde yer alan bilgiler ışığında en etkili olabileceği düşünülen sekiz parametre, Plackett Burmann deney tasarımı ile incelenmişlerdir. Böylelikle parametrelerin etki düzeyleri ve istatistiksel olarak etkili olup olmadığı araştırılmıştır.



Şekil 5.2. Nanopartikül üretiminde etkili olabileceği düşünülen proses ve formülasyon parametreleri.

5.4. Partikül Büyüklük Dağılımı

PBD ve BBD kapsamında üretilen nanopartiküllerin partikül boyutları dinamik ışık saçılımı prensibine göre ölçülmüştür. Ortalama partikül boyutu değerleri ise yazılım aracılığıyla hesaplanmıştır. Partikül boyutu nanopresipitasyon metodun izin verdiği aralıkta gözlenmiştir. Plackett Burmann deney tasarımı ile elde edilen partikül büyüklükleri incelendiğinde, farklı formülasyonlardan elde edilen en küçük partiküller 156,8nm ve en büyük partiküller 293,5nm ortalama partikül boyutuna sahiplerdir. Box-Behnken Deney tasarımı ile üretilen 15 farklı formülasyonda ise en düşük ortalama partikül boyutu 169,6nm iken en yüksek ortalama partikül boyutu 265,4nm olarak tespit edilmiştir.

Dinamik ışık saçılımı metoduyla ölçülen partikül boyutu, partikülün sıvı içerisinde oluşturduğu brownian hareketlerden kaynaklı ışık saçılmasını oluşturacak eşdeğer kürenin çapı olarak hesaplanmaktadır. Dolayısıyla ölçümü yapılan partiküller küresel geometriye ne kadar yakınsa, elde edilen sonuçların doğruluğu da o derece yüksek olmaktadır. Partiküllerin geometrisi AFM ve TEM analizleri ile

ölçülmüştür. Elde edilen görüntüler, üretilen partiküllerin dar bir partikül boyutu aralığında dağılan ve küresel partiküller olduğunu göstermiştir.

Optimum formülasyon için alendronat kaplama öncesi (194,3nm) ve sonrasında (206nm) yapılan ölçümler; kaplama işleminin partikül boyutunu değiştirmedeği fakat yüzey yükü üzerinde değişikliğine neden olduğunu göstermiştir. Kemiğe hedeflendirmenin çalışıldığı literatürdeki benzer çalışmalar 200nm civarında partiküller kullanılarak elde edilmiş olup, bu bilgiler ışığında tez kapsamında üretimi yapılan nanopartiküllerin de amaca uygun olacağı düşüncesiyle in vitro ve in vivo çalışmalara geçilmiştir (186-188).

5.5. Yüzey yükü

Partiküllerin yüzey yükü özellikleri, aynı ortamda disperse edilip zeta potansiyeli değerleri ölçülerek gerçekleştirilmiştir. Kullanılan ölçüm yöntemi dinamik ışık saçılımı yöntemine benzer olup bu sefer partiküllerin bir elektrik alanda gerçekleştirdikleri hareketlerden oluşan ışık saçılmaları ölçülerek internal bir fonksiyon yardımıyla zeta potansiyeli değerini vermektedir. PPD ve BBD formülasyon denemelerin zeta potansiyelin incelenen parametrelerden herhangi birisiyle anlamlı derecede ilişkili olmadığı tespit edilmiştir. PBD formülasyonlarında -17,4 ile -13,4mV arasında değişirken; BBD formülasyonlarında zeta potansiyeli değerleri -17,5 ile -12,3mV arasında değişmektedir. Zeta potansiyeline temelde etkili faktörün kullanılan polimer tipi olduğu bilinmektedir (222-224). Optimizasyon çalışmaları kapsamında üretilen denemelerde elde edilen zeta potansiyeli değerleri (-) değeri sahiplerdir. İleri çalışmalar için seçilen nanopartikül formülasyonunda ise alendronat kaplama öncesinde -16,3mV olarak tespit edilen zeta potansiyeli, kaplama sonrasında -25,6mV olarak değişmiştir.

Partiküler stabiliteyi inceleyen DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, Overbeek) teorisi, kolloidal bir sistemde partiküller üzerindeki kuvvetlerin, elektrostatik itme ve van der Waals çekme kuvvetleri olduğunu ileri sürmektedir (67). Bu esasa göre partikül yüzeyindeki yüksek elektrostatik yük, partiküllerin birbirinden ayrılmasını ve kolloidal dispersiyonun fiziksel olarak dayanıklılığının artmasını sağlarken, van der Waals çekim kuvvetleri agregasyona neden olmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan nanopartiküllerin yüzeyindeki bu elektriksel

tabakanın değerlendirilmesi zeta potansiyel ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyellerinin belirlenmesi sistemin dayanıklılığı hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. Partiküllerin kolloidal stabilitesi üzerine etkili olan bir diğer etmen ise sulandırıldıkları, disperse edildikleri fazın viskozitesidir. Liyofilizasyon sonrası yapılan ölçüm sonuçları, ürünün kullanım öncesinde sulandırılarak/disperse edildiği takdirde uygun bir fiziksel stabiliteye sahip olacağını göstermiştir. Dispersiyon ve sulandırma sonrasında hastaya uygulanmadan önce uzun süre stabil olması yönünde, ileri formülasyon çalışmaları ile değerlendirme ve yeniden şekillendirme yapılması mümkündür.

5.6. In vitro İlaç Salımı

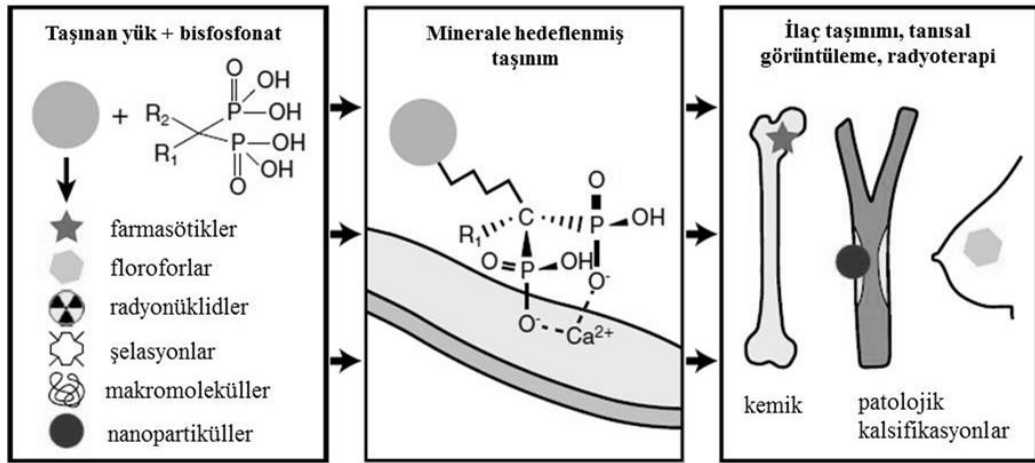
Etkin maddelerin optimize edilmiş nanopartikül formülasyonundan salım denemeleri hem kan dolaşımını simüle etmek için pH 7,4'te kanserli hücre dokusunun nispeten asidik mikro çevresini simüle etmek için pH 4,5'ta gerçekleştirilmiştir.

Doksorubisin salım hız, salım ortamının pH'ı düştükçe artış göstermiştir. pH 7,4'te %20 lik bir ön salım (*burst release*) gözlenirken pH 4,5 salım ortamında bu değer %45'lere çıkmıştır. Bu durum literatürde belirtilen doksorubisin iyonizasyonu ile ilgili veriler ile paralellik göstermektedir (41). Doksorubisin tuz formunun sudaki yüksek çözünürlük değeri olarak yorumlanmıştır. Ayrıca formülasyonda pH duyarlı salım tasarlanmamış olmakla birlikte bu profilin gözlenmesi taşıyıcı sistem için bir avantaj sağlamıştır. Selekoksisib ise hidrofobik doğasının da etkisiyle, pH'dan bağımsız olarak salım profili göstermiştir. Düşük pH hem tümör mikro çevresinde hem de hücre içi lizozomlarda gözlenmektedir. Bu durum da etkin madde salımının kanserli hücreler yakını ve internalizasyon sonrası hızlanacağını düşündürmektedir. Taşıyıcı sistem tasarımında haftalar, aylar sürecektir uzun süreli bir salım öngörülmemiş olup nanopartikül hedef bölgeye ulaştığında hızlı bir şekilde etkin maddeleri salarak etkinliğini göstermesi hedeflenmiştir. PLGA in 50:50 kopolimer seçimi ve matriks tipi bir nanopartikül tasarımı bundan dolayı gerçekleştirilmiştir (132).

5.7. In vitro Bağlanma Özelliklerinin Araştırılması

Bisfosfonatlar klinikte osteoporoz tedavisinde kullanılan bir ilaç grubu olup son yıllarda kemiğe ilaç hedeflendirilmesinde tercih edilen ligandlardır (225). Alendronat ise taşıdığı serbest amin grubu nedeniyle bisfosfonatlar arasında hedeflendirme amacıyla en sık kullanılan moleküllerdendir.

Çoğunlukla mevcut hedeflendirmede yaklaşım, tedavi edici olan moleküle bisfosfonat konjuge edilmesi yönündedir. Bu yaklaşım daha iyi karakterizasyon sağlamakla birlikte, taşınmak istenilen molekülün konjugasyon sonrası farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin değişebilmesi söz konusu olmaktadır. Şekil 5.3.'te özetlenen kalsifiye dokuya hedeflendirmede, bisfosfonat molekülleri tedavi edici farmasötik bir moleküle, işaretlemeye kullanılan bir florofor bileşiğe ya da radyonüklide, bir şelasyon ajanına yada taşıyıcı bir sisteme konjuge edilebilmektedir. Bu konjugasyon sonrasında bisfosfonat molekülünün kalsiyum iyonlarına afinitesi sayesinde tedavi/görüntüleme amacıyla hedef dokuya ulaşım mümkün olabilmektedir.



Şekil 5.3. Bisfosfonatlar ile gerçekleştirilen hedeflendirme yaklaşımları (225).

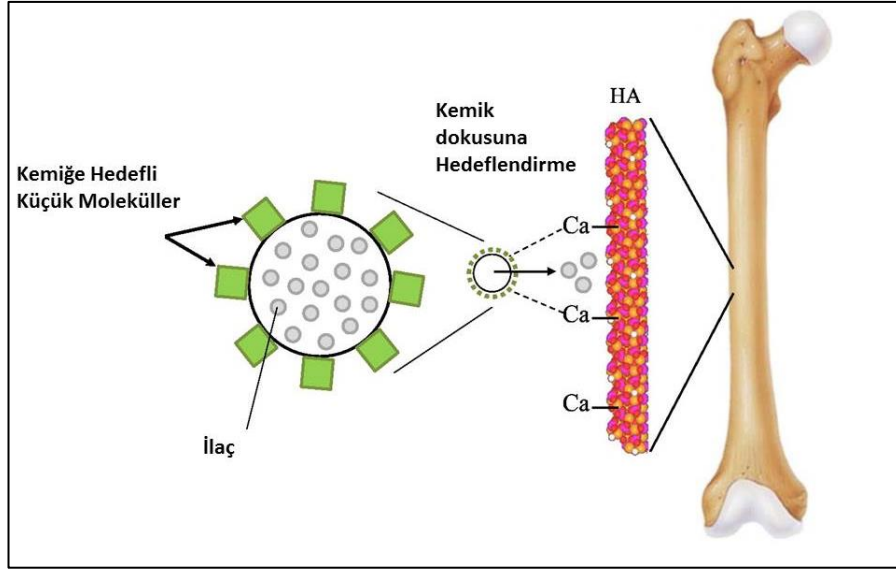
Bu çalışmada ise Şekil 5.3'te de belirtildiği gibi, bir bisfosfonat olan alendronat, nanopartikül yüzeyine kaplanmış ve farmakolojik etkisi beklenen etkin maddeler olan doksorubisin ve selekoksib herhangi bir şekilde konjugasyona tabi

tutulmamışlardır. Böylelikle etkin maddelerde yer alan ve farmakolojik etkinin gözlenmesini sağlayan efektör grupların korunması sağlanmıştır.

Alendronatın nanopartikül yüzeyine kaplanıp kaplanmadığı ^{31}P -NMR spektroskopisi ile irdelenmiştir. Prensibi gereği yalnızca P atomlarının varlığında sinyal oluşturan ^{31}P -NMR ölçümlerinde, alendronat kaplanmış ve kaplanmamış PLGA nanopartikülleri analize tabi tutulmuşlardır. PLGA nanopartiküllerine ait spektrumda herhangi bir pik gözlenmezken, alendronat ile kaplanmış nanopartiküllerde 17,8 ppm de fosfor gruplarına ait karakteristik singlet bir pik gözlenmiştir. Benzer doğrulama yaklaşımı literatürde hedeflendirici ajan olan alendronat kullanılan başka çalışmalarda da elde edilmiştir (208).

Taşıyıcı sistemin hedeflenme özelliği literatür çalışmalarına benzer şekilde üç aşamalı olarak test edilmiştir. Birinci aşama molekül düzeyde etkileşimin incelenmesi yönünde olup, nanopartiküllerin kalsiyum bağlama kapasitelerini incelemiştir (219). Kalsiyum, kemik dokusunun inorganik yapısının temel elementidir. İkinci aşamada ise en başta kalsiyum olmak üzere başka mineralleri de içeren ve kemikte mineral depolanmasında yapıtaşısı olan hidroksiapatit kristallerine hedeflendirme özelliği test edilmiştir (219). Üçüncü ve son aşamada ise canlı hayvanlarda kemik dokusuna ve diğer organlara taşıyıcı sistemin afinitesi test edilmiştir (188).

Kalsiyum bağlanma kapasitesi sonuçları incelendiğinde elde edilen kalsiyum bağlanma oranının literatürde yer alan başarılı çalışmalarda elde edilen oranlara benzer olduğu ve alendronat ile kaplanmış olan nanopartiküler sistemin kalsiyum içerecek dokulara yüksek afinite göstereceği ispatlanmıştır. Kalsiyum bağlanma testi hem etkin madde içermeyen alendronat kaplı nanopartiküller hem de etkin madde yüklenen nanopartiküller ile gerçekleştirilmiştir. PLGA nanopartiküllerinde %10,5 oranında kalsiyum bağlanması gözlenirken, alendronat kaplı olanlarda bu değer %45,7'ye yükselmiştir, etkin madde yüklü alendronat kaplı nanopartiküllerde ise %50,6 olarak tespit edilmiştir. Sonuçta alendronat kaplamanın kalsiyum bağlanma afinitesinde belirgin artış gösterdiği ancak etkin madde yüklenmesinin bu bağlanmayı değiştirmediği tespit edilmiştir.



Şekil 5.4. Geliştirilen kemiğe ilaç taşıyıcı sistemin şematik gösterimi (226).

Hidroksiapatit kristalleri kemiğin inorganik matriksini oluşturan temel yapılardır. Metastatik lezyonlarda osteoklastik aktivitenin atılmış olması ve kemiğin HA ile benzer inorganik yapı göstermesi sonucunda hidroksiapatit kemik dokusunda yer alan sekonder tümör doku çevresini simüle etmek için kullanılabilir (227, 228). Aln(+)-NP nanopartiküllerinin kemik afiniteleri hidroksiapatit bağlanma ve görüntülenme metodu ile test edilmişlerdir. HA ve nanopartiküllerin inkübasyonu sonrasında floresan mikroskopu ile görüntüleme yapılmıştır. Nanopartiküller optik bir mikroskopla görüntülenemeyecek kadar küçük yapılardır. Bundan dolayı nanopartiküllerin doğrudan görüntülenmesi mümkün olmamıştır. Ancak HA yüzeyine adsorbe olmuş nanopartiküllerin sahip olduğu yüksek intensite değeri, alendronat kaplamanın HA kristalleri üzerinde afiniteyi arttırdığını göstermektedir. Her iki grup da inkübasyon sonrası yıkanmış olup, salınmış etkin maddeler ve apatit yüzeyine adsorbe olmamış nanopartiküller ortamdan uzaklaştırılmıştır. Böylelikle gözlenen intensite artışının NP içerisindeki doksorubisin kaynaklı olduğu yönündeki kalsiyum bağlanma kapasitesi sonuçlarını desteklemiştir.

5.8. Hücre içine Alım ve Sitotoksitenin Değerlendirmeleri

Nanopartiküllerin sitotoksitenin değerlendirilmesi yine MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrasında, alendronat

kaplı olan ya da olmayan nanopartiküllerin hücreler üzerinde sitotoksik özellik göstermediği gözlenmiştir. Bu PLGA polimerinin biyouyumlu olması durumuyla paralel bir sonuçtur.

Selekoksisib ve doksorubisin çözeltilerine bakıldığında ise doz kombinasyon çalışmalarında elde edilene benzer bir sonuç elde edilmiştir. Etkin maddelerin nanopartikül içerisine enkapsüle edilmeleri sitotoksitelerinde belirgin bir artışa neden olmuştur. Enkapsüle edilmiş nanopartiküllerin alendronatla kaplanması ise gözlenen bu sitotoksitite artışına dolayısıyla nanopartikül hücre etkileşimine olumsuz bir etki göstermemiştir.

Bu durum alendronat kaplamasının hücre içine alım üzerinde bir etkisi olmadığını göstermektedir. Etkin maddelerin PLGA nanopartikülleri içerisine yüklenmesinin neden olduğu sitotoksitite artışı, enkapsülasyon ile etkin maddelerin hücre içinde daha uzun süre kalabildiği, kanser hücrelerindeki direnç mekanizmalarından olan sitotoksik ajanı hücre dışına pompalayan p glikoprotein pompalarının etkisinden korundukları yönünde yorumlanabilmektedir.

Etkin madde çözeltisi ve nanopartikül süspansiyonu ile inkübe edilmiş olan hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri incelenmiştir. Görüntülerde ise sitotoksitite sonuçlarına paralel şekilde; çözelti grubu uygulanan hücrelerde daha düşük intensite değerleri gözlenirken nanopartikül içerisine enkapsüle edilmiş etkin maddelerin uygulandığı hücrelerde intensite değerleri daha yüksektir.

5.9. In vivo biyodağılım çalışmaları

İki tip nanopartikül grubunun kullanıldığı hayvan çalışmasında (PLGA–NPs ve Ale(+)/PLGA NP) indosiyanin yeşil enkapsüle edilmiş nanopartiküller, Balb/c farelere intraperitoneal yoldan uygulanmış ve sonrasında gözlemlene çalışmalarını gerçekleştirilmiştir. 6 saat sonrasında alınan görüntü sonrasında hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek organları çıkartılmıştır.

Canlı hayvan görüntülerinde çözelti grubunun hızla vücuttan elimine olması literatürde belirtilen düşük yarılanma ömrü ile paralellik gösteren bir sonuçtur (229).

Kaplama yapılmamış nanopartiküllerin görüntüleri ise batın bölgesinde lokalize olmuş halde ve daha yüksek intensitede gözlenmiştir. Alendronat kaplaması

karaciğer lokalizasyonunu azaltmış ve vücutta genel bir dağılım göstermişlerdir. Gözlenen dağılım net bir veri olmamakla birlikte genel bir ışık tutmaktadır. Bu dağılımın nanopartiküllerin kostalar ve omurga tarafından tutulması sonucu oluşmuş olabileceği düşünülmeyle birlikte daha detaylı analizlerin yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Analiz süresi sonrasında çıkartılan organlar incelendiğinde ise canlı görüntülerden elde edilen görüntüler desteklenmektedir. Çözelti gurubu hemen hemen hiçbir dokuda gözlenmezken (çok az miktarda karaciğerde intensiteye rastlanmıştır), alendronat kaplı olmayan nanopartiküller tamamen karaciğerde tutulum göstermişlerdir. Alendronat kaplı nanopartiküller ise bir miktar karaciğerde gözlenmiş olmakla birlikte aynı zamanda femur dokusunda da bir intensite artışı sağlamışlardır.

Bu veriler ışığında tasarlanmış olan sistemin hidrofilik ve hidrofobik yapılı iki farklı etkin madde molekülünü başarılı bir şekilde istenilen oranda enkapsüle ettiği ve alendronat kaplama yaklaşımının kemik dokusuna hedeflendirmede planlanan etkiyi oluşturduğu söylenebilir.

Sonuç olarak kalite tasarımı ile deney planlaması gerçekleştirilmiş, öncelikle formülasyon parametreleri irdelenmiş ve etki düzeylerine göre sınıflara ayrılmışlardır. Etkili olduğu tespit edilen parametreler ile ileri düzey araştırmalar gerçekleştirilmiştir. İstenilen doz oranına ve partikül boyutuna sahip nanopartiküllerin elde edilebilmesini sağlayan bir modelleme yapılmıştır.

Elde edilen partiküllerin fizikokimyasal yönden *in vitro* karakterizasyonu ve hücreler ile *in vitro* düzeyde etkileşimlerinin incelenmesi sonrasında hedeflendirme etkinlikleri hem *in vitro* ortamda hem de canlı hayvanlar üzerinde test edilmiştir. Böylelikle gelecekte ileri düzey araştırmalara temel oluşturulabilecek, kontrol edilebilir, kemiğe ilaç taşınımında etkin ve seçici, umut vadeden taşıyıcı polimerik bir sistem geliştirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, nanopartiküllerin kritik kalite özellikleri olan doksorubisin ve selekoksib etkin maddelerini taşıma miktarları ve partikül büyüklükleri üzerine etkili olabilecek formülasyon ve proses parametrelerinin etkisi Plackett-Burman ve Box-Behnken istatistiksel deney tasarımları kullanılarak değerlendirilmiştir.

Optimizasyon sırasında, etkili olabileceği düşünülen formülasyon parametreleri belirlenmiş ve birinci dereceden bir istatistiksel tasarım olan Plackett-Burman deney tasarımı kullanılarak nanopartiküldeki yanıt değişkenler üzerindeki etkisi istatistiksel olarak incelenmiştir. Analiz sonucunda etkin maddelerin yüklenmesinde etkili iki parametrenin polimer konsantrasyonu ve etkin madde miktarı olduğu tespit edilmiştir. Nanopartiküllerin büyüklükleri üzerine ise etkili tek parametrenin polimer konsantrasyonu olduğu bulunmuştur.

Birinci derece tasarım ile formülasyondaki kritik parametrelerin belirlenmesinin sonrasında, bu parametrelerin nanopartiküllere ait cevap değişkenler üzerindeki etkisinin matematiksel olarak modellenbilmesi için ikinci derece bir deney tasarımı olan Box-Behnken deney tasarımı kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda formülasyon optimizasyonu ile MCF-7 hücre hatlarında yapılan sinerjik doz kombinasyon çalışmasının sonuçlarına göre, hedeflenen oranda etkin madde nanopartiküller içerisinde enkapsüle edilebilmiştir.

Alendronat ile kaplanmış olan ve sinerjik etkili iki etkin maddeyi içeren nanopartiküller, *in vitro* ve *in vivo* olarak test edilmiştir. *In vitro* analizlerde nanopartiküllerin kalsiyum bağlama kapasitelerine bakılmış ve alendronat ile kaplanmış nanopartiküllerin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek kalsiyum bağlama kapasitesine sahip oldukları görülmüştür. Diğer bir *in vitro* test de ise kalsiyumu kemikte bulunduran hidroksiapatit kristallerine nanopartiküllerin afinitesi test edilmiştir. Bu testte de hidroksiapatit kristalleri ile inkübe edilen nanopartiküller floresan mikroskop altında görüntülenmişlerdir. Görüntüleme sonucunda alendronat kaplı nanopartiküllerin daha yüksek afinite gösterdiği gözlenmiştir. *In vitro* olarak hücre kültüründe yapılan formülasyonun sitotoksitesinin araştırıldığı hücre canlılık testinde ise hücrelere taşınımın enkapsülasyon ile arttığı ve sitotoksik etkinin serbest çözelti haline göre daha yüksek

olduğu tespit edilmiştir.

In vivo çalışmalarda ise floresan boya yüklü alendronat kaplı olan ve kaplı olmayan nanopartiküller farelere intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Altı saat sonrasında canlı hayvanlarda yapılan gözlemlerde alendronat kaplı olmayan grubun tamamen batın bölgesinde ve karaciğerde akümüle olduğu fakat kaplı grubun kosta ve vertebraların yoğunlukta olduğu kısımlarda yayılım gösterdiği tespit edilmiştir. Görüntüleme sonrasında hayvanların organları çıkartılarak yapılan incelemeler de bu verileri desteklemiştir.

Sonuç olarak metastatik kemik kanseri başta olmak üzere spesifik olarak kemiğe ilaç hedeflendirmenin gerektiği hastalıklarında tedavisinde yan etkilerin azaltılarak tedavi etkinliğinin arttırılabilmesini mümkün kılacak bir sistem geliştirilmiştir.

İleriye yönelik çalışmalar için, hayvanlarda kemik metastaz modelinin geliştirilmesi ile ileri analizlerin yapılması mevcut biyodağılım verisine üstünlük sağlayacak nitelikte olacaktır. Kendinden floresan ışımaya oluşturan proteinlerin sentezini yapan genetik olarak modifiye edilmiş olan kanser hücrelerinin yerleştirildikleri hayvanlar, zamanın fonksiyonu olarak yalnızca nanopartikül dağılımı değil aynı zamanda da tedavi etkinliği açısından değerlendirilmiş olacaklardır.

Devamında yapılacak çalışmalarda, tedavi etkinliğinin yanı sıra canlıya uygulama öncesinde nanopartiküller sistemin steril hale getirilmesi önem arz etmektedir. Termal sterilizasyon yöntemlerinin nanopartikül yapısında yer alan polimerin bozunma sıcaklığının üzerine çıkabileceğinden ötürü aseptik filtrasyonla ya da gama ışınları ile sterilizasyon seçenekleri değerlendirilmelidir. Bununla birlikte filtrasyon esnasında partikül boyutuna bağlı bir seçilimin, filtrede tutunmanın olup olmadığı incelenmelidir. Gama ışınları ile yapılabilecek sterilizasyon denemeleri için ise polimer zincirinin bağ yapısının ve degradasyon karakterinin etkilenmediği incelenmelidir.

Devam eden çalışmalarda, tedavi etkinliğinin gösterilmesine paralel olarak; geliştirilmiş nanopartikül formülasyonunun saklama koşulları stabilite çalışmaları ile hem fiziksel hem de kimyasal açıdan değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Hahn WC, Weinberg RA. 1 - Cancer: A Genetic Disorder A2 - Mendelsohn, John. In: Gray JW, Howley PM, Israel MA, Thompson CB, editors. The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition). Philadelphia: Content Repository Only!; 2015. p. 3-18.e1.
2. Loncaster J. Cancer Principles & Practice of Oncology Review, DeVita, Hellman, Rosenberg, Govindan Ramaswamy (Ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA (2005), ISBN: 0-7817-5278-7. Surgical Oncology. 2005;14(3):149.
3. Kurumu TCSBTHS. Türkiye Kanser İstatistikleri. Ankara; 2016.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017;67(1):7-30.
5. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. 36 - The Molecular Biology of Breast Cancer A2 - Mendelsohn, John. In: Gray JW, Howley PM, Israel MA, Thompson CB, editors. The Molecular Basis of Cancer (Fourth Edition). Philadelphia: Content Repository Only!; 2015. p. 523-30.e3.
6. Donepudi MS, Kondapalli K, Amos SJ, Venkanteshan P. Breast cancer statistics and markers. J Cancer Res Ther. 2014;10(3):506-11.
7. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. Breast Cancer Res. 2011;13(4):215.
8. Song X, Ren Y, Zhang J, Wang G, Han X, Zheng W, et al. Targeted delivery of doxorubicin to breast cancer cells by aptamer functionalized DOTAP/DOPE liposomes. Oncol Rep. 2015;34(4):1953-60.
9. Croucher PI, McDonald MM, Martin TJ. Bone metastasis: the importance of the neighbourhood. Nat Rev Cancer. 2016;16(6):373-86.
10. Rosenthal DI. Radiologic diagnosis of bone metastases. Cancer. 1997;80(8 Suppl):1595-607.
11. Wagner G. Frequency of pain in patients with cancer. Recent Results Cancer Res. 1984;89:64-71.
12. Li S, Peng Y, Weinhandl ED, Blaes AH, Cetin K, Chia VM, et al. Estimated number of prevalent cases of metastatic bone disease in the US adult population. Clin Epidemiol. 2012;4:87-93.
13. Selvaggi G, Scagliotti GV. Management of bone metastases in cancer: a review. Crit Rev Oncol Hematol. 2005;56(3):365-78.
14. Zeichner SB, Terawaki H, Gogineni K. A Review of Systemic Treatment in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. Breast Cancer : Basic and Clinical Research. 2016;10:25-36.
15. Sharp PA, Langer R. Research agenda. Promoting convergence in biomedical science. Science. 2011;333(6042):527.

16. Zhang TY, Huang B, Wu HB, Wu JH, Li LM, Li YX, et al. Synergistic effects of co-administration of suicide gene expressing mesenchymal stem cells and prodrug-encapsulated liposome on aggressive lung melanoma metastases in mice. *J Control Release*. 2015;209:260-71.
17. Steeg PS. Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(4):201-18.
18. Safra T, Muggia F, Jeffers S, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lyass O, et al. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². *Ann Oncol*. 2000;11(8):1029-33.
19. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol Pharm*. 2011;8(6):2101-41.
20. Miele E, Spinelli GP, Miele E, Tomao F, Tomao S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int J Nanomedicine*. 2009;4:99-105.
21. Harisinghani MG, Saksena M, Ross RW, Tabatabaei S, Dahl D, McDougal S, et al. A pilot study of lymphotropic nanoparticle-enhanced magnetic resonance imaging technique in early stage testicular cancer: a new method for noninvasive lymph node evaluation. *Urology*. 2005;66(5):1066-71.
22. Shih HA, Harisinghani M, Zietman AL, Wolfgang JA, Saksena M, Weissleder R. Mapping of nodal disease in locally advanced prostate cancer: rethinking the clinical target volume for pelvic nodal irradiation based on vascular rather than bony anatomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005;63(4):1262-9.
23. Mutch DG, Babb SA, Di Saia PJ. 19 - Genes and Cancer: Genetic Counseling and Clinical Management. *Clinical Gynecologic Oncology (Ninth Edition)*: Elsevier; 2018. p. 493-527.e6.
24. Alpaslan MAYADAĞLI GB, Kemal EKİCİ. Metastatik Kemik Tümörlerine Yaklaşım. *J Kartal TR*. 2011;22(1):49-55.
25. Tang V, Murphy DG, Moon D. Chapter 51 - Management of Locally Advanced (Nonmetastatic) Prostate Cancer A2 - Mydlo, Jack H. In: Godec CJ, editor. *Prostate Cancer (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 467-77.
26. Heinemann V, Douillard JY, Ducreux M, Peeters M. Targeted therapy in metastatic colorectal cancer – An example of personalised medicine in action. *Cancer Treatment Reviews*. 2013;39(6):592-601.
27. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):283-318.
28. Gulati A, Fine R. Chapter 2 - The Management and Biology of Metastatic Cancers to the Brain A2 - Hayat, M.A. *Brain Metastases from Primary Tumors, Volume 3*. San Diego: Academic Press; 2016. p. 21-35.
29. Fidler IJ, Kripke ML. The challenge of targeting metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2015;34(4):635-41.

30. Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R, et al. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(1):39-50.
31. Fernandes R, Siegel P, Komarova S, Hilton J, Addison C, Ibrahim MFK, et al. Future directions for bone metastasis research – highlights from the 2015 bone and the Oncologist new updates conference (BONUS). *Journal of Bone Oncology*. 2016;5(2):57-62.
32. Cutts SM, Nudelman A, Rephaeli A, Phillips DR. The power and potential of doxorubicin-DNA adducts. *IUBMB Life*. 2005;57(2):73-81.
33. Minotti G, Recalcati S, Menna P, Salvatorelli E, Corna G, Cairo G. Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. *Methods Enzymol*. 2004;378:340-61.
34. Zara GP, Cavalli R, Fundaro A, Bargoni A, Caputo O, Gasco MR. Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN). *Pharmacol Res*. 1999;40(3):281-6.
35. Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;47(2-3):165-96.
36. Pereverzeva E, Treschalin I, Bodyagin D, Maksimenko O, Langer K, Dreis S, et al. Influence of the formulation on the tolerance profile of nanoparticle-bound doxorubicin in healthy rats: focus on cardio- and testicular toxicity. *Int J Pharm*. 2007;337(1-2):346-56.
37. Li X, Hirsh DJ, Cabral-Lilly D, Zirkel A, Gruner SM, Janoff AS, et al. Doxorubicin physical state in solution and inside liposomes loaded via a pH gradient. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1415(1):23-40.
38. Xie M, Chen Y, Wu L. Preparation of doxorubicin-hydrochloride nanoliposomes by ethanol injection-pH gradient method and their safety evaluation. *J Nanosci Nanotechnol*. 2013;13(1):216-21.
39. Fritze A, Hens F, Kimpfler A, Schubert R, Peschka-Süss R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2006;1758(10):1633-40.
40. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004;56(2):185-229.
41. Tewes F, Munnier E, Antoon B, Ngaboni Okassa L, Cohen-Jonathan S, Marchais H, et al. Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;66(3):488-92.
42. Furuchi T, Takahashi T, Tanaka S, Nitta K, Naganuma A. Functions of yeast helicase Ssl2p that are essential for viability are also involved in protection from the toxicity of adriamycin. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(8):2578-85.
43. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for

- the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999;57(7):727-41.
44. Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *Lancet Oncol.* 2002;3(3):166-74.
 45. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors. *FASEB J.* 2001;15(12):2057-72.
 46. Groen HJ, Sietsma H, Vincent A, Hochstenbag MM, van Putten JW, van den Berg A, et al. Randomized, placebo-controlled phase III study of docetaxel plus carboplatin with celecoxib and cyclooxygenase-2 expression as a biomarker for patients with advanced non-small-cell lung cancer: the NVALT-4 study. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4320-6.
 47. Limburg PJ, Mandrekar SJ, Aubry MC, Ziegler KL, Zhang J, Yi JE, et al. Randomized phase II trial of sulindac for lung cancer chemoprevention. *Lung Cancer.* 2013;79(3):254-61.
 48. Garcia M, Velez R, Romagosa C, Majem B, Pedrola N, Oliván M, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumour progression of prostate cancer bone metastases in nude mice. *BJU Int.* 2014;113(5b):E164-77.
 49. van Wijngaarden J, van Beek E, van Rossum G, van der Bent C, Hoekman K, van der Pluijm G, et al. Celecoxib enhances doxorubicin-induced cytotoxicity in MDA-MB231 cells by NF-kappaB-mediated increase of intracellular doxorubicin accumulation. *Eur J Cancer.* 2007;43(2):433-42.
 50. Awara WM, El-Sisi AE, El-Sayad ME, Goda AE. The potential role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of experimentally-induced mammary tumour: does celecoxib enhance the anti-tumour activity of doxorubicin? *Pharmacol Res.* 2004;50(5):487-98.
 51. Ponthan F, Wickstrom M, Gleissman H, Fuskevåg OM, Segerstrom L, Sveinbjornsson B, et al. Celecoxib prevents neuroblastoma tumor development and potentiates the effect of chemotherapeutic drugs in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2007;13(3):1036-44.
 52. Sastry SV, Khan MA. Aqueous based polymeric dispersion: Plackett--Burman design for screening of formulation variables of atenolol gastrointestinal therapeutic system. *Pharm Acta Helv.* 1998;73(2):105-12.
 53. M.D. Anderson Cancer Center Internet Erişim tarihi: 18 Nisan 2017 Erişim Adresi: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00080782>.
 54. De Jong WH, Borm PJA. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine.* 2008;3(2):133-49.
 55. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2008;60(15):1615-26.
 56. Kaş S. İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler. In: Gürsoy AZ, editor. *Kontrollü Salım Sistemleri*
İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği; 2002. p. 65-102.

57. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(5):631-51.
58. Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schafer U, Takeuchi H, Maincent P, et al. Biodegradable nanoparticles for targeted drug delivery in treatment of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;299(2):775-81.
59. Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(3):329-47.
60. Saleem IY, Vordermeier M, Barralet JE, Coombes AG. Improving peptide-based assays to differentiate between vaccination and Mycobacterium bovis infection in cattle using nanoparticle carriers for adsorbed antigens. *J Control Release.* 2005;102(3):551-61.
61. Zhang N, Chittasupho C, Duangrat C, Siahaan TJ, Berklund C. PLGA nanoparticle-peptide conjugate effectively targets intercellular cell-adhesion molecule-1. *Bioconjug Chem.* 2008;19(1):145-52.
62. Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res.* 1997;14(11):1568-73.
63. Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL, Levy RJ. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm Res.* 1996;13(12):1838-45.
64. Panyam J, Sahoo SK, Prabha S, Bargar T, Labhasetwar V. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Int J Pharm.* 2003;262(1-2):1-11.
65. Thomas M, Klibanov AM. Conjugation to gold nanoparticles enhances polyethylenimine's transfer of plasmid DNA into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9138-43.
66. Pedraza CE, Bassett DC, McKee MD, Nelea V, Gbureck U, Barralet JE. The importance of particle size and DNA condensation salt for calcium phosphate nanoparticle transfection. *Biomaterials.* 2008;29(23):3384-92.
67. Raghunathan VK, Devey M, Hawkins S, Hails L, Davis SA, Mann S, et al. Influence of particle size and reactive oxygen species on cobalt chrome nanoparticle-mediated genotoxicity. *Biomaterials.* 2013;34(14):3559-70.
68. Ravivarapu HB, Burton K, DeLuca PP. Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000;50(2):263-70.
69. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Ruzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release.* 2001;70(1-2):1-20.
70. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(11):1649-59.
71. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(10):750-63.

72. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Adv Enzyme Regul.* 2001;41:189-207.
73. Sui H, Zhou S, Wang Y, Liu X, Zhou L, Yin P, et al. COX-2 contributes to P-glycoprotein-mediated multidrug resistance via phosphorylation of c-Jun at Ser63/73 in colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2011;32(5):667-75.
74. Vetten MA, Yah CS, Singh T, Gulumian M. Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: effects on structural stability and biomedical applications. *Nanomedicine.* 2014;10(7):1391-9.
75. Gupta A, Kaur CD, Saraf S, Saraf S. Formulation, characterization, and evaluation of ligand-conjugated biodegradable quercetin nanoparticles for active targeting. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2016;44(3):960-70.
76. Ma W, Xu A, Ying J, Li B, Jin Y. Biodegradable Core-Shell Copolymer-Phospholipid Nanoparticles for Combination Chemotherapy: An In Vitro Study. *J Biomed Nanotechnol.* 2015;11(7):1193-200.
77. Petrizzo A, Conte C, Tagliamonte M, Napolitano M, Bifulco K, Carriero V, et al. Functional characterization of biodegradable nanoparticles as antigen delivery system. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015;34:114.
78. Garner S, Barbour ME. Nanoparticles for controlled delivery and sustained release of chlorhexidine in the oral environment. *Oral Dis.* 2015;21(5):641-4.
79. Gaur PK, Mishra S, Bajpai M, Mishra A. Enhanced oral bioavailability of efavirenz by solid lipid nanoparticles: in vitro drug release and pharmacokinetics studies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:363404.
80. Walczak AP, Hendriksen PJ, Woutersen RA, van der Zande M, Undas AK, Helsdingen R, et al. Bioavailability and biodistribution of differently charged polystyrene nanoparticles upon oral exposure in rats. *J Nanopart Res.* 2015;17(5):231.
81. Rodzinski A, Guduru R, Liang P, Hadjikhani A, Stewart T, Stimpf E, et al. Targeted and controlled anticancer drug delivery and release with magnetoelectric nanoparticles. *Sci Rep.* 2016;6:20867.
82. Sarkar K, Yang H. Encapsulation and extended release of anti-cancer anastrozole by stealth nanoparticles. *Drug Deliv.* 2008;15(5):343-6.
83. Friedman AD, Claypool SE, Liu R. The Smart Targeting of Nanoparticles. *Current pharmaceutical design.* 2013;19(35):6315-29.
84. Beringer JPRP. *Remington : the science and practice of pharmacy.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. 316 p.
85. Sutradhar KB, Amin ML. *Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting.* ISRN Nanotechnology. 2014;2014:12.
86. Nasir A, Kausar A, Younus A. A Review on Preparation, Properties and Applications of Polymeric Nanoparticle-Based Materials. *Polymer-Plastics Technology and Engineering.* 2015;54(4):325-41.
87. Ignatius AA, Claes LE. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers:

- poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials*. 1996;17(8):831-9.
88. Jalil R, Nixon JR. Microencapsulation using poly(DL-lactic acid). III: Effect of polymer molecular weight on the release kinetics. *J Microencapsul*. 1990;7(3):357-74.
 89. Gopferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*. 1996;17(2):103-14.
 90. Li S. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomed Mater Res*. 1999;48(3):342-53.
 91. Danhier F, Lecouturier N, Vroman B, Jerome C, Marchand-Brynaert J, Feron O, et al. Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation. *J Control Release*. 2009;133(1):11-7.
 92. Chao TC, Chu Z, Tseng LM, Chiou TJ, Hsieh RK, Wang WS, et al. Paclitaxel in a novel formulation containing less Cremophor EL as first-line therapy for advanced breast cancer: a phase II trial. *Invest New Drugs*. 2005;23(2):171-7.
 93. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer*. 2001;37(13):1590-8.
 94. Ng SS, Figg WD, Sparreboom A. Taxane-mediated antiangiogenesis in vitro: influence of formulation vehicles and binding proteins. *Cancer Res*. 2004;64(3):821-4.
 95. Zhang JA, Anyarambhatla G, Ma L, Ugwu S, Xuan T, Sardone T, et al. Development and characterization of a novel Cremophor EL free liposome-based paclitaxel (LEP-ETU) formulation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2005;59(1):177-87.
 96. Torchilin VP. Micellar nanocarriers: pharmaceutical perspectives. *Pharm Res*. 2007;24(1):1-16.
 97. Talluri SV, Kuppusamy G, Karri VV, Tummala S, Madhunapantula SV. Lipid-based nanocarriers for breast cancer treatment - comprehensive review. *Drug Deliv*. 2016;23(4):1291-305.
 98. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer Nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology(). *Advanced drug delivery reviews*. 2014;66:2-25.
 99. Bazak R, Hourri M, Achy SE, Hussein W, Refaat T. Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature. *Mol Clin Oncol*. 2014;2(6):904-8.
 100. Kumari P, Ghosh B, Biswas S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *J Drug Target*. 2016;24(3):179-91.
 101. Kolhe S, Parikh K. Application of nanotechnology in cancer: a review. *Int J Bioinform Res Appl*. 2012;8(1-2):112-25.
 102. Koziara JM, Whisman TR, Tseng MT, Mumper RJ. In-vivo efficacy of novel

- paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors. *J Control Release*. 2006;112(3):312-9.
103. Couvreur P, Barratt G, Fattal E, Legrand P, Vauthier C. Nanocapsule technology: a review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 2002;19(2):99-134.
 104. Couvreur P, Gref R, Andrieux K, Malvy C. Nanotechnologies for drug delivery: Application to cancer and autoimmune diseases. *Progress in Solid State Chemistry*. 2006;34(2-4):231-5.
 105. Cho EJ, Holback H, Liu KC, Abouelmagd SA, Park J, Yeo Y. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. *Molecular Pharmaceutics*. 2013;10(6):2093-110.
 106. Allemann E, Leroux J, Gurny R. Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;34(2-3):171-89.
 107. McCarron PA, Donnelly RF, Marouf W. Celecoxib-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared using a novel and controllable combination of diffusion and emulsification steps as part of the salting-out procedure. *J Microencapsul*. 2006;23(5):480-98.
 108. Toy R, Hayden E, Shoup C, Baskaran H, Karathanasis E. The effects of particle size, density and shape on margination of nanoparticles in microcirculation. *Nanotechnology*. 2011;22(11):115101.
 109. He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31(13):3657-66.
 110. Yin Win K, Feng S-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*. 2005;26(15):2713-22.
 111. Lobato KBdS, Paese K, Forgearini JC, Guterres SS, Jablonski A, Rios AdO. Characterisation and stability evaluation of bixin nanocapsules. *Food Chemistry*. 2013;141(4):3906-12.
 112. Souza TGF, Ciminelli VST, Mohallem NDS. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*. 2016;733(1):012039.
 113. Hoo CM, Starostin N, West P, Mecartney ML. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*. 2008;10(1):89-96.
 114. Zahir SHaF. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12(2):255-64.
 115. Ma N, Ma C, Li C, Wang T, Tang Y, Wang H, et al. Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake. *J Nanosci Nanotechnol*. 2013;13(10):6485-98.

116. Sun S-B, Liu P, Shao F-M, Miao Q-L. Formulation and evaluation of PLGA nanoparticles loaded capecitabine for prostate cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(10):19670-81.
117. Hazra M, Dasgupta Mandal D, Mandal T, Bhuniya S, Ghosh M. Designing polymeric microparticulate drug delivery system for hydrophobic drug quercetin. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2015;23(4):429-36.
118. Chadha R, Bhandari S. Drug–excipient compatibility screening—Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;87:82-97.
119. #x, Souza S. A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceutics*. 2014;2014:12.
120. Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *Journal of polymer science Part B, Polymer physics*. 2011;49(12):832-64.
121. Marin E, Briceño MI, Caballero-George C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. *International Journal of Nanomedicine*. 2013;8:3071-91.
122. Marin E, Briceno MI, Caballero-George C. Critical evaluation of biodegradable polymers used in nanodrugs. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:3071-90.
123. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(3):3640-59.
124. Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*. 2011;3(3):1377.
125. Anderson JM, Shive MS. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997;28(1):5-24.
126. Danhier F, Ansorena E, Silva JM, Coco R, Le Breton A, Pr at V. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2012;161(2):505-22.
127. Sharma S, Parmar A, Kori S, Sandhir R. PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016;80:30-40.
128. Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(3):391-410.
129. Lima KM, Rodrigues Jr JM. Poly-DL-lactide-co-glycolide microspheres as a controlled release antigen delivery system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1999;32(2):171-80.
130. Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, Krenzlin S, Siepmann J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;314(2):198-206.

131. Kapoor DN, Bhatia A, Kaur R, Sharma R, Kaur G, Dhawan S. PLGA: A unique polymer for drug delivery. *Therapeutic Delivery*. 2015;6(1):41-58.
132. Mirakabad FST, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15(2):517-35.
133. Khan I, Gothwal A, Sharma AK, Kesharwani P, Gupta L, Iyer AK, et al. PLGA Nanoparticles and Their Versatile Role in Anticancer Drug Delivery. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 2016;33(2):159-93.
134. Castillo-Dalí G, Velázquez-Cayón R, Angeles Serrera-Figallo M, Rodríguez-González-Elipse A, Gutierrez-Pérez JL, Torres-Lagares D. Importance of poly(lactic-co-glycolic acid) in scaffolds for guided bone regeneration: A focused review. *Journal of Oral Implantology*. 2015;41(4):e152-e7.
135. Zhang K, Tang X, Zhang J, Lu W, Lin X, Zhang Y, et al. PEG-PLGA copolymers: Their structure and structure-influenced drug delivery applications. *Journal of Controlled Release*. 2014;183(1):77-86.
136. Xu Y, Kim CS, Saylor DM, Koo D. Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug-polymer applications: A review of experiments and theories. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2016.
137. Peres C, Matos AI, Coniot J, Sainz V, Zupančič E, Silva JM, et al. Poly(lactic acid)-based particulate systems are promising tools for immune modulation. *Acta Biomaterialia*. 2017;48:41-57.
138. Pandita D, Kumar S, Lather V. Hybrid poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Design and delivery prospectives. *Drug Discovery Today*. 2015;20(1):95-104.
139. Boudad H, Legrand P, Lebas G, Cheron M, Duchêne D, Ponchel G. Combined hydroxypropyl- β -cyclodextrin and poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles intended for oral administration of saquinavir. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;218(1-2):113-24.
140. Gürsoy AZ. *Kontrollü Salım Sistemleri: İlaç Tasıyıcı Partiküler Sistemler*. Gürsoy AZ, editor. İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını; 2002.
141. Miladi K, Ibraheem D, Iqbal M, Sfar S, Fessi H, Elaissari A. Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. *EXCLI Journal*. 2014;13:28-57.
142. Tautzenberger A, Kovtun A, Ignatius A. Nanoparticles and their potential for application in bone. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:4545-57.
143. Ortega-Oller I, Padial-Molina M, Galindo-Moreno P, #x, Valle F, #xf3, et al. Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles. *BioMed Research International*. 2015;2015:18.
144. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods critical comparison. *Adv Colloid*

- Interface Sci. 2011;163(2):90-122.
145. Vandervoort J, Ludwig A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *Int J Pharm.* 2002;238(1-2):77-92.
 146. Zhang DD, Kong YY, Sun JH, Huo SJ, Zhou M, Gui YL, et al. Co-delivery nanoparticles with characteristics of intracellular precision release drugs for overcoming multidrug resistance. *International Journal of Nanomedicine.* 2017;12:2081-108.
 147. Li Z, Xiong F, He J, Dai X, Wang G. Surface-functionalized, pH-responsive poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles for intranasal vaccine delivery: Effect of surface modification with chitosan and mannan. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2016;109:24-34.
 148. Ubrich N, Bouillot P, Pellerin C, Hoffman M, Maincent P. Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nanoparticles: a comparative study. *J Control Release.* 2004;97(2):291-300.
 149. Morales-Cruz M, Flores-Fernández GM, Morales-Cruz M, Orellano EA, Rodriguez-Martinez JA, Ruiz M, et al. Two-step nanoprecipitation for the production of protein-loaded PLGA nanospheres. *Results in Pharma Sciences.* 2012;2:79-85.
 150. D'Addio SM, Prud'homme RK. Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2011;63(6):417-26.
 151. Thao Truong-Dinh T, Phuong Ha-Lien T, Khanh Tu N, Van-Thanh T. Nano-Precipitation: Preparation and Application in the Field of Pharmacy. *Current Pharmaceutical Design.* 2016;22(20):2997-3006.
 152. Bilati U, Allémann E, Doelker E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2005;24(1):67-75.
 153. Botet R, Roger K. How do interactions control droplet size during nanoprecipitation? *Current Opinion in Colloid and Interface Science.* 2016;22:108-12.
 154. Alshamsan A. Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2014;22(3):219-22.
 155. Jaiswal J, Kumar Gupta S, Kreuter J. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process. *Journal of Controlled Release.* 2004;96(1):169-78.
 156. Gref R, Couvreur P, Barratt G, Mysiakine E. Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling. *Biomaterials.* 2003;24(24):4529-37.
 157. Dhamecha D, Jalalpure S, Jadhav K, Jagwani S, Chavan R. Doxorubicin loaded gold nanoparticles: Implication of passive targeting on anticancer efficacy. *Pharmacological Research.* 2016;113, Part A:547-56.

158. Theek B, Gremse F, Kunjachan S, Fokong S, Pola R, Pechar M, et al. Characterizing EPR-mediated passive drug targeting using contrast-enhanced functional ultrasound imaging. *Journal of Controlled Release*. 2014;182:83-9.
159. Ma X, Gong N, Zhong L, Sun J, Liang X-J. Future of nanotherapeutics: Targeting the cellular sub-organelles. *Biomaterials*. 2016;97:10-21.
160. Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci*. 2013;48(3):416-27.
161. Zhang X, Yang X, Ji J, Liu A, Zhai G. Tumor targeting strategies for chitosan-based nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;148:460-73.
162. Singh B, Bhatowa R, Tripathi CB, Kapil R. Developing micro-/nanoparticulate drug delivery systems using “design of experiments”. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2011;1(2):75-87.
163. Yang X, Patel S, Sheng Y, Pal D, Mitra AK. Statistical design for formulation optimization of hydrocortisone butyrate-loaded PLGA nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(3):569-87.
164. Kan S, Lu J, Liu J, Wang J, Zhao Y. A quality by design (QbD) case study on enteric-coated pellets: Screening of critical variables and establishment of design space at laboratory scale. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;9(5):268-78.
165. Yerlikaya F, Ozgen A, Vural I, Guven O, Karaagaoglu E, Khan MA, et al. Development and evaluation of paclitaxel nanoparticles using a quality-by-design approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;102(10):3748-61.
166. Danhier F, Vroman B, Lecouturier N, Crockart N, Pourcelle V, Freichels H, et al. Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with paclitaxel. *J Control Release*. 2009;140(2):166-73.
167. Rahman Z, Zidan AS, Habib MJ, Khan MA. Understanding the quality of protein loaded PLGA nanoparticles variability by Plackett-Burman design. *Int J Pharm*. 2010;389(1-2):186-94.
168. Jin SJ, Yoo YH, Kim MS, Kim JS, Park JS, Hwang SJ. Paroxetine hydrochloride controlled release POLYOX matrix tablets: screening of formulation variables using Plackett-Burman screening design. *Arch Pharm Res*. 2008;31(3):399-405.
169. Abdelbary AA, AbouGhaly MH. Design and optimization of topical methotrexate loaded niosomes for enhanced management of psoriasis: application of Box-Behnken design, in-vitro evaluation and in-vivo skin deposition study. *Int J Pharm*. 2015;485(1-2):235-43.
170. Zidan AS, Sammour OA, Hammad MA, Megrab NA, Habib MJ, Khan MA. Quality by design: understanding the formulation variables of a cyclosporine A self-nanoemulsified drug delivery systems by Box-Behnken design and desirability function. *Int J Pharm*. 2007;332(1-2):55-63.
171. Zhu S, Hong M, Liu C, Pei Y. Application of Box-Behnken design in

- understanding the quality of genistein self-nanoemulsified drug delivery systems and optimizing its formulation. *Pharm Dev Technol.* 2009;14(6):642-9.
172. Khan AM, Ahmad FJ, Panda AK, Talegaonkar S. Investigation of imatinib loaded surface decorated biodegradable nanocarriers against glioblastoma cell lines: Intracellular uptake and cytotoxicity studies. *Int J Pharm.* 2016;507(1-2):61-71.
 173. Afshari M, Derakhshandeh K, Hosseinzadeh L. Characterisation, cytotoxicity and apoptosis studies of methotrexate-loaded PLGA and PLGA-PEG nanoparticles. *J Microencapsul.* 2014;31(3):239-45.
 174. Avadhani KS, Manikkath J, Tiwari M, Chandrasekhar M, Godavarthi A, Vidya SM, et al. Skin delivery of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and hyaluronic acid loaded nano-transfersomes for antioxidant and anti-aging effects in UV radiation induced skin damage. *Drug Deliv.* 2017;24(1):61-74.
 175. Bahari Javan N, Rezaie Shirmard L, Jafary Omid N, Akbari Javar H, Rafiee Tehrani M, Abedin Dorkoosh F. Preparation, statistical optimisation and in vitro characterisation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/poly (lactic-co-glycolic acid) blend nanoparticles for prolonged delivery of teriparatide. *J Microencapsul.* 2016:1-15.
 176. Balthasar S, Michaelis K, Dinauer N, von Briesen H, Kreuter J, Langer K. Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes. *Biomaterials.* 2005;26(15):2723-32.
 177. Redhead HM, Davis SS, Illum L. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *J Control Release.* 2001;70(3):353-63.
 178. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN.* 2008;3(Suppl 3):S131-S9.
 179. Zhang S, Gangal G, Uludag H. 'Magic bullets' for bone diseases: progress in rational design of bone-seeking medicinal agents. *Chem Soc Rev.* 2007;36(3):507-31.
 180. Ruphuy G, Saralegi A, Lopes JC, Dias MM, Barreiro MF. Spray drying as a viable process to produce nano-hydroxyapatite/chitosan (n-HAp/CS) hybrid microparticles mimicking bone composition. *Advanced Powder Technology.* 2016;27(2):575-83.
 181. Huber FX, McArthur N, Hillmeier J, Kock HJ, Baier M, Diwo M, et al. Void filling of tibia compression fracture zones using a novel resorbable nanocrystalline hydroxyapatite paste in combination with a hydroxyapatite ceramic core: first clinical results. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2006;126(8):533-40.
 182. Jafari S, Maleki-Dizaji N, Barar J, Barzegar-Jalali M, Rameshrad M, Adibkia K. Methylprednisolone acetate-loaded hydroxyapatite nanoparticles as a

- potential drug delivery system for treatment of rheumatoid arthritis: In vitro and in vivo evaluations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;91:225-35.
183. Laranjeira MS, Moço A, Ferreira J, Coimbra S, Costa E, Santos-Silva A, et al. Different hydroxyapatite magnetic nanoparticles for medical imaging: Its effects on hemostatic, hemolytic activity and cellular cytotoxicity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;146:363-74.
 184. Thomas SC, Sharma H, Rawat P, Verma AK, Leekha A, Kumar V, et al. Synergistic anticancer efficacy of Bendamustine Hydrochloride loaded bioactive Hydroxyapatite nanoparticles: In-vitro, ex-vivo and in-vivo evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;146:852-60.
 185. Frikha-Benayed D, Basta-Pljakic J, Majeska RJ, Schaffler MB. Regional differences in oxidative metabolism and mitochondrial activity among cortical bone osteocytes. *Bone*. 2016;90:15-22.
 186. Thamake SI, Raut SL, Gryczynski Z, Ranjan AP, Vishwanatha JK. Alendronate coated poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles for active targeting of metastatic breast cancer. *Biomaterials*. 2012;33(29):7164-73.
 187. Ramanlal Chaudhari K, Kumar A, Megraj Khandelwal VK, Ukawala M, Manjappa AS, Mishra AK, et al. Bone metastasis targeting: a novel approach to reach bone using Zoledronate anchored PLGA nanoparticle as carrier system loaded with Docetaxel. *J Control Release*. 2012;158(3):470-8.
 188. Swami A, Reagan MR, Basto P, Mishima Y, Kamaly N, Glavey S, et al. Engineered nanomedicine for myeloma and bone microenvironment targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(28):10287-92.
 189. Zhang S, Wright JE, Ozber N, Uludag H. The interaction of cationic polymers and their bisphosphonate derivatives with hydroxyapatite. *Macromol Biosci*. 2007;7(5):656-70.
 190. Skarpos H, Osipov SN, Vorob'eva DV, Odinetz IL, Lork E, Roschenthaler GV. Synthesis of functionalized bisphosphonates via click chemistry. *Org Biomol Chem*. 2007;5(15):2361-7.
 191. Lin JH. Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone*. 18(2):75-85.
 192. Cole LE, Vargo-Gogola T, Roeder RK. Targeted delivery to bone and mineral deposits using bisphosphonate ligands. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;99:12-27.
 193. Hortobagyi GN. Novel Approaches to the Management of Bone Metastases. *Seminars in Oncology*. 2003;30(5 SUPPL. 16):161-6.
 194. Ossipov DA. Bisphosphonate-modified biomaterials for drug delivery and bone tissue engineering. *Expert Opin Drug Deliv*. 2015;12(9):1443-58.
 195. Uludag H, Gao T, Wohl GR, Kantoci D, Zernicke RF. Bone affinity of a bisphosphonate-conjugated protein in vivo. *Biotechnol Prog*. 2000;16(6):1115-8.

196. Uludag H, Kousinioris N, Gao T, Kantoci D. Bisphosphonate conjugation to proteins as a means to impart bone affinity. *Biotechnol Prog.* 2000;16(2):258-67.
197. Uludag H, Yang J. Targeting systemically administered proteins to bone by bisphosphonate conjugation. *Biotechnol Prog.* 2002;18(3):604-11.
198. Zhang C, Gordon PB, Sutton R, Lentle B. Proximal femoral changes related to bisphosphonate use and looser zones in hypophosphatemic osteomalacia: dual-energy X-ray absorptiometry findings. *J Clin Densitom.* 2013;16(3):380-3.
199. Zhang X, Chang CK, Zhang Z, Zhao YS, Xiao C, Li X. [Influence of bisphosphonate combined with chemotherapy on bone mineral density of patients with multiple myeloma]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2012;20(5):1135-8.
200. Saylor PJ, Smith MR. Chapter 61 - Pathophysiology—Prostate Cancer A2 - Marcus, Robert. In: Feldman D, Dempster DW, Luckey M, Cauley JA, editors. *Osteoporosis (Fourth Edition)*. San Diego: Academic Press; 2013. p. 1455-64.
201. Roelofs AJ, Ebetino FH, Reszka AA, Russell RGG, Rogers MJ. Chapter 81 - Bisphosphonates: Mechanisms of Action A2 - Bilezikian, John P. In: Raisz LG, Martin TJ, editors. *Principles of Bone Biology (Third Edition)*. San Diego: Academic Press; 2008. p. 1737-67.
202. Choi SW, Kim JH. Design of surface-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone. *J Control Release.* 2007;122(1):24-30.
203. Pan H, Sima M, Kopeckova P, Wu K, Gao S, Liu J, et al. Biodistribution and pharmacokinetic studies of bone-targeting N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer-alendronate conjugates. *Mol Pharm.* 2008;5(4):548-58.
204. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: Mechanism of Action and Role in Clinical Practice. *Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic.* 2008;83(9):1032-45.
205. Haque SM, Ratemi ES. Drug Development and Analysis Review. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2017;50(12):837-50.
206. Group IEW. Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1). International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use; November 2005
207. Chittasupho C, Lirdprapamongkol K, Kewsuwan P, Sarisuta N. Targeted delivery of doxorubicin to A549 lung cancer cells by CXCR4 antagonist conjugated PLGA nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;88(2):529-38.
208. Ozcan I, Bouchemal K, Segura-Sanchez F, Ozer O, Guneri T, Ponchel G. Synthesis and characterization of surface-modified PBLG nanoparticles for bone targeting: in vitro and in vivo evaluations. *J Pharm Sci.*

- 2011;100(11):4877-87.
209. Zang PL. Basics of Atomic Force Microscope (AFM) [Internet] Erişim Tarihi:21 Nisan 2017 Erişim Adresi: http://www.eng.utah.edu/~lzang/images/Lecture_10_AFM.pdf.
 210. Bravo-Osuna I, Millotti G, Vauthier C, Ponchel G. In vitro evaluation of calcium binding capacity of chitosan and thiolated chitosan poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Int J Pharm*. 2007;338(1-2):284-90.
 211. Fu YC, Fu TF, Wang HJ, Lin CW, Lee GH, Wu SC, et al. Aspartic acid-based modified PLGA-PEG nanoparticles for bone targeting: in vitro and in vivo evaluation. *Acta Biomater*. 2014;10(11):4583-96.
 212. Song H, Zhang J, Liu X, Deng T, Yao P, Zhou S, et al. Development of a bone targeted thermosensitive liposomal doxorubicin formulation based on a bisphosphonate modified non-ionic surfactant. *Pharm Dev Technol*. 2016;21(6):680-7.
 213. Awara WM, El-Sisi AE, El-Sayad ME, Goda AE. The potential role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of experimentally-induced mammary tumour: does celecoxib enhance the anti-tumour activity of doxorubicin? *Pharmacological Research*. 2004;50(5):487-98.
 214. Chen C, Shen HL, Yang J, Chen QY, Xu WL. Preventing chemoresistance of human breast cancer cell line, MCF-7 with celecoxib. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(1):9-17.
 215. Meng X, Zhang Q, Zheng G, Pang R, Hua T, Yang S, et al. Doxorubicin combined with celecoxib inhibits tumor growth of medullary thyroid carcinoma in xenografted mice. *Oncol Lett*. 2014;7(6):2053-8.
 216. Schubert S, Delaney JT, Schubert US. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter*. 2011;7(5):1581-8.
 217. Lepeltier E, Bourgaux C, Couvreur P. Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to drug delivery devices. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;71:86-97.
 218. Beck-Broichsitter M, Nicolas J, Couvreur P. Solvent selection causes remarkable shifts of the "Ouzo region" for poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Nanoscale*. 2015;7(20):9215-21.
 219. Wang H, Liu J, Tao S, Chai G, Wang J, Hu FQ, et al. Tetracycline-grafted PLGA nanoparticles as bone-targeting drug delivery system. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:5671-85.
 220. Jiang T, Yu X, Carbone EJ, Nelson C, Kan HM, Lo KW. Poly aspartic acid peptide-linked PLGA based nanoscale particles: potential for bone-targeting drug delivery applications. *Int J Pharm*. 2014;475(1-2):547-57.
 221. Li N, Song J, Zhu G, Shi X, Wang Y. Alendronate conjugated nanoparticles for calcification targeting. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016;142:344-50.
 222. Chen Y, Zheng XL, Fang DL, Yang Y, Zhang JK, Li HL, et al. Dual agent

- loaded PLGA nanoparticles enhanced antitumor activity in a multidrug-resistant breast tumor xenograft model. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):2761-72.
223. Cooper DL, Harirforoosh S. Effect of formulation variables on preparation of celecoxib loaded polylactide-co-glycolide nanoparticles. *PLoS One.* 2014;9(12):e113558.
 224. da Silveira JM, da Silva AR, Senge MO, Jorge RA. Effects of preparation conditions of poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with amphiphilic porphyrins and their photoactivities. *J Nanosci Nanotechnol.* 2014;14(8):6274-86.
 225. Maiseyeu A. Non-antigenic regulators of targeting for imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99(Pt A):1.
 226. Carbone EJ, Rajpura K, Allen BN, Cheng E, Ulery BD, Lo KW. Osteotropic nanoscale drug delivery systems based on small molecule bone-targeting moieties. *Nanomedicine.* 2017;13(1):37-47.
 227. Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bastert G. Metastatic breast cancer: clinical course, prognosis and therapy related to the first site of metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;59(3):271-8.
 228. Fukuta K, Har-Shai Y, Collares MV, Lichten JB, Jackson IT. Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full-thickness skull defect. *J Craniofac Surg.* 1992;3(1):25-9.
 229. Yaseen MA, Yu J, Jung B, Wong MS, Anvari B. Biodistribution of encapsulated indocyanine green in healthy mice. *Mol Pharm.* 2009;6(5):1321-32.

EKLER

Ek -1 Hayvan deneyleri yerel etik kurul onayı

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

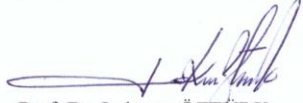
SAYI: 2016-010
KONU: Onay

24.02.2016

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **"FARKLI ÖZELLİKLERE SAHİP NANOPARTİKÜL FORMÜLASYONLARININ BİYODAĞILIMLARININ BELİRLENMESİ VE DEĞERLENDİRİLMESİ"** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Prof. Dr. Yılmaz ÇAPAN, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM, Ege Üniversitesi ARGEFAR/ Fen Fakültesi
Uzm. Ecz. Serhat KOZLU, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Ecz. Adem ŞAHİN, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurumunuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.



Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)



Prof. Dr. Gülcihan Mehtap KÖKSAL *Katılmadı* Prof. Dr. Uğur KAYA

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL *Katılmadı*

Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU *Katılmadı*

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN *Katılmadı*

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR *Katılmadı*

Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU *Katılmadı*

Yrd. Doç. Dr. Sumru SÖZER KARADAĞLI *Katılmadı*

Özcan NALBANTOĞLU *Katılmadı*

Tingiz ÖZCAN *Katılmadı*

Ek-2 Deney hayvanı kullanım sertifikası



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU

Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası

SERHAT KOZLU

Orman ve Su İşleri Bakanlığı tarafından Onbeş Şubat İkibinondört tarihinde yayımlanan
“Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik*”
uyarınca eğitim almış ve Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası
almaya hak kazanmıştır

KURS KATEGORİSİ : B
BELGE NO: 2016/392
TARİH: 23.08.2016



Prof.Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr. A. Haluk ÖZEN
Rektör

* Yönetmelik hükümleri Orman ve Su İşleri Bakanlığı tarafından yürütülmektedir

9. ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Serhat KOZLU

Doğum Yeri ve Tarihi : Şanlıurfa – 31/03/1985

Uyruğu : TC

İletişim Adresi ve Telefonu : serhatkozlu@gmail.com, +905057766614

II. Eğitim Bilgileri

Doktora:

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
(2017)

Yüksek Lisans:

-Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
(2010)

-Advanced Drug Delivery Of Biotechnological Drugs, Yaz Okulu; Università degli
Studi di Camerino, İtalya

Lisans:

- Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2007)

- Université du Droit et de la Santé de Lille, Fransa (Erasmus Değişim Programı)

Ortaöğretim:

İzmir Fen Lisesi (2003)

Kırıkkale Anadolu Lisesi (2000)

III. Mesleki Deneyim

Ar-Ge Şefi: Gen İlaç ve Sağlık Ürünleri, Ankara (2015 Şubat-Devam etmekte)

Ar-Ge Proje Yöneticisi: Drogan İlaçları San. ve Tic. A.Ş., Ankara (2014 Mart-
2015 Ocak)

Depo Mesul Müdürü: Gen İlaç ve Sağlık Ürünleri, Ankara (2012 Ekim-2014 Mart)

Ruhsatlandırma Uzmanı: Gen İlaç ve Sağlık Ürünleri, Ankara (2012 Ekim-2013 Ağustos)

Sargı ve Pansuman Malzemeleri Üretim Bölüm Amiri (Zorunlu askerlik hizmeti): Milli Savunma Bakanlığı Ordu İlaç Fabrikası, Ankara (2011 Ağustos-2012 Temmuz)

Araştırma Görevlisi: Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Ankara (2008 - 2011)

Araştırma Görevlisi: Yakın Doğu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Farmasötik Teknoloji Laboratuvar Uygulamaları, Lefkoşa/KKTC

Ürün Müdürü: Milenyum Farma İlaç San. Tic. Ltd. Şti., Ankara (2008 Haziran-Kasım)

IV. Bilimsel Faaliyetler

Poster ve Yayınlar

- 1. Kozlu, S.,** Sahin, A., Sahan, S., Yerlikaya, F., Capan, Y. “Co-Encapsulation Studies of Doxorubicin and Celecoxib in PLGA Nanoparticles” 18th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS 2016, September 18-21 2016, Antalya, Türkiye.
- 2. Sahin, A.,** Esendagli, G., Yerlikaya, F., **Kozlu, S.,** Yoyen Ermis, D., Horzum, U., Aktas, Y., Khan, M, Couvreur, P., Capan, Y. “Intracellular delivery and intraperitoneal retention of different sized PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation method” 18th International Pharmaceutical Technology Symposium-IPTS 2016, September 18-21 2016, Antalya, Türkiye.
- 3. Kozlu, S.,** Caban, S., Yerlikaya, F., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Riguera, R., Yemisci, M., Gursoy-Ozdemir, Y., Dalkara, T., Couvreur, P., Capan, Y., An Aquaporin 4 Antisense Oligonucleotide Loaded, Brain Targeted

Nanoparticulate System Design. *Pharmazie*,69(5):340-5, 2014.

4. Caban, S., Ozturk, K., **Kozlu, S.**, Yemisci, M. Fernandez-Megia, E., NovoaCarballal, R., Riguera, R., Capan, Y. Investigation of Neuroprotection using PBN and Antisense Oligonucleotide Loaded Biodegradable Nanocarriers, 2012 AAPS Annual Meeting and Exposition, October 14-18, 2012, Chicago, IL, ABD
5. Ozturk K, Caban S, **Kozlu S**, Kadayifci E, Yerlikaya F, Capan Y. The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles. *Pharmazie*, 65(9):665-9, 2010.
6. **S. Kozlu**, Y. Gursoy-Ozdemir, M. Yemisci, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, R. Riguera, K. Andrieux, P. Couvreur, T. Dalkara, Y. Capan Development of an oligonucleotide carrier nanoparticulate system with modified chitosan polymers The 37th Annual Meeting and Exposition of The Controlled Release Society July10-14 2010, Oregon Convention Center, Portland, Oregon, ABD
7. **S. Kozlu**, Y. Gursoy-Ozdemir, M. Yemisci, S. Lule, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, R. Riguera, K. Andrieux, P. Couvreur, Y. Capan, T. Dalkara; Design of antisense oligonucleotide loaded, brain targeted nanoparticles against cytotoxic brain edema, Hacettepe University, ARGEP, 2010, Ankara-Turkiye
8. S. Caban, E. Kadayifci, **S. Kozlu**, K. Ozturk, F. Yerlikaya, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, E. Quiñoá, R. Riguera, Y. Aktas, T. Dalkara, Y. Capan, The Preparation And Characterization Of Chitosan-Based Nanoparticles, 17th international Symposium on Microencapsulation, 29.09.2009 – 01.10.2009, Nagoya, Japonya
9. K. Ozturk, S. Caban, E. Kadayifci, **S. Kozlu**, F. Yerlikaya, Y. Capan, The Influence Of Technological Parameters On The Characterization Of Blank

PLGA Nanoparticles, 17th International Symposium on Microencapsulation, 29.09.2009 – 01.10.2009, Nagoya, Japonya

10. S. Kozlu, F.Yerlikaya, Y. Capan; Development and validation of a reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) method for the *in vitro* determination of an antisense oligonucleotide; 2009 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 8-12, 2009, Los Angeles, CA, ABD

11. K. Ozturk, S. Caban, E. Kadayifci, **S. Kozlu**, F. Yerlikaya, Y. Capan, The influence of technological parameters on the physicochemical properties of blank PLGA nanoparticles; 2009 AAPS Annual Meeting and Exposition, November 8-12, 2009, Los Angeles, CA, ABD

Projeler

Ulusal kuruluşlarca desteklenmiş projeler

- 1. Kan Beyin Engelini Geçişte Taşıyıcı Sistem Özelliklerinin Optimizasyonu Ve Geçiş Mekanizmalarının İncelenmesi**, TÜBİTAK, 1001 Araştırma Projesi
- 2. Sitotoksik Beyin Ödemi Tedavisine Yönelik Aquaporin 4 Antisense Oligonükleotid Yüklü, Beyine Hedeflendirilmiş Nanopartiküler Sistem Tasarımı** Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi Hızlı Destek Projesi 09D01301001 (4750)

Üyelikler

- Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Mezunlar Derneği
- TÜFTAD
- İzmir Fen Lisesi Mezunlar Derneği